UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO MARTINS

CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS EM PLATAFORMAS DESCARTÁVEIS VISANDO DIAGNÓSTICO E TRIAGEM DE HANTAVÍRUS ARAUCÁRIA E SARS-CoV-2

> CURITIBA 2022

# **GUSTAVO MARTINS**

# CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS EM PLATAFORMAS DESCARTÁVEIS VISANDO DIAGNÓSTICO E TRIAGEM DE HANTAVÍRUS ARAUCÁRIA E SARS-CoV-2

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Química Analítica, no Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Exatas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Márcio F. Bergamini Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz H. Marcolino Jr.

CURITIBA 2022

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Martins, Gustavo.

Construção e avaliação de imunossensores eletroquímicos em plataformas descartáveis visando diagnóstico e triagem de Hantavírus Araucária e SARS-CoV-2 / Gustavo Martins. – Curitiba, 2022. 1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química. Orientador Prof. Dr. Márcio F. Bergamini. Coorientador: Prof. Dr. Luiz H. Marcolino Jr.

1. Eletroquímica. 2. Hantavírus. 3. SARS-CoV-2. 4. Impressão 3D. I. Bergamini, Márcio F. II. Marcolino Jr, Luiz H. III. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Bibliotecário: Nilson Carlos Vieira Junior CRB-9/1797



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -40001016026P2

ATA Nº 264

### ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM QUÍMICA

No dia vinte e seis de agosto de dois mil e vinte e dois às 13:30 horas, na sala Auditório do Departamento de Química, Centro Politécnico - UFPR, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese do doutorando GUSTAVO MARTINS, intitulada: CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS EM PLATAFORMAS DESCARTÁVEIS VISANDO DIAGNÓSTICO E TRIAGEM DE HANTAVÍRUS ARAUCÁRIA E SARS-CoV-2, sob orientação do Prof. Dr. MÁRCIO FERNANDO BERGAMINI. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: MÁRCIO FERNANDO BERGAMINI (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), FABIO ROBERTO CAETANO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), BRUNO CAMPOS JANEGITZ (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS), BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), GILBERTO ABATE (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutor está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada asessão, da qual eu, MÁRCIO FERNANDO BERGAMINI, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 26 de Agosto de 2022.

Assinatura Eletrônica 29/08/2022 11:15:40.0 MÁRCIO FERNANDO BERGAMINI Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica 29/08/2022 14:14:16.0 FABIO ROBERTO CAETANO Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ) Assinatura Eletrônica 29/08/2022 11:03:59.0 BRUNO CAMPOS JANEGITZ Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS)

Assinatura Eletrônica 29/08/2022 11:17:34.0 BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ) Assinatura Eletrônica 29/08/2022 11:03:30.0 GILBERTO ABATE Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-3006 - E-mail: cpgquim@ufpr.br Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal <u>Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015</u>. Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 218607 Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://www.prpg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp e insira o codigo 218607



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -40001016026P2

### **TERMO DE APROVAÇÃO**

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **GUSTAVO MARTINS** intitulada: **CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS EM PLATAFORMAS DESCARTÁVEIS VISANDO DIAGNÓSTICO E TRIAGEM DE HANTAVÍRUS ARAUCÁRIA E SARS-CoV-2**, sob orientação do Prof. Dr. MÁRCIO FERNANDO BERGAMINI, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Agosto de 2022.

Assinatura Eletrônica 29/08/2022 11:15:40.0 MÁRCIO FERNANDO BERGAMINI Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica 29/08/2022 14:14:16.0 FABIO ROBERTO CAETANO Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ) Assinatura Eletrônica 29/08/2022 11:03:59.0 BRUNO CAMPOS JANEGITZ Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS)

Assinatura Eletrônica 29/08/2022 11:17:34.0 BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ) Assinatura Eletrônica 29/08/2022 11:03:30.0 GILBERTO ABATE Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-3006 - E-mail: cpgquim@ufpr.br Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015. Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 218607

Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp e insira o codigo 218607

Aos meus pais, À Larissa pelo amor e paciência Dedico

### AGRADECIMENTOS

Aos Professores Dr. Luiz Humberto Marcolino-Jr. e Márcio Fernando Bergamini, pela confiança e oportunidade de desenvolver essa tese de doutorado.

Aos professores Dr. Bruno Campos Janegitz, Dr. Dênio Emanuel Pires Souto e Dr. Tiago Almeida Silva pelas contribuições na pesquisa durante o exame de qualificação.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz, Dr. Fábio Roberto Caetano, Prof. Dr. Gilberto Abate, Prof. Dr. Breno Castello Branco Beirão.

À CAPES e CNPq pela bolsa.

À UFPR pela estrutura cedida.

Aos colegas do LabSensE, pelos anos de apoio e amizade.

Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim.

À Larissa, pelo amor e carinho incondicional. Por me apoiar em todos os altos e baixos do doutorado. Amo você!

Obrigado.

I just wanna stay in the sun where I find Pieces of peace in sun's peace of mind I know it's hard sometimes (Twenty One Pilots)

#### RESUMO

A presente tese de doutorado apresenta como objetivo o desenvolvimento de dois imunossensores, um para detecção de nucleoproteína do Hantavírus Araucária (Np) e outro para detecção de anticorpos contra o SARS-CoV-2. Sendo assim, foi realizado o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico baseado em impressão 3D por FDM, o qual foi utilizado para detecção da Np. A construção do dispositivo consistiu na imobilização direta de anticorpos IgG contra a Np em eletrodos impressos utilizando o polímero condutor proto-pasta e a detecção da proteína foi realizada por label-free através da inibição do sinal da sonda de Ferricianeto de Potássio. O dispositivo mostrou potencialidade para a detecção quantitativa da Np na faixa de concentração de 30 a 240  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, com limite de detecção de 22  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Além disso, o imunossensor foi aplicado para detecção da Np em amostras de soro humano fortificadas e possibilitou a diferenciação de amostras positivas e negativas. O segundo objetivo consistiu na utilização de quantum dots de grafeno (GQD) e polihidroxibutirato (PHB) como plataforma de imobilização para o RBD do SARS-CoV-2 visando detectar anticorpos IgG contra essa proteína (AbS). Utilizando condições experimentais ótimas, foram construídas duas curvas analíticas, uma em PBS e outra em soro humano diluído, as quais mostraram baixo efeito de matriz e uma correlação logarítmica entre a concentração de AbS e a corrente de pico anódico na faixa de concentração de 100 ng mL<sup>-1</sup> a 10 µg mL<sup>-1</sup>. O sensor se mostrou seletivo frente a anticorpos contra a febre amarela e oito amostras clínicas de soro humano foram analisadas, obtendo-se 87,5% de assertividade no diagnóstico. Sendo assim, os dispositivos se mostraram adequados ao propósito de detecção das proteínas nas condições estudadas.

**Palavras-chave:** Imunossensor eletroquímico; Impressão 3D; Hantavírus; SARS-CoV-2; GQD; PHB.

#### ABSTRACT

The following doctoral thesis has as objective the development of two immunosensors, one for the detection of Hantavirus Araucária nucleoprotein and the other one aiming to detect antibodies IgG against SARS-CoV-2. Therefore, an electrochemical immunosensor was developed based on 3D printing by FDM. The device was applied to detect Hantavirus Araucaria nucleoprotein. The immunosensor assemble consists of immobilizing IgG antibodies against Np on electrodes, which were 3D printed with conductive polymer proto-pasta. The detection was performed on a label-free array based on potassium ferricyanide redox signal. The device showed potential for quantitative detection of Np with concentration ranging from 30 to 240  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> with a limit of detection of 22,0 µg mL<sup>-1</sup>. In addition, the immunosensor was applied for serological detection of Np in fortified human serum sample and showed the ability to differentiate positive from negative samples. The second objective consisted of use graphene quantum dots (GOD) and polyhydroxybutyrate (PHB) as an immobilization platform for RBD from SARS-CoV-2 in order to detect IgG antibodies against this protein (AbS). Using the optimal experimental conditions, analytical curves were performed in PBS and human serum spiked with AbS showing a slight matrix effect and a relationship between voltametric signal and AbS concentration in the range of 100 ng mL<sup>-1</sup> and 10 µg mL<sup>-1</sup>. The proposed sensor selectivity was tested against yellow fever antibodies (YF) and the selective layer on the electrode surface did not interact with these antibodies. Eight samples of blood serum were analyzed and 87.5% provided adequate results. Thus, the devices proved to be adequate for the purpose of detecting these proteins under the studied conditions.

**Keywords:** Electrochemical immunosensor; 3D printing; Hantavirus; SARS-CoV-2; GQD; PHB.

# LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE IMPRESSÃO
POR FDM
FIGURA 2: FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DO MÉTODO DE IMPRESSÃO 3D 24
FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE ANTICORPOS
PRODUZIDOS: IgG E IgM
FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA BÁSICA DE UM ANTICORPO.
FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO HANTAVÍRUS
FIGURA 6: DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS PATOLOGIAS ASSOCIADAS À
INFECÇÃO POR HANTAVÍRUS
FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA UMA
INFECÇÃO VIRAL, SENDO O PERÍODO DE INCUBAÇÃO CONTADO A PARTIR
DA INFECÇÃO E O DIA 0 O PRIMEIRO DIA DE PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS.
FIGURA 8: ESTRUTURA BÁSICA DO SARS-CoV-2
FIGURA 9: MECANISMO DE REAÇÃO DE LIGAÇÃO CRUZADA COM EDC /
NHS
FIGURA 10: ESQUEMA DAS DIFERENTES POSSIBILIDADES DE
ARQUITETURA PARA IMUNOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENOS
OU ANTICORPOS
FIGURA 11: ESQUEMA DE UM IMUNOSSENSOR COM MARCAÇÃO
ENZIMÁTICA
FIGURA 12: ESQUEMA REPRESENTANDO A DETECÇÃO LABEL-FREE DE UM
ANTICORPO PELAS TÉCNICAS VOLTAMETRICAS E IMPEDIMÉTRICAS 40
FIGURA 13: ILUSTRAÇÃO DAS POSSÍVEIS APLICAÇÕES DO GQD EM
SENSORES ELETROQUÍMICOS
FIGURA 14: POSSIVEIS ROTAS SINTÉTICAS PARA OS GQDs
FIGURA 15: ESTRUTURA BÁSICA DOS PHAS 44
FIGURA 16: ROTA SINTÉTICA PARA OBTENÇÃO DE PHAS 45
FIGURA 17: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TIPO MICELA FORMADA
PELO PHB EM SOLUÇÕES AQUOSAS 46

FIGURA 18: ESQUEMA DAS ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DOS DISPOSITIVOS
POR 3D E MATERIAL IN NATURA
FIGURA 19: FOTOGRAFIA DOS DISPOSITIVOS IMPRESSOS EM UMA
IMPRESSORA 3D GTMAX GRABBER I3 51
FIGURA 20: ESQUEMA DAS ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR
CONTRA PROTEÍNA N DO HANTAVÍRUS
FIGURA 21: ANÁLISES DE TGA OBTIDAS PARA O PLA E O PROTO-PASTA.
UTILIZANDO AR SINTÉTICO, COM TAXA DE AQUECIMENTO DE 5º C.min <sup>-1</sup> ,
ATÉ 800 °C
FIGURA 22: IMAGENS REPRESENTATIVAS DE MEV OBTIDAS PARA NEGRO
DE FUMO: (A), (B) E (C), E PARA PROTO-PASTA SOLUBILIZADO EM MISTURA
DE ETANOL E ACETONA (1:1): (D), (E) E (F), NAS AMPLIAÇÕES DE 5, 25 E 50K
RESPECTIVAMENTE. (G), (H) E (I) FORAM OBTIDOS PARA PLA COM
AMPLIAÇÕES DE 5, 10 E 25K RESPECTIVAMENTE
FIGURA 23: IMAGENS DE MET OBTIDAS PARA NEGRO DE FUMO: (A), (B) E
(C), E PARA PROTO-PASTA SOLUBILIZADO EM MISTURA DE ETANOL E
ACETONA (1:1): (D), (E) E (F), NAS AMPLIAÇÕES DE 5, 10 E 25KX
RESPECTIVAMENTE
FIGURA 24: ESPECTROS DE RAMAN OBTIDOS PARA AMOSTRAS DE PLA, PLA
CONDUTOR (PROTO-PASTA) E NEGRO DE FUMO. COM RESOLUÇÃO
ESPACIAL DE 1 $\mu$ M, LASER DE Ar <sup>+</sup> (514,5 NM) COM POTÊNCIA DE INCIDÊNCIA
DE 2,5 MW, NA REGIÃO DE 130 A 4000 cm <sup>-1</sup>
FIGURA 25: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PRÉVIO AO
TRATAMENTO COM NaOH E APÓS O TRATAMENTO COM NaOH, SONDA
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] 2,0 mmol L <sup>-1</sup> ELETRÓLITO SUPORTE KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 3,062
FIGURA 26: (A) ESQUEMA DAS TRÊS GEOMETRIAS DE IMPRESSÃO
AVALIADOS. (B) RESULTADOS DE CV, SUMARIZADOS, OBTIDOS PARA O
MATERIAL IN NATURA E PARA AS IMPRESSÕES (2) E (3) ( $n = 3; \pm DP$ ) 63
FIGURA 27: ESPECTROS DE FTIR REALIZADOS PARA AS AMOSTRAS DE PLA,
PROTO-PASTA E PROTO-PASTA APÓS A REAÇÃO COM EDC/NHS. ENSAIO
REALIZADO EM PASTILHA DE KBr, 64 VARREDURAS DE 4000 cm <sup>-1</sup> A 500 cm <sup>-1</sup> .

FIGURA 28: MECANISMO DE REAÇÃO DO EDC + NHS E ANCORAMENTO DO ANTICORPO CONTRA O HANTAVÍRUS NOS GRUPOS CARBOXÍLICOS DO FIGURA 29: ESQUEMA DAS ETAPAS ENVOLVIDAS NA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR CONTRA HANTAVÍRUS NA SUPERFICIE DO PROTO-PASTA. FIGURA 30: (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA CADA ETAPA DA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR UTILIZANDO PROTO-PASTA IMPRESSO, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 50 mV s<sup>-1</sup>, SONDA K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 2,0 mmol L<sup>-1</sup> E ELETRÓLITO SUPORTE KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. (B) RESULTADOS DE CV FIGURA 31: MEDIDAS DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA OBTIDAS PARA O PROTO-PASTA APÓS CADA ETAPA ENVOLVIDA NA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR, UTILIZANDO A SONDA K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 2,0 mmol L<sup>-1</sup> EM KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, 10 mV DE AMPLITUDE. (B) RESULTADOS DE EIS SUMARIZADOS (n =FIGURA 32: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE Np, K[Fe(CN)<sub>6</sub>] 2,0 mmol L<sup>-1</sup> E 0,1 mol L<sup>-1</sup> KCl, 25 mV s<sup>-1</sup>. (B) CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA ATRAVÉS DOS DADOS DE CV, Ipa VS FIGURA 33: (A) TESTE DE SELETIVIDADE DO DISPOSITIVO PARA PROTEÍNA VP2, DADOS DE EIS SUMARIZADOS ( $n = 3, \pm$  SD). (B) TESTE DE SELETIVIDADE DO DISPOSITIVO PARA PROTEÍNA VP2, DADOS DE CV SUMARIZADOS (n = 3, FIGURA 34: (A) TESTE DO SORO FORTIFICADO COM NP OBTIDO ATRAVÉS DE DADOS EIS (n = 5,  $\pm$  DP). (B) TESTE DO SORO FORTIFICADO COM NP FIGURA 35: ESQUEMA DAS ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DO ANTICORPO CONTRA RBD DO SARS-COV-2...... 80 FIGURA 36: IMAGENS DE MET OBTIDAS PARA AS PARTÍCULAS DE GQD FIGURA 37: ESPECTROS DE FTIR REALIZADOS PARA AS AMOSTRAS DE GQD E PHB, AMOSTRA HOMOGENEIZADA EM PASTILHA DE KBr, 64  FIGURA 38: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA ETAPA DE FIGURA 39: IMAGEM DE MEV OBTIDAS PARA A SUPERFICIE DO SPE EM AMPLIAÇÃO DE 15 KX. (B) IMAGEM DE MEV OBTIDAS PARA A SUPERFICIE DO SPE EM AMPLIAÇÃO DE 15 KX. (C) IMAGEM DE MEV OBTIDAS PARA A SUPERFICIE DO SPE APÓS A ELETRODEPOSICÃO DO GOD, EM AMPLIAÇÃO DE 50 KX. (D) IMAGEM DE MEV OBTIDAS PARA A SUPERFICIE DO SPE APÓS FIGURA 40: (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR, UTILIZANDO SONDA K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 2,0 mMOL L-1, PBS COMO ELETRÓLITO SUPORTE E VELOCIDADE DE VARREDURA DE 50 MV S<sup>-1</sup>. (B) GRÁFICO DE BARRAS CONSTRUÍDO PELOS DADOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA, UTILIZANDO A INTENSIDADE DE PICO ANÓDICO DA SONDA PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO FIGURA 41: IMAGEM DE MEV OBTIDA PARA A SUPERFÍCIE DO SPE MODIFICADO COM GQD E PHB, MAGNITUDE DE AMPLIAÇÃO DE 3,22 KX. (B) MAPEAMENTO QUÍMICO PARA ATOMOS DE OXIGÊNIO OBTIDO PARA IMAGEM DE MEV REPRESENTADA EM (A). (C) MAPEAMENTO QUÍMICO DE ATOMOS DE NITROGÊNIO OBTIDO PARA IMAGEM DE MEV REPRESENTADA FIGURA 42: IMAGEM DE MEV OBTIDA PARA A SUPERFÍCIE DO SPE MODIFICADO COM GQD, PHB E RBD, MAGNITUDE DE AMPLIAÇÃO DE 10 KX COM MAPEAMENTO QUÍMICO PARA ATOMOS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO FIGURA 43: (A) DADOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA SUMARIZADOS PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DOS IMUNOSSENSORES - COM E SEM GQD. (B) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS UTILIZANDO O IMUNOSSENSOR CONSTRUÍDO SEM GQD EM ENSAIO UTILIZANDO AMOSTRA DE SORO NEGATIVO, SONDA K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 2,0 mmol L<sup>-1</sup>, TAMPÃO PBS PH 7,4 COMO ELETRÓLITO SUPORTE E 50 mV s<sup>-1</sup> VELOCIDADE DE VARREDURA. (C) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS UTILIZANDO O IMUNOSSENSOR CONSTRUÍDO SEM GQD EM ENSAIO UTILIZANDO AMOSTRA DE SORO

POSITIVO, SONDA K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 2,0 mmol L<sup>-1</sup>, TAMPÃO PBS PH 7,4 COMO FIGURA 44: (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR ATRAVÉS DA ROTA COM EDC/NHS, UTILIZANDO SONDA K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 2,0 mmol L<sup>-1</sup>, PBS COMO ELETRÓLITO SUPORTE E VELOCIDADE DE VARREDURA DE 50 mV s<sup>-1</sup>. (B) GRÁFICO DE BARRAS CONSTRUÍDO PELOS DADOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA, UTILIZANDO A INTENSIDADE DE PICO ANÓDICO DA SONDA PARA CADA FIGURA 45: (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR ATRAVÉS DA ROTA DE IMOBILIZAÇÃO DA MISTURA, UTILIZANDO SONDA K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 2,0 mmol L<sup>-1</sup>, PBS COMO ELETRÓLITO SUPORTE E VELOCIDADE DE VARREDURA DE 50 mV s<sup>-1</sup>. (B) GRÁFICO DE BARRAS CONSTRUÍDO PELOS DADOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA, UTILIZANDO A INTENSIDADE DE PICO ANÓDICO FIGURA 46: GRÁFICO DE BARRAS SUMARIZANDO OS DADOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA PARA DETECÇÃO DO ANTICORPO COM DIFERENTES CICLOS DE ELETRODEPOSIÇÃO DO GQD, UTILIZANDO A FIGURA 47: GRÁFICO DE BARRAS SUMARIZANDO OS DADOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA OBTIDOS PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO DISPOSITIVO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PHB...... 100 FIGURA 48: GRÁFICO DE BARRAS SUMARIZANDO OS DADOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA OBTIDOS PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO DISPOSITIVO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE RBD. ..... 101 FIGURA 49: GRÁFICO DE BARRAS SUMARIZANDO OS DADOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA OBTIDOS PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO DISPOSITIVO COM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO DO RBD...... 103 FIGURA 50: GRÁFICO DE BARRAS SUMARIZANDO OS DADOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA OBTIDOS PARA A DETECÇÃO DO AbS COM DE INCUBAÇÃO PARA FORMAÇÃO DIFERENTES TEMPOS DO IMUNOCOMPLEXO......104

FIGURA 51: CURVAS ANALÍTICAS CONTRUÍDAS ATRAVÉS DOS DADOS OBTIDOS POR DPV PARA CONCENTRAÇÃO DE AbS VARIANDO DE 10 μg mL<sup>-1</sup> A 100 ng mL<sup>-1</sup> NAS MATRIZES DE PBS E SORO NEGATIVO ENRIQUECIDAS.

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABS Acrilonitrilo butadieno estireno
- AbS Anticorpo contra proteína S
- BSA Albumina de soro bovino
- CAD do inglês Computer-aided design
- CV Voltametria cíclica
- DNA Ácido desoxirribonucleico (do inglês Desoxyribonucleic acid)

DP – Desvio Padrão

- DPV Voltametria de pulso diferencial
- EDC Cloridrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
- EIS Espectroscopia de impedância eletroquímica
- ELISA Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês Enzyme-Linked

*Immunosorbent Assay*)

FA - Febre amarela

- FDM do inglês fused deposition modeling
- FHSR Febre Hemorrágica com Síndrome Renal
- FTIR Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
- GQD Quantum dots de grafeno
- HAb Anticorpo contra proteína N do Hantavírus
- HRP Horseradish peroxidase
- Ig Imunoglobulina
- IgA Imunoglobulina A
- IgG Imunoglobulina G
- IgM Imunoglobulina M
- LD Limite de detecção
- MERS Síndrome respiratória do Oriente Médio
- MET Microscopia eletrônica de transmissão
- MEV Microscopia eletrônica de varredura

NF - Negro de fumo

- NHS N-Hidroxisuccinimida
- Np Nucleoproteína do Hantavírus
- PBS Tampão fosfato salino
- PHA Polihidroxialcanoato

- PHB Polihidroxibutirato
- PLA ácido polilático
- POC do inglês point-of-care
- RBD do inglês Receptor-Binding Domain
- R<sub>CT</sub> Resistência a transferência de cargas
- RNA Ácido ribonucleico (do inglês Ribonucleic acid)
- RT-PCR do inglês Reverse-transcription polymerase chain reaction
- SARS Síndrome respiratória aguda grave.
- SBD do inglês solid binding domain
- SPE do inglês screen printed electrodes
- SPH Síndrome Pulmonar por Hantavírus
- STL do inglês Standard triangle language
- TGA Análise termogravimétrica

# SUMÁRIO

	1ª SEÇÃO	21		
1	INTRODUÇÃO	22		
1.1	IMPRESSÃO 3D POR FUSED DEPOSITION MODELING			
1.2	VIRUS E SISTEMA IMUNE			
1.3	HANTAVIRUS	28		
1.4	SARS-CoV-2 e a patologia COVID-19	33		
1.5	IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS	35		
1.6	MÉTODOS ELETROQUÍMICOS PARA DETECÇÃO	EM		
IMUNC	DSSENSORES LABEL-FREE	38		
1.7	QUANTUM DOTS DE GRAFENO	41		
1.8	POLIHIDROXIBUTIRATO	43		
2	OBJETIVOS	47		
	2ª SEÇÃO - IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO			
	DA PROTEÍNA N DO HANTAVÍRUS ARAUCÁRIA BASEADO	) NA		
	IMOBILIZAÇÃO DE ANTICORPOS EM ELETRODOS IMPRE	SSOS		
	POR FDM	48		
3	MATERIAIS E MÉTODOS	49		
3.1	IMPRESSÃO 3D	50		
3.2	MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	51		
3.3	PRÉ-TRATAMENTO DOS ELETRODOS	52		
3.4	CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR	52		
3.5	AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS DE SORO HUMANO	53		
3.6	CARACTERIZAÇÃO POR ANÁLISES DE INFRAVERMELHO	COM		
TRANS	SFORMADA DE FOURIER (FTIR)	54		
3.7	CARACTERIZAÇÃO POR IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔ	NICA		
DE VA	RREDURA (MEV) E DE TRANSMISSÃO (MET)	54		
3.8	ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS (TGA)	54		
3.9	ESPECTROSCOPIA RAMAN	54		
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56		
4.1	CARACTERIZAÇÕES DO PROTO-PASTA	56		
4.2	AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO BÁSICO E DA GEOMETRIA	A DE		
IMPRE	SSÃO	62		

4.3	ANÁLISES DE ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO				
COM	TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	64			
4.4	CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO VOLTAMÉTRICA	DO			
IMUN	NOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA N	DO I			
HANT	TAVÍRUS	66			
4.5	RESPOSTA ELETROQUÍMICA DO IMUNOSSENSOR				
4.6	TESTE DE SELETIVIDADE DO DISPOSITIVO PROPOSTO				
4.7	AMOSTRAS DE SORO HUMANO73				
5	CONCLUSÕES PARCIAIS				
	3ª SEÇÃO - IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO				
	DE ANTICORPOS CONTRA PROTEÍNA S DO SARS-CoV-2 BASE.	ADO			
	NA IMOBILIZAÇÃO DO RBD DO VÍRUS EM UMA INTERFACI	E DE			
	QUANTUM DOTS DE GRAFENO	E			
	POLIHIDROXIBUTIRATO	76			
6	MATERIAIS E MÉTODOS	77			
6.1	MATERIAIS E REAGENTES				
6.2	SÍNTESE DO GQD77				
6.3	SÍNTESE DAS PARTÍCULAS DE PHB78				
6.4	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO RBD DA PROTEÍNA SPIKE DO				
VÍRUS	'S SARS-COV-2	78			
6.5	MEDIDAS ELETROQUÍMICAS 79				
6.6	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ESTRUTURAL				
6.7	CONSTRUÇÃO DOS IMUNOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE AbS 79				
6.8	SELETIVIDADE, CURVA ANALÍTICA E AMOSTRA 81				
7	RESULTADOS E DISCUSSÕES	82			
7.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO GQD E PHB	82			
7.2	CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO IMUNOSSENSOR	84			
7.3	OTIMIZAÇÃO DOS PARAMETROS DE CONSTRUÇÃO	DO			
IMUN	NOSSENSOR	98			
7.4	DESEMPENHO ANALÍTICO E ESTUDOS SOBRE O EFEITO	DE			
MATE	RIZ	104			
7.5	SELETIVIDADE DA RESPOSTA DO IMUNOSSENSOR E ANÁLISE	DAS			
AMOS	STRAS DE SORO	. 108			
8	CONCLUSÕES PARCIAIS	. 110			

9	CONCLUSÕES GERAIS	
	REFERÊNCIAS	
	ANEXOS 1	
	ANEXOS 2	
	ANEXOS 3	



Introdução

# 1 INTRODUÇÃO

# 1.1 IMPRESSÃO 3D POR FUSED DEPOSITION MODELING

A Química Analítica compreende uma das subáreas da Química direcionada principalmente ao desenvolvimento de métodos, processos e técnicas aplicadas na determinação e monitoramento de espécies nos mais variados tipos de amostras [1]. Dentro deste contexto, diversas estratégias vêm sendo empregadas visando a solução de problemas analíticos aplicando métodos clássicos ou instrumentais [1], na indústria e na academia.

Atualmente, a pesquisa em Química Analítica mostra tendência de um crescente interesse no uso de novos materiais e tecnologias que permitem aumentar o desempenho de diversos sistemas e procedimentos. Nesse sentido, dispositivos de impressão 3D surgem como uma tecnologia atraente para atender essa demanda [2]. Estas novas técnicas de impressão vêm sendo aplicadas na fabricação de diferentes tipos e formatos de objetos [3–5]. O emprego das técnicas de impressão 3D propicia a confecção destes materiais de forma prática e rápida, além da facilidade no desenvolvimento de dispositivos com diferentes *layouts*, sendo essa uma das características mais relevantes relacionadas a essa tecnologia, abrindo inúmeras possibilidades de aplicação [6].

Em linhas gerais, a impressão em 3D pode ser definida como um processo usado para fabricar objetos em dimensões tridimensionais de forma controlada a partir de uma estrutura pré-definida. Dentre os diversos métodos de impressão 3D, o processo de extrusão e deposição de filamento fundido (do inglês *fused deposition modeling* - FDM) é o mais empregado em impressoras comerciais de baixo custo [7]. Este processo é baseado na deposição de um filamento polimérico que é empurrado através de um bico extrusor aquecido onde é fundido (torna-se semissólido) e dispensado sobre a mesa de impressão em posições pré-definidas pelo projeto, desenhado previamente. Uma vez depositado, o material solidifica rapidamente e forma uma camada rígida uniforme, e o processo continua empilhando uma nova camada do material sobre a anterior até a obtenção do objeto desejado, como representado na FIGURA 1.



FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE IMPRESSÃO POR FDM.

FONTE: O autor.

Materiais termoplásticos tais como ácido polilático (PLA), acrilonitrilo butadieno estireno (ABS), policarbonato, poliamida, entre outros são comumente usados e comercializados para esse tipo de impressão, obtidos na forma de filamento. A gama de materiais termoplásticos permite o uso de diferentes configurações de impressora, mais precisamente com a utilização de diferentes bicos de extrusão. Isso possibilita o emprego simultâneo de diferentes materiais durante um único processo de impressão, o que aumenta a aplicabilidade do equipamento e a precisão do processo de extrusão [2,8,9]. O processo básico de impressão 3D, desde o uso de softwares de *design* à obtenção do objeto impresso está representado na FIGURA 2.



FIGURA 2: FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DO MÉTODO DE IMPRESSÃO 3D.

FONTE: O autor.

Resumidamente, o 'CAD' (*Computer-aided design*) é o software de construção de projetos 2D e 3D, que possibilita criação de arquivos em formatos STL (*Standard triangle language*), utilizados na interface de impressão. Enquanto NetFabb tem papel fundamental na manufatura, auxiliando design e correção de erros de compilação, muito comuns advindos do CAD em plataformas STL, normalmente o NetFabb já está embutido ou no software do CAD ou no Slic3r. Por fim, Slic3r é um software embutido na interface do Repetier host (controlador do Arduino da impressora). O Slic3r tem como função leitura dos arquivos STL, provenientes do CAD, e transcrição do projeto (desenho sólido) em um modelo "fatiado", o qual pode ser interpretado pelo controlador e impresso em forma de camadas.

A impressão se inicia com o aquecimento do bico extrusor, sendo que as condições de temperatura dependem intrinsicamente de cada tipo de termoplástico, mas geralmente varia de 180 a 260 °C. Após aquecido, ocorre a extrusão do filamento pelo bico da impressora, que apresenta precisão dependente do diâmetro de saída, dimensões milimétricas de 0,2 mm – 0,4 mm são as mais comuns. A interpretação dos dados do Slic3r permite então a movimentação do bico extrusor nas orientações dimensionais X, Y, Z com precisão. O acabamento da peça consiste na correção de imperfeições da peça, podendo ser realizado com banhos em solventes como acetona, acetonitrila ou até mesmo acabamento mecânico por abrasão.

Dentre as aplicações de impressão 3D destaca-se a utilização em construção civil [10], construção de sondas oceanográficas [11] e transplantes ósseos [12,13]. Paralelo a isso, a área da Química Analítica é uma das que mais se beneficia com as possibilidades de impressão 3D, desde a fabricação dos microcanais, bem como o desenvolvimento de plataformas hibridas com outros materiais, resultando em dispositivos totalmente integrados que atuam em diferentes campos da pesquisa científica [8,14,15]. O aspecto revolucionário da impressão 3D minimiza as barreiras para fabricação, permitindo a preparação rápida de um modelo físico (protótipo), que pode ser testado e avaliado antes de se investir em ferramentas de usinagem ou processos de fabricação de moldes [8].

Além dos diversos sistemas construídos utilizando a impressão 3D por extrusão também são encontrados filamentos condutores que podem ser empregados como material de impressão. Isso permite a construção de peças condutoras com geometria totalmente adequada à aplicação [16]. Nesse sentido, o trabalho desenvolvido por Leigh *et al.* [17] apresentou a formulação de um termoplástico condutor e impressão desse material para construção sensores eletrônicos capazes de monitorar flexões mecânicas e variações de capacitância elétrica.

O advento dos compósitos polímero-condutor comerciais, como por exemplo Proto-Pasta® (PLA e negro de fumo) e Black-Magic® (PLA e grafeno), possibilita a impressão 3D de eletrodos [18,19]. Recentemente, Yang et al [20] relataram o emprego da impressão 3D para construir micro-eletrodos de carbono para detecção eletroquímica de neurotransmissores. Dentre as várias abordagens possíveis para a construção e avaliação de dispositivos impressos, o emprego de técnicas eletroanalíticas exibem uma elevada potencialidade de aplicação [21–23], devido às características, como serem pouco influenciadas pela redução de tamanho dos sistemas, ou seja, a miniaturização dos sensores eletroquímicos tem pouco impacto sobre seu desempenho [23]. Sendo assim, a facilidade e baixo custo para microfabricação dos sensores eletroquímicos aliado ao emprego de configurações eletrônicas simples apresentam efeito sinérgico na construção de sistemas de detecção eletroanalíticos compactos e portáteis [24–26].

Nesse sentido, a eletroanalítica explora o uso da impressão 3D na construção de sistemas complexos com baixo custo e grande versatilidade. Em particular, essa tecnologia pode ser empregada para produzir células eletroquímicas com formas diferentes das convencionais, plataformas que possam ser usadas em processos catalíticos, construção de eletrodos condutores e/ou para projetar novos sistemas macro ou microfluídicos, que podem então ser combinados com detectores eletroquímicos [9,16,27–29]. A utilização de dispositivos eletroquímicos customizáveis e miniaturizados é uma alternativa bastante viável para a aplicação em diversas áreas analíticas; por exemplo, dispositivos *point-of-care* (POC), que

consistem numa abordagem clínica simplificada que pode auxiliar na obtenção de um diagnóstico rápido, são a prova o sucesso dos dispositivos comerciais para a determinação eletroquímica de glicose e lactato através de sistemas miniaturizados [30].

Através dos imunossensores é possível o monitoramento de agentes patológicos ou da produção de anticorpos. Essa classe de dispositivos apesar de bem difundida em literatura, ainda é pouco através de sistemas construídos por impressão 3D. Sendo assim, inicialmente será feito um apanhado sobre agentes virais e sistema imune seguido dos agentes infecciosos avaliados para melhor compreensão dos imunossensores eletroquímicos.

# 1.2 VIRUS E SISTEMA IMUNE

Os vírus são agentes infecciosos de dimensões nanométricas que apresentam em sua estrutura essencialmente ácidos nucléicos, sejam esses DNA ou RNA de fita dupla ou simples. A estrutura genética viral costumeiramente se apresenta em um invólucro de proteína denominada nucleoproteína, cuja função é proteger o material genético. A estrutura viral é simples, ao ser comparado com células por exemplo, e não são considerados organismos uma vez que não apresentam organelas, característica que confere ao vírus defasagem de potencial bioquímico, ou seja, ausência de enzimas, fundamentais nos processos metabólicos. Sendo assim, dependem de estruturas celulares para processos de replicação, tornando-os parasitas intracelulares obrigatórios [31,32].

O vírus se utiliza do material biológico do hospedeiro para se reproduzir [33]. Por esse motivo, mutações acontecem de forma não espontânea e não relacionados à um processo adaptativo. As mutações são essencialmente influenciadas pelo material genético e composição celular do hospedeiro, e afetam tanto o material genético do vírus quanto os chamados sítios antigênicos, que são partes específicas do vírus que causam uma reação do sistema imune do hospedeiro, também chamados de epítopo [34].

Após o processo de infecção, o primeiro estágio viral é a viremia, a qual consiste na presença do vírus circulando na corrente sanguínea e tem como principal função o processo de alastramento e alocação do vírus no organismo [35]. Em contraposto, o corpo humano apresenta como resposta a imunidade contra infecções virais, a qual depende da atuação integrada da imunidade inata e adquirida [36].

Os mecanismos envolvidos na resposta imune inata atuam imediatamente após o contato do hospedeiro com as partículas virais, entretanto não possuem habilidade de discriminação entre diferentes estruturas virais, sendo assim são inespecíficos e não apresentam

resposta memorial [37]. A resposta inata, responsável pela primeira defesa do organismo, é constituída essencialmente de enzimas, peptídeos antivirais e anticorpos IgM. Essas estruturas apresentam também a função de reconhecimento das estruturas antigênicas, denominadas epítopos, para produção e liberação de uma resposta lenta, mas específica e memorial, denominada imunidade adquirida, a qual é constituída inicialmente de anticorpos IgG específicos [37]. Na FIGURA 3 é apresentada uma ilustração das estruturas dos anticorpos IgM e IgG.

# FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE ANTICORPOS PRODUZIDOS: IgG E IgM.



FONTE: Adaptado de Britannica [38].

A liberação de anticorpos IgM consiste na produção de anticorpos policionais, os quais são anticorpos derivados de diferentes linhagens de linfócito B [37]. Sendo assim, eles são uma mistura de imunoglobulinas (anticorpos – Ig), cada uma responsável pelo reconhecimento de um epítopo diferente. A existência de diferentes anticorpos, em uma única estrutura, torna a resposta pouco eficiente, no quesito combate ao vírus, entretanto possibilita um reconhecimento rápido para ativação da resposta adquirida (resposta específica) [37].

Após a ativação da resposta adquirida, a liberação de anticorpos IgG é feita a partir de reprodução monoclonal. Anticorpos monoclonais são produzidos por um único clone de linfócito B, esses anticorpos apresentam-se iguais entre si em estrutura, propriedades físicoquímicas e biológicas, afinidade e especificidade, ligando-se sempre ao mesmo epítopo no antígeno, garantindo resposta eficiente e específica contra o vírus, como representado na FIGURA 4 [39].



FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA BÁSICA DE UM ANTICORPO.

FONTE: Adaptado de Britannica [40].

Apesar de existirem diferentes tipos e classes de anticorpos, a estrutura básica de um anticorpo é constante, essencialmente composta por duas cadeias carbônicas, uma leve e variável e outra pesada invariável. A cadeia carbônica superior, leve (V<sub>L</sub>), é a porção variável do anticorpo que possui função de reconhecimento e interação com sítios antigênicos, sendo a região responsável pela formação do imunocomplexo antígeno-anticorpo. Já a cadeia pesada, especificamente a "*effector region*" interage com os receptores da superfície de células ou proteínas; esta propriedade permite aos anticorpos ativar o sistema imunológico [41,42].

# 1.3 HANTAVÍRUS

De modo geral, o Hantavírus é classificado como um gênero viral, pertencente à família *Bunyaviridae*, que agrupa diversos vírus de estrutura genética RNA. Apesar da diversidade, a estrutura viral se assemelha para todos: envelopados esfericamente, diâmetro de aproximadamente 100 nm, apresentam RNA viral de fita simples (fita única), o qual é trissegmentado com polaridade negativa, como representado na FIGURA 5 [43].



FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO HANTAVÍRUS.

FONTE: Adaptado de Antti Vaheri et. Al. [44]

Os segmentos de RNA do Hantavírus são divididos e denominados:

- L (*large* grande): codifica a transcriptase viral, enzima que tem como função transformar RNA de polaridade negativa, que não pode ser lido, em RNA de polaridade positiva, também chamado de mRNA. O RNA de polaridade positiva pode ser facilmente traduzido pelo ribossomo celular, que então produz as proteínas codificadas no material genético[45];
- M (*medium* médio): é o RNA que codifica as glicoproteínas do capsídeo, que são um conjunto de proteínas que formam o epítopo e protegem o material genético. O epítopo é uma porção de antígeno capaz de gerar resposta imune. É uma região da estrutura do antígeno que se liga aos receptores celulares, para adentrar o meio intracelular [46];
- S (*small* pequeno): responsável pela codificação da nucleoproteína viral, a qual atua no processo de alocação e proteção mecânica do material genético viral. Estrutura similar ao epítopo, podendo ativar o sistema imune [46].

Desde a primeira elucidação do Hantavírus e isolamento, em 1976, diferentes Hantavírus foram encontrados e identificados ao longo do globo, com pelo menos 22 espécies nocivas à saúde humana. As variações mutagênicas são encontradas em diferentes regiões geográficas com patologias distintas, como representado na FIGURA 6 [47,48].



FONTE: Adaptado de C. Johnson L. et. Al [49].

Na região da Eurásia a infecção por Hantavírus causa, majoritariamente, febre hemorrágica com síndrome renal (FHSR) e nefropatia epidêmica (NE). Por outro lado, na região das Américas causa a síndrome pulmonar por hantavírus (SPH) [50]. A taxa de mortalidade associada aos casos de FHSR oscila de 1% a 12%, dependendo dos vírus. A menor taxa de mortalidade relaciona-se com a possibilidade de tratamento da FHSR por hemodiálise e Ribavirina (medicamento antiviral). Embora o SPH apresente menor número de casos, aproximadamente 200 casos por ano nas Américas, a taxa média de letalidade é de 40%, que estão atrelados à falta de tratamento específico [47,50]. No estado do Paraná a variação do vírus responsável pelas contaminações é denominada *Hantavírus Araucária* [51].

Os casos notificados de infecção por hantavírus estão aumentando em muitos países e novas cepas de hantavírus tem sido cada vez mais comuns, o que constitui um problema de saúde pública de crescente preocupação. A infecção por hantavírus pode ser subestimada devido a possibilidade de infecção leve, costumeiramente assintomática ou inespecífica, e também devido à falta de diagnóstico laboratorial simples e padronizado, especialmente em países subdesenvolvidos [52].

Os sintomas iniciais da SPH consistem em dores musculares, de cabeça, febre e tosse. Estágios posteriores incluem danos ao sistema respiratório, sendo que o desenvolvimento total da SPH ocorre de 2 a 7 dias após os primeiros sintomas, comprometendo os capilares pulmonares, e a partir disso é reportado insuficiência respiratória seguida de choque cardiogênico. As semelhanças clínicas encontradas na SPH e outras infecções virais tornam o diagnóstico da doença por exames clínicos difícil, portanto, diagnósticos moleculares e sorológicos se fazem necessários para a correta identificação do agente patogênico e tratamento adequado [53].

Os vetores do hantavírus são majoritariamente roedores silvestres. Dentre os modos de transmissão mais comuns, lista-se de forma decrescente em ocorrência:

- Inalação de partículas virais aerossolizadas (transportadas pelo ar), proveniente de excrementos ou saliva de roedores;
- Contato com mucosas ou feridas infectadas, inclusive entre humanos;
- Ingestão de água ou alimentos contaminados.

A infecção em humanos resulta em viremia de curto prazo e a resposta imune do organismo libera anticorpos IgM e IgG contra o antígeno (FIGURA 7), sendo a detecção destes anticorpos um dos possíveis métodos para diagnóstico do agente patogênico. Agentes patogênicos virais apresentam reprodução intracelular obrigatória, que dificulta a detecção direta do vírus em corrente sanguínea. Por esse motivo, ensaios sorológicos que avaliam anticorpos produzidos são de grande valia [54].

FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA UMA INFECÇÃO VIRAL, SENDO O PERÍODO DE INCUBAÇÃO CONTADO A PARTIR DA INFECÇÃO E O DIA 0 O PRIMEIRO DIA DE PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS.



FONTE: adaptado de Partners in Health [55]

O diagnóstico da infecção por Hantavírus é comumente estabelecido por meio de ensaios sorológicos, classicamente pelo método de ELISA. Esse ensaio identifica anticorpos IgM e IgG. A detecção de anticorpos é possível logo no início da doença, junto com o aparecimento dos primeiros sintomas, permitindo o diagnóstico. Os níveis de IgM indicam a infecção pelo vírus em um passado próximo, enquanto os níveis de IgG são detectáveis por longos períodos de tempo, sendo esse o parâmetro utilizado para a realização de estudos de prevalência da doença.

De modo geral, o *Hantavírus araucária* é um agente etiológico transmitido principalmente por roedores selvagens para humanos. A infecção geralmente resulta em síndrome pulmonar por Hantavírus, nas Américas, e febre hemorrágica com síndrome renal, na região da Eurásia, com taxa de letalidade acima de 40%, devido à falta de tratamento específico. Portanto, o diagnóstico precoce e o monitoramento ambiental tornam-se essenciais e, sendo assim, os testes eletroquímicos do tipo POC mostram-se adequados para essa aplicação [56].

#### 1.4 SARS-CoV-2 e a patologia COVID-19

Em dezembro de 2019, em Wuhan, na China, foram relatados os primeiros casos de pneumonia causados por agentes até então desconhecidos. Após o sequenciamento imparcial de amostras de pacientes, foi descoberto um novo coronavírus, denominado SARS-CoV-2 [57]. A sequência do genoma revelou que o vírus está intimamente relacionado com a família viral CoV, relacionado à síndrome respiratória aguda grave (SARS) [58]. Desde 1960, já foram descobertos 7 principais tipos de coronavírus que apresentam capacidade de infectar humanos, quatro deles responsáveis por causar síndrome respiratória leve e 3 deles são conhecidos por causar síndrome respiratória do Oriente Médio) [59].

O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado, com RNA de fita simples. O sequenciamento metagenômico, baseado em RNA, foi utilizado para caracterizar todo o genoma, que apresenta 29.881 pares de base de comprimento (GenBank nº MN908947), codificando 9.860 aminoácidos. Fragmentos de genes expressam proteínas estruturais e não estruturais. Os genes S, E, M e N codificam proteínas estruturais, enquanto proteínas não estruturais são codificadas pela região ORF [60]. A estrutura do SARS-CoV-2 está representada na FIGURA 8.



FIGURA 8: ESTRUTURA BÁSICA DO SARS-CoV-2.

FONTE: Adaptado de Yamamoto et. Al. [61].

Durante a etapa de infecção, as glicoproteínas S, que cobrem a superficie do SARS-CoV-2, se ligam à enzima ACE2 da célula hospedeira, mediando a entrada das estruturas virais através da interação com o receptor. Uma vez que o vírus entra na célula, o RNA viral é liberado e as proteínas são traduzidas do genoma do RNA. A partir disso, o RNA viral é replicado e as proteínas estruturais são sintetizadas, montadas e empacotadas na célula hospedeira, então o vírus replicado é liberado para infecção de novas células [60].

O SARS-CoV-2 é um vírus que atua majoritariamente por meio da transmissão de secreção ou excreção contaminada, o que torna a transmissão do vírus rápida. Em geral, os acometidos podem sofrer desde resfriado e febre até graves crises respiratórias, exigindo hospitalização e intervenção profissional [62]. Os sintomas se desenvolvem de um a cinco dias após a infecção pelo vírus e incluem dor de cabeça, fadiga, febre, tosse, congestão nasal, dificuldades respiratórias, perda do olfato, perda do paladar e dores musculares [63].

Sendo assim, é de grande importância identificar e isolar os contaminados com o vírus, uma vez que isso diminui a probabilidade de contaminar outros indivíduos. Nesse sentido, vários métodos de diagnósticos foram desenvolvidos e tornou-se fundamental ferramentas de detecção do SARS-CoV-2 de alto desempenho, rápidas, precisas, sensíveis e seletivas. Atualmente, há três principais testes existentes no mercado: (i) Os testes genéticos, baseados no método de RT-PCR, cujo identifica regiões específicas de genes virais por meio de técnicas de amplificação de ácidos nucleicos; (ii) os testes sorológicos, que identificam os anticorpos produzidos pelo sistema imunológico em resposta à infecção viral; (iii) e os testes de antígeno por ensaios de *lateral flow* [64].

Em crescente desenvolvimento, os métodos eletroquímicos, em especial os imunossensores eletroquímicos, permitem o monitoramento do desenvolvimento tanto da doença quanto da produção de anticorpos e se apresentam como uma alternativa viável para diagnóstico de diversas espécies biológicas, como por exemplo: detecção de troponina cardíaca T [65]; hepatite [66]; biomarcadores para câncer [67]; amostras alimentícias [68,69]; bactérias [70]; HIV [71]; Hantavírus [72,73]; e COVID-19 [74–76]. Nesse sentido, Biljana Mojsoska et. Al. [77], relatou a construção de um imunossensor eletroquímico para detecção de proteína S do SARS-CoV-2 baseado na imobilização de anticorpos em grafeno. A detecção da proteína foi realizada pela inibição do sinal da sonda de ferricianeto de potássio. O autor relata a detecção de proteínas acima da concentração de 20 µg mL<sup>-1</sup>, com ganhos em relação ao tempo de montagem e análise frente as técnicas tradicionais.

#### 1.5 IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

A capacidade de avaliar condições fisiológicas, rastrear a progressão da doença e monitorar o tratamento são os principais objetivos no campo da pesquisa em saúde. Isso explica a grande demanda existente no desenvolvimento de novas estratégias para uma detecção confiável e rápida do tipo POC [78–80]. Os imunoensaios costumam apresentar resultados bastante satisfatórios e são a metodologia base da maioria dos dispositivos POC encontrados comercialmente. Além disso, são costumeiramente utilizados como triagem para testes laboratoriais complexos ou demorados, como é o caso de ensaios por ELISA ou PCR. Sendo assim, o estudo para a criação de diferentes plataformas de detecção, para suprir a demanda por medições contínuas ou de resposta rápida e estáveis utilizando pequenos volumes e amostras de baixa concentração tem sido a força que impulsiona a pesquisa em muitas áreas da química analítica [81,82].

Dentro dessa perspectiva, imunossensores com detecção eletroquímica se adequam às características que preconizam os dispositivos do tipo POC devido a possibilidade de aplicação em sistemas miniaturizados de fácil preparo e baixo custo [66,83,84]. Essencialmente, essa classe de sensores utiliza anticorpos, ou antígenos, como elemento reconhecedor molecular com o fim de formar um (imuno)complexo estável, antígeno-anticorpo, detectável. O atrativo deste tipo de dispositivo é a possibilidade de diagnóstico e controle de doenças e agentes patogênicos, *in vivo* ou *in vitro* [85].

A aplicação dos imunossensores depende de diversos aspectos, essencialmente relacionados a condições de confecção do dispositivo, ancoramento proteico, como por exemplo a funcionalização da superfície do material base utilizado para a imobilização das biomoléculas. De modo geral, o processo de imobilização de proteínas pode ser realizado por intermédio de um grupo funcional carboxílico ou amínico. Esses grupos são ativados com um agente de ligação cruzada, gluteraldeído para grupos amínicos e EDC / NHS para grupos carboxílicos, sendo o mecanismo de reação do último apresentado na FIGURA 9 [86,87].






Inicialmente, o EDC atua interagindo com o grupo carboxílico e forma o intermediário O-acylisourea. Esse intermediário apresenta baixa estabilidade e pode ser substituído por aminas primárias, advindas de uma proteína, ou sofrer hidrólise e regenerar o ácido carboxílico. A fim de contornar a instabilidade do EDC, é comum a utilização do reagente NHS, ou Sulfo-NHS, que apresenta estabilidade e mitiga a hidrólise. Nesse caso o NHS atua substituindo o EDC e permite também a imobilização de uma proteína através da substituição por uma amina primária volumosa [89].

Outro fator determinante é a orientação dos anticorpos ou antígenos e a densidade superficial dos anticorpos, na plataforma de ancoramento. Nesse caso, a rota de imobilização por reagentes de ligação cruzada apresenta uma deficiência no quesito orientação, uma vez que a ligação ocorre em aminas primárias de qualquer região proteica, sendo assim as proteínas podem se ligar em uma geometria que desfavoreça a formação do imunocomplexo [90]. A quantidade de proteínas ligadas na superfície pode ser modulada variando o tempo e ou a concentração durante a etapa de imobilização e é crucial para evitar o efeito *Hook*, que consiste na formação de aglomerados de anticorpos interagindo entre si, ou proteínas. Esse efeito mitiga a formação do imunocomplexo e a detectabilidade em amostras mais concentradas [90,91].

Além disso, a arquitetura de imobilização rege o alvo a ser detectado, com possibilidades de arquiteturas análogas ao ensaio ELISA. As principais arquiteturas estão representadas na FIGURA 10.





FONTE: O autor.

O ensaio direto consiste na imobilização da proteína na superfície do dispositivo e posterior adição de um anticorpo primário específico. Essa abordagem é normalmente utilizada para detecção direta do antígeno, uma vez que o anticorpo primário é conjugado com uma enzima, cuja reação é monitorada para detecção da interação antígeno-anticorpo [90,92]. O ensaio indireto por sua vez utiliza o antígeno imobilizado como estrutura de reconhecimento biológico e visa detecção de um anticorpo, mas pode ser utilizado para detecção de um antígeno. Nesse caso, a detecção pode ser realizada através de um segundo anticorpo conjugado com uma enzima, ou através da variação de sinal de uma sonda redox [90,92]. Por fim, o ensaio sanduíche consiste na utilização de um anticorpo de captura imobilizado na superfície do dispositivo que apresenta afinidade com o antígeno, seguido da adição de um segundo anticorpo específico e de um anticorpo conjugado à uma enzima. Essa arquitetura pode ser utilizada para detecção tanto do antígeno capturado, quanto do anticorpo e apresenta maior sensibilidade e seletividade quando comparado aos ensaios anteriormente descritos uma vez que se utiliza de dois anticorpos para captura e detecção [90,92].

Ainda, todos os imunoensaios podem ser competitivos, estratégia comumente usada quando o antígeno é pequeno e apresenta apenas um epítopo ou ocupa somente um sítio de ligação do anticorpo. O método consiste em marcar o antígeno purificado e não o anticorpo. Então, o antígeno não marcado advindo da amostra e o antígeno marcado competem pela ligação com o anticorpo de captura. A diminuição do sinal do antígeno purificado, previamente registrado, indica a presença do antígeno nas amostras [90,92].

A identificação/monitoramento das interações proteicas e consequente formação do imunocomplexo pode ser realizada de duas maneiras, com biomarcação enzimática ou *label-free* [93]. Para ensaios que envolvem marcação enzimática, a interação antígeno-anticorpo é mensurada mediante detecção do produto de uma reação enzimática. Como mostrado na FIGURA 11.



FIGURA 11: ESQUEMA DE UM IMUNOSSENSOR COM MARCAÇÃO ENZIMÁTICA.

FONTE: O autor.

Esse método de detecção geralmente se utiliza de um anticorpo secundário, um antianticorpo, que apresenta especificidade de interação com o alvo. Esse anticorpo secundário é marcado com uma enzima, normalmente *Horseradish peroxidase* (HRP), e através do monitoramento da reação enzimática é realizada a detecção da interação antígeno-anticorpo.

O método *label-free* envolve a detecção da formação do imunocomplexo, antígenoanticorpo por intermédio do sinal eletroquímico de uma sonda [94]. Essa abordagem simplifica o processo de construção do dispositivo, diminui custos e tempo de preparo e análise, comparado ao método biomarcado. Dentre os métodos de detecção possíveis para a configuração *label-free* estão o uso de detectores piezoelétricos, espectroscopia de impedância eletroquímica, ou a detecção eletroquímica por alteração do sinal redox de uma sonda eletroativa [95–97]. Estes métodos permitem o monitoramento da formação dos imunocomplexos, antígeno-anticorpo, por meio da alteração das propriedades eletroquímicas superficiais, sem a necessidade de um mediador enzimático.

# 1.6 MÉTODOS ELETROQUÍMICOS PARA DETECÇÃO EM IMUNOSSENSORES *LABEL-FREE*

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) é uma técnica que pode trazer informações sobre a superfície eletródica. Sendo assim, modificações superficiais podem ser monitoradas e ser associadas com a presença de biomoléculas ou conjugados antígeno e anticorpo. A EIS pode ser entendida como uma perturbação de um sistema eletroquímico ao qual é aplicado um sinal alternado de potencial ou corrente, de amplitude pequena em uma ampla faixa de frequência. A impedância do sistema é a resultante da resposta da perturbação pela divisão complexa do potencial pela corrente. Impedância (Z) consiste na resistência elétrica de um circuito com corrente alternada, onde a frequência deve ser diferente de zero, obedecendo a um análogo da lei de Ohm ( $\mathbf{R} = \mathbf{V} \ \mathbf{I}^{-1}$ ). Por meio da análise da impedância é possível investigar processos de interface, fazendo associação dos elementos elétricos a cada evento relacionado as camadas superficiais (efeitos resistivos e capacitivos) e confrontá-los a um circuito equivalente. Sendo assim, a EIS possibilita a caracterização da interface estabelecida entre eletrodo e solução de sistemas eletroquímicos [98]. Uma vez que a construção de imunossensores pode consistir na adição de várias camadas de caráter isolante sobre a superfície de um eletrodo condutor, o procedimento pode ser observado facilmente pela avaliação do perfíl obtido pelos dados de EIS, já que cada etapa da estruturação do dispositivo resulta em uma mudança no comportamento superficial [99].

