

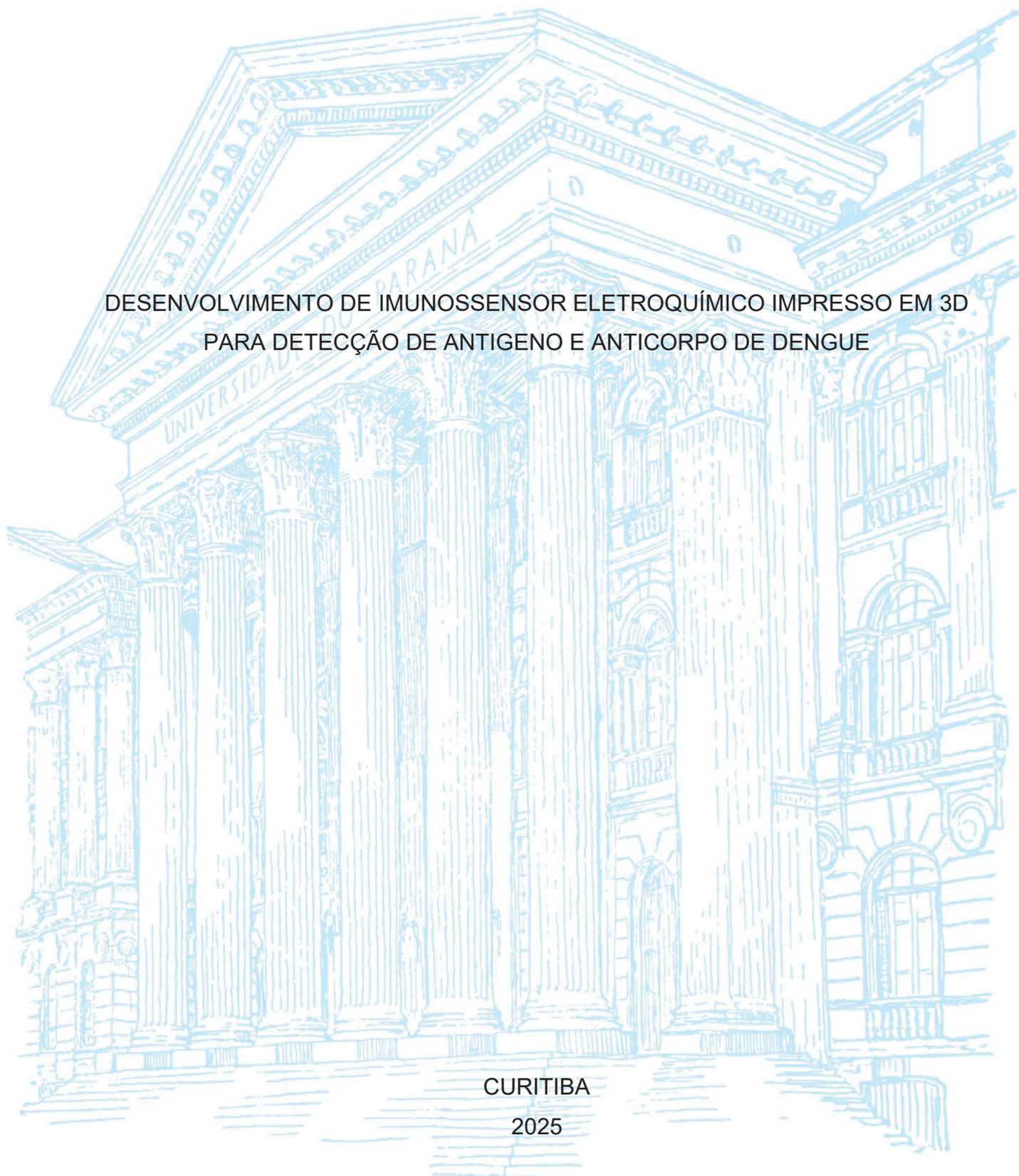
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THOMAS ANTONIO CARDOZO MARTINS

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR ELETROQUÍMICO IMPRESSO EM 3D  
PARA DETECÇÃO DE ANTIGENO E ANTICORPO DE DENGUE

CURITIBA

2025



THOMAS ANTONIO CARDOZO MARTINS

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO IMPRESSO EM 3D  
PARA DETECÇÃO DE ANTIGENO E ANTICORPO DE DENGUE

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini

Coorientadores: Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino-Junior, Dr. Gustavo Martins