As técnicas voltamétricas se baseiam na medida de uma corrente elétrica, em função de um potencial aplicado [100]. São inúmeras as possibilidades de voltametrias, sendo as variações da técnica relacionadas à forma com que o potencial é aplicado ao eletrodo de trabalho. Na voltametria cíclica, por exemplo, é realizada uma varredura linear de potencial em relação ao tempo, no sentido direto e inverso [101]. O potencial é variado de forma a atingir a energia suficiente para promover uma reação de oxidação ou redução de uma espécie eletroativa, a reação por sua vez gera uma corrente que pode ser mensurada, sendo a intensidade da corrente do processo proporcional à concentração das espécies eletroativas em solução [86,102]. O processo de conversão redox depende também da área eletroativa do eletrodo e da eficiência dessa superfície em promover a transferência eletrônica para a espécie eletroativa [102]. Assim, um bloqueio ou alteração na superfície de um eletrodo reflete em uma variação na taxa de conversão da espécie, alterando o sinal de corrente da espécie redox em solução, como representado na FIGURA 12 [102].

### FIGURA 12: ESQUEMA REPRESENTANDO A DETECÇÃO *LABEL-FREE* DE UM ANTICORPO PELAS TÉCNICAS VOLTAMETRICAS E IMPEDIMÉTRICAS.



#### FONTE: O autor.

Esse efeito permite o uso da técnica para analisar mudanças na superfície de eletrodos, inclusive imunossensores *label-free*, pois a adição de material proteico ao eletrodo afeta diretamente a resposta voltamétrica referente a conversão de uma sonda eletroquímica. Assim, a variação do sinal voltamétrico de uma sonda eletroquímica é proporcional ao bloqueio ou ativação da superfície do eletrodo, devido a etapas de ancoramento proteico. Portanto, a imobilização de uma proteína ou formação de um imunocomplexo, por exemplo, diminuem a intensidade de corrente da sonda, a qual pode ser relacionada com a quantidade de proteínas que efetivamente se ligaram a superfície [103].

Os primeiros imunossensores eletroquímicos utilizaram eletrodos com superfície de ouro, devido a sua biocompatibilidade. Entretanto, para imobilização de proteínas em superfícies de ouro se faz necessário a utilização de camadas auto-organizadas, uma vez que ligações entre superfícies metálicas e proteínas não ocorrem de maneira espontânea [104]. Costumeiramente, as monocamadas auto-organizadas em superfícies de ouro são formadas através de estruturas orgânicas que apresentam um grupamento tiol, o qual se liga espontaneamente a superfície de ouro, e um grupo carboxílico na outra extremidade da molécula, que pode ser utilizado para ancoramento proteico através de reações de ligação cruzada [86,105]. Entretanto a utilização destas camadas promove o bloqueio da superfície eletródica, sendo assim prejudicam a etapa de transferência eletrônica, uma vez que agem como isolante na superfície eletroativa [106].

Alternativamente, diversos tipos de materiais e compostos podem ser utilizados para a modificação de eletrodos visando sobrepor a problemática das camadas auto-organizadas. Há a

possibilidade de utilização de materiais termoplásticos, como ácido polilático (PLA), para processos de ancoramento de biomoléculas, uma vez que essa classe de polímeros apresenta grupos carboxílicos em suas extremidades. A aplicação dessa classe de materiais, termoplásticos, para a construção de biossensores garante uma abordagem simples e barata, uma vez que podem ser impressos por FDM. A literatura já relata algumas aplicações de biossensores eletroquímicos enzimáticos construídos através da imobilização proteica em substratos condutores de PLA/grafeno, impressos por FDM [107,108].

Além disso, nanomateriais de carbono apresentam a possibilidade de serem funcionalizados com grupos funcionais oxigenados, possibilitando ancoramento direto de biomoléculas. Como é o caso dos nanotubos de carbono [109], grafeno [110], quantum dots de grafeno [111].

#### 1.7 QUANTUM DOTS DE GRAFENO

Descritos pela primeira vez em 2004 por Xu et al.[112], os materiais 0D à base de carbono são classificados como *nanodots* e podem ser divididos em três categorias principais: *nanodots* de carbono, *quantum dots* de carbono e *quantum dots* de grafeno (GQD) [113,114].

Esses materiais apresentam diversas propriedades únicas e dependentes essencialmente do material precursor, tipo de síntese e tamanho [103], costumeiramente um diâmetro inferior a 10 nm. Ao longo de sua estrutura, majoritariamente carbonácea, podem também coexistir elementos como oxigênio e nitrogênio decorando o material e resultando em uma superfície altamente funcionalizada [114–118].

Nesse sentido, GQDs são fragmentos de folhas de grafeno com menos de 100 nm de diâmetro [119]. Suas propriedades gerais se assemelham ao grafeno, como elevada área superficial, abundância de grupos funcionais e possibilidade de funcionalização com grupos inorgânicos, orgânicos ou biomoléculas [119]. Além disso, o confinamento quântico e o efeito de borda afetam diretamente sua condutividade elétrica, levando a uma transferência de elétrons com alta velocidade [120]. Portanto, o GQD apresenta potencialidade de aplicação eletroquímica em células de combustível [121], supercapacitores [122], células fotovoltaicas [123] e também na área de sensores eletroquímicos [111,124,125].

A aplicação do GQD em sensores eletroquímicos é alicerçada no efeito sinérgico das características supramencionadas aliadas a uma ampla faixa de potencial, atividade catalítica e baixa corrente de fundo [120]. O mecanismo de interação do GQD com um analito pode ocorrer por interação de borda, interação  $\pi$ - $\pi$  ou por meio dos grupos funcionais. A modulação da

quantidade de grupos funcionais na superfície do GQD, rege a taxa de transferência de elétrons e, consequentemente, a condutividade. Assim, a remoção desses grupos leva a um aumento da hibridização sp<sup>2</sup> ao longo da cadeia carbônica, que culmina com a aumento da transferência eletrônica. Esta característica permite modular a densidade dos grupos funcionais e a condutividade do material. Tais propriedades garantem robustez e versatilidade para aplicação do material para fins de sensores eletroquímicos [126]. As possibilidades de aplicação remetem a sensores biológicos como aptassensores [127], detecção de biomarcadores como glucose [128], progesterona [129], dopamina [130], ácido ascórbico e ácido úrico [131] e aplicações para detecção de fármacos [132], amônia [125] e patulina [133]. Nesse sentido a FIGURA 13 ilustra possíveis aplicações do GQD em sensores eletroquímicos.

FIGURA 13: ILUSTRAÇÃO DAS POSSÍVEIS APLICAÇÕES DO GQD EM SENSORES ELETROQUÍMICOS.



O processo de síntese do GQD pode ser dividido em duas principais rotas: *top-down* e *bottom-up* (FIGURA 14), que já são bem descritas em literatura [134,135]. A metodologia de síntese *top-down* parte de materiais *bulk* e consiste na fragmentação desse material, como por exemplo folhas de grafeno, nanotubos de carbono, grafite ou fibras de carbono. A fragmentação leva a formação dos GQDs. A segunda rota sintética, *bottom-up*, parte de pequenas moléculas como material de partida para síntese do GQD.



FIGURA 14: POSSIVEIS ROTAS SINTÉTICAS PARA OS GQDs.

FONTE: Tese de doutorado de Chrischon Dieivase [136].

Apesar da estrutura altamente funcionalizada ainda se faz necessário a utilização de agentes de ligação para mediar a ligação de proteínas na superfície do GQD. Como já descrito anteriormente, uma das rotas mais exploradas é utilização de agentes de ligação cruzada para formação de uma ligação covalente entre a proteína e o ácido carboxílico ou amina do GQD. Entretanto, outros materiais podem atuar como ponte entre superfície do GQD e a proteína, como por exemplo os polihidroxialcanoatos, que já são explorados como agente de carreador de proteínas em vacinas, mas pouco explorados na construção de biossensores, especialmente eletroquímicos.

#### 1.8 POLIHIDROXIBUTIRATO

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são uma classe de poliésteres de origem microbiana e constituem uma família de polímeros termoplásticos. Eles são produzidos por uma variedade de microrganismos procarióticos sob condições de nutrição desequilibradas, por esse motivo são produzidos e utilizados para armazenamento de carbono e fonte de obtenção de energia [137]. São diversas as possibilidades de estrutura química básica relacionados aos polímeros de PHA. A estrutura geral da unidade de repetição monomérica do PHA é representada na FIGURA 15.

FIGURA 15: ESTRUTURA BÁSICA DOS PHAs.



Grupo R	Número de Carbonos (total)	Polímero	
Metil	4	Poli(3-hidroxibutirato)	
Etil	5	Poli(3-hidroxivalerato)	
Propil	6	Poli(3-hidroxihexanoato)	

FONTE: O autor

Na estrutura básica do PHA, *n* representa o número de repetições da cadeia polimérica e R representa um grupo funcional na estrutura, que varia de acordo com o tipo de PHA. Nesse sentido, as unidades de PHA podem ser classificadas de acordo com a quantidade de carbonos na estrutura monomérica: PHAs de cadeia curta e de cadeia média. O comprimento da unidade de monômero desempenha um papel crítico nas propriedades físicas e químicas do polímero resultante e, portanto, é necessário o conhecimento prévio da estrutura química do monômero para direcionar propriedades específicas do material para sua aplicação. Os PHAs de cadeia curta compreendem de 3 a 5 átomos de carbono. Como o poli(3-hidroxibutirato) (PHB) contém um grupo metil em sua estrutura química, é o representante mais proeminente do grupo [138,139].

O PHB foi o primeiro isolado e caracterizado entre os PHAs. O PHB é altamente cristalino devido à sua estrutura de cadeia linear, podendo apresentar fases amorfas ao longo de sua estrutura. Uma vez que se trata de um PHA, ele é gerado como reserva de energia por diversas linhagens de bactérias e a nível industrial é produzido por meio de fermentação bacteriana. A síntese bacteriana desse polímero permite que ele seja encontrado como polímero puro ou como parte de copolímeros e blendas [140]. Nesse sentido, existem três rotas principais de síntese de PHB, que já são descritas em literatura: A primeira abordagem consiste na

polimerização por abertura do anel de  $\beta$ -butirolactona mediado por enzima [141]. Outra abordagem é através do uso de plantas naturais ou transgênicas. Nesse caso, a biossíntese de PHB em células vegetais é possível devido à disponibilidade geral de acetil-CoA, o substrato primário da biossíntese de PHB, como é o caso, por exemplo, de *Linum usitatissimum L.*, também conhecido como linho [142,143]. A terceira abordagem de obtenção de PHB é através da fermentação por bactérias, já citada anteriormente. Esse processo é o mais utilizado devido à facilidade técnica e possibilidade de produção industrial, uma vez que, quando em condições ideais de fermentação, é possível que mais de 90% do peso seco das células possa ser composto de PHB [144]. Nesse caso, a síntese de PHB depende de uma sequência de reações enzimáticas, centralizadas no acetil-CoA, o processo de síntese está sumarizado na FIGURA 16.





Dentre as possibilidades de aplicações do PHB, além das clássicas como bioplástico e termoplástico devido à sua alta biodegradabilidade, destaca-se também aplicações clínicas, relacionadas majoritariamente ao ancoramento de proteínas. De modo geral, imobilização de proteínas em materiais funcionalizados a base de carbono tradicionalmente emprega reações de ligação cruzada para ativar sua superfície e permitir uma ligação covalente entre a proteína e a superfície do carbono. Como alternativa, os polihidroxialcanoatos (PHA) podem se ligar à resíduos proteicos e são descritos na literatura desde 1925, mas poucos estudos exploram o potencial de aplicação desses biopolímeros na preparação de biossensores eletroquímicos. Além disso, o PHB permite a síntese de uma estrutura similar a uma micela (100 a 300 nm) com um núcleo hidrofóbico e superfície com domínios de ligação que facilitam a interação e a ligação de proteínas, como representado na FIGURA 17.



# FIGURA 17: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TIPO MICELA FORMADA PELO PHB EM SOLUÇÕES AQUOSAS.



Nesse sentido, a aplicação clínica do PHB reside majoritariamente como carreador de proteínas em vacinas, exibindo proteínas decoradas ao longo de sua estrutura superficial [145–147]. Da mesma forma, esse sistema de imobilização de proteínas é adequado para construção e aplicação de biossensores, porém ainda é pouco explorado no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos [148,149].

Baseado nisso, foi proposto a utilização do PHB em sinergia com o GQD para modificação da superfície do eletrodo de trabalho de um SPE visando ancoramento do domínio RBD da proteína spike do SARS-CoV-2, com a finalidade de formar uma camada seletiva à interação com anticorpos contra essa proteína.

A presente tese tem como principal foco o desenvolvimento de sensores eletroquímicos empregado plataformas descartáveis. Os dispositivos propostos visam o desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos *label-free* para doenças virais emergentes ou recorrentes, como é o caso do *Hantavírus araucária e* do SARS-CoV-2, os quais foram avaliados no quesito da potencialidade do dispositivo para ancoramento de proteínas, bioafinidade e detecção.

Os trabalhos de Hantavírus e SARS-CoV-2 serão apresentados separados em duas sessões com metodologia, resultados e conclusões independentes, com uma conclusão geral apresentada ao final dos dois trabalhos.

#### **2 OBJETIVOS**

A seguinte tese teve como objetivo a construção de imunossensores eletroquímicos a partir de materiais condutores carbonáceos.

### 2ª SEÇÃO

Construir um imunossensor *label-free* para detecção eletroquímica das nucleoproteínas do Hantavírus araucária utilizando o filamento condutor comercial Proto-Pasta® construído por impressão 3D baseada na deposição de filamento fundido.

### 3ª SEÇÃO

Construir e avaliar um imunossensor eletroquímico para detecção de anticorpos contra SARS-CoV-2 baseado na imobilização do sítio de reconhecimento (Receptor-Binding Domain - RBD) em quantum dots de grafeno (GQD) e partículas de polihidroxibutirato (PHB).



# IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA N DO HANTAVÍRUS ARAUCÁRIA BASEADO NA IMOBILIZAÇÃO DE ANTICORPOS EM ELETRODOS IMPRESSOS POR FDM.

# **3** MATERIAIS E MÉTODOS

Na Tabela 1 são listados todos os reagentes utilizados.

Desgente	Ducadônaia	Grau/
Keagente	rroceuencia	Concentração
Ferricianeto de potássio K3[Fe(CN)6]	Vetec	P.A.
Cloreto de potássio	Merck	P.A.
1-Ethyl-3-(3- dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)	Sigma-Aldrich	P.A.
Sulfo-N-Hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS)	Sigma-Aldrich	P.A.
Albumina de soro bovino (BSA)	Fundação Instituto Oswaldo Cruz	1,00 mg mL <sup>-1</sup>
Anticorpo contra Hantavírus (HAb)	Fundação Instituto Oswaldo Cruz	1,18 mg mL <sup>-1</sup>
Nucleoproteína Hantavírus (Np)	Fundação Instituto Oswaldo Cruz	0,40 mg mL <sup>-1</sup>
Hidróxido de sódio	Dinâmica	P.A.
Ácido acético glacial	Synth	99,8%
Acetato de sódio	Synth	P.A.
Soro Humano Comercial	Sigma-Aldrich	-

TABELA 1 - LISTA DE REAGENTES UTILIZADOS.

FONTE: O autor.

#### 3.1 IMPRESSÃO 3D

Todas as peças foram impressas com uma impressora 3D Graber i3 GTMax3D com um único bico de extrusão. A área de impressão possui largura de 200 mm, com profundidade de 200 mm e altura de 190 mm, o que permite construir peças com dimensões adequadas para o propósito desejado. Características como temperatura do bico de extrusão, da mesa e velocidade foram empregadas segundo recomendação do fabricante para cada material (filamento) utilizado.

- ABS: temperatura do bico de extrusão 220 °C, mesa de impressão 90°C, velocidade 60 mm s<sup>-1</sup> e preenchimento 80%;
- Proto-pasta: temperatura do bico de extrusão 235 °C; mesa de impressão 60 °C, velocidade 40 mm s<sup>-1</sup> e preenchimento 100% rectilinear.

Os projetos formato STL, utilizados para impressão, foram desenvolvidos no software SketchUp 3D – 2019. O eletrodo de trabalho foi impresso com 1,0 cm de comprimento e 2,85 mm de diâmetro, com geometria circular. Além disso, a área superficial do eletrodo foi delimitada através da impressão de uma camada de 1,0 mm de polímero ABS em torno do eletrodo de trabalho. Por fim, o contato elétrico foi realizado pela inserção de um fio de cobre no eletrodo impresso, o que garante o contato elétrico e fornece simplicidade técnica na conexão com o potenciostato, o processo de construção está ilustrado na FIGURA 18.





FONTE: O autor.

As condições de impressão foram avaliadas e o dispositivo foi impresso com 100% de preenchimento, a fim de não restarem vacâncias nas camadas e garantir homogeneidade e uma boa condutividade ao longo do material. Foi realizado também um comparativo com o dispositivo não impresso, com as mesmas medidas geométricas e área delimitada através de um tubo de PVC. A FIGURA 19 ilustra os dispositivos construídos.

### FIGURA 19: FOTOGRAFIA DOS DISPOSITIVOS IMPRESSOS EM UMA IMPRESSORA 3D GTMAX GRABBER I3.



FONTE: O autor.

#### 3.2 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando uma célula de três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho construído com Proto-pasta, contra eletrodo de platina e eletrodo de referência Ag|AgCl (KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>) em um potenciostato/ galvanostato  $\mu$ Autolab tipo III da Metrohm Autolab (Utrecht, Holanda) controlado pelo programa NOVA 2.1.4. Para fins de caracterização eletroquímica do polímero condutor Proto-pasta, o sistema proposto foi inicialmente avaliado por voltametria cíclica (*Cyclic Voltammetry* - CV) utilizando a sonda K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (2,0 mmol L<sup>-1</sup>) e eletrólito suporte KCl (0,1 mol L<sup>-1</sup>) pH 7,0, com velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup>. Em seguida foram realizadas medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), com frequência variando de 0,01 Hz a 100 kHz, com potencial equivalente ao potencial de pico anódico do [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> e 10 mV de amplitude de potencial.

#### 3.3 PRÉ-TRATAMENTO DOS ELETRODOS

Prévio à aplicação do dispositivo proposto para medidas eletroquímicas, foram realizadas duas etapas de tratamento: (i) Tratamento físico que consiste na abrasão da superfície do material com lixa d'água (600 e 2000), com a finalidade de corrigir imperfeições da impressão e garantir uma superfície lisa e homogênea; (ii) Tratamento eletroquímico em solução de NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>, empregando CV entre os potenciais de -1,2 a 1,2 V e velocidade de varredura de 200 mV s<sup>-1</sup> e 15 ciclos [150,151].

#### 3.4 CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR

Primeiramente, para a construção do imunossensor proposto, os eletrodos avaliados foram submetidos à reação com EDC e NHS. Esta etapa foi realizada imergindo o eletrodo em uma solução de EDC e NHS, ambas na concentração de 5,0 mmol L<sup>-1</sup>, em solução tampão de acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,5) sob agitação constante. Posteriormente, 5,0  $\mu$ L de uma solução de anticorpo contra a proteína N do Hantavírus (HAb; 0,40 mg mL<sup>-1</sup>) foram adicionados diretamente na superfície do eletrodo, com uma incubação em temperatura controlada (4 °C por 60 min). Em seguida, foi adicionado, e incubado por 30 minutos, 5,0  $\mu$ L de BSA (1,00 mg mL<sup>-1</sup>), visando mitigar possíveis interações inespecíficas através do bloqueio do EDC / NHS residual.

A detecção da nucleoproteína do Hantavírus (Np) foi a etapa final, empregada após a construção completa do imunossensor. Para tal, 5,0 µL da Np foi adicionada à superfície do imunossensor e incubado à 4 °C durante 1 hora.

Após cada etapa de preparação do dispositivo, efetuaram-se lavagens com água deionizada para remover as biomoléculas que não se ligaram eficientemente à superfície do eletrodo. Cada etapa da construção do imunossensor foi avaliada através de medidas de EIS e CV, na presença da sonda [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup>. A detecção foi realizada comparando os valores de resistência de transferência de carga (R<sub>ct</sub>) ou corrente de pico anódico (I<sub>pa</sub>) antes e após a incubação. A FIGURA 20 ilustra o processo de construção do imunossensor proposto.



FIGURA 20: ESQUEMA DAS ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR CONTRA PROTEÍNA N DO HANTAVÍRUS.

3.5 AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS DE SORO HUMANO.

Com o objetivo de simular um ensaio clínico e verificar possíveis reações paralelas com proteínas que não são derivadas do Hantavírus, avaliou-se uma amostra de soro humano enriquecida com Np. Para isso, a amostra de soro humano comercial foi submetida a uma diluição de 1:100, com 0,1 mol L<sup>-1</sup> de PBS (pH 7,4) e, na sequência, enriquecida com Np até atingir uma concentração final de 120 µg mL<sup>-1</sup>. Os testes estatísticos *t-student* foram realizados com 95% de confiança.

# 3.6 CARACTERIZAÇÃO POR ANÁLISES DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os experimentos de FTIR tem como finalidade verificar os grupos funcionais superficiais do compósito e verificar a reação de EDC / NHS na superficie do material. Os espectros de infravermelho foram obtidos com um espectrômetro BOMEN, 64 varreduras de 4000 cm<sup>-1</sup> a 500 cm<sup>-1</sup>. As amostras foram previamente homogeneizadas em uma pastilha de KBr e secas a 60 °C.

# 3.7 CARACTERIZAÇÃO POR IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E DE TRANSMISSÃO (MET)

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) obtidas para o polímero condutor, PLA e negro de fumo foram realizadas com Microscópio Eletrônico de Varredura de Alta Resolução FEI, modelo Quanta 450, com fonte de elétrons FEG (*field emission gun*), que possui resolução de 1,0 nm. Todas as imagens foram obtidas com uma aceleração de voltagem de 10 kV e com detectores de elétrons secundários. As imagens foram obtidas com ampliação de 5 kx, 10 kx, 25 kx e 50 kx, no centro de microscopia eletrônica da UFPR. O material foi previamente dissolvido em acetona e adicionado ao porta amostras do MEV – *stub*.

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) realizadas no microscópio JEOL, modelo JEM 1200, do centro de microscopia eletrônica da UFPR. As imagens foram obtidas com ampliação de 5 kx, 10 kx, 25 kx. O material foi previamente dissolvido em acetona e adicionado ao porta amostras do MET – *grid*.

### 3.8 ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS (TGA)

As curvas termogravimétricas dos materiais utilizados foram obtidas em um equipamento TGA 4000 (Perkin Elmer). As amostras de 50 mg de cada material foram analisadas utilizando ar sintético, com taxa de aquecimento de 5º C min<sup>-1</sup>, até 800 °C.

#### 3.9 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Os espectros Raman dos sólidos foram obtidos em um equipamento Renishaw acoplado a um microscópio óptico com resolução espacial de 1 µm. O laser utilizado foi o de

Ar<sup>+</sup> (514,5 nm) com potência de incidência de 2,5 mW, na região de 130 a 2000 cm<sup>-1</sup>. As analises de Raman foram realizadas no laboratório GQM da UFPR.

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 4.1 CARACTERIZAÇÕES DO PROTO-PASTA

Inicialmente foi avaliado o comportamento térmico dos materiais PLA e Proto-pasta (PLA Condutor), empregados na construção do dispositivo de análise. Para isso, foram feitas medidas termogravimétricas de ambos os materiais, tal como evidenciado na FIGURA 21. Este estudo tem como finalidade tentar elucidar a composição do material condutor constituinte do proto-pasta.

FIGURA 21: ANÁLISES DE TGA OBTIDAS PARA O PLA E O PROTO-PASTA. UTILIZANDO AR SINTÉTICO, COM TAXA DE AQUECIMENTO DE 5º C.min<sup>-1</sup>, ATÉ 800 °C.



FONTE: O autor.

Com base nas análises de TGA observou-se uma diferença no comportamento térmico entre os dois materiais. Nesse caso, o PLA apresentou um evento expressivo de perda de massa em aproximadamente 300 °C, referente à eliminação de grupamentos hidroxil e carboxil bem como degradação térmica de sua matriz. Por outro lado, o Proto-Pasta, que é essencialmente constituído de PLA e negro de fumo apresentou dois eventos térmicos de perda de massa expressiva, um também em 300 °C, possivelmente atrelado a decomposição do PLA e outro evento, seguido do anterior, iniciado em 350 °C com fim em 650 °C. O segundo evento de perda de massa está possivelmente atrelado à combustão do negro de fumo, com regiões de perda de massa em 400 °C relacionado à eliminação de grupos oxigenados [152,153]. A partir da análise de TGA do Proto-pasta, mostra indícios que o filamento comercial apresenta materiais carbonáceos condutores com aproximadamente 30% de razão de massa [154].

Para avaliar a superfície do material e corroborar com os resultados observados por TGA, foram realizadas medidas de MEV do Proto-pasta e comparado com imagens obtidas para negro de fumo e PLA, a fim de confirmar a estrutura do material, mostradas na FIGURA 22. FIGURA 22: IMAGENS REPRESENTATIVAS DE MEV OBTIDAS PARA NEGRO DE FUMO: (A), (B) E (C), E PARA PROTO-PASTA SOLUBILIZADO EM MISTURA DE ETANOL E ACETONA (1:1): (D), (E) E (F), NAS AMPLIAÇÕES DE 5, 25 E 50K RESPECTIVAMENTE. (G), (H) E (I) FORAM OBTIDOS PARA PLA COM AMPLIAÇÕES DE 5, 10 E 25K RESPECTIVAMENTE.



FONTE: O autor.

Nas imagens obtidas para negro de fumo e proto-pasta (FIGURA 22 A, B e C – Negro de fumo; D, E e F – Proto-pasta), observa-se em ambos os casos estruturas amorfas, ausentes de organização que se repetem ao longo da amostra, bem como uma estrutura porosa [155]. As

imagens obtidas para PLA, mostram uma superfície lisa, com baixo teor de irregularidades. As FIGURAS 22 D-F apresentam sólidos globulares interligados, em que a matriz polimérica do PLA entrelaçados e forma glóbulos de Negro de Fumo (*Carbon black*), estes sólidos esferoides aparentemente possuem um tamanho disforme, com uma larga variação, isso pode estar relacionado a dispersão do material em solvente, seguida da secagem para realização dos ensaios. Os sólidos globulares regulares são observados nas FIGURAS 22 A-C, que apresenta as características convencionais do Negro de Fumo, vários glóbulos de tamanho homogêneo. As FIGURAS 22 G-I mostra as imagens convencionais de matrizes poliméricas sem nenhum copolímero, aglutinante ou 2º composto.

As partículas de negro de fumo são formadas por carbono elementar em arranjos de estrutura amorfa com porções grafiticas. De modo geral, o tamanho médio das partículas de negro de fumo pode variar de 3,0 a 100 nm, que podem se aglomerar formando agregados. A temperatura de síntese é um fator predominante para a estrutura do material, sendo que maiores temperaturas de síntese aumentam o caráter grafítico de organização, devido a maior quantidade de carbonos sp<sup>2</sup>, que culmina com ganho na condutividade do material. Por outro lado, menores temperaturas favorecem a formação de grupos oxigenados, preferencialmente nas bordas do material. Nesse sentido, a temperatura de síntese permite modular a razão condutividade / grupos funcionais [156].

Os planos de borda sp<sup>2</sup>, os grupos funcionais oxigenados e a formação de aglomerados relacionam-se intrinsecamente com as propriedades eletroquímicas do negro de fumo e dependem essencialmente da síntese do material. Os grupos funcionais superficiais podem ser explorados na imobilização de proteínas [157].

Tendo em vista o observado por MEV, foram realizadas imagens de MET a fim de comprovar as características morfológicas observadas para o negro de fumo e proto-pasta, as quais podem ser observadas na FIGURA 23.

FIGURA 23: IMAGENS DE MET OBTIDAS PARA NEGRO DE FUMO: (A), (B) E (C), E PARA PROTO-PASTA SOLUBILIZADO EM MISTURA DE ETANOL E ACETONA (1:1): (D), (E) E (F), NAS AMPLIAÇÕES DE 5, 10 E 25KX RESPECTIVAMENTE.

**NEGRO DE FUMO** 

**PROTO-PASTA** 



FONTE: O autor.

As imagens de MET mostram que é possível observar semelhanças na morfologia para as três condições de ampliação avaliadas. São observados aglomerados, provenientes da interação de agregados ramificados, de geometria essencialmente globular [158], para ambas as amostras, o que evidência similaridade na estrutura do negro de fumo com o Proto-pasta, como já observado também em MEV. Nas maiores ampliações para o Proto-Pasta, nota-se um invólucro entre os glóbulos, decorrente da atuação do PLA como aglutinante no filamento e prendendo o NF em suas redes poliméricas, que também confirmam as suposições levantadas nas imagens de MEV.

A técnica de espectroscopia de Raman fornece informações estruturais sobre materiais carbonáceos, como biochar, negro de fumo, grafeno, nanotubos de carbono, grafite, entre outros [159]. Neste caso, a investigação de materiais a base de carbono baseia-se em propriedade eletrônicas e vibracionais dos carbonos sp<sup>2</sup>, quando essas propriedades são investigadas juntas é possível obter um análogo a "impressão digital" para o material [159]. Os espectros obtidos para PLA, PLA Condutor (Proto-pasta) e negro de fumo são apresentados na FIGURA 24.

FIGURA 24: ESPECTROS DE RAMAN OBTIDOS PARA AMOSTRAS DE PLA, PLA CONDUTOR (PROTO-PASTA) E NEGRO DE FUMO. COM RESOLUÇÃO ESPACIAL DE 1  $\mu$ M, LASER DE Ar<sup>+</sup> (514,5 NM) COM POTÊNCIA DE INCIDÊNCIA DE 2,5 MW, NA REGIÃO DE 130 A 4000 cm<sup>-1</sup>.



FONTE: O autor.

Os espectros Raman obtidos para as amostras de Proto-pasta (PLA-Condutor) e negro de fumo, apresentam quatro bandas principais localizadas em aproximadamente 1300, 1500 e 2500 e 2850 cm<sup>-1</sup>, denominadas bandas D, G, G' e D+G respectivamente [160]. A posição e intensidade das bandas do espectro Raman fornecem informações referentes ao grau de grafitização da amostra sendo que deslocamentos para maiores números de onda indicam diminuição no grau de grafitização e o alargamento das bandas indica uma maior heterogeneidade ou desordem da estrutura [161,162].

A banda D refere-se a distorções da estrutura grafitica, uma vez que está atribuída a vibração simultânea de seis carbonos. Esse modo vibracional não é permitido segundo as regras de seleção, entretanto a existência de heteroátomos, defeitos ou vacâncias na rede cristalina torna este modo vibracional ativo no espectro de Raman. Sendo assim, essa banda é frequentemente associada a falhas da estrutura grafítica (carbono sp<sup>2</sup>). A banda G, em aproximadamente 1500 cm<sup>-1</sup>, é associada a vibrações C=C no plano. A razão da intensidade das

bandas D e G  $(I_D/I_G)$  fornece informações sobre a presença de defeitos ou cristalinidade da estrutura do material. Nesse sentido, os três materiais apresentaram razão das bandas  $I_D/I_G$  próximo de 1,0, sendo 1,04 para o PLA condutor (Proto-pasta), 1,00 para PLA e 1,02 para negro de fumo, por consequência não é possível especular sobre a diferença relacionadas aos defeitos ou cristalinidade dos materiais.

As bandas G' e D+G, em 2500 cm<sup>-1</sup> e 2850 cm<sup>-1</sup> respectivamente, são atribuídas a bandas de ressonância dupla, *overtones* da banda em 1300 cm<sup>-1</sup> e a combinações de vibrações na estrutura do negro de fumo [163]. Nesse sentido, a banda G' está relacionada com o segundo harmônico da banda D, a qual pode também estar atrelada a organização do material.

#### 4.2 AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO BÁSICO E DA GEOMETRIA DE IMPRESSÃO

Antes da avaliação dos dispositivos impressos, os eletrodos foram submetidos a um tratamento físico em lixa d'água, visando homogeneização da superfície e remoção de imperfeições provenientes da impressão e posterior ativação eletroquímica em NaOH. O efeito da ativação eletroquímica sobre o sinal da sonda está mostrado na FIGURA 25.

FIGURA 25: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PRÉVIO AO TRATAMENTO COM NaOH E APÓS O TRATAMENTO COM NaOH, SONDA K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 2,0 mmol L<sup>-1</sup> ELETRÓLITO SUPORTE KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 3,0.



62

Os tratamentos foram propostos segundo metodologia já descrita em literatura [151], que sugere que o processo de ativação eletroquímica em NaOH remove parcialmente o PLA superficial do dispositivo, através de uma reação de saponificação. Sendo assim, o negro de fumo, o qual é o componente condutor do compósito, fica com sua superfície mais disponível, efeito que leva a melhora os sinais redox das sondas eletroquímicas, como pode ser observado na FIGURA 25.

Estudos eletroquímicos iniciais envolveram a verificação do efeito da orientação de impressão na resposta eletroquímica do compósito. Para isso foram avaliadas três possibilidades de impressão: horizontal (1), vertical com a superfície do eletrodo sem tocar (2) a mesa e vertical com a superfície do eletrodo tocando a mesa (3), descritos na FIGURA 26A. Sendo que a impressão (1) não apresentou resultados voltamétricos comparáveis. Os resultados obtidos através da técnica de CV em K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] estão sumarizados na FIGURA 26B.

FIGURA 26: (A) ESQUEMA DAS TRÊS GEOMETRIAS DE IMPRESSÃO AVALIADOS. (B) RESULTADOS DE CV, SUMARIZADOS, OBTIDOS PARA O MATERIAL IN NATURA E PARA AS IMPRESSÕES (2) E (3) ( $n = 3; \pm DP$ ).





Já foi reportado em literatura [164] que o processo de impressão, por FDM, pode alterar a homogeneidade e também a condutividade de materiais compósitos. Os resultados obtidos com o dispositivo impresso em orientação horizontal (1) mostraram alta resistividade, sem a presença clara dos pares redox da sonda, sendo assim foram suprimidos. Tal efeito pode estar relacionado com a homogeneidade das camadas impressas ou, também, devido a diminuição dos caminhos condutores ao longo do material. Por outro lado, os eletrodos impressos em orientação vertical mostraram um aumento na resposta eletroquímica (I<sub>pa</sub>) em comparação com o eletrodo não impresso, o qual pode estar relacionada com o aumento da área superficial, uma vez que o processo de impressão 3D cria ramificações entre as camadas e/ou devido a melhora na condutividade do material por uma maior homogeneidade.

Uma vez que ambas as orientações verticais mostraram melhora nos sinais eletroquímicos e similaridade na resposta, o dispositivo impresso com a superfície tocando a mesa impressora foi utilizado para estudos posteriores. A escolha dessa posição de impressão levou em consideração a superfície do eletrodo impresso, uma vez que a primeira camada de impressão é levemente pressionada contra o vidro da mesa de impressão, a superfície é mais homogênea e lisa. Sendo assim, há maior facilidade na correção da superfície na etapa de abrasão mecânica.

# 4.3 ANÁLISES DE ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Uma vez que a proposta do trabalho é mostrar a funcionalidade do material para ancoramento proteico visando sua aplicação na construção de imunossensores eletroquímicos, foram realizados estudos de FTIR do material a fim de investigar grupos funcionais superficiais e, também, verificar a eficácia da reação com os ativadores de ligação cruzada EDC / NHS. Os estudos de FTIR realizados estão mostrados na FIGURA 27.

FIGURA 27: ESPECTROS DE FTIR REALIZADOS PARA AS AMOSTRAS DE PLA, PROTO-PASTA E PROTO-PASTA APÓS A REAÇÃO COM EDC/NHS. ENSAIO REALIZADO EM PASTILHA DE KBr, 64 VARREDURAS DE 4000 cm<sup>-1</sup> A 500 cm<sup>-1</sup>.



FONTE: O Autor.

A partir da análise dos espectros de FTIR (FIGURA 27) realizados para PLA, que é o aglutinante do material compósito, e Proto-pasta, antes e após a reação com EDC / NHS. Foi possível observar na amostra de Proto-pasta uma banda alargada centrada em 3000 cm<sup>-1</sup>, o qual pode ser atribuída ao estiramento O-H proveniente de ácidos carboxílicos. Outra característica dominante é a presença de uma banda na região 1750 cm<sup>-1</sup>, que pode ser atribuída a absorção do estiramento assimétrico de carbonilas proveniente de ácidos, uma vez que a banda se apresenta intensa e bem definida. A região cuja absorção acontece no comprimento de onda de 1600 a 1300 cm<sup>-1</sup> corresponde a absorção de grupos O-H, C-O e C-H. Os resultados anteriores sugerem a possibilidade de aplicação dos grupos oxigenados para reação com EDC / NHS visando posterior substituição para ancoramento proteico. Tendo em vista isso, foram realizados FTIR de amostras de Proto-Pasta após a reação com EDC / NHS.

As principais diferenças observadas no FTIR, FIGURA 27, após a reação com EDC / NHS são a banda na região de 3000 cm<sup>-1</sup> que se desdobra em duas, possivelmente em virtude da sobreposição das bandas de estiramento N-H, provenientes do EDC / NHS, as quais absorvem nessa região causando então o desdobramento. Além disso, percebe-se uma alteração

nas bandas da região 1750-1300 cm<sup>-1</sup>, que pode estar relacionado, também, com a sobreposição das bandas provenientes do material com EDC / NHS, uma vez que correspondem a frequência de deformação de aminas primarias e, por fim, é possível perceber uma diminuição aparente (qualitativa) da banda em 1750 cm<sup>-1</sup>, a qual é característica de estiramento C=O. Tais evidências sugerem que houve a ligação dos agentes de ligação cruzada nos grupos carboxílicos superficiais [165,166].

# 4.4 CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO VOLTAMÉTRICA DO IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA N DO HANTAVÍRUS

Estudos iniciais se concentraram na verificação da viabilidade de aplicação do Protopasta para ancoramento proteico, explorando os grupos funcionais oxigenados presentes na extremidade do PLA e do negro de fumo. A etapa de ativação superficial com os agentes de ligação cruzada EDC e Sulfo-NHS foi realizada pela simples imersão do eletrodo em solução contendo os modificadores em solução tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup> e pH 4,2, sob condição de agitação durante 15 minutos. Essa condição já é descrita em literatura e favorece a formação do reativo amínico sulfo-NHS [165,167]. Neste caso, o produto da reação (sulfo-NHS) apresenta baixa estabilidade, e por consequência pode ser facilmente substituído por aminas primarias proveniente de proteínas [168], como mostrado na FIGURA 28.

### FIGURA 28: MECANISMO DE REAÇÃO DO EDC + NHS E ANCORAMENTO DO ANTICORPO CONTRA O HANTAVÍRUS NOS GRUPOS CARBOXÍLICOS DO PROTO-PASTA.





A verificação das etapas de ancoramento e viabilidade do dispositivo foram avaliadas através do perfil da sonda eletroquímica  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ , visto que é um composto que apresenta

seu perfil voltamétrico conhecido e difundido na literatura para avaliação de processos de ancoramento e caracterização eletroquímica de biossensores [169–171]. A FIGURA 29 ilustra a construção e cada etapa de caracterização eletroquímica do dispositivo.

FIGURA 29: ESQUEMA DAS ETAPAS ENVOLVIDAS NA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR CONTRA HANTAVÍRUS NA SUPERFICIE DO PROTO-PASTA.





A primeira etapa consiste na modificação dos grupos oxigenados ácidos com os reagentes de ligação cruzada EDC + NHS. Na etapa 2, os grupos EDC/NHS são substituídos por aminas primárias volumosas, por exemplo proteínas, nesse caso anticorpos contra hantavírus. Em seguida (etapa 3), os grupos EDC + NHS residuais, não substituídos pelos anticorpos, são bloqueados utilizando uma proteína inerte, nesse caso BSA. Esse bloqueio dos sítios residuais garante que a interação com a superfície do dispositivo aconteça majoritariamente através da interação com os anticorpos. Os anticorpos por sua vez apresentam seletividade de interação com as NP e essa interação culmina com a formação de um imunocomplexo HAb-Np (etapa 4).

Como já mencionado anteriormente, o Hantavírus foi utilizado como prova de conceito para imobilização de proteínas e detecção eletroquímica de patologias virais no dispositivo proposto. Após a verificação, por FTIR, da reação de EDC / NHS na superfície do compósito, proto-pasta, as próximas etapas envolveram a caracterização eletroquímica de cada etapa da construção do imunossensor proposto, sendo que as etapas foram avaliadas através das técnicas de CV e EIS, com a sonda  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ . Os resultados obtidos através da técnica de CV e EIS estão apresentados na FIGURA 30 e 31.

FIGURA 30: (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA CADA ETAPA DA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR UTILIZANDO PROTO-PASTA IMPRESSO, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 50 mV s<sup>-1</sup>, SONDA K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 2,0 mmol L<sup>-1</sup> E ELETRÓLITO SUPORTE KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. (B) RESULTADOS DE CV SUMARIZADOS (n = 3;  $\pm$  DP).



A FIGURA 30 apresenta os resultados obtidos através da técnica de CV e representa o comportamento voltamétrico da sonda  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  ao longo de cada etapa de imobilização e incubação. A etapa de imobilização do anticorpo contra Hantavírus, representada por HAb, consiste na adição do HAb, 0,4 mg mL<sup>-1</sup> e incubado à 4 °C por 1 hora. Através do comparativo da resposta obtida para o eletrodo base, sem modificação, e a imobilização do HAb é possível observar um aumento da intensidade dos picos redox,  $\Delta I_{pa} = 8.33 \mu A$ , após a inserção do HAb. O efeito se repete ao longo de replicatas e sugere-se que tenha relação com a imobilização do HAb na superfície do dispositivo e também uma contribuição parcial de EDC / NHS que não foi substituído [172].

Com o fim de garantir que não haja EDC / NHS residual, passivo de interação inespecífica com outras proteínas, o dispositivo foi incubado com BSA (1,0 mg mL<sup>-1</sup>). A adição de BSA (5  $\mu$ L) e incubação por 30 minutos em temperatura ambiente, visa substituir o EDC / NHS que não reagiu com o HAb. Isso, consequentemente, garante a seletividade do dispositivo frente a outras biomoléculas, uma vez que somente antígenos que possuam epítopo com afinidade de interação com o anticorpo, nesse caso Np, podem interagir com a superfície do eletrodo. A etapa de ancoramento do BSA, representada na FIGURA 30 por BSA, apresenta redução na intensidade do sinal redox da sonda indicando substituição dos grupos EDC / NHS. Uma vez que o BSA apresenta caráter isolante, ele atua atua reduzindo a superfície eletroativa

do dispositivo, contribui com impedimento estérico e prejudica a difusão da sonda, resultando na diminuição da corrente mensurada.

A última etapa consistiu na detecção da Np (antígeno, 120 μg mL<sup>-1</sup>) através da interação antígeno-anticorpo. A interação HAb-Np leva a formação do imunocomplexo, o qual é uma macromolécula que atua na superfície do dispositivo bloqueando sítios eletroativos e causando efeito de impedimento estérico. Sendo assim, a formação do imunocomplexo leva diminuição do fator condutividade do dispositivo, devido ao efeito isolante. Além disso, há a interação da sonda com a superfície do eletrodo que é dificultada, em decorrência do bloqueio espacial, como consequência dos dois efeitos observa-se uma queda na intensidade de corrente dos picos redox da sonda, que pode ser atribuído à Np, como mostrado na FIGURA 30 - Np.

Os estudos mostraram comportamento eletroquímico similar ao dispositivo não impresso, mostrados no Anexo 1, durante os processos de ancoramento, mas com maiores alterações de I<sub>pa</sub>. O observado pode estar relacionado com a alteração da condutividade do material devido ao efeito de temperatura para fusão do filamento na extrusora, sendo assim especula-se uma alteração na organização das cadeias poliméricas do PLA bem como melhor incorporação e homogeneidade do negro de fumo na matriz. Ainda, a impressão 3D pode levar a um aumento da área superficial, devido a criação de rugosidades, esse ganho de área culmina com o aumento da corrente e com maior disponibilidade dos grupos superficiais para ancoramento proteico.

A caracterização do processo de ancoramento no eletrodo impresso também foi avaliada pela técnica de EIS, visando confirmar o perfil e os resultados obtidos por CV. Os resultados obtidos estão representados na FIGURA 31.

FIGURA 31: MEDIDAS DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA OBTIDAS PARA O PROTO-PASTA APÓS CADA ETAPA ENVOLVIDA NA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR, UTILIZANDO A SONDA  $K_3$ [Fe(CN)<sub>6</sub>], 2,0 mmol L<sup>-1</sup> EM KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, 10 mV DE AMPLITUDE. (B) RESULTADOS DE EIS SUMARIZADOS (n = 3; ± DP).



FONTE: O autor.

Os dados de EIS obtidos, representados no diagrama de Nyquist – FIGURA 31, mostram a relação entre impedância (resistência a transferência de carga) para cada etapa de construção do imunossensor. Então, uma alteração na resistência do sistema indica uma mudança na superfície do eletrodo, em virtude do processo de ancoramento das proteínas, HAb, BSA e Np. Através da simulação do circuito equivalente, R<sub>ct</sub>, mostrado na Figura 31 B, foi possível calcular a resistência do sistema para cada etapa da construção do dispositivo, sendo elas: 2,05 k $\Omega$  para o branco do eletrodo, 1,00 kΩ após a etapa de inserção do HAb, que sugere a imobilização e corrobora com resultados obtidos por CV. Para o BSA por sua vez, foi constatado um aumento de resistência para 3,63 k $\Omega$ , devido a substituição do EDC / NHS residual e por se tratar de uma molécula isolante. A detecção da Np, que consiste na confirmação da formação do imunocomplexo HAb-Np, gerou um incremento no valor de  $R_{ct}$  de 3,63 k $\Omega$  (HAb-BSA) a 7,39 kΩ (HAb-BSA-Np), que sugere a formação do complexo, devido a efeitos já supramencionados de efeito isolante na superfície e impedimento estérico. A partir dos estudos de caracterização foi possível observar uma correlação entre cada etapa de construção do dispositivo e os dados obtidos, seja por CV ou EIS, indicando sucesso no processo de ancoramento das biomoléculas assim como a detecção da Np.

### 4.5 RESPOSTA ELETROQUÍMICA DO IMUNOSSENSOR

Visando verificar o desempenho analítico do imunossensor proposto, foi avaliada a variação de concentração de Np adicionada à superfície do dispositivo, através verificação do comportamento voltamétrico da sonda  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ , em termos de I<sub>pa</sub>, empregando a voltametria cíclica. Os resultados obtidos são mostrados na FIGURA 32.

FIGURA 32: (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE Np, K[Fe(CN)<sub>6</sub>] 2,0 mmol L<sup>-1</sup> E 0,1 mol L<sup>-1</sup> KCl, 25 mV s<sup>-1</sup>. (B) CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA ATRAVÉS DOS DADOS DE CV, I<sub>pa</sub> VS C<sub>NP</sub> (n = 3,  $\pm$  DP).



FONTE: O autor.

A FIGURA 32A mostra os voltamogramas cíclicos representativos obtidos para a detecção de Np, com concentração variando de 30 a 580 µg mL<sup>-1</sup>. A partir da análise dos dados de CV foi possível observar uma dependência da resposta eletroquímica, I<sub>pa</sub> da sonda, com a variação da concentração de Np, indicando uma barreira cinética para a transferência de elétrons à medida que a concentração de Np aumenta, que está possivelmente ligado com a formação do imunocomplexo antígeno-anticorpo (HAb-Np), uma vez que este age como um isolante na superfície do dispositivo. [96,173,174]

A FIGURA 32B, obtida através dos dados de CV e representa a variação do I<sub>pa</sub> com o aumento da concentração de Np, mostra dependência linear da concentração de Np na faixa de 30  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> a 240  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> representada pela equação de reta  $\Delta$ I /  $\mu$ A = 1,925 + 0,0875 \* C<sub>Np</sub>. Ainda, a curva analítica possibilitou o cálculo da sensibilidade do dispositivo, sendo essa igual a 0,1047  $\mu$ A  $\mu$ g<sup>-1</sup> mL com um LD calculado de 21.48  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (3\*DP<sub>branco</sub>/coeficiente angular). Apesar do dispositivo proposto não apresentar resposta linear para concentrações acima de 240  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, ainda apresenta aplicabilidade como sensor qualitativo para altas concentrações de
antígeno, uma vez que a eficácia de imunossensores depende essencialmente da seletividade da formação do imunocomplexo, independente da concentração.

#### 4.6 TESTE DE SELETIVIDADE DO DISPOSITIVO PROPOSTO

Antes da aplicação do imunossensor em amostras de soro fortificado, foram realizados estudos para comprovar a seletividade dos anticorpos contra a proteína VP2 da doença de Gumboro. A VP2 é uma proteína do nucleocapsídeo do vírus *infectious bursal disease vírus*, que apresenta estrutura similar à proteína N do Hantavírus, sendo assim foi utilizada como potencial interferente no sistema proposto. Para avaliar a seletividade do sensor, a resposta EIS e CV do imunossensor desenvolvido foi testada na presença de 5,0  $\mu$ L de proteína VP2 (0,60 mg mL<sup>-1</sup>).

As medidas de EIS e CV foram registradas na presença de  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ , após a incubação das proteínas (60 min a 4 °C). Os experimentos foram realizados na presença de VP2, Np e uma mistura de Np e VP2, os dados obtidos estão resumidos na FIGURA 33.

FIGURA 33: (A) TESTE DE SELETIVIDADE DO DISPOSITIVO PARA PROTEÍNA VP2, DADOS DE EIS SUMARIZADOS (n = 3,  $\pm$  SD). (B) TESTE DE SELETIVIDADE DO DISPOSITIVO PARA PROTEÍNA VP2, DADOS DE CV SUMARIZADOS (n = 3,  $\pm$  SD).





Neste estudo, HAb representa a resposta do imunossensor, HAb-VP2 após incubação de 5  $\mu$ L de proteína VP2 (600  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), e subsequente uma mistura de Np (590  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) e VP2 (600  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) representado por HAb-Np+VP2. Os resultados dos estudos de EIS e CV mostraram que o imunossensor, HAb, não apresentou variação de sinal significativa (teste *t*-student p > 0,05), após a incubação com os interferentes (HAb-VP2), sendo este um indicativo

de que a proteína VP2 não interage eficientemente com a superfície do imunossensor. Ainda, como comparativo foram registrados os sinais referentes a detecção de Np e da mistura em concentrações semelhantes. A Variação de sinal obtida, tanto por EIS quanto CV, foi semelhante para incubação da Np e da mistura, efeito que sugere que somente a Np interage com a superfície do dispositivo. Sendo assim, sugere-se que o imunossensor se apresenta seletivo à Np do Hantavírus, quando em contato com VP2, efeito esperado uma vez que os anticorpos utilizados são IgGs contra Np do Hantavírus araucária, sendo assim são seletivos à interação e formação do imunocomplexo com a nucleoproteína do Hantavírus araucária. Então, o sensor apresentou uma boa seletividade permitindo que fosse utilizado para a detecção de Np em amostra de soro humano fortificado.

#### 4.7 AMOSTRAS DE SORO HUMANO

Por fim, foi realizado a simulação de um imunoensaio utilizando amostras de soro humano comercial enriquecidas com Np (antígeno), uma vez que a matriz apresenta proteínas e outras biomoléculas que podem interagir com a superfície do dispositivo de maneira não específica. Para isso, a amostra de soro humana foi incubada sobre a superfície do eletrodo a 4 °C por 1h, e então realizado as medidas de EIS e CV em 2,0 mmol L<sup>-1</sup> de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], o mesmo procedimento foi realizado com soro diluído 100x que foi enriquecido com Np até concentração de 120 μg mL<sup>-1</sup>. Os resultados estão sumarizados na FIGURA 34.



FIGURA 34: (A) TESTE DO SORO FORTIFICADO COM NP OBTIDO ATRAVÉS DE DADOS EIS ( $n = 5, \pm$  DP). (B) TESTE DO SORO FORTIFICADO COM NP OBTIDOS POR MEIO DE DADOS CV ( $n = 5, \pm$  DP).

FONTE: O autor.

A resistência equivalente calculada, através dos dados de EIS obtidos (FIGURA 34A), mostra um aumento significativo após a adição do soro enriquecido com Np. É possível observar uma variação pequena do R<sub>ct</sub> entre o imunossensor e o soro humano de 1,49 kΩ, que não é significativa ao nível de 95% utilizando o teste estatístico *t-Student* (t<sub>calculado</sub> 1,73 < t<sub>crítico</sub> 2,31), o que pode estar relacionado com a interação não especifica de proteínas ou outras bioestruturas presentes na matriz. Entretanto, a medida de soro enriquecido mostrou maior variação do R<sub>ct</sub> (5,02 kΩ). Essa variação sugere a formação do imunocomplexo, uma vez que apresentam diferença significativa com 95% de confiança (t<sub>calculado</sub> 2,58 > t<sub>crítico</sub> 2,31) cuja consequência é o bloqueio da superfície do dispositivo.

O mesmo estudo foi avaliado pela técnica de CV, sumarizado na FIGURA 34B, e concorda com o resultado obtido por EIS, uma diminuição do  $I_{pa}$  da sonda em 15,01 µA, como consequência da formação do imunocomplexo com diferença significativa ( $t_{calculado} 2,92 > t_{crítico} 2,31,95\%$  de intervalo de confiança). Além disso, a variação de 15,01 µA corresponde a concentração da curva analítica de 120 µg mL<sup>-1</sup>, valor da amostra enriquecida. Sendo assim, ambas as técnicas mostraram potencialidade na diferenciação dos soros.

### 5 CONCLUSÕES PARCIAIS

A manufatura 3D por FDM permite uma abordagem simples, rápida e barata de preparo de projetos e protótipos, com possibilidades inesgotáveis de arquitetura. Além disso, os filamentos condutores comerciais oferecem ótimas alternativas para o desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos. Nesse trabalho, foi realizado com sucesso a construção de um imunossensor para detecção de Np do Hantavírus Araucária utilizando um filamento condutor comercial (compósito de negro de fumo e PLA). Após tratamento em solução alcalina, o material permitiu a preparação de um imunossensor utilizando EDC/NHS combinado com grupos carboxílicos naturalmente presentes na superfície do filamento, evidenciado pelos estudos de FTIR. Verificou-se, também, que as propriedades de superfície, assim como os grupos de oxigenados, se mostraram adequados para ancoragem de proteínas por formação de ligações covalentes. O dispositivo mostrou potencialidade na detecção da proteína N do Hantavírus na faixa de 30 a 240 µg mL<sup>-1</sup> apresentando sensibilidade de 0,1047 µA µg<sup>-1</sup> mL com um LD calculado de 21.48 µg mL<sup>-1</sup>. Além disso, a resposta do dispositivo proposto foi seletiva para amostras de soro humano diluídas 100x e permitiu a detecção de anticorpos em amostras de soro enriquecidas. Portanto, a plataforma proposta, que tinha como finalidade prova conceito da aplicação 3D para construção de biossensores, pode ser estendida para outros biossensores eletroquímicos.



# IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA PROTEÍNA S DO SARS-CoV-2 BASEADO NA IMOBILIZAÇÃO DO RBD DO VÍRUS EM UMA INTERFACE DE QUANTUM DOTS DE GRAFENO E POLIHIDROXIBUTIRATO.

# 6 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 6.1 MATERIAIS E REAGENTES

Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico ou de alta pureza. N-(3dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimidacloridrato (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), Ferricianeto de Potássio K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] e ácido cítrico foram adquiridos da Sigma Aldrich. O tampão fosfato salino, pH 7,4, foi preparado utilizando cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de potássio monobásico e hidrogenofosfato dissódico, todos da Sigma Aldrich. A albumina de soro bovino (BSA) e anticorpo contra febre Amarela (FA - 0,16 mg mL<sup>-1</sup>) foram fornecidos pelo Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/PR. O PHB, 2,2,2-trifluoroetanol e a membrana de celulose (12 kDa) foram obtidos da Sigma Aldrich.

Os eletrodos impressos (SPE) foram obtidos pelo laboratório do professor Craig E. Banks da Manchester Metropolitan University. Os eletrodos de trabalho e contra-eletrodo foram feitos com uma tinta condutora de grafite, uma tinta Ag|AgCl foi utilizada para a construção do eletrodo de pseudo-referência. O conjunto final foi suportado sobre um substrato de poliéster com eletrodos e contatos elétricos delimitados por uma tinta isolante. O substrato de poliéster é flexível e apresenta resistência mecânica.

#### 6.2 SÍNTESE DO GQD

A síntese do GQD foi realizada conforme descrito por Gevaerd et al.[175], baseado na pirólise do ácido cítrico. Em uma primeira etapa, o ácido cítrico (m ~ 1,00 g) é pesado em um béquer e aquecido em chapa de aquecimento a 200° C. Durante o tempo de síntese, o sólido é liquefeito, tornando-se incolor e subsequentemente torna-se amarelo claro, o que indica o início dos processos de pirólise e carbonização e, ao final da reação o líquido torna-se laranja, indicando a formação dos GQDs. O processo todo de formação dos GQDs foi de aproximadamente 20 minutos. A segunda etapa da rota consiste na adição do líquido laranja em uma solução de NaOH (0,250 mol L<sup>-1</sup>), gota a gota sob agitação vigorosa, obtendo-se assim a solução de grafeno quantum dots. Ao final da reação, os GQDs são armazenados sob refrigeração e ao abrigo de claridade. Prévio ao uso, a solução de GQD é neutralizada com uma solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, aproximadamente 1:1 GQD: HCl.