CURITIBA

2025

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

Martins, Thomas Antonio Cardozo

Desenvolvimento de imunossensor eletroquímico impresso em 3D para detecção de antígeno e anticorpo de dengue / Thomas Antonio Cardozo Martins. – Curitiba, 2025.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Márcio Fernando Bergamini

Coorientadores: Luiz Humberto Marcolino Junior ; Gustavo Martins

1. Dengue. 2. Sensores eletroquímicos. 3. Eletrodos. 4. Imunossensor eletroquímico. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Bergamini, Márcio Fernando. IV. Marcolino Junior, Luiz Humberto. V. Martins, Gustavo. VI. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



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

**ATA Nº477**

**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE Mestrado PARA A OBTENÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE EM QUÍMICA**

No dia dezoito de fevereiro de dois mil e vinte e cinco às 13:30 horas, na sala A definir, Centro Politécnico - UFPR, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação do mestrando **THOMAS ANTONIO CARDOZO MARTINS**, intitulada: **DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO IMPRESSO EM 3D PARA DETECÇÃO DE ANTIGENO E ANTICORPO DE DENGUE**, 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), DÊNIO EMANUEL PIRES SOUTO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), AVA GEVAERD (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 mestre 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 a sessão, da qual eu, MÁRCIO FERNANDO BERGAMINI, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 18 de Fevereiro de 2025.

Assinatura Eletrônica

19/02/2025 11:28:37.0

MÁRCIO FERNANDO BERGAMINI  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

20/02/2025 16:38:45.0

DÊNIO EMANUEL PIRES SOUTO  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

21/02/2025 12:45:36.0

AVA GEVAERD  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE 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 Dissertação de Mestrado de **THOMAS ANTONIO CARDOZO MARTINS** intitulada: **DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR ELETRÓQUÍMICO IMPRESSO EM 3D PARA DETECÇÃO DE ANTIGENO E ANTICORPO DE DENGUE**, 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 mestre 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, 18 de Fevereiro de 2025.

Assinatura Eletrônica

19/02/2025 11:28:37.0

MÁRCIO FERNANDO BERGAMINI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

20/02/2025 16:38:45.0

DÊNIO EMANUEL PIRES SOUTO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

21/02/2025 12:45:36.0

AVA GEVAERD

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico esse trabalho a minha  
amada família e amados amigos, que  
acreditam em mim todos os dias, mesmo  
que tenham dias que eu mesmo acordo  
não acreditando.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador prof. Dr. Márcio F. Bergamini e coorientador prof. Dr. Luiz H. Marcolino-Junior, que abriram as portas do laboratório para mim e me deram a oportunidade de dar meus primeiros passos para me tornar um pesquisador.

Ao meu coorientador e colega de laboratório Dr. Gustavo Martins, que me auxiliou desde o início do desenvolvimento desse trabalho e sem ele esse trabalho nunca ganharia vida. Além de ter se tornando um grande amigo para a vida.

Ao prof. Dr. Patrício e Dr. Paulo R. de Oliveira pelas valiosas contribuições feitas no exame de qualificação e por toda compreensão e dedicação em contornar os problemas que enfrentei no período de qualificação.

Ao prof. Dr. Dênio Souto pelas considerações na correção do projeto e a profa. Dra. Noemi pelas correções e sugestões feitas na correção do relatório anual.

Aos meus colegas do Laboratório de Sensores Eletroquímicos que estiveram ao meu lado durante período do mestrado me ajudando e tornando os dias mais engraçados.

Ao Grupo de Química de Materiais por fornecerem o oxido de grafeno utilizado no trabalho.

Ao Núcleo de Fixação de Nitrogênio por fornecer as nanopartículas de PHB utilizadas no trabalho.

Ao centro de microscopia da UFPR por realizar as medidas de MEV para caracterização dos eletrodos 3D e nanomateriais usado ao longo do trabalho.

Ao Laboratório Multiusuário de Infravermelho por ceder o espaço e equipamento para realização das medidas FTIR para caracterização dos eletrodos impresso 3D e nanomateriais empregados no trabalho.

À UFPR, Programa de Pós-Graduação em Química e agências de fomento CAPES, Cnpq e Fundação Araucária, por fornecerem infraestrutura e financiamento para o desenvolvimento desse trabalho.