#### 6.3 SÍNTESE DAS PARTÍCULAS DE PHB

As partículas de polihidroxibutirato foram produzidas pelo Núcleo de Fixação de Nitrogênio (NFIX), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR), liderado pelo professor Dr. Marcelo Mueller dos Santos. A síntese foi realizada pelo método de nanoprecipitação[176]. 10 mg de PHB foram dissolvidos em 10 ml de TFE (2,2,2-trifluoroetanol) com agitação à temperatura ambiente. A solução foi dialisada através de uma membrana de celulose (12 kDa) contra 2 L de água destilada por 24 h.

# 6.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO RBD DA PROTEÍNA SPIKE DO VÍRUS SARS-COV-2

A síntese do RBD com domínio de ligação para PHB foi realizada Núcleo de Fixação de Nitrogênio (NFIX), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR), liderado pelo professor Dr. Marcelo Mueller dos Santos.

A sequência de aminoácidos, entre os resíduos 319 a 541, da proteína Spike do SARS-CoV-2 (NCBI, Gene ID: 43740568) foi imobilizada no *Substrate-Binding Domain* (SBD) da PHA depolimerase de *Alcaligenes faecalis* [177] seguido de uma marcação com 6-histidinas no C-terminal. A Twist Bioscience (South San Francisco, CA, EUA) sintetizou, sob demanda, o pET29-RBD-SBD-6His. O marcador de 6-histidinas foi usado para purificar a proteína por cromatografia de afinidade contra íons de níquel (Ni<sup>2+</sup>). O domínio SBD introduzido interage com o PHB como descrito em literatura [177].

*E. coli* BL21(DE3) carregando o pET29-RBD-SBD-6His foi cultivado em 80 mL de *Lysogeny Broth*[178] a 37°C e 160 rpm de agitação orbital até OD<sub>600</sub> de 0,4. Então, a cultura foi dividida em 8 tubos e centrifugada a 5.000 rotações a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de Tampão Tris-HCl 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 8,0, 150 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl e sonicado 5 vezes (10 s de sonicação, 10 s repouso) em banho de gelo. Após centrifugação (12.000 x g, 4°C, 10 min), a fração solúvel foi descartada e os corpos de inclusão foram lavados 3 vezes com 1 mL de Tampão Tris-HCl 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 8,0, 0,5 % Triton X-100, 1 mol L<sup>-1</sup> de ureia). Os corpos de inclusão lavados foram dissolvidos com 1 mL de ureia 8 mol L<sup>-1</sup> à temperatura ambiente, pipetando e dispensando 10 vezes. A solução não era totalmente translúcida após solubilização com ureia, no entanto, havia RBD-SBD solúvel suficiente para seguir a etapa de *refolding*.

Um volume de 1,0 mL do RBD-SBD desnaturado foi transferido para uma membrana de celulose de 12 kDa e dialisado contra 2 L de tampão Tris-HCl, 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 9,0, 150 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl por 24 h em temperatura ambiente. A solução dialisada foi centrifugada (12.000 x g, 4°C, 10 min), e o sobrenadante foi purificado em um HiTrap Chelating com coluna de Ni<sup>2+</sup>. O RBD-SBD foi eluído em Tampão Tris-HCl, 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 9,0, 150 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl, 200 mmol L<sup>-1</sup> imidazol. O imidazol remanescente foi removido por diálise[179]. Por uma questão de clareza o RBD-SBD será nomeado, a partir daqui, somente como RBD.

# 6.5 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

As medidas de voltametria cíclica (CV) foram realizadas com velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup> e a voltametria de pulso diferencial (DPV) foram realizadas com amplitude de pulso de 150 mV e velocidade de varredura de 5 mV s<sup>-1</sup>. Para as medidas foi utilizado o SPE em um Potenciostato/Galvanostato PGSTAT204. Os experimentos foram conduzidos em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4, como eletrólito suporte e 2,0 mmol L<sup>-1</sup> da sonda (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]). A performance do imunossensor proposto foi avaliado pela supressão da corrente de pico anódico após cada etapa de modificação do SPE.

# 6.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ESTRUTURAL

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas em um Microscópio eletrônico de varredura de alta resolução FEI, Felmi ZFE - modelo Quanta 450, que possui resolução de 1,0 nm. Todas as imagens foram obtidas com aceleração de 10 kV e detector de elétrons secundários. A análise química elementar (EDS) foi realizada com um detector Apollo X SDD que apresenta resolução de 131 eV.

Os espectros de infravermelho foram obtidos com um espectrômetro BOMEN, realizando 64 varreduras de 4000 cm<sup>-1</sup> a 500 cm<sup>-1</sup>. As amostras foram previamente homogeneizadas em pastilhas de KBr e secas.

#### 6.7 CONSTRUÇÃO DOS IMUNOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE AbS

Primeiro, o GQD foi eletrodepositado na superfície do SPE. Esta etapa foi realizada por voltametria cíclica em valores de potencial entre -1,4 e 0,0 V a 50 mV s<sup>-1</sup> (3 a 10 ciclos). Depois, 2,0  $\mu$ L da solução de partículas de PHB (1,0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> - prévio a otimização) foram adicionados

diretamente ao eletrodo de trabalho e seco a 37 °C. Após essa etapa, 2,0 µL do RBD (0,47 µg mL<sup>-1</sup> - prévio a otimização) foram adicionados (e incubado a 37 °C em atmosfera saturada de água, a partir daqui todas as incubações foram realizadas nessa condição. Todos os tempos de incubação foram avaliados, variando de 15 a 60 minutos. Após cada etapa de incubação os eletrodos foram lavados três vezes em PBS para remover as proteínas em excesso e não ligadas. Os sítios não ocupados pelo RBD no PHB foram bloqueados utilizando 2,0 µL de BSA (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) incubados por 15 minutos a 37 °C. Finalmente, a detecção dos anticorpos IgG (1,0 µg mL<sup>-1</sup>) contra o RBD do SARS-CoV-2 (AbS) foi realizada incubando 2,0 µL da solução de AbS. Cada etapa envolvendo a construção do sensor foi avaliada por VC, -0,3 a 0,6 V, 50 mV s<sup>-1</sup>, 3 ciclos utilizando 2 mmol L<sup>-1</sup> da sonda K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]. A FIGURA 35 representa o esquema geral para cada etapa envolvida na construção do sensor proposto.

# FIGURA 35: ESQUEMA DAS ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DO ANTICORPO CONTRA RBD DO SARS-COV-2.



FONTE: O autor.

O dispositivo construído utilizando a rota por EDC / NHS foi construído utilizando solução dos constituintes na concentração de  $1,0 / 1,2 \text{ mg mL}^{-1}$  respectivamente. Para isso, o GQD foi eletrodepositado e em seguida  $2,0 \mu$ L da solução contendo EDC e NHS foram

inseridos na superfície do dispositivo e reagidos por uma hora a 37 °C, em uma atmosfera saturada em água para evitar a secagem. Em sequência, as etapas de imobilização foram realizadas utilizando 1h de incubação para o RBD, 15 minutos para BSA e 1h para AbS. Para fins de comparativo, as concentrações utilizadas foram as mesmas dos ensaios com PHB. Após cada etapa foi realizada lavagem três vezes por imersão em PBS.

O ensaio utilizando a mistura de PHB+RBD+BSA consistiu na utilização de 1,0 mL de PHB (1,0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). Na solução de PHB foi adicionado o RBD, concentração final de 0,47  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, e agitado em geladeira durante uma hora. Em sequência, 100  $\mu$ L da solução de BSA (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) foram adicionados e agitados por mais 15 minutos. Após essa etapa, o SPE foi modificado com GQD seguido do *dropcasting* da mistura, a qual foi seca em estufa a 37 °C. Por fim, 2,0  $\mu$ L de AbS (1,0  $\mu$ g mL) foram incubados na superfície do dispositivo durante uma hora a 37 °C.

# 6.8 SELETIVIDADE, CURVA ANALÍTICA E AMOSTRA

As amostras de soro humano positivas e negativas para anticorpos contra SARS-CoV-2 foram obtidas de um hospital local. A utilização de amostras humanas foi avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa, protocolo número 30342520.5.0000.0008. As amostras de soro foram diluídas 1000x em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4.

Para avaliação da seletividade do dispositivo, também foram utilizadas amostras de soro negativo diluídas 1000x em PBS e enriquecidas com anticorpos AbS e IgGs contra febre amarela (FA) (0,47 e 1,6 µg mL<sup>-1</sup> de concentração final, respectivamente).

As curvas analíticas foram realizadas em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> e amostra de soro negativo diluído 1000x em PBS com concentração final de AbS variando de 25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> a 50 ng mL<sup>-1</sup>. Os testes estatísticos *t-student* e ANOVA foram realizados com 95% de confiança.

#### 7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

# 7.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO GQD E PHB

A síntese do GQD foi realizada conforme descrito por Gevaerd et al.[175], baseado na pirólise do ácido cítrico. As partículas sintetizadas foram inicialmente avaliadas através de imagens de MET, com a finalidade de avaliar a morfologia e tamanho médio de partículas. As imagens obtidas estão representadas na FIGURA 36.

# FIGURA 36: IMAGENS DE MET OBTIDAS PARA AS PARTÍCULAS DE GQD OBTIDAS COM AMPLIAÇÃO DE 10 KX.



FONTE: O autor.

A partir das imagens de MET, FIGURA 36, é possível observar que as partículas de GQD sintetizadas apresentam geometria circular uniforme e dispersão homogênea ao longo da amostra. A partir da contagem das partículas obteve-se um tamanho médio de  $60 \pm 30$  nm.

Tendo em vista o observado por MET, foram então realizados espectros de FTIR do GQD, com a finalidade de observar possível residual do precursor na síntese e também avaliar grupos funcionais do GQD, uma vez que a finalidade do material é ancoramento proteico. Em paralelo as partículas de PHB sintetizadas também foram avaliadas por FTIR, visando também

avaliar os grupos funcionais superficiais e possíveis alterações ou contaminações no processo de formação das partículas. Os espectros obtidos estão representados na FIGURA 37.

FIGURA 37: ESPECTROS DE FTIR REALIZADOS PARA AS AMOSTRAS DE GQD E PHB, AMOSTRA HOMOGENEIZADA EM PASTILHA DE KBr, 64 VARREDURAS DE 4000 A 500 cm<sup>-1</sup>.



FONTE: O autor.

A amostra de GQD apresenta duas bandas intensas em 1600 e 1400 cm<sup>-1</sup> que estão relacionados ao estiramento C-O e C=O de grupos carboxílicos e cetônicos. Ainda é possível perceber bandas em 1300 cm<sup>-1</sup> e 1150 cm<sup>-1</sup> que são frequentemente atribuídas a estiramento C-H e vibração de alongamento de C-O. Por fim, a banda alargada e centrada em 3300 cm<sup>-1</sup> referese a estiramento -OH de moléculas de água intercaladas ou adsorvidas. Esses grupos são frequentemente encontrados em literatura, quando trata-se da síntese de GQD a partir da pirolise incompleta do ácido cítrico, sendo assim os resultados são concordantes com os reportados em literatura [111,180,181]. Ainda, não se percebe a presença de ácido cítrico remanescente da síntese em comparação com o já reportado em literatura [111,180,181].

A amostra de PHB, por sua vez, também apresenta a banda centrada em 1600 cm<sup>-1</sup> que é atribuída ao estiramento C=O e apresentou uma banda centrada em 1083 cm<sup>-1</sup>, devido a estiramento C-O de grupos éster, esses grupos estão relacionados com a polimerização do PHB através dos grupos carboxílicos. Na região de 1000 cm<sup>-1</sup> e 900 cm<sup>-1</sup> encontram-se as bandas referentes aos estiramentos de C-OH de álcoois e C-H de olefinas respectivamente, sendo que o espectro obtido coincide com os resultados já reportados em literatura [182–185].

# 7.2 CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO IMUNOSSENSOR

Tendo em vista os resultados observados por FTIR e MET, o material sintetizado se mostrou uma possível alternativa como modificador da superfície de SPE, visando auxiliar processos de ancoramento proteico, uma vez que a presença de grupos oxigenados na superfície do GQD pode criar uma interface de interação entre o PHB, que é altamente funcionalizado, e a superfície do eletrodo de trabalho, cuja superfície é majoritariamente constituída de grafite. Sendo assim, a primeira etapa avaliada foi a inserção do GQD na superfície do SPE. Esse processo foi realizado por intermédio da redução das nanopartículas na superfície do eletrodo de trabalho, através de um procedimento de eletrodeposição, representado na FIGURA 38.

FIGURA 38: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA ETAPA DE ELETRODEPOSIÇÃO DO GQD.



FONTE: O autor.

O voltamograma obtido, FIGURA 38, mostra um evento de redução em aproximadamente -1,0 V (*vs* Ag/AgCl), o qual é característico da redução de grupos oxigenados em superfícies a base de grafeno. À medida que ciclos voltamétricos consecutivos são realizados se percebe uma diminuição da intensidade do pico catódico. O efeito se relaciona com as etapas que envolvem a deposição do GQD, sendo elas: a organização do GQD na superfície do eletrodo, a diminuição da quantidade de grupos oxigenados superficiais disponíveis e passiveis de redução e, consequentemente, menor disponibilidade do material para ser reduzido. A redução dos grupos funcionais nessa etapa é necessária para a modificação do eletrodo, entretanto os grupos oxidados são essenciais para a posterior imobilização do PHB, sendo esse um dos parâmetros estudados posteriormente na construção do imunossensor. O perfil voltamétrico obtido já é amplamente descrito em literatura e sugere então a modificação do eletrodo com o GQD depositado [186,187].

A redução dos grupos funcionais presentes no GQD, na etapa de eletrodeposição, acarreta a diminuição da quantidade de grupos funcionais polares, incidindo na diminuição da solubilidade do material, que resulta na formação de um filme na superfície do eletrodo [188,189]. Baseado nisso, a confirmação da deposição do GQD na superfície do SPE foi realizada através de imagens de MEV. As imagens obtidas estão representadas na FIGURA 39.

FIGURA 39: IMAGEM DE MEV OBTIDAS PARA A SUPERFICIE DO SPE EM AMPLIAÇÃO DE 15 KX. (B) IMAGEM DE MEV OBTIDAS PARA A SUPERFICIE DO SPE EM AMPLIAÇÃO DE 15 KX. (C) IMAGEM DE MEV OBTIDAS PARA A SUPERFICIE DO SPE APÓS A ELETRODEPOSIÇÃO DO GQD, EM AMPLIAÇÃO DE 50 KX. (D) IMAGEM DE MEV OBTIDAS PARA A SUPERFICIE DO SPE APÓS A ELETRODEPOSIÇÃO DO GQD, EM AMPLIAÇÃO DE 50 KX.



FONTE: O autor.

As imagens de MEV, FIGURA 39, (A) e (B) representam a superfície do SPE sem modificação com GQD. A superfície do SPE não modificado apresentou característica porosa e rugosa, como esperado uma vez que a matriz constituinte é majoritariamente grafite. A FIGURA 39, (C) e (D), representam a superfície do SPE após a etapa de eletrodeposição do GQD e conseguinte modificação do eletrodo. Nessas imagens é possível perceber a formação de aglomerados de folhas de grafeno, que se repetem ao longo da superfície e confirmam a eletrodeposição do GQD. Entretanto, a partir das imagens não foi possível confirmar a formação do filme contínuo e homogêneo, devido a morfologia disforme da superfície do SPE.

A superfície do SPE modificada com GQD foi então utilizada para construção do imunossensor. A utilização do PHB em sinergia com o GQD para modificação da superfície do SPE visa ancoramento do domínio RBD da proteína spike do SARS-CoV-2, com a finalidade de formar uma camada seletiva à interação com anticorpos contra essa proteína.

Para isso, 2,0  $\mu$ L da solução de PHB (1,0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) foram adicionados a superficie do eletrodo pela técnica de *dropcasting* e secos a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 2  $\mu$ L do RBD (0,47  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) e incubados a 37 °C durante uma hora em atmosfera saturada em água, para que a solução das proteínas não secasse na superficie do dispositivo, a partir daqui todas as incubações são realizadas na mesma condição. Os sítios remanescentes, inespecíficos que não se ligaram ao RBD, foram então bloqueados com BSA (1 mg mL<sup>-1</sup>), utilizando 2,0  $\mu$ L e incubado durante 15 minutos. Por fim, foi realizada a detecção do anticorpo através da incubação de 2,0  $\mu$ L de uma solução de anticorpos IgG, 1,0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, durante uma hora. Cada etapa de construção foi avaliada por CV utilizando ferricianeto de potássio (2 mmol L<sup>-1</sup>) como sonda e tampão fosfato salino, 0,1 mol L<sup>-1</sup> e pH 7,4, como eletrólito suporte. Os dados obtidos estão registrados na FIGURA 40.

FIGURA 40: (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR, UTILIZANDO SONDA K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 2,0 mMOL L<sup>-1</sup>, PBS COMO ELETRÓLITO SUPORTE E VELOCIDADE DE VARREDURA DE 50 MV S<sup>-1</sup>. (B) GRÁFICO DE BARRAS CONSTRUÍDO PELOS DADOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA, UTILIZANDO A INTENSIDADE DE PICO ANÓDICO DA SONDA PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO DISPOSITIVO.



FONTE: O autor.

A FIGURA 40A mostra o comportamento voltamétrico registrado usando a sonda redox K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], após cada etapa de construção do imunossensor. O CV obtido em sequência à eletrodeposição do GQD evidencia maiores intensidades de sinal redox tanto nos processos de redução quanto de oxidação. O sinal anódico se intensificou de 10,33  $\mu$ A à 13,50  $\mu$ A ( $\Delta I = 3,17$   $\mu$ A) como resultado da deposição do GQD na superfície do eletrodo de trabalho, que atua contribuindo nos processos redox da sonda devido à maior condutividade, área superfícial e

possivelmente área eletroativa. Observa-se também a diminuição da separação entre os picos catódico e anódico que sugere um ganho em cinética e reversibilidade do processo.

Em sequência, o PHB foi adicionado por *dropcasting* de 2,0  $\mu$ L (8,33  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) e seco a 37 °C. Comparando o comportamento do PHB com o eletrodo modificado com GQD, a I<sub>pa</sub> aumentou de 13,09 para 15,15  $\mu$ A ( $\Delta I = 2,06 \mu$ A), sugerindo que o PHB foi imobilizado com sucesso na superfície do eletrodo. O efeito está possivelmente relacionado com a inserção das partículas de PHB na superfície do SPE, as quais atuam possibilitando um rearranjo do GQD, expondo uma maior área de eletroativa, que resulta em uma melhor interação da superfície. com a sonda durante as reações redox, e consequentemente é registrado um aumento do I<sub>pa</sub>. A próxima etapa consistiu no ancoramento RBD sobre PHB.

Uma vez que as partículas poliméricas interagem e se ligam espontaneamente (*self-assemble*) com as proteínas expressas que apresentam o domínio SBD-RBD, a simples adição e incubação permite a formação de uma ligação entre o polímero e a proteína. O mecanismo de interação ainda não é claro, mas essa interação já é descrita em literatura [177]. Essa etapa consistiu na adição e incubação de 2,0 µL da solução de RBD (0,47 µg mL<sup>-1</sup>) na superfície do E.T., a incubação foi realizada em atmosfera saturada de água a 37 °C, inicialmente durante uma hora. Essa condição de atmosfera saturada em água permite que a incubação seja realizada a 37 °C, pois evita que a solução proteica seque na superfície do dispositivo, efeito que pode causar desnaturação das proteínas. Além disso, o aumento de temperatura, bem como estabilidade, favorece a cinética de ligação entre o RBD e o PHB sem comprometer a conformação da proteína. Após a incubação, o eletrodo foi lavado 3 vezes por imersão em solução de PBS e, em seguida, o excesso de PBS foi seco e as medidas de CV foram realizadas.

Após a imobilização do RBD, o voltamograma registrado apresenta diminuição da intensidade de pico catódico e anódico,  $\Delta I_{pa} = -2,36 \mu A$ . O RBD bloqueia a superfície e, sendo assim, atua como isolante que compromete a área eletroativa. Ainda, o arranjo geométrico da proteína pode atuar acrescentando um impedimento estérico, e consequentemente, prejudicando o acesso da sonda à superfície do eletrodo de trabalho. Sendo assim, a diminuição da corrente observada pode ser atribuída à imobilização do RBD na superfície do dispositivo.

O próximo passo consistiu em bloquear sítios ativos remanescentes que não foram ocupados pelo RBD. Nessa etapa, foi utilizado BSA como agente de bloqueio, uma vez que se apresenta como proteína inerte. Para isso, 2,0 µL de BSA (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) foram adicionados e incubados a 37 °C durante 15 minutos, em atmosfera saturada de água, lavado 3 vezes em PBS por imersão, seco e então realizadas as medidas de CV. O BSA se liga aos sítios ativos remanescentes e faz com que a interação de proteínas-alvo com a superfície do dispositivo

ocorra majoritariamente através de interação ou ligação com o RBD ancorado na superfície. Então, o BSA se faz essencial para a construção de uma camada seletiva na superfície do SPE. O processo de ancoragem foi avaliado pela diminuição da intensidade do  $I_{pa}$  ( $\Delta I = 2,45 \mu A$ ), pois o BSA, análogo ao RBD, atua como isolante elétrico, bloqueia os sítios eletroativos e ocasiona um impedimento geométrico.

A detecção dos anticorpos IgG (1,0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) contra o domínio RBD (AbS) é baseada na interação dos anticorpos (analito) e o RBD ancorado na superfície do eletrodo. A interação antígeno-anticorpo leva a formação do imunocomplexo RBD-AbS. O complexo RBD-AbS cria um efeito isolante e impedimento estérico, que afeta a interação entre a sonda redox e a superfície do eletrodo, levando a uma diminuição do sinal faradaico. Então, como esperado as medidas de CV mostraram uma redução de I<sub>pa</sub> de 2,32  $\mu$ A, conforme mostrado na FIGURA 40B - AbS.

O processo de ancoramento foi então confirmado através de imagens de MEV acoplado com EDS. Sendo as etapas de ancoramento do PHB e RBD avaliadas e mostradas na FIGURA 41 e 42 respectivamente. FIGURA 41: IMAGEM DE MEV OBTIDA PARA A SUPERFÍCIE DO SPE MODIFICADO COM GQD E PHB, MAGNITUDE DE AMPLIAÇÃO DE 3,22 KX. (B) MAPEAMENTO QUÍMICO PARA ATOMOS DE OXIGÊNIO OBTIDO PARA IMAGEM DE MEV REPRESENTADA EM (A). (C) MAPEAMENTO QUÍMICO DE ATOMOS DE NITROGÊNIO OBTIDO PARA IMAGEM DE MEV REPRESENTADA EM (A).



FONTE: O autor.

A partir das imagens de MEV é possível perceber que as partículas de PHB se apresentam como estruturas esférica. As partículas se apresentam diretamente ligadas a superfície do dispositivo, é observado também a formação de aglomerados. Observa-se também estruturas cristalinas brancas e quase simétricas que são atribuídas ao NaCl advindo do PBS, mesmo após sucessivos enxagues com água ainda são observados os cristais. O mapeamento químico de átomos de oxigênio, FIGURA 41 B, apresenta um acúmulo de átomos de oxigênio com posição sobreposta às partículas de PHB, oriundo da estrutura do PHB. Entretanto, especula-se que a interação do PHB com a superfície ocorra com maior afinidade pelas regiões nas quais o GQD foi depositado, nesse caso o acúmulo de oxigênio seria uma soma da contribuição do GQD com o PHB. O mapeamento químico de átomos de nitrogênio, FIGURA 41 C, não mostrou nenhum padrão de deposição de nitrogênio nessa etapa, que era esperado uma vez que nenhum dos constituintes modificadores apresenta nitrogênio em sua composição. A partir disso foi avaliado o processo de ancoramento das proteínas na superfície do PHB, também por MEV EDS, representado na FIGURA 42.

FIGURA 42: IMAGEM DE MEV OBTIDA PARA A SUPERFÍCIE DO SPE MODIFICADO COM GQD, PHB E RBD, MAGNITUDE DE AMPLIAÇÃO DE 10 KX COM MAPEAMENTO QUÍMICO PARA ATOMOS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO SOBREPOSTO À IMAGEM.





A imagem de MEV apresentada na FIGURA 42 foi focalizada e centralizada em uma partícula de PHB, da qual foi então realizado o mapeamento químico para átomos de oxigênio e nitrogênio. Nesse caso, o registro da imagem com mapeamento ocorreu após a etapa de incubação, e consequentemente ancoramento, do RBD. Análogo ao verificado no mapeamento anterior, o acúmulo de oxigênio, que é registrado como pontos azuis na imagem, ocorre majoritariamente na superfície da partícula. Por outro lado, o mapeamento para átomos de

nitrogênio, registrado como pontos verdes, mostrou também um acúmulo sobre a superfície do PHB, que está relacionado com o ancoramento do RBD na superfície do biopolímero. O resultado reforça o observado nos dados obtidos por voltametria que sugerem o ancoramento do RBD na superfície do PHB.

A partir disso, verificou-se a influência do GQD no processo de construção e avaliação do dispositivo. Uma vez que o ancoramento das proteínas ocorre mais pronunciadamente na superfície do PHB, o seguinte estudo visa verificar a necessidade da utilização do GQD, tanto no processo de construção da camada seletiva quanto como amplificador de corrente. Os resultados obtidos de comparativo do dispositivo com e sem GQD estão representados na FIGURA 43.

FIGURA 43: (A) DADOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA SUMARIZADOS PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DOS IMUNOSSENSORES – COM E SEM GQD. (B) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS UTILIZANDO O IMUNOSSENSOR CONSTRUÍDO SEM GQD EM ENSAIO UTILIZANDO AMOSTRA DE SORO NEGATIVO, SONDA  $K_3$ [Fe(CN)<sub>6</sub>] 2,0 mmol L<sup>-1</sup>, TAMPÃO PBS PH 7,4 COMO ELETRÓLITO SUPORTE E 50 mV s<sup>-1</sup> VELOCIDADE DE VARREDURA. (C) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS UTILIZANDO O IMUNOSSENSOR CONSTRUÍDO SEM GQD EM ENSAIO UTILIZANDO UTILIZANDO AMOSTRA DE SORO POSITIVO, SONDA  $K_3$ [Fe(CN)<sub>6</sub>] 2,0 mmol L<sup>-1</sup>, TAMPÃO PBS PH 7,4 COMO ELETRÓLITO SUPORTE E 50 mV s<sup>-1</sup> VELOCIDADE DE VARREDURA.





A FIGURA 43A representa a variação de corrente de pico após cada etapa de construção para os dois imunossensores preparados. A partir dos resultados é possível observar que os dois dispositivos apresentam perfil de resposta semelhante para as etapas de construção, essencialmente a diminuição da I<sub>pa</sub> a cada etapa de imobilização proteica. As principais diferenças entre os dois dispositivos residem em três principais características:

- (1) Menor desvio padrão para cada etapa de construção do dispositivo com GQD;
- (2)  $\Delta I_{pa}$  do sinal PHB-RBD para o dispositivo com GQD é mais pronunciado;

(3) Maior diferença de  $\Delta I_{pa}$  entre a etapa BSA-ABS para o dispositivo com GQD.

O menor desvio padrão se relaciona com uma melhor acomodação do PHB na superficie do dispositivo quando há GQD depositado. O efeito acontece em virtude da interação dos grupos funcionais presentes na superficie do GQD com o PHB, que é rico em grupos oxigenados. A melhor acomodação do PHB permite que mais RBD seja ancorado e permaneça estável na superfície, o que acarreta em uma maior magnitude de variação da I<sub>pa</sub>, 46% em relação ao  $\Delta$ I<sub>pa</sub> sem GQD, para a etapa de ancoramento do RBD, uma vez que a proteína atua bloqueando a área eletroativa e inserindo um fator geométrico de impedimento estérico. Por fim e alicerçado pela melhor acomodação do PHB e também maior quantidade de RBD superficial, a detecção do AbS mostra um maior  $\Delta$ I<sub>pa</sub> quando comparado ao dispositivo sem GQD, 1,70 ± 0,24 µA e 1,00 ± 0,24 µA respectivamente. O efeito sugere que mais AbS interage com a superfície e forma o imunocomplexo RBD-AbS.

O dispositivo construído sem GQD também foi avaliado frente a amostras reais de soro positivo e negativo, com e sem anticorpos respectivamente. O estudo tem a finalidade de verificar a formação e estabilidade da camada seletiva na superfície do SPE, na ausência do nanomaterial, FIGURA 43B e C. A leitura de ambas as amostras evidência um problema na camada seletiva. A FIGURA 43B mostra um aumento da corrente faradaica após a incubação do soro negativo, o que pode estar associado a lixiviação do PHB e, consequentemente, dos componentes do imunossensor (PHB-RBD-BSA). Por outro lado, a amostra de soro positivo, que apresenta AbS, não mostrou variação do sinal da sonda após a incubação da amostra. Apesar de não apresentar lixiviação como no soro negativo, o sinal obtido sugere que os anticorpos não interagiram suficientemente com a superfície do dispositivo, seja por adsorção ou formação do imunocomplexo. O efeito relaciona-se com ineficiência da formação da camada seletiva na superfície do dispositivo, provavelmente devido à baixa quantidade de PHB e RBD imobilizada.

Para fins de comparação, o processo de ancoramento das proteínas RBD e BSA, assim como detecção do AbS, foram avaliados pela tradicional e bem descrita rota de imobilização intermediada pela reação de ligação cruzada utilizando os reagentes EDC e NHS [190]. O mecanismo dessa reação consiste na ativação dos grupos carboxílicos superficiais, que são advindos da matriz do GQD. Inicialmente, o EDC interage com os grupos carboxílicos superficiais formando o intermediário *o*-acilureia. Esse intermediário apresenta baixa estabilidade, podendo ser substituído por aminas primárias volumosas, que nesse caso são provenientes das proteínas adicionadas, RBD e BSA. Em virtude da baixa estabilidade, a superfície ativada é passiva de hidrólise, que culmina com a regeneração dos grupos carboxílicos "livres".

Com a finalidade de mitigar o processo de hidrólise é utilizado o NHS em associação com o EDC. O NHS atua com mecanismo análogo à proteína e substitui o EDC. Agora, a superfície ativada com NHS minimiza a hidrólise e ainda, mesmo ativado com NHS, pode ser substituída por uma proteína, cuja substituição permite a formação de uma ligação covalente entre a superfície dos grupos carboxílicos e a proteína inserida. Os resultados voltamétricos obtidos para a rota de imobilização com EDC/NHS estão representados na FIGURA 44 A e B.

FIGURA 44: (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR ATRAVÉS DA ROTA COM EDC/NHS, UTILIZANDO SONDA K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 2,0 mmol L<sup>-1</sup>, PBS COMO ELETRÓLITO SUPORTE E VELOCIDADE DE VARREDURA DE 50 mV s<sup>-1</sup>. (B) GRÁFICO DE BARRAS CONSTRUÍDO PELOS DADOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA, UTILIZANDO A INTENSIDADE DE PICO ANÓDICO DA SONDA PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO DISPOSITIVO.





As etapas de construção do dispositivo, de maneira geral, apresentaram um comportamento eletroquímico semelhante ao PHB para cada etapa de ancoramento proteico. Após a etapa de reação com EDC NHS observa-se um aumento da corrente faradaica, que se relaciona com a interação eletrostática da sonda com superfície ativada, efeito que já foi observado em outros dispositivos propostos em nosso laboratório de pesquisa [83,111,191] e também na literatura [172].A imobilização do RBD, mostrou uma diminuição da intensidade de pico anódico da sonda, que sugere a imobilização uma vez que a proteína contribui com impedimento estérico e bloqueia a superfície eletródica. O mesmo comportamento é observado para imobilização do BSA, pelo mesmo motivo.

Quando é observada a resposta, na etapa de detecção de AbS usando a estratégia convencional com EDC/NHS, o dispositivo mostrou apenas 12% de redução de  $I_{pa}$  enquanto a abordagem de imobilização usando PHB mostrou uma diminuição de  $I_{pa}$  de 23% para a mesma concentração de AbS (0,47 µg mL<sup>-1</sup>). Isso indica uma maior sensibilidade para detecção de AbS quando o RBD está ancorado no PHB, o que pode ser atribuído à maior eficiência no processo de ancoragem, significando que mais RBD está ligado e disponível para interagir com o AbS.

Além de apresentar maior sensibilidade frente a rota de imobilização com EDC/NHS, o PHB ainda apresenta maior versatilidade de uso, visto que a imobilização das proteínas pode ser realizada na superfície do PHB prévio a etapa de *dropcasting* na superfície do eletrodo, o que permite que somente uma etapa de ancoramento seja efetuada. Assim, avaliou-se a construção do imunossensor explorando essa abordagem de imobilização de etapa única. Para demonstrar esta característica, uma mistura de PHB, RBD e BSA foi preparada sob as mesmas condições de concentração e tempo utilizadas em estudos prévios com PHB. Inicialmente, a dispersão de PHB foi diluída até a concentração final de 0,83 µg mL<sup>-1</sup>, em seguida 2,0 µL da solução estoque de RBD foram adicionados, resultando numa concentração final de 0,47 µg mL<sup>-1</sup> de RBD e agitado por uma hora a 4 °C. Em seguida, o BSA foi adicionado (2 µL; 1,0 mg mL<sup>-1</sup>) e agitado durante 15 minutos também a 4 °C. Essa mistura foi então inserida sobre a superfície do eletrodo de trabalho para formação da camada seletiva do imunossensor.

A construção do dispositivo foi avaliada por VC, no qual GQD foi previamente eletrodepositado, seguido da adição da mistura PHB-RBD-BSA por *dropcasting* e secagem a 37 °C (aproximadamente 30 minutos). Os resultados obtidos estão sumarizados na FIGURA 45.

FIGURA 45: (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR ATRAVÉS DA ROTA DE IMOBILIZAÇÃO DA MISTURA, UTILIZANDO SONDA  $K_3$ [Fe(CN)<sub>6</sub>] 2,0 mmol L<sup>-1</sup>, PBS COMO ELETRÓLITO SUPORTE E VELOCIDADE DE VARREDURA DE 50 mV s<sup>-1</sup>. (B) GRÁFICO DE BARRAS CONSTRUÍDO PELOS DADOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA, UTILIZANDO A INTENSIDADE DE PICO ANÓDICO DA SONDA PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO DISPOSITIVO.



FONTE: O autor.

Os voltamogramas cíclicos mostram um aumento do I<sub>pa</sub> após a eletrodeposição do GQD, como esperado e já observado em estudos anteriores. Após o *dropcasting* da mistura observase uma diminuição do I<sub>pa</sub>. Essa diminuição está associada à imobilização da mistura e seus constituintes proteicos, que bloqueiam parcialmente a superfície eletroativa. Por fim, a detecção do AbS mostra diminuição da corrente faradaica ( $\Delta$ I<sub>pa</sub> = 3,08 µA), que sugere a formação do imunocomplexo com o RBD superficial, cujo resultado é comparável com a detecção do AbS no dispositivo construído através das etapas separadas ( $\Delta$ I<sub>pa</sub> = 2,94 µA).

Portanto os estudos mostraram que o PHB apresentou potencialidade para ancoramento das proteínas RBD e BSA, assim como permitiu a disponibilidade do epítopo da proteína RBD para interação com o AbS e consequentemente formação do imunocomplexo. Os ensaios eletroquímicos mostraram maior sensibilidade na detecção do AbS utilizando a plataforma com PHB frente à rota com EDC NHS, além de possibilitar o ancoramento prévio à inserção no dispositivo, o que possibilita a construção do imunossensor em uma única etapa. Tendo em vista isso, os parâmetros de construção do dispositivo foram avaliados visando melhorar a resposta obtida para detecção do AbS em termos de reprodutibilidade, estabilidade e sensibilidade.

#### 7.3 OTIMIZAÇÃO DOS PARAMETROS DE CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR

Como já mencionado no tópico anterior, o método proposto foi otimizado, visando aumentar a sensibilidade, reprodutibilidade e viabilidade do sensor. Portanto, foram avaliados parâmetros envolvendo a construção do sensor como eletrodeposição do GQD, modificação com PHB e imobilização do RBD (tempo e concentração).

Inicialmente a eletrodeposição do GQD foi avaliada tendo em vista o processo de ancoramento e estabilidade da superfície das proteínas, tendo em vista que há uma contraposição entre a redução dos grupos oxigenados e sua disponibilidade para ancoramento. Então, o estudo teve como base o  $\Delta I_{pa}$  da sonda para detecção da formação do imunocomplexo, ou seja, o sinal do imunossensor construído e a variação após a inserção e detecção do AbS, os resultados obtidos estão sumarizados na FIGURA 46.

FIGURA 46: GRÁFICO DE BARRAS SUMARIZANDO OS DADOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA PARA DETECÇÃO DO ANTICORPO COM DIFERENTES CICLOS DE ELETRODEPOSIÇÃO DO GQD, UTILIZANDO A INTENSIDADE DE PICO ANÓDICO DA SONDA.



FONTE: O Autor.

O estudo avaliou três, cinco e dez ciclos de eletrodeposição do GQD, no qual se observa que com três ciclos de eletrodeposição há uma limitação relacionada ao intervalo útil de detecção. Além disso, apesar de haver uma diferença visual entre o sinal do imunossensor e a detecção do AbS, não há diferença estatística no nível de 95% (t<sub>crítico</sub> 2,776 > 2,611 t<sub>calculado</sub>). Sendo assim, especula-se que com três ciclos a deposição do GQD ainda é pouco homogênea e em decorrência disso percebe-se também maiores barras de estimativa de desvio padrão para a medida de "branco" do imunossensor, que está relacionado com uma variação na quantidade de material biológico ancorado, devido à falta de homogeneidade de deposição do GQD [126,129,192].

No outro extremo, dez ciclos, observa-se diferença significativa entre as duas médias ao nível de 95% (t<sub>calculado</sub> 3,171 > 2,776 t<sub>crítico</sub>), que confirma a detecção do AbS nessa condição. Entretanto, as barras de desvio padrão ( $\pm$  DP) são aproximadamente duas vezes maior que aquelas registradas com cinco ciclos. O efeito pode estar atrelado à redução dos grupos oxigenados superficiais do GQD, durante o processo de eletrodeposição, uma vez que a maior quantidade de ciclos de eletrodeposição implica na diminuição da quantidade de grupos funcionais oxigenados superficiais, os quais participam ativamente no processo de adsorção do PHB na superfície do eletrodo [126,129,192]. Por fim, com cinco ciclos foram registrados os melhores resultados tanto relacionados ao intervalo útil de detecção quanto ao menor DP, que sugere um balanço entre a deposição homogênea do GQD e a quantidade de grupos funcionais adequadas para um ancoramento estável do PHB na superfície do eletrodo de trabalho. Portanto, cinco ciclos de deposição do GQD foram considerados como a condição ótima e utilizados para estudos posteriores.

Em seguida, a concentração do PHB adicionado foi avaliada, visto que ele atua criando uma interface de ancoramento entre a superfície do eletrodo de trabalho e a biomolécula adicionada. Para isso, a quantidade de PHB na superfície do dispositivo dita quanto de cada biomolécula será ancorada na superfície do dispositivo. O estudo avaliou diferentes diluições da suspensão de partículas de PHB na faixa de 5 µg mL<sup>-1</sup> a 0,05 µg mL<sup>-1</sup>. Para cada diluição estudada o dispositivo construído foi avaliado passo a passo por VC com a finalidade de comparar o efeito da concentração do PHB no ancoramento do RBD, BSA e detecção do AbS. Os resultados obtidos estão sumarizados na FIGURA 47.

FIGURA 47: GRÁFICO DE BARRAS SUMARIZANDO OS DADOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA OBTIDOS PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO DISPOSITIVO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PHB.



FONTE: O autor.

A maior concentração de PHB estudada (5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) apresentou comportamento voltamétrico já observado para a ancoragem RBD, uma diminuição de I<sub>pa</sub>. No entanto, o excesso de PHB gerou, indiretamente, um bloqueio da superfície após a imobilização do BSA. Como consequência, não houve variação significativa da corrente faradaica entre a leitura realizada da superfície com BSA e após incubação na presença do AbS, sugerindo que não houve formação do imunocomplexo.

A condição ótima de concentração de PHB foi obtida utilizando 0,50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de PHB, uma vez que apresentou sinal estável e bem definido para cada etapa de imobilização e com a maior magnitude de variação de I<sub>pa</sub> para a detecção do AbS ( $\Delta$ I<sub>pa</sub> = 3,74  $\mu$ A), que representa uma queda de 46% do I<sub>pa</sub> registrado na etapa do BSA. Concentrações mais baixas de PHB mostraram o mesmo comportamento eletroquímico, mas com variações de corrente menos expressivas nas etapas de imobilização, principalmente no que se refere a  $\Delta I_{pa}$  registrado para o RBD. O efeito sugere que menos proteína foi imobilizada e como consequência a sensibilidade de detecção do AbS é menor. Nesse caso, a detecção do AbS registrou uma queda do  $I_{pa}$  de 18% e 25% em relação ao sinal obtido na etapa do BSA, para 0,1 e 0,05 µg mL<sup>-1</sup> de PHB respectivamente. Portanto, 0,50 µg mL<sup>-1</sup> de PHB foi definido como a condição ideal de concentração e aplicado para estudos posteriores.

Uma vez verificada a condição ótima de concentração de PHB, a concentração de RBD foi avaliada, uma vez que essa proteína atua como elemento de reconhecimento biológico e é fundamental para a detecção seletiva dos anticorpos IgG contra o vírus da covid. A quantidade de RBD adicionada dita quanto do PHB estará decorado com a proteína e efetivamente estará disponível para interagir com o AbS. Sendo assim, a concentração de RBD afeta diretamente a sensibilidade e seletividade do método proposto. A concentração de RBD foi avaliada de 4,7 µg mL<sup>-1</sup> a 0,11 µg mL<sup>-1</sup> levando em consideração todas as etapas de montagem do dispositivo, as quais foram avaliadas por CV e estão sumarizadas na FIGURA 48.

FIGURA 48: GRÁFICO DE BARRAS SUMARIZANDO OS DADOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA OBTIDOS PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO DISPOSITIVO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE RBD.



FONTE: O autor.

A partir da análise estatística dos dados voltamétricos obtidos, não se observa diferença significativa de I<sub>pa</sub> nos voltamogramas registrados para o RBD, baseado no teste de ANOVA com 95% de confiança p<sub>calculado</sub> 0,1368 > 0,05 p. Então, a escolha da condição ótima levou em consideração majoritariamente o AIpa entre as etapas RBD e BSA. Nesse caso, a diminuição da corrente referente a imobilização do BSA pode fornecer indícios de quanto RBD está efetivamente imobilizado na superfície do dispositivo, visto que menores variações de corrente atrelados a imobilização do BSA indicam menor quantidade de BSA imobilizado, ou seja menos sítios ativos livres após a imobilização do RBD. Além disso, a maior variação do Ipa para a etapa de detecção de AbS sugere maior sensibilidade de detecção, sendo esse também um parâmetro avaliado. Assim, seria esperado que a maior concentração de RBD (4,7 µg mL<sup>-1</sup>) fornecesse a maior sensibilidade para detecção do AbS e uma menor contribuição do BSA. Entretanto, isso não foi observado, sendo a contribuição do BSA para o bloqueio da superfície eletroativa comparável com o resultado obtido para 0,23 µg mL<sup>-1</sup>, o que sugere que o RBD não está interagindo eficientemente com a superfície do PHB devido ao excesso de concentração, possivelmente devido ao efeito Hook [193,194]. Por outro lado, os resultados obtidos utilizando a concentração de 0,47 µg mL<sup>-1</sup> de RBD mostraram a menor contribuição do BSA, em termos de bloqueio da superfície eletroativa, e a maior variação de Ipa para detecção do AbS, que está relacionado com uma melhor acomodação do RBD na superfície do dispositivo. Sendo assim, 0,47 µg mL<sup>-1</sup> de RBD foi utilizado como concentração ótima para estudos posteriores.

Em seguida, foram estudados os tempos de incubação das proteínas. Uma vez que a finalidade do sensor sugerido é a aplicação como *POC*, o desenvolvimento desses dispositivos preconiza baixo tempo de ensaio associado à um baixo custo e consequentemente acessibilidade. Portanto, os ensaios relacionados a otimização de tempo visam minimizar o processo de montagem do dispositivo bem como detecção dos anticorpos. Inicialmente o tempo de incubação do RBD foi avaliado, os resultados estão sumarizados na FIGURA 49.

FIGURA 49: GRÁFICO DE BARRAS SUMARIZANDO OS DADOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA OBTIDOS PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO DISPOSITIVO COM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO DO RBD.



O estudo do tempo de incubação do RBD, FIGURA 49, não apresentou diferença na resposta voltamétrica no intervalo de tempo estudado para nenhuma das imobilizações (RBD e BSA), assim como não houve variação significativa no  $\Delta I_{pa}$  para detecção do AbS, portanto 15 minutos de incubação foi utilizado em estudos posteriores.

O tempo de incubação do AbS foi avaliado com tempos de incubação para formação do imunocomplexo RBD-AbS de 15 a 60 minutos. Os resultados observados estão sumarizados na FIGURA 50.

/FIGURA 50: GRÁFICO DE BARRAS SUMARIZANDO OS DADOS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA OBTIDOS PARA A DETECÇÃO DO AbS COM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO PARA FORMAÇÃO DO IMUNOCOMPLEXO.



O estudo do tempo de interação do anticorpo com o imunossensor, FIGURA 50, mostrou que tempos menores que 60 minutos não apresentam variação estatística significativa do  $I_{pa}$  (ANOVA 95% p<sub>calculado</sub> 0,1690 > 0,05 p) para a detecção do AbS, indicando que não há interação suficiente nesse tempo, limitada provavelmente pela cinética de formação do imunocomplexo na condição estudada. Tempos maiores que 60 minutos não foram avaliados tendo em vista a premissa dos sensores tipo POC que é a redução dos tempos de ensaio. Nesse sentido, a redução dos tempos de incubação para desenvolvimento de sensores que visam diagnóstico ainda é uma barreira a ser quebrada. Uma vez otimizado todos os parâmetros de construção do dispositivo, foi avaliado o desempenho analítico do imunossensor para detecção de AbS.

# 7.4 DESEMPENHO ANALÍTICO E ESTUDOS SOBRE O EFEITO DE MATRIZ

Para avaliar como o sensor otimizado responde a diferentes concentrações de anticorpos alvo, o imunossensor proposto foi submetido à incubação com anticorpos IgG contra o RBD do SARS-CoV-2 entre 25 µg mL<sup>-1</sup> e 50 ng mL<sup>-1</sup> diluídos em solução de PBS. Além disso, para verificar o efeito da matriz biológica (soro sanguíneo) na resposta voltamétrica, o mesmo conjunto de experimentos foi realizado usando uma amostra de soro humano negativo (para

anticorpos IgG anti-RBD) enriquecida com diferentes concentrações de AbS, os resultados foram obtidos pela técnica de DPV e estão resumidos na FIGURA 51.

FIGURA 51: CURVAS ANALÍTICAS CONTRUÍDAS ATRAVÉS DOS DADOS OBTIDOS POR DPV PARA CONCENTRAÇÃO DE AbS VARIANDO DE 10 μg mL<sup>-1</sup> A 100 ng mL<sup>-1</sup>NAS MATRIZES DE PBS E SORO NEGATIVO ENRIQUECIDAS.



FONTE: O autor.

Para ambos os estudos, observou-se uma relação entre a diminuição do sinal faradaico e a concentração de AbS de 100 ng mL<sup>-1</sup> até 10 µg mL<sup>-1</sup>. Além disso, as medidas registradas com AbS na concentração de 25 µg mL<sup>-1</sup> não mostraram variação no sinal voltamétrico. Esse comportamento pode estar relacionado ao efeito *Hook*, que é um fenômeno pelo qual a eficácia dos anticorpos em interagir e formar um imunocomplexo é prejudicada quando a concentração de um anticorpo ou antígeno é muito alta. Assim, a formação do imunocomplexo é minimizada com concentrações mais altas [193,194]. A curva de correlação obtida em solução de PBS mostrou maior sensibilidade à detecção de AbS em comparação com a amostra de soro humano fortificada, baseado nas equações ( $\Delta I_{soro}$  (%) = 86.47 – 9.80 log( $C_{AbS}$ ) e ( $\Delta I_{PBS}$  (%) = 78.86 – 12.89 log( $C_{AbS}$ ) e o LOD foi definido como a menor concentração detectável, 100 ng mL<sup>-</sup> <sup>1</sup>.Nesse sentido, observou-se uma sensibilidade menor com o uso de soro humano quando comparado à solução de PBS.

A avaliação do efeito de matriz na resposta analítica de imunossensores eletroquímicos é crucial para aplicação visando diagnóstico, pois a complexidade da matriz pode levar a interações inespecíficas resultando em um sinal falso-positivo. O desempenho analítico sugeriu pequeno efeito da matriz na resposta voltamétrica, o que não foi considerado um inconveniente para o imunossensor, uma vez que a amostra biológica utilizada é uma matriz muito complexa.

A combinação do GQD com o PHB como plataforma para ancorar proteínas e/ou outros componentes biológicos deve ser destacada, pois é uma forma rápida e viável de construir imunossensores. O desempenho geral e o tempo de montagem do sistema GQD-PHB são comparáveis com a literatura, que ressalta a competitividade da aplicação quando comparada a metodologias bem estabelecidas. A Tabela 1 resume outros trabalhos destinados a detecção do COVID utilizando estratégias conhecidas e ou bem definidas para montagem dos imunossensores.

TABELA 2: COMPARATIVO ENT	<b>RE DIFERENTES DISPOSIT</b>	<b>IVOS PARA DETECO</b>	ÇÃO DE ANTICORPOS E PROTI	EÍNAS DO SARS-COV-2.	
Sistema de ancoramento	Alvo (Analito)	LOD	Amostra	Tempo de montagem	Ref.
SPAuE-Peptídeo	Proteína S	18,2 ng mL <sup>-1</sup>	Swab Nasofaringeal	120 min.	[195]
Au-Anti-RBD	Proteína S	$0,1 \text{ mg mL}^{-1}$	Soro Humano	1-3 dias	[196]
Grafeno - Anti-S-RBD	Anti-S (IgG / IgM)	ND	Sangue e saliva	315 min.	[197]
NCM	Anticorpos	$0,77 \text{ ng mL}^{-1}$	PBS	240 min.	[198]
SPCE-NCM	Anti-N (IgG)	2 ng mL <sup>-1</sup>	Soro Humano	60 min	[74]
SPE-CB	Proteína S / N	19 e 8 ng mL <sup>-1</sup>	Saliva	90 min.	[199]
Co-TiO <sub>2</sub> nanotubos	Proteína S	14 nM	Swab Nasofaringeal e	N.D.	[200]
			saliva		
ePAD-GO	Anti-S (IgG / IgM)	$0,11 \text{ ng mL}^{-1}$	Soro Humano	180 min.	[201]
SPE-GQD-PHB	Anti-S (IgG)	$100 \text{ ng mL}^{-1}$	Soro Humano	120 min.	Este trabalho
Stencil printed carbon electrode - Si	PCE; Screen-printed Au Elect	trode – SPAuE; Nitroce	elullose membrane - NCM; Screer	1 printed electrode - SPE; Polyhyd	lroxibutirate - PHB;

Graphene Quantum Dots - GQD; Carbon Black - CB; Graphene oxide - GO; electrochemical paper-based analytical device - ePAD. Stenc

107
# 7.5 SELETIVIDADE DA RESPOSTA DO IMUNOSSENSOR E ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SORO

A seletividade é um dos principais requisitos para que um imunossensor seja viável, visto que resultados falsos positivos são comuns e um obstáculo a ser superado na maioria dos métodos de detecção e diagnóstico em matrizes biológicas. A seletividade do sensor proposto foi testada em matriz de soro negativo enriquecida com anticorpos contra a febre amarela (FA), o resultado obtido foi comparado com a detecção dos anticorpos Anti-S na presença de anticorpos contra FA. Além disso, o dispositivo proposto foi avaliado frente a diferenciação de amostras de soro positivo e negativo. Os resultados obtidos estão representados na FIGURA 52.

FIGURA 52: (A) RESULTADOS OBTIDOS POR DPV SUMARIZADOS PARA O ENSAIO DE SELETIVIDADE EM AMOSTRA DE SORO NEGATIVO ENRIQUECIDA COM AbS e FA. (B) DPV REPRESENTANDO A DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DOS SOROS POSITIVO E NEGATIVO. (C) RESULTADOS OBTIDOS POR DPV SUMARIZADOS PARA O ENSAIO DE DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE AMOSTRAS DE SORO NEGATIVO E POSITIVO.



Conforme observado na FIGURA 52A, não há diferença estatística, no nível de 95%, entre o sinal obtido antes e após a incubação do soro enriquecido com anticorpos de controle (FA) ( $t_{calculado} - 1,243 \le 2,776 - t_{crítico}$ ). O resultado observado é um indicativo de que a camada seletiva não interagiu de maneira inespecífica com os constituintes do soro negativo, assim como com os anticorpos contra a FA.

Também foi realizada a avaliação do soro negativo fortificado com AbS na presença de FA. O ensaio mostra uma diminuição da corrente faradaica, proporcionada essencialmente pela interação dos AbS com o RBD da camada seletiva. Sendo assim sugere-se que os anticorpos contra FA não apresentam competição ou interferência significativa na detecção dos AbS em matriz de soro sanguíneo humano. Assim, foi possível verificar que o sensor proposto apresentou pouca interação com a matriz da amostra, que aliado a seletividade, permitiu a diferenciação de 0,50 µg mL<sup>-1</sup> de anticorpos específicos contra a proteína RBD do SARS-CoV-2 na matriz da amostra negativa. Apesar do número de anticorpos nas amostras depender do sistema imunológico do paciente e da cronologia da doença, variando em uma ampla faixa, o sistema GQD-PHB-RBD pode auxiliar na avaliação de uma resposta imunogênica.

Uma vez que o sensor proposto mostrou potencialidade de aplicação foram avaliadas amostras de soro humano positivas e negativas (1000x diluídas). A Fig. 52B mostra medidas representativas de DPV realizadas usando o imunossensor proposto. De modo geral, as medidas de amostras de soro negativas não alteraram o sinal redox, enquanto as amostras de soro positivas para COVID-19 diminuíram o I<sub>pa</sub>. Amostras de soro negativo, de modo geral, não mostraram diferença estatística no nível de 95%, em relação ao sinal em branco (t<sub>calculado</sub> < t<sub>crítico</sub>). No entanto, a amostra 2- mostrou uma diferença estatística (t<sub>calculado</sub> 2,35 > t<sub>crítico</sub> 2,306), indicando um teste falso positivo.

As amostras de soro positivo evidenciaram diferença estatística entre o sinal do branco e a amostra ( $t_{calculado} > t_{crítico}$  2,306) para todas as amostras analisadas, diferenciando claramente os positivos dos negativos. Nesse caso, das oito amostras de soro analisadas apenas um falso positivo foi obtido e nenhum falso negativo foi registrado. Assim, cerca de 87,5% das amostras investigadas forneceram resultados adequados, mas um conjunto de amostras mais significativo deve ser avaliado para determinar a eficácia do dispositivo e sua confiabilidade como um dispositivo POC.

#### 8 CONCLUSÕES PARCIAIS

Embora descoberto em 1925, o PHB ainda é pouco estudado e aplicado no desenvolvimento de biossensores, em especial eletroquímicos. Esse material possui grande potencial para o desenvolvimento de dispositivos *POC*, pois apresenta baixo custo, fácil obtenção e pode ser escalado para produção industrial. Além disso, a possibilidade de adicionar domínios de ligação para interação específica com o PHB e produzir micro e nanoestruturas torna o material muito versátil. No presente estudo, o PHB apresentou melhores resultados do que a tradicional reação para imobilização de proteínas - EDC/NHS. O sensor proposto mostrou seletividade contra anticorpos de Febre Amarela e possibilitou diferenciar amostras de soro negativas e positivas com resultados comparáveis aos da literatura. Além disso, foi possível imobilizar proteínas diretamente no PHB, prévio a adsorção no SPE, que indica possibilidade de uma redução drástica nos tempos de construção do dispositivo. O GQD apresentou papel fundamental na construção do imunossensor proposto uma vez que criou uma interface adequada a criação da camada seletiva na superfície do SPE, que garantiu seletividade do dispositivo frente as amostras reais e a febre amarela.