A minha namorada Luciane N. Tenório e amor da minha vida que desde nossa graduação até aqui sempre esteve ao meu lado em todos os momentos e me fez ser uma pessoa melhor e mais feliz.

A Mariana de Araujo, que conheci nos últimos meses de meu mestrado e com quem nesse curto período criei uma conexão muito especial que sempre guardarei com muito amor e carinho.

Aos meus pais, Daezi T. C. Martins e João Martins que me proporcionaram amor, carinho e tudo que eu precisei para chegar até aqui e por sempre me apoiarem a buscar meus sonhos.

Aos meus irmãos João Felipe e Manuela que amo muito e estão sempre em meu coração.

Ao meu melhor amigo Gustavo Loch que esteve presente na minha vida desde minha infância até agora me apoiando e fazendo os dias serem mais divertidos.

Ao meu nobre amigo Adriano Paiva que conheci na graduação e se tornou um grande amigo para a vida e com quem sempre posso contar.

Ao meu querido amigo Eduardo Bello, que começou sendo o primeiro aluno de Iniciação Científica que acompanhei quando me tornei mestrando e se tornou um amigo por quem tenho muito carinho.

Aos meus queridos amigos da graduação e mestrado Miguel Valença, André Martinez, Bernardo Régner, Elias Belo, Ana Beatriz Mendes e Letícia Fonseca por tornarem meus dias no departamento de química mais leves.

Aos amigos que fiz por meio do ICC-Fiocruz/PR Amanda Hecktheuer, Bruna Moura, Danrley Fernandes, Julia Vicentini, Giovanna Zuzarte, Natasha Mikaela, Miguel Gaspareto, Amanda Bertão e Melissa Paixão pelos barzinhos e litros que bebemos juntos e fizeram muitas noites serem mais alegres.

I come from far away.  
My boots don't know this ground.  
But they know it's real.  
(The Keeper – Chris Cornell, 2011)

## RESUMO

O presente trabalho envolve o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico multiplex impresso em 3D para detecção de proteína não estrutural 1 (NS1 DENV-1) e anticorpos contra a proteína não estrutural 1 (Ab DENV-1) da Dengue sorotipo 1. Para isso foram confeccionadas celas eletroquímicas, impressas com filamento de acrilonitrila butadieno estireno (ABS), que comportassem seis eletrodos de trabalho, um eletrodo de referência e um contra eletrodo. Os eletrodos empregados foram preparados empregando uma impressora 3D a partir de um filamento condutor comercial composto de ácido polilático (PLA) e negro de fumo (elemento condutor). Antes de serem usados, os eletrodos passaram por tratamento em solução de NaOH, com condição otimizada de  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 min, a fim de expor o elemento condutor. Posteriormente, para melhorar o desempenho do eletrodo em tampão fosfato (PBS) pH 7,4 e também a incorporação de proteínas em sua superfície, foi realizada a modificação dos eletrodos com óxido de grafeno, o qual foi eletroquimicamente reduzido (ErGO). Esse processo foi realizado com aplicação de  $-1,8 \text{ V}$  (vs. Eletrodo impresso com filamento condutor) por 30 s de  $1,0 \text{ mL}$  de uma dispersão de óxido de grafeno  $0,12 \text{ mg mL}^{-1}$  diluído 1:1 em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 3,0. Para a construção do imunossensor foi depositado na superfície dos eletrodos de trabalho um volume de  $10 \text{ uL}$  de uma dispersão de nanopartículas de polihidroxibutirato (PHB) ( $3,0 \text{ ug mL}^{-1}$ ) decoradas previamente com elemento de reconhecimento (NS1 DENV-1,  $1,0 \text{ ug mL}^{-1}$ , ou Ab DENV-1,  $1,5 \text{ ug mL}^{-1}$ ) e agente bloqueador (BSA,  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ), deixado para secar a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por cerca de 20 min. Os dispositivos foram avaliados separadamente para avaliar a montagem e verificar a viabilidade da detecção dos alvos empregando uma sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . Para isso foram utilizadas medidas de voltametria de onda quadrada (SWV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). A avaliação foi feita empregando uma estratégia *label free* com base nos perfis de resposta do sensor depois da construção (controle) e após incubação na presença do alvo em solução contendo íons  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . Foram construídas curvas analíticas para verificar a relação entre concentração e sinal eletroquímico para ambos os alvos investigados (antígenos e anticorpos). Para detecção de anticorpos foram observadas respostas para concentrações maiores que  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  para ambas as técnicas. Já para a detecção de antígenos foram observadas respostas para concentrações acima de  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  para EIS e  $20 \text{ ng mL}^{-1}$  para SWV. A seletividade do dispositivo frente a Febre Amarela e Chikungunya foi investigada e não sendo observadas interferências significativas. O efeito de matriz em amostras diluídas de soro comercial negativo e fortificado com os alvos também foi avaliado, não sendo observados efeitos de matriz significativos. Após avaliar viabilidade dos sensores de forma isolado, os sensores foram combinados em um mesmo dispositivo e foi possível detectar os alvos de forma sequencial sem interferências significativas em amostras de soro comercial negativo diluído em tampão PBS pH 7,4, soro comercial fortificado com NS1 DENV-1 e soro comercial fortificado com Ab DENV-1.