### 9 CONCLUSÕES GERAIS

Os imunossensores eletroquímicos apresentam grande potencialidade para o desenvolvimento de dispositivos *POC*, devido ao baixo custo e acessibilidade. Entretanto, ainda é necessário o desenvolvimento de plataformas mais simples, com menores tempos de preparo e ensaios de detecção, para que seja competitivo frente aos métodos atuais já estabelecidos. Nesse sentido, são diversas as pesquisas relacionadas a novos eletrodos, que sejam mais robustos e baratos, como é o caso do Proto-pasta impresso por FDM. Assim como, novas plataformas para ancoramento de proteínas, que atendam aos requisitos de acessibilidade e simplicidade técnica, como o aqui reportado GQD e PHB. Os dispositivos se mostraram adequados ao propósito de detecção das proteínas estudadas, mas ainda existe uma lacuna relacionado a viabilidade de aplicação desses sensores em situações clínicas rotineiras que remete a menores tempos de preparo e incubação, construção da camada seletiva e preparo de amostras. A construção de dispositivos mais robustos, que permitam a utilização de amostras sem diluição por exemplo, ainda é um desafio que barra a aplicação dos imunossensores eletroquímicos em sistemas clínicos.

### REFERÊNCIAS

- Gross BC, Erkal JL, Lockwood SY, Chen C, Spence DM. Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences.
   Analytical Chemistry 2014;86:3240–53. https://doi.org/10.1021/ac403397r.
- [2] Gross B, Lockwood SY, Spence DM. Recent advances in analytical chemistry by
   3D printing. Analytical Chemistry 2017;89:57–70. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04344.
- [3] Bracci R, Maccaroni E, Cascinu S. Transient Sunitinib Resistance in Gastrointestinal Stromal Tumors. New England Journal of Medicine 2013;368:2042–3. https://doi.org/10.1056/nejmc1301237.
- [4] Haselhuhn AS, Gooding EJ, Glover AG, Anzalone GC, Wijnen B, Sanders PG, et al. Substrate Release Mechanisms for Gas Metal Arc Weld 3D Aluminum Metal Printing. 3D Printing and Additive Manufacturing 2014;1:204–9. https://doi.org/10.1089/3dp.2014.0015.
- [5] Zhang C, Anzalone NC, Faria RP, Pearce JM. Open-Source 3D-Printable Optics Equipment. PLoS ONE 2013;8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059840.
- [6] Carrilho E, Martinez AW, Whitesides GM. Understanding wax printing: A simple micropatterning process for paper-based microfluidics. Analytical Chemistry 2009;81:7091–5. https://doi.org/10.1021/ac901071p.
- Soloviova O. 3D Printing Technology. Applied Geometry and Engineering Graphics 2020;0:136–48. https://doi.org/10.32347/0131-579x.2020.97.136-148.
- [8] Bhattacharjee N, Urrios A, Kang S, Folch A. The upcoming 3D-printing revolution in microfluidics. Lab on a Chip 2016;16:1720–42. https://doi.org/10.1039/c6lc00163g.
- [9] Ambrosi A, Pumera M. 3D-printing technologies for electrochemical applications.
   Chemical Society Reviews 2016;45:2740–55. https://doi.org/10.1039/c5cs00714c.
- [10] Hager I, Golonka A, Putanowicz R. 3D Printing of Buildings and Building Components as the Future of Sustainable Construction? Procedia Engineering 2016;151:292–9. https://doi.org/10.1016/j.proeng.2016.07.357.

- [11] Mohammed JS. Applications of 3D printing technologies in oceanography.
   Methods in Oceanography 2016;17:97–117. https://doi.org/10.1016/j.mio.2016.08.001.
- [12] Maroulakos M, Kamperos G, Tayebi L, Halazonetis D, Ren Y. Applications of 3D printing on craniofacial bone repair: A systematic review. Journal of Dentistry 2019;80:1–14. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.11.004.
- [13] Ma H, Feng C, Chang J, Wu C. 3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy. Acta Biomaterialia 2018;79:37–59. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.026.
- [14] Ho CMB, Ng SH, Li KHH, Yoon YJ. 3D printed microfluidics for biological applications. Lab on a Chip 2015;15:3627–37. https://doi.org/10.1039/c51c00685f.
- [15] Au AK, Huynh W, Horowitz LF, Folch A. 3D-Printed Microfluidics. Angewandte Chemie - International Edition 2016;55:3862–81. https://doi.org/10.1002/anie.201504382.
- [16] Foster CW, Down MP, Zhang Y, Ji X, Rowley-Neale SJ, Smith GC, et al. 3D
   Printed Graphene Based Energy Storage Devices. Scientific Reports 2017;7:1–
   11. https://doi.org/10.1038/srep42233.
- [17] Leigh SJ, Bradley RJ, Purssell CP, Billson DR, Hutchins DA. A Simple, Low-Cost Conductive Composite Material for 3D Printing of Electronic Sensors. PLoS ONE 2012;7:1–6. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049365.
- [18] Katseli V, Economou A, Kokkinos C. Single-step fabrication of an integrated 3D-printed device for electrochemical sensing applications. Electrochemistry Communications 2019;103:100–3.

https://doi.org/10.1016/j.elecom.2019.05.008.

- [19] Foster CW, Zou G, Jiang Y, Down MP, Liauw CM, Garcia-Miranda Ferrari A, et al. Next-Generation Additive Manufacturing: Tailorable Graphene/Polylactic(acid) Filaments Allow the Fabrication of 3D Printable Porous Anodes for Utilisation within Lithium-Ion Batteries. Batteries & Supercaps 2019;2:448–53. https://doi.org/10.1002/batt.201800148.
- [20] Yang C, Cao Q, Puthongkham P, Lee ST, Ganesana M, Lavrik N V., et al. 3D-Printed Carbon Electrodes for Neurotransmitter Detection. Angewandte Chemie

- [21] Xu X, Zhang S, Chen H, Kong J. Integration of electrochemistry in micro-total analysis systems for biochemical assays: Recent developments. Talanta 2009;80:8–18. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.06.039.
- [22] Sassa F, Morimoto K, Satoh W, Suzuki H. Electrochemical techniques for microfluidic applications. Electrophoresis 2008;29:1787–800. https://doi.org/10.1002/elps.200700581.
- [23] Nyholm L. Electrochemical techniques for lab-on-a-chip applications. Analyst 2005;130:599–605. https://doi.org/10.1039/b415004j.
- [24] Kadimisetty K, Song J, Doto AM, Hwang Y, Peng J, Mauk MG, et al. Fully 3D printed integrated reactor array for point-of-care molecular diagnostics.
   Biosensors and Bioelectronics 2018;109:156–63. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.03.009.
- [25] O'Neill PF, Ben Azouz A, Vázquez M, Liu J, Marczak S, Slouka Z, et al. Advances in three-dimensional rapid prototyping of microfluidic devices for biological applications. Biomicrofluidics 2014;8. https://doi.org/10.1063/1.4898632.
- [26] Cruz AFD, Norena N, Kaushik A, Bhansali S. A low-cost miniaturized potentiostat for point-of-care diagnosis. Biosensors and Bioelectronics 2014;62:249–54. https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.06.053.
- [27] Bishop GW, Satterwhite JE, Bhakta S, Kadimisetty K, Gillette KM, Chen E, et al.
   3D-Printed fluidic devices for nanoparticle preparation and flow-injection amperometry using integrated prussian blue nanoparticle-modified electrodes.
   Analytical Chemistry 2015;87:5437–43. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00903.
- [28] Krejcova L, Nejdl L, Rodrigo MAM, Zurek M, Matousek M, Hynek D, et al. 3D printed chip for electrochemical detection of influenza virus labeled with CdS quantum dots. Biosensors and Bioelectronics 2014;54:421–7. https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.10.031.
- [29] Rymansaib Z, Iravani P, Emslie E, Medvidović-Kosanović M, Sak-Bosnar M, Verdejo R, et al. All-Polystyrene 3D-Printed Electrochemical Device with Embedded Carbon Nanofiber-Graphite-Polystyrene Composite Conductor. Electroanalysis 2016;28:1517–23. https://doi.org/10.1002/elan.201600017.

- [30] Argollo APB, Faustino TN, Faustino TN, Pedreira LC. Portable blood glucose meter values using different sampling ways: a validity study. Revista Brasileira de Terapia Intensiva 2010;22:351–7.
- [31] Lawrence CM, Menon S, Eilers BJ, Bothner B, Khayat R, Douglas T, et al. Structural and functional studies of archaeal viruses. Journal of Biological Chemistry 2009;284:12599–603. https://doi.org/10.1074/jbc.R800078200.
- [32] Koonin E V., Senkevich TG, Dolja V V. The ancient virus world and evolution of cells. Biology Direct 2006;1:1–27. https://doi.org/10.1186/1745-6150-1-29.
- [33] Nathan AJ, Scobell A. How China sees America. vol. 91. 2012. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004.
- [34] Earn DJD, Dushoff J, Levin SA. Ecology and evolution of the flu. Trends in Ecology and Evolution 2002;17:334–40. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02502-8.
- [35] Breitbart M, Rohwer F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? Trends in Microbiology 2005;13:278–84. https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.04.003.
- [36] David D. Chaplin. Overview of the Immune Response. J Allergy Clin Immunol 2010;125. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980.Overview.
- [37] David D. Chaplin. Overview of the Immune Response. J Allergy Clin Immunol 2010;125. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980.Overview.
- [38] No Title n.d.
- [39] Sela-Culang I, Kunik V, Ofran Y. The structural basis of antibody-antigen recognition. Frontiers in Immunology 2013;4:1–13. https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00302.
- [40] No Title n.d.
- [41] Sela-Culang I, Kunik V, Ofran Y. The structural basis of antibody-antigen recognition. Frontiers in Immunology 2013;4:1–13. https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00302.
- [42] Nathan AJ, Scobell A. How China sees America. vol. 91. 2012. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004.
- [43] Schmaljohn C, Hjelle B. Hantaviruses: A Global Disease Problem. Emerging Infectious Diseases 1997;3:95–104. https://doi.org/10.3201/eid0302.970202.

- [44] Vaheri A, Strandin T, Hepojoki J, Sironen T, Henttonen H, Mäkelä S, et al. Uncovering the mysteries of hantavirus infections. Nature Reviews Microbiology 2013;11:539–50. https://doi.org/10.1038/nrmicro3066.
- [45] Muyangwa M, Martynova E V., Khaiboullina SF, Morzunov SP, Rizvanov AA. Hantaviral proteins: Structure, functions, and role in hantavirus infection.
   Frontiers in Microbiology 2015;6:1–10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01326.
- [46] Muyangwa M, Martynova E V., Khaiboullina SF, Morzunov SP, Rizvanov AA. Hantaviral proteins: Structure, functions, and role in hantavirus infection.
   Frontiers in Microbiology 2015;6:1–10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01326.
- [47] Bi Z, Formenty PBH, Roth CE. Hantavirus infection: a review and global update.J Infect Dev Ctries 2008;2:3–23. https://doi.org/10.3855/jidc.317.
- [48] Lee HW, Lee RW, Johnson KM. Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. Journal of Infectious Diseases 1978;137:298–308. https://doi.org/10.1093/infdis/137.3.298.
- [49] Jonsson CB, Figueiredo LTM, Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. Clinical Microbiology Reviews 2010;23:412–41. https://doi.org/10.1128/CMR.00062-09.
- [50] Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist Å, Henttonen H, Plyusnin A, Vaheri A. Hantavirus infections in Europe. Lancet Infectious Diseases 2003;3:653–61. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00774-6.
- [51] Pereira SS, Moreira-Dill LS, Morais MSS, Prado NDR, Barros ML, Koishi AC, et al. Novel camelid antibody fragments targeting recombinant nucleoprotein of Araucaria hantavirus: A prototype for an early diagnosis of hantavirus pulmonary syndrome. PLoS ONE 2014;9:1–11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108067.
- [52] Avšič-Županc T, Saksida A, Korva M. Hantavirus infections. Clinical Microbiology and Infection 2019;21:e6–16. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12291.
- [53] Colavecchia SB, Edelstein A, Miguel SDL, Rabinovich RD, Segura EL. Development and evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay based on Andes hantavirus recombinant nucleoprotein 2017;49:149–55.

- [54] Colavecchia SB, Edelstein A, Miguel SDL, Rabinovich RD, Segura EL. Development and evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay based on Andes hantavirus recombinant nucleoprotein 2017;49:149–55.
- [55] Partners in Health. Partners In Health Guide | COVID-19. Part I: Testing, Contact Tracing and Community Management of COVID-19. 2020.
- [56] Bunney PE, Zink AN, Holm AA, Billington CJ, Kotz CM. Orexin activation counteracts decreases in nonexercise activity thermogenesis (NEAT) caused by high-fat diet. Physiology and Behavior 2017;176:139–48. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- [57] Long C, Xu H, Shen Q, Zhang X, Fan B, Wang C, et al. Diagnosis of the Coronavirus disease (COVID-19): rRT-PCR or CT? European Journal of Radiology 2020;126:108961. https://doi.org/10.1016/J.EJRAD.2020.108961.
- [58] Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR.
  Eurosurveillance 2020;25. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
- [59] Rafael RDMR, Neto M, Carvalho MMB de, David HMSL, Acioli S, Faria MG de A. Epidemiologia, políticas públicas e pandemia de Covid-19: o que esperar no Brasil? [Epidemiology, public policies and Covid-19 pandemics in Brazil: what can we expect?] [Epidemiologia, políticas públicas y la pandémia de Covid-19 en Brasil: que podemos esperar?]. Revista Enfermagem UERJ 2020;28:e49570. https://doi.org/10.12957/reuerj.2020.49570.
- [60] Huang Y, Yang C, Xu X feng, Xu W, Liu S wen. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. Acta Pharmacologica Sinica 2020;41:1141–9. https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4.
- [61] Yamamoto V, Bolanos JF, Fiallos J, Strand SE, Morris K, Shahrokhinia S, et al. COVID-19: Review of a 21st Century Pandemic from Etiology to Neuropsychiatric Implications. Journal of Alzheimer's Disease 2020;77:459–504. https://doi.org/10.3233/JAD-200831.
- [62] Alexandridi M, Mazej J, Palermo E, Hiscott J. The Coronavirus pandemic 2022: Viruses, variants & vaccines. Cytokine & Growth Factor Reviews 2022;63:1–9. https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2022.02.002.

- [63] Berlin DA, Gulick RM, Martinez FJ. Severe Covid-19. New England Journal of Medicine 2020;383:2451–60. https://doi.org/10.1056/NEJMcp2009575.
- [64] Yüce M, Filiztekin E, Özkaya KG. COVID-19 diagnosis A review of current methods. Biosensors and Bioelectronics 2021;172:112752. https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2020.112752.
- [65] Gomes-Filho SLR, Dias ACMS, Silva MMS, Silva BVM, Dutra RF. A carbon nanotube-based electrochemical immunosensor for cardiac troponin T.
   Microchemical Journal 2013;109:10–5. https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.033.
- [66] Trindade EKG, Dutra RF. A label-free and reagentless immunoelectrode for antibodies against hepatitis B core antigen (anti-HBc) detection. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2018;172:272–9. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.050.
- [67] Suresh L, Bondili JS, Brahman PK. Development of proof of concept for prostate cancer detection: an electrochemical immunosensor based on fullerene-C60 and copper nanoparticles composite film as diagnostic tool. Materials Today Chemistry 2020;16. https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2020.100257.
- [68] Li G, Liu C, Zhang X, Luo P, Lin G, Jiang W. Highly photoluminescent carbon dots-based immunosensors for ultrasensitive detection of aflatoxin M1 residues in milk. Food Chemistry 2021;355. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129443.
- [69] He P, Wang Z, Zhang L, Yang W. Development of a label-free electrochemical immunosensor based on carbon nanotube for rapid determination of clenbuterol.
   Food Chemistry 2009;112:707–14. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.116.
- [70] Braiek M, Rokbani KB, Chrouda A, Mrabet B, Bakhrouf A, Maaref A, et al. An electrochemical immunosensor for detection of Staphylococcus aureus bacteria based on immobilization of antibodies on self-assembled monolayers-functionalized gold electrode. Biosensors 2012;2:417–26. https://doi.org/10.3390/bios2040417.
- [71] Gogola JL, Martins G, Gevaerd A, Blanes L, Cardoso J, Marchini FK, et al. Labelfree aptasensor for p24-HIV protein detection based on graphene quantum dots as

an electrochemical signal amplifier. **Analytica Chimica Acta** 2021;1166. https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338548.

- [72] Gogola JL, Martins G, Caetano FR, Ricciardi-Jorge T, Duarte dos Santos CN, Marcolino-Junior LH, et al. Label-free electrochemical immunosensor for quick detection of anti-hantavirus antibody. Journal of Electroanalytical Chemistry 2019;842:140–5. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.04.066.
- [73] Martins G, Gogola JL, Caetano FR, Kalinke C, Jorge TR, Santos CND, et al. Quick electrochemical immunoassay for hantavirus detection based on biochar platform.
   Talanta 2019;204:163–71. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.101.
- [74] Samper IC, Sánchez-Cano A, Khamcharoen W, Jang I, Siangproh W, Baldrich E, et al. Electrochemical Capillary-Flow Immunoassay for Detecting Anti-SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Antibodies at the Point of Care. ACS Sensors 2021;6:4067–75. https://doi.org/10.1021/acssensors.1c01527.
- [75] Seo G, Lee G, Kim MJ, Baek SH, Choi M, Ku KB, et al. Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor-Based Biosensor. ACS Nano 2020;14:5135–42. https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02823.
- [76] Yakoh A, Pimpitak U, Rengpipat S, Hirankarn N, Chailapakul O, Chaiyo S. Paperbased electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: Detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen. Biosensors and Bioelectronics 2021;176. https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112912.
- [77] Mojsoska B, Larsen S, Olsen DA, Madsen JS, Brandslund I, Alatraktchi FA. Rapid SARS-CoV-2 detection using electrochemical immunosensor. Sensors (Switzerland) 2021;21:1–11. https://doi.org/10.3390/s21020390.
- [78] Choi S. Powering point-of-care diagnostic devices. Biotechnology Advances 2016;34:321–30. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.11.004.
- [79] Yager P, Domingo GJ, Gerdes J. Point-of-care diagnostics for global health.
   Annual Review of Biomedical Engineering 2008;10:107–44. https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160524.
- [80] Von Lode P. Point-of-care immunotesting: Approaching the analytical performance of central laboratory methods. Clinical Biochemistry 2005;38:591– 606. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.03.008.

- [81] Reyes DR, Iossifidis D, Auroux P, Manz A. Micro Total Analysis Systems . 1 . Introduction, Theory, and Technology. Anal Chem 2002;74:2623–36.
- [82] Ríos Á, Zougagh M, Avila M. Miniaturization through lab-on-a-chip: Utopia or reality for routine laboratories? A review. Analytica Chimica Acta 2012;740:1– 11. https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.06.024.
- [83] Martins G, Gogola JL, Caetano FR, Kalinke C, Jorge TR, Santos CND, et al. Quick electrochemical immunoassay for hantavirus detection based on biochar platform. Talanta 2019;204:163–71. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.101.
- [84] Wang Y, Luo J, Liu J, Li X, Kong Z, Jin H, et al. Electrochemical integrated paperbased immunosensor modified with multi-walled carbon nanotubes nanocomposites for point-of-care testing of 17β-estradiol. Biosensors and Bioelectronics 2018;107:47–53. https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.02.012.
- [85] Luppa PB, Sokoll LJ, Chan DW. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. Clinica Chimica Acta 2001;314:1–26.
- [86] Ricci F, Volpe G, Micheli L, Palleschi G. A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. Analytica Chimica Acta 2007;605:111–29. https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.10.046.
- [87] Mehrotra P. Biosensors and their applications A review. Journal of Oral Biology and Craniofacial Research 2016;6:153–9. https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002.
- [88] No Title n.d.
- [89] Bart J, Tiggelaar R, Yang M, Schlautmann S, Zuilhof H, Gardeniers H. Roomtemperature intermediate layer bonding for microfluidic devices. Lab on a Chip 2009;9:3481–8. https://doi.org/10.1039/b914270c.
- [90] Mollarasouli F, Kurbanoglu S, Ozkan SA. The role of electrochemical immunosensors in clinical analysis. Biosensors (Basel) 2019;9. https://doi.org/10.3390/bios9030086.
- [91] Vashist SK, Luong JHT. Bioanalytical requirements and regulatory guidelines for immunoassays. Handbook of Immunoassay Technologies: Approaches, Performances, and Applications 2018:81–95. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811762-0.00004-9.

- [92] Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. Peptides (NY) 2015;72:4– 15. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012.
- [93] Lim SA, Ahmed MU. Electrochemical immunosensors and their recent nanomaterial-based signal amplification strategies: A review. RSC Advances 2016;6:24995–5014. https://doi.org/10.1039/c6ra00333h.
- [94] Zhao G, Wang H, Liu G. Advances in biosensor-based instruments for pesticide residues rapid detection. International Journal of Electrochemical Science 2015;10:9790–807.
- [95] Pohanka M. Overview of piezoelectric biosensors, immunosensors and DNA sensors and their applications. Materials 2018;11. https://doi.org/10.3390/ma11030448.
- [96] Oliveira N, Costa-Rama E, Viswanathan S, Delerue-Matos C, Pereira L, Morais S. Label-free Voltammetric Immunosensor for Prostate Specific Antigen Detection. Electroanalysis 2018;30:2604–11. https://doi.org/10.1002/elan.201800417.
- [97] Darwish NT, Alrawi AH, Sekaran SD, Alias Y, Khor SM. Electrochemical Immunosensor Based on Antibody-Nanoparticle Hybrid for Specific Detection of the Dengue Virus NS1 Biomarker. Journal of The Electrochemical Society 2016;163:B19–25. https://doi.org/10.1149/2.0471603jes.
- [98] Barsoukov E, Macdonald JR. Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications. 2005. https://doi.org/10.1002/0471716243.
- [99] Rogers KR. Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring. Analytica Chimica Acta 2006;568:222–31. https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.12.067.
- [100] Gupta VK, Jain R, Radhapyari K, Jadon N, Agarwal S. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals-A review. Analytical Biochemistry 2011;408:179–96. https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.09.027.
- [101] Achterberg EP. Laboratory techniques in electroanalytical chemistry. vol. 15. 1996. https://doi.org/10.1016/s0165-9936(96)80740-0.
- [102] Achterberg EP. Laboratory techniques in electroanalytical chemistry. vol. 15.1996. https://doi.org/10.1016/s0165-9936(96)80740-0.
- [103] Marques RCB, Costa-Rama E, Viswanathan S, Nouws HPA, Costa-García A, Delerue-Matos C, et al. Voltammetric immunosensor for the simultaneous analysis

of the breast cancer biomarkers CA 15-3 and HER2-ECD. **Sensors and Actuators, B: Chemical** 2018;255:918–25. https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.08.107.

- [104] Jalal UM, Khalid Hossain M, Hossain MI, Qarony W, Tayyaba S, Mia MNH, et al. Modeling of self-assembled monolayers (SAMs) of Octadecanethiol and Hexadecanethiol on gold (Au) and silver (Ag). Results in Physics 2017;7:2289– 95. https://doi.org/10.1016/j.rinp.2017.06.055.
- [105] Ricci F, Adornetto G, Palleschi G. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. Electrochimica Acta 2012;84:74–83. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.06.033.
- [106] Jalal UM, Khalid Hossain M, Hossain MI, Qarony W, Tayyaba S, Mia MNH, et al. Modeling of self-assembled monolayers (SAMs) of Octadecanethiol and Hexadecanethiol on gold (Au) and silver (Ag). Results in Physics 2017;7:2289– 95. https://doi.org/10.1016/j.rinp.2017.06.055.
- [107] Cardoso RM, Silva PRL, Lima AP, Rocha DP, Oliveira TC, do Prado TM, 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 2020;307:127621. https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127621.
- [108] López Marzo AM, Mayorga-Martinez CC, Pumera M. 3D-printed graphene direct electron transfer enzyme biosensors. Biosensors and Bioelectronics 2020;151. https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111980.
- [109] Oliveira TMBF, Fátima Barroso M, Morais S, De Lima-Neto P, Correia AN, Oliveira MBPP, et al. Biosensor based on multi-walled carbon nanotubes paste electrode modified with laccase for pirimicarb pesticide quantification. Talanta 2013;106:137–43. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.017.
- [110] Tuteja SK, Duffield T, Neethirajan S. Graphene-based multiplexed disposable electrochemical biosensor for rapid on-farm monitoring of NEFA and βhBA dairy biomarkers. Journal of Materials Chemistry B 2017;5:6930–40. https://doi.org/10.1039/c7tb01382e.
- [111] Gogola JL, Martins G, Gevaerd A, Blanes L, Cardoso J, Marchini FK, et al. Labelfree aptasensor for p24-HIV protein detection based on graphene quantum dots as an electrochemical signal amplifier. Analytica Chimica Acta 2021;1166:1–7. https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338548.

- [112] Xu X, Ray R, Gu Y, Ploehn HJ, Gearheart L, Raker K, et al. Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. J Am Chem Soc 2004;126:12736–7. https://doi.org/10.1021/ja040082h.
- [113] Liu J, Li R, Yang B. Carbon Dots: A New Type of Carbon-Based Nanomaterial with Wide Applications. ACS Central Science 2020;6:2179–95. https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01306.
- [114] Li S, Li L, Tu H, Zhang H, Silvester DS, Banks CE, et al. The development of carbon dots: From the perspective of materials chemistry. Materials Today 2021;51:188–207. https://doi.org/10.1016/j.mattod.2021.07.028.
- [115] Nazri NAA, Azeman NH, Luo Y, A Bakar AA. Carbon quantum dots for optical sensor applications: A review. Optics and Laser Technology 2021;139. https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2021.106928.
- [116] Lim SY, Shen W, Gao Z. Carbon quantum dots and their applications. Chemical Society Reviews 2015;44:362–81. https://doi.org/10.1039/c4cs00269e.
- [117] Chen Y, Huang G, Gao Y, Chen Q, Bi J. Up-conversion fluorescent carbon quantum dots decorated covalent triazine frameworks as efficient metal-free photocatalyst for hydrogen evolution. International Journal of Hydrogen Energy 2022;47:8739–48. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.12.220.
- [118] Liang Y, Hou D, Ni Z, Cao M, Cai L. Preparation, characterization of naringenin, β-cyclodextrin and carbon quantum dot antioxidant nanocomposites. Food Chemistry 2022;375. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131646.
- [119] Hassanvand Z, Jalali F, Nazari M, Parnianchi F, Santoro C. Carbon Nanodots in Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. ChemElectroChem 2021;8:15–35. https://doi.org/10.1002/celc.202001229.
- [120] Bressi V, Ferlazzo A, Iannazzo D, Espro C. Graphene quantum dots by ecofriendly green synthesis for electrochemical sensing: Recent advances and future perspectives. Nanomaterials 2021;11. https://doi.org/10.3390/nano11051120.
- [121] Shaari N, Kamarudin SK, Bahru R. Carbon and graphene quantum dots in fuel cell application: An overview. International Journal of Energy Research 2021;45:1396–424. https://doi.org/10.1002/er.5889.
- [122] Xiao J, Momen R, Liu C. Application of carbon quantum dots in supercapacitors: A mini review. Electrochemistry Communications 2021;132:107143. https://doi.org/10.1016/j.elecom.2021.107143.

- [123] Wu W, Wu H, Zhong M, Guo S. Dual Role of Graphene Quantum Dots in Active Layer of Inverted Bulk Heterojunction Organic Photovoltaic Devices. ACS Omega 2019;4:16159–65. https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02348.
- [124] Hu Y, Zhang L, Zhao P, Wang C, Fei J, Xie Y. Ultrasensitive luteolin electrochemical sensor based on zeolitic imidazolate frameworks-derived cobalt trioxide @ nitrogen doped carbon nanotube/amino-functionalized graphene quantum dots composites modified glass carbon electrode. Sensors and Actuators B: Chemical 2022;351:130938. https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130938.
- [125] Wongrat E, Nuengnit T, Panyathip R, Chanlek N, Hongsith N, Choopun S. Highly selective room temperature ammonia sensors based on ZnO nanostructures decorated with graphene quantum dots (GQDs). Sensors and Actuators, B: Chemical 2021;326:128983. https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128983.
- [126] Ozhukil Valappil M, K. Pillai V, Alwarappan S. Spotlighting graphene quantum dots and beyond: Synthesis, properties and sensing applications. Applied Materials Today 2017;9:350–71. https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.09.002.
- [127] Yao J, Li Y, Xie M, Yang Q, Liu T. The electrochemical behaviors and kinetics of AuNPs/N, S-GQDs composite electrode: A novel label-free amplified BPA aptasensor with extreme sensitivity and selectivity. Journal of Molecular Liquids 2020;320:114384. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114384.
- [128] Shehab M, Ebrahim S, Soliman M. Graphene quantum dots prepared from glucose as optical sensor for glucose. Journal of Luminescence 2017;184:110–6. https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2016.12.006.
- [129] Arvand M, Hemmati S. Analytical methodology for the electro-catalytic determination of estradiol and progesterone based on graphene quantum dots and poly(sulfosalicylic acid) co-modified electrode. Talanta 2017;174:243–55. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.083.
- [130] Arumugasamy SK, Govindaraju S, Yun K. Electrochemical sensor for detecting dopamine using graphene quantum dots incorporated with multiwall carbon nanotubes. Applied Surface Science 2020;508:145294. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.145294.
- [131] Kunpatee K, Traipop S, Chailapakul O, Chuanuwatanakul S. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid using graphene quantum dots/ionic liquid modified screen-printed carbon electrode. Sensors and

 Actuators,
 B:
 Chemical
 2020;314:128059.

 https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128059.
 2020;314:128059.
 2020;314:128059.

- [132] Hatamluyi B, Es'haghi Z, Modarres Zahed F, Darroudi M. A novel electrochemical sensor based on GQDs-PANI/ZnO-NCs modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of Irinotecan and 5-Fluorouracil in biological samples. Sensors and Actuators, B: Chemical 2019;286:540–9. https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.02.017.
- [133] Hatamluyi B, Rezayi M, Beheshti HR, Boroushaki MT. Ultra-sensitive molecularly imprinted electrochemical sensor for patulin detection based on a novel assembling strategy using Au@Cu-MOF/N-GQDs. Sensors and Actuators, B: Chemical 2020;318:128219. https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128219.
- [134] Wang H, Liu Y, Li M, Huang H, Xu HM, Hong RJ, et al. Focusing on luminescent graphene quantum dots: current status and future perspectives. Nanoscale 2010;4:1166–9.
- Bacon M, Bradley SJ, Nann T. Graphene quantum dots. Particle and Particle
   Systems Characterization 2014;31:415–28. https://doi.org/10.1002/ppsc.201300252.
- [136] Chrischon D. Nanotubos magnéticos sintetizados por eletrodeposição em alumina anódica porosa. Tese de Doutorado 2016.
- [137] Steinbüchel A. Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. Macromolecular Bioscience 2001;1:1–24. https://doi.org/10.1002/1616-5195(200101)1:1<1::AID-MABI1>3.0.CO;2-B.
- [138] Sujatha K, Mahalakshmi A, Shenbagarathai R. A study on accumulation of PHB in native Pseudomonas isolates LDC-5 and LDC-25. Indian Journal of Biotechnology 2005;4:216–21.
- [139] Chen S, Liu Q, Wang H, Zhu B, Yu F, Chen GQ, et al. Polymorphic crystallization of fractionated microbial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. Polymer (Guildf) 2009;50:4378–88. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2009.07.011.
- [140] Rao U, Sridhar R, Sehgal PK. Biosynthesis and biocompatibility of poly(3hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by Cupriavidus necator from spent palm oil. Biochemical Engineering Journal 2010;49:13–20. https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.11.005.

- [141] Vroman I, Tighzert L. Biodegradable polymers. Materials 2009;2:307-44.
- [142] Wróbel-Kwiatkowska M, Kostyn K, Dymińska L, Hanuza J, Kurzawa A, Żuk M, et al. Spectroscopic and biochemical characteristics of flax transgenic callus cultures producing PHB. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2020;141:489– 97. https://doi.org/10.1007/s11240-020-01806-5.

https://doi.org/10.3390/ma2020307.

- [143] Dobrogojski J, Spychalski M, Luciński R, Borek S. Transgenic plants as a source of polyhydroxyalkanoates. Acta Physiologiae Plantarum 2018;40. https://doi.org/10.1007/s11738-018-2742-4.
- [144] Handrick R, Reinhardt S, Kimmig P, Jendrossek D. The "intracellular" poly(3hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase of Rhodospirillum rubrum is a periplasmlocated protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerases. Journal of Bacteriology 2004;186:7243–53. https://doi.org/10.1128/JB.186.21.7243-7253.2004.
- [145] Parlane NA, Rehm BHA, Wedlock DN, Buddle BM. Novel particulate vaccines utilizing polyester nanoparticles (bio-beads) for protection against Mycobacterium bovis infection-A review. Veterinary Immunology and Immunopathology 2014;158:8–13. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.04.002.
- [146] Parlane NA, Grage K, Mifune J, Basaraba RJ, Wedlock DN, Rehm BHA, et al. Vaccines displaying mycobacterial proteins on biopolyester beads stimulate cellular immunity and induce protection against tuberculosis. Clinical and Vaccine Immunology 2012;19:37–44. https://doi.org/10.1128/CVI.05505-11.
- [147] Martínez-Donato G, Piniella B, Aguilar D, Olivera S, Pérez A, Castañedo Y, et al. Protective T cell and antibody immune responses against hepatitis C virus achieved using a biopolyester-bead-based vaccine delivery system. Clinical and Vaccine Immunology 2016;23:370–8. https://doi.org/10.1128/CVI.00687-15.
- [148] Parlane NA, Gupta SK, Rubio-Reyes P, Chen S, Gonzalez-Miro M, Wedlock DN, et al. Self-Assembled Protein-Coated Polyhydroxyalkanoate Beads: Properties and Biomedical Applications. ACS Biomaterials Science and Engineering 2017;3:3043–57. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00355.
- [149] Soda N, Gonzaga ZJ, Chen S, Koo KM, Nguyen NT, Shiddiky MJA, et al. Bioengineered Polymer Nanobeads for Isolation and Electrochemical Detection of

Cancer Biomarkers. ACS Applied Materials and Interfaces 2021;13:31418–30. https://doi.org/10.1021/acsami.1c05355.

- [150] Kim S, Park SJ. Effect of acid/base treatment to carbon blacks on preparation of carbon-supported platinum nanoclusters. Electrochimica Acta 2007;52:3013–21. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2006.09.060.
- [151] Richter EM, Rocha DP, Cardoso RM, Keefe EM, Foster CW, Munoz RAA, et al. Complete Additively Manufactured (3D-Printed) Electrochemical Sensing Platform. Analytical Chemistry 2019;91:12844–51. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02573.
- [152] Shen J, Shi M, Li N, Yan B, Ma H, Hu Y, et al. Facile synthesis and application of Ag-chemically converted graphene nanocomposite. Nano Research 2010;3:339– 49. https://doi.org/10.1007/s12274-010-1037-x.
- [153] Yang H, Li F, Shan C, Han D, Zhang Q, Niu L, et al. Covalent functionalization of chemically converted graphene sheets via silane and its reinforcement. Journal of Materials Chemistry 2009;19:4632–8. https://doi.org/10.1039/b901421g.
- [154] Kim H, Lee S. Characterization of Electrical Heating of Graphene/PLA Honeycomb Structure Composite Manufactured by CFDM 3D Printer. Fashion and Textiles 2020;7. https://doi.org/10.1186/s40691-020-0204-2.
- [155] De Pinto SS, Rezende MC. Estudo da Aplicação da Poli(O-Metoxianilina) e de seus Compósitos com Negro de Fumo no Processamento de Absorvedores de Micro-Ondas. Polimeros 2012;22:325–31. https://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000049.
- [156] Silva TA, Moraes FC, Janegitz BC, Fatibello-Filho O, Ganta D. Electrochemical biosensors based on nanostructured carbon black: A review. Journal of Nanomaterials 2017;2017. https://doi.org/10.1155/2017/4571614.
- [157] Silva TA, Moraes FC, Janegitz BC, Fatibello-Filho O, Ganta D. Electrochemical biosensors based on nanostructured carbon black: A review. Journal of Nanomaterials 2017;2017. https://doi.org/10.1155/2017/4571614.
- [158] Chinaglia CR, Correa CA. Análise de falhas em materiais através de técnicas avançadas de microscopia. Polímeros 1997;7:19–23. https://doi.org/10.1590/s0104-14281997000300005.

- [159] Malard LM, Pimenta MA, Dresselhaus G, Dresselhaus MS. Raman spectroscopy in graphene. Physics Reports 2009;473:51–87. https://doi.org/10.1016/j.physrep.2009.02.003.
- [160] Wang H, Hu YH. Effect of oxygen content on structures of graphite oxides.
   Industrial and Engineering Chemistry Research 2011;50:6132–7. https://doi.org/10.1021/ie102572q.
- [161] Ferrari AC. Raman spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electronphonon coupling, doping and nonadiabatic effects. Solid State Communications 2007;143:47–57. https://doi.org/10.1016/j.ssc.2007.03.052.
- [162] Ferrari AC, Meyer JC, Scardaci V, Casiraghi C, Lazzeri M, Mauri F, et al. Raman spectrum of graphene and graphene layers. Physical Review Letters 2006;97:1–4. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.97.187401.
- [163] Sadezky A, Muckenhuber H, Grothe H, Niessner R, Pöschl U. Raman microspectroscopy of soot and related carbonaceous materials: Spectral analysis and structural information. Carbon N Y 2005;43:1731–42. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2005.02.018.
- [164] Bin Hamzah HH, Keattch O, Covill D, Patel BA. The effects of printing orientation on the electrochemical behaviour of 3D printed acrylonitrile butadiene styrene (ABS)/carbon black electrodes. Scientific Reports 2018;8:1–8. https://doi.org/10.1038/s41598-018-27188-5.
- [165] Wang C, Yan Q, Liu HB, Zhou XH, Xiao SJ. Different EDC/NHS activation mechanisms between PAA and PMAA brushes and the following amidation reactions. Langmuir 2011;27:12058–68. https://doi.org/10.1021/la202267p.
- [166] Settanni G, Zhou J, Suo T, Schöttler S, Landfester K, Schmid F, et al. Protein corona composition of poly(ethylene glycol)-and poly (phosphoester)-coated nanoparticles correlates strongly with the amino acid composition of the protein surface. Nanoscale 2017;9:2138–44. https://doi.org/10.1039/c6nr07022a.
- [167] Vashist SK. Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Based Strategies to Crosslink Antibodies on Amine-Functionalized Platforms for Immunodiagnostic Applications. Diagnostics 2012;2:23–33. https://doi.org/10.3390/diagnostics2030023.

- [168] Li H, Bapat AP, Li M, Sumerlin BS. Protein conjugation of thermoresponsive amine-reactive polymers prepared by RAFT. Polymer Chemistry 2011;2:323–7. https://doi.org/10.1039/c0py00178c.
- [169] Motta N, Guadalupe AR. Activated Carbon Paste Electrodes for Biosensors. Analytical Chemistry 1994;66:566–71. https://doi.org/10.1021/ac00076a023.
- [170] Zaib M, Athar MM. Electrochemical evaluation of Phanerocheaete chrysosporium based carbon paste electrode with potassium ferricyanide redox system. International Journal of Electrochemical Science 2015;10:6690–702.
- [171] Khan NI, Maddaus AG, Song E. A low-cost inkjet-printed aptamer-based electrochemical biosensor for the selective detection of lysozyme. Biosensors (Basel) 2018;8. https://doi.org/10.3390/bios8010007.
- [172] Pauliukaite R, Ghica ME, Fatibello-Filho O, Brett CMA. Comparative study of different cross-linking agents for the immobilization of functionalized carbon nanotubes within a chitosan film supported on a graphite-epoxy composite electrode. Analytical Chemistry 2009;81:5364–72. https://doi.org/10.1021/ac900464z.
- [173] Li XP, Ji G, Chen Z, Addad A, Wu Y, Wang HW, et al. Selective laser melting of nano-TiB2decorated AlSi10Mg alloy with high fracture strength and ductility.
   Acta Materialia 2017;129:183–93. https://doi.org/10.1016/j.actamat.2017.02.062.
- [174] Thunkhamrak C, Chuntib P, Ounnunkad K, Banet P, Aubert PH, Saianand G, et al. Highly sensitive voltammetric immunosensor for the detection of prostate specific antigen based on silver nanoprobe assisted graphene oxide modified screen printed carbon electrode. Talanta 2020;208:120389. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120389.
- [175] Gevaerd A, Banks CE, Bergamini MF, Marcolino-Junior LH. Graphene Quantum Dots Modified Screen-printed Electrodes as Electroanalytical Sensing Platform for Diethylstilbestrol. Electroanalysis 2019;31:838–43. https://doi.org/10.1002/elan.201800838.
- [176] Chiellini E, Errico C, Bartoli C, Chiellini F. Poly(hydroxyalkanoates)-based polymeric nanoparticles for drug delivery. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2009;2009. https://doi.org/10.1155/2009/571702.

- [177] Lee SJ, Park JP, Park TJ, Lee SY, Lee S, Park JK. Selective immobilization of fusion proteins on poly(hydroxyalkanoate) microbeads. Analytical Chemistry 2005;77:5755–9. https://doi.org/10.1021/ac0505223.
- [178] Bertani G. Studies on Lysogenesis I. Journal of Bacteriology 1951;62:293–300.
   https://doi.org/10.1128/jb.62.3.293-300.1951.
- [179] Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry 1976;72:248–54. https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999.
- [180] Yuan X, Liu Z, Guo Z, Ji Y, Jin M, Wang X. Cellular distribution and cytotoxicity of graphene quantum dots with different functional groups. Nanoscale Research Letters 2014;9:1–9. https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-108.
- [181] Gevaerd A, Banks CE, Bergamini MF, Marcolino-Junior LH. Graphene Quantum Dots Modified Screen-printed Electrodes as Electroanalytical Sensing Platform for Diethylstilbestrol. Electroanalysis 2019;31:838–43. https://doi.org/10.1002/elan.201800838.
- [182] Kansiz K, Billman-Jacobe H, McNaughton D. Quantitative determination of the biodegradable polymer poly(β-hydroxybutyrate) in a recombinant Escherichia coli strain by use of mid-infrared spectroscopy and multivariative statistics. Applied and Environmental Microbiology 2000;66:3415–20. https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3415-3420.2000.
- [183] Sayyed RZ, Wani SJ, Alarfaj AA, Syed A, El-Enshasy HA. Production, purification and evaluation of biodegradation potential of PHB depolymerase of Stenotrophomonas sp. RZS7. PLoS ONE 2020;15. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220095.
- [184] Werlang EB, Moraes LB, Muller MVG, Julich J, Corbellini VA, Neves F de F, et al. Polyhydroxybutyrate (PHB) Production via Bioconversion Using Bacillus pumilus in Liquid Phase Cultivation of the Biomass of Arthrospira platensis Hydrolysate as a Carbon Source. Waste and Biomass Valorization 2021;12:3245–55. https://doi.org/10.1007/s12649-020-01213-z.
- [185] Isak I, Patel M, Riddell M, West M, Bowers T, Wijeyekoon S, et al. Quantification of polyhydroxyalkanoates in mixed and pure cultures biomass by Fourier transform infrared spectroscopy: comparison of different approaches. Letters in Applied Microbiology 2016;63:139–46. https://doi.org/10.1111/lam.12605.

- [186] Hashemzadeh N, Hasanzadeh M, Shadjou N, Eivazi-Ziaei J, Khoubnasabjafari M, Jouyban A. Graphene quantum dot modified glassy carbon electrode for the determination of doxorubicin hydrochloride in human plasma. Journal of Pharmaceutical Analysis 2016;6:235–41. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2016.03.003.
- [187] Yu Y, Liu W, Ma J, Tao Y, Qin Y, Kong Y. An efficient chiral sensing platform based on graphene quantum dot-tartaric acid hybrids. RSC Advances 2016;6:84127–32. https://doi.org/10.1039/c6ra18477d.
- [188] Nguyen TD, Geuli O, Yeo LP, Magdassi S, Mandler D, Tok AIY. Additive-Free Electrophoretic Deposition of Graphene Quantum Dots Thin Films. Chemistry A European Journal 2019;25:16573–81. https://doi.org/10.1002/chem.201903596.
- [189] Yan Y, Liu Q, Mao H, Wang K. The immobilization of graphene quantum dots by one-step electrodeposition and its application in peroxydisulfate electrochemiluminescence. Journal of Electroanalytical Chemistry 2016;775:1–7. https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.05.010.
- [190] Fischer MJE. Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach. Methods Mol Biol 2010;627:55–73. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-670-2 3.
- [191] Martins G, Gogola JL, Budni LH, Janegitz BC, Marcolino-Junior LH, Bergamini MF. 3D-printed electrode as a new platform for electrochemical immunosensors for virus detection. Analytica Chimica Acta 2021;1147:30–7. https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.12.014.
- [192] Cogal S. Electrochemical Determination of Dopamine Using a Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene)-Reduced Graphene Oxide-Modified Glassy Carbon Electrode. Analytical Letters 2018;51:1666–79. https://doi.org/10.1080/00032719.2017.1387791.
- [193] Roy RD, Rosenmund C, Stefan MI. Cooperative binding mitigates the high-dose hook effect. BMC Systems Biology 2017;11. https://doi.org/10.1186/s12918-017-0447-8.
- [194] Dodig S. Interferences in quantitative immunochemical methods. Biochemia Medica 2009;19:50–62. https://doi.org/10.11613/bm.2009.005.

- [195] Soto D, Orozco J. Peptide-based simple detection of SARS-CoV-2 with electrochemical readout. Analytica Chimica Acta 2022:339739. https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339739.
- [196] Rashed MZ, Kopechek JA, Priddy MC, Hamorsky KT, Palmer KE, Mittal N, et al.
   Rapid detection of SARS-CoV-2 antibodies using electrochemical impedancebased detector. Biosensors and Bioelectronics 2021;171. https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112709.
- [197] Torrente-Rodríguez RM, Lukas H, Tu J, Min J, Yang Y, Xu C, et al. SARS-CoV-2 RapidPlex: A Graphene-Based Multiplexed Telemedicine Platform for Rapid and Low-Cost COVID-19 Diagnosis and Monitoring. Matter 2020;3:1981–98. https://doi.org/10.1016/j.matt.2020.09.027.
- [198] Grant BD, Anderson CE, Williford JR, Alonzo LF, Glukhova VA, Boyle DS, et al. SARS-CoV-2 coronavirus nucleocapsid antigen-detecting half-strip lateral flow assay toward the development of point of care tests using commercially available reagents. Analytical Chemistry 2020;92:11305–9. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01975.
- [199] Fabiani L, Saroglia M, Galatà G, De Santis R, Fillo S, Luca V, 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 2021;171. https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112686.
- [200] Vadlamani BS, Uppal T, Verma SC, Misra M. Functionalized tio2 nanotube-based electrochemical biosensor for rapid detection of sars-cov-2. Sensors (Switzerland) 2020;20:1–10. https://doi.org/10.3390/s20205871.
- [201] Yakoh A, Pimpitak U, Rengpipat S, Hirankarn N, Chailapakul O, Chaiyo S. Paperbased electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: Detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen. Biosensors and Bioelectronics 2021;176. https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112912.
- [202] Qin X, Shen J, Dai E, Li H, Tang G, Zhang L, et al. The seroprevalence and kinetics of IgM and IgG in the progression of COVID-19. BMC Immunology 2021;22. https://doi.org/10.1186/s12865-021-00404-0.
- [203] Xu X, Severson W, Villegas N, Schmaljohn CS, Jonsson CB. The RNA Binding Domain of the Hantaan Virus N Protein Maps to a Central, Conserved Region.

Journal of Virology 2002;76:3301–8. https://doi.org/10.1128/jvi.76.7.3301-3308.2002.

#### **ANEXOS 1**

### AVALIAÇÃO DO FILAMENTO IN NATURA – NÃO IMPRESSO

A avaliação de cada etapa do imunossensor utilizando o filamento não impresso foi realizada empregando-se voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. O sistema de detecção consiste em uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos, utilizando Proto-pasta (não impresso – *in natura*) como eletrodo de trabalho, contra-eletrodo de platina e referência prata-cloreto de prata. Os resultados obtidos podem ser observados na FIGURA A1.

FIGURA A1: (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA CADA ETAPA DA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR UTILIZANDO FILAMENTO PROTO-PASTA *IN NATURA* – NÃO IMPRESSO COMO ELETRODO DE TRABALHO, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 50 mV s<sup>-1</sup>, SONDA K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 2,0 mmol L<sup>-1</sup> E ELETRÓLITO SUPORTE KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. (B) RESULTADOS DE CV OBTIDOS SUMARIZADOS (n = 3; ± DP).



FONTE: O Autor.

O estudo voltamétrico representado na FIGURA A1 trata essencialmente da potencialidade de aplicação do filamento proto-pasta tanto para propósito de sensor eletroquímico, sendo utilizado como eletrodo de trabalho, quanto para imobilização de proteínas para montagem do imunossensor para detecção da proteína N do Hantavírus Araucária. Nesse sentido, o branco do dispositivo mostrou perfil voltamétrico característico da sonda  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  o que indicou a viabilidade de utilização do material

como eletrodo de trabalho. A partir disso o imunossensor foi construído e avaliado etapa a etapa.

Após a ativação dos grupos carboxílicos, foi realizada a imobilização do anticorpo contra o hantavírus araucária (HAb), feita a partir de incubação (4 °C por 60 min.), utilizando 5,0  $\mu$ L da solução estoque dos anticorpos (1,18 mg mL<sup>-1</sup>). Como se trata de uma reação de substituição (ligação cruzada), especula-se que o anticorpo se liga aos grupos carboxílicos provenientes das bordas do PLA e do negro de fumo. Os voltamogramas obtidos para essa etapa de ancoramento estão representados na FIGURA A1 - em vermelho (HAb).

A partir da comparação dos voltamogramas obtidos observa-se um aumento da intensidade de corrente ( $\Delta I = 2,53 \ \mu$ A) para ambos os processos redox após a imobilização do HAb, efeito que sugere que o anticorpo foi imobilizado. É reportado em literatura [203], que a superfície do anticorpo contra o hantavírus apresenta densidade de carga positiva, efeito que justifica a maior magnitude de variação da intensidade de pico do Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup>. Uma vez que esta sonda apresenta carga negativa, ocorre possivelmente interação eletrostática da superfície positiva do anticorpo com o Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-/4-</sup> e por consequência se observa processos redox de maior intensidade.

Para garantir que não existam sítios inespecíficos na superfície do eletrodo, ou seja, EDC/NHS não substituído pelo anticorpo, realizou-se o ancoramento da albumina. Para isso, foi utilizado 5,0  $\mu$ L de uma solução de BSA 1,0 mg mL<sup>-1</sup>, em tampão fosfato 0,02 mol L<sup>-1</sup> e pH 7.4, a qual foi adicionada à superfície do eletrodo e incubada a temperatura ambiente. O voltamograma obtido (FIGURA A1 – representados como BSA na cor verde) para essa etapa de ancoramento mostra uma diminuição da intensidade dos processos redox, quando comparado ao sinal obtido para HAb, que pode ser atribuído ao bloqueio da superfície remanescente de Proto-Pasta ativado com EDC/NHS, bem como bloqueio da superfície eletroativa, uma vez que se trata de uma estrutura proteica não condutora.

Por fim, verificou-se a interação da nucleoproteína do hantavírus (Np) com o anticorpo. A Np foi adicionada à superfície do eletrodo, utilizando 5,0 µL da solução estoque (0,4 mg mL<sup>-1</sup>) incubada a 4 °C por 1h. Analisando os voltamogramas obtidos, FIGURA A1 - HAb-Np em azul, pode-se observar uma diminuição da intensidade de corrente, que pode estar relacionado fundamentalmente com a interação da Np com o anticorpo levando a formação do imunocomplexo HAb-Np. O imunocomplexo, por sua

vez, possivelmente bloqueia a superfície do eletrodo promovendo passivação da superfície eletroativa, dificultando a difusão da sonda até a superfície do eletrodo e diminuindo transferências de elétrons. Como consequência, observa-se a diminuição da intensidade dos sinais redox.

O processo de construção do imunossensor proposto também foi investigado empregando EIS utilizando a sonda K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]. Os resultados representativos estão apresentados na FIGURA A2.

FIGURA A2: (A) MEDIDAS DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA OBTIDAS PARA O PROTO-PASTA *IN NATURA* – NÃO IMPRESSO, APÓS CADA ETAPA ENVOLVIDA NA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR, UTILIZ ANDO A SONDA K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 2,0 mmol L<sup>-1</sup> EM KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, 10 mV DE AMPLITUDE. (B) RESULTADOS DE EIS SUMARIZADOS (n = 3; ± DP).



FONTE: O Autor.

A partir dos dados obtidos por EIS, foi possível construir os diagramas de Nyquist (FIGURA A2) obtidos para cada etapa de montagem do imunossensor, com as mesmas etapas descritas anteriormente. A partir do diagrama é possível verificar o mesmo padrão de perfil obtido na voltametria cíclica, para a EIS. Observou-se uma diminuição da resistência à transferência de cargas (R<sub>ct</sub>) após a imobilização do anticorpo, de 2,72 kΩ (branco) para 1,70 kΩ (HAb), que indica maior taxa de transferência de elétrons entre o dispositivo e a sonda, possivelmente atrelado ao efeito de interação eletrostática da superfície dos anticorpos com a sonda. O processo de ancoramento da BSA (FIGURA 26 – BSA, em verde) bloqueou sítios do dispositivo, aumentando a resistência para 2,22 kΩ. Por fim, a interação HAb-Np (FIGURA A2 – HAb-Np em azul) mostrou um acréscimo de resistência a transferência de carga para 4,47 kΩ, atrelado ao bloqueio da superfície devido a formação do imunocomplexo. O estudo mostrou a potencialidade de aplicação do filamento condutor para utilização em ancoramento de proteínas e construção de imunossensores.

## ANEXOS 2

### **DISCIPLINAS CURSADAS**

SIGLA	DISCIPLINA	CRÉDITOS	CARGA	CONCEITO
			HORÁRIA	
QUIM-	SEMINARIOS D2	1	15H	А
7039				
QUIM-	SEMINÁRIOS D1	1	15H	А
7038				
QUIM-	PRÁTICA DE DOCÊNCIA EM	1	30H	А
7024	QUÍMICA			
QUIM-	QUÍMICA AMBIENTAL	4	60H	А
7025				
QUIM-	NOVAS TENDÊNCIAS NO	4	60H	В
7046	TRATAMENTO DE RESÍDUOS			
PRPPG-	ESCRITA ACADÊMICA EM	4	60H	А
7000	INGLÊS			
PRPPG-	METODOLOGIA DE PESQUISA	4	60H	А
7005	CIENTÍFICA			

# ANEXOS 3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1.

**MARTINS, GUSTAVO**; BUDNI, LUCAS H. ; JANEGITZ, BRUNO C. ; MARCOLINO-JUNIOR, LUIZ H. ; BERGAMINI, MÁRCIO F. . 3D-printed electrode as a new platform for electrochemical immunosensors for virus detection. ANALYTICA CHIMICA ACTA JCR, v. 1147, p. 30-37, 2021.

### 2.

GOGOLA, JEFERSON L. ; **MARTINS, GUSTAVO** ; GEVAERD, AVA ; BLANES, LUCAS ; CARDOSO, JOSIANE ; MARCHINI, FABRICIO KLERYNTON ; BANKS, CRAIG E. ; BERGAMINI, MÁRCIO F. ; MARCOLINO-JUNIOR, LUIZ H. . Label-free aptasensor for p24-HIV protein detection based on graphene quantum dots as an electrochemical signal amplifier. ANALYTICA CHIMICA ACTAJCR, v. 1166, p. 338548, 2021.

### 3.

GOGOLA, JEFERSON L. ; MARTINS, GUSTAVO ; CAETANO, FABIO R. ; RICCIARDI-JORGE, TAÍSSA ; DUARTE DOS SANTOS, CLAUDIA N. ; MARCOLINO-JUNIOR, LUIZ H. ; BERGAMINI, MÁRCIO F. . Label-free electrochemical immunosensor for quick detection of anti-hantavirus antibody. JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY JCR, v. 842, p. 140-145, 2019.

### 4.

MARTINS, GUSTAVO; GOGOLA, JEFERSON L. ; CAETANO, FABIO R. ; KALINKE, CRISTIANE ; JORGE, TAÍSSA R. ; SANTOS, CLAUDIA N.D. ; BERGAMINI, MÁRCIO F. ; MARCOLINO-JUNIOR, LUIZ H. . Quick electrochemical immunoassay for hantavirus detection based on biochar platform. TALANTA JCR, v. 204, p. 163-171, 2019. 5.

KALINKE, CRISTIANE ; WOSGRAU, VANESSA ; OLIVEIRA, PAULO R. ; OLIVEIRA, GEOVANE A. ; **MARTINS, GUSTAVO** ; MANGRICH, ANTONIO S. ; BERGAMINI, MÁRCIO F. ; MARCOLINO-JUNIOR, LUIZ H. . Green method for glucose determination using microfluidic device with a non-enzymatic sensor based on nickel oxyhydroxide supported at activated biochar. TALANTAJCR, v. 200, p. 518-525, 2019.