Palavras-chave: Imunossensor eletroquímico; eletrodos impressos 3D; Sensor Multiplex, Dengue.

## ABSTRACT

This study presents the development of a 3D-printed multiplex electrochemical immunosensor for detecting non-structural protein 1 (NS1 DENV-1) and antibodies against NS1 (Ab DENV-1) of Dengue serotype 1. To achieve this, electrochemical cells were fabricated using acrylonitrile butadiene styrene (ABS) filament, designed to accommodate six working electrodes, one pseudo-reference electrode, and one counter electrode. The electrodes were 3D-printed using a commercial conductive filament composed of polylactic acid (PLA) and carbon black. Before use, they underwent a NaOH treatment under optimized conditions ( $1.0 \text{ mol L}^{-1}$  at  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  for 30 minutes) to expose the conductive element. To further enhance electrode performance in phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4 and improve protein incorporation onto its surface, the electrodes were modified with graphene oxide, which was electrochemically reduced (ErGO). This process involved applying  $-1.8 \text{ V}$  (vs. printed electrode with conductive filament) for 30 seconds in  $1.0 \text{ mL}$  of a  $0.12 \text{ mg mL}^{-1}$  graphene oxide dispersion diluted 1:1 in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl at pH 3.0. For immunosensor construction,  $10 \text{ } \mu\text{L}$  of a polyhydroxybutyrate (PHB) nanoparticle dispersion ( $3.0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) was deposited onto the working electrode surfaces. These nanoparticles had been previously functionalized with the recognition element (NS1 DENV-1,  $1.0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , or Ab DENV-1,  $1.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and a blocking agent (BSA,  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$ ). The electrodes were then dried at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  for approximately 20 minutes. The sensors were individually tested to assess their assembly and verify their ability to detect target molecules using a redox probe,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . Square wave voltammetry (SWV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were used for characterization. A label-free detection strategy was employed, comparing sensor response profiles before and after incubation with the target in a solution containing  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  ions. Analytical curves were constructed to establish the correlation between concentration and electrochemical signal for both antigens and antibodies. For antibody detection, both techniques (SWV and EIS) showed responses for concentrations above  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ . For antigen detection, responses were observed at concentrations above  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  using EIS and  $20 \text{ ng mL}^{-1}$  using SWV. The sensor's selectivity was evaluated against Yellow Fever and Chikungunya, with no significant interference observed. Additionally, the potential matrix effect was assessed using diluted commercial negative serum samples, both unspiked and spiked with the target analytes, revealing no significant matrix interferences. After confirming the viability of the individual sensors, they were integrated into a single multiplexed device. This allowed for the sequential detection of both targets in diluted commercial negative serum, as well as in serum samples fortified with NS1 DENV-1 or Ab DENV-1, without significant cross-reactivity or interference.

Keywords: Electrochemical immunosensor; 3D-printed electrodes; Multiplex sensor; Dengue.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA DO PROCESSO DE TRANSMISSÃO VIRAL PELO <i>Aedes Aegypti</i> .....	22
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE ANTICORPOS A) IgM E B) IgG E C) GRÁFICO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE VÍRUS E ANTICORPOS NO SANGUE FUNÇÃO DOS DIAS TRANSCORRIDOS.....	25
FIGURA 3 - ILUSTRAÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE TESTE ELISA (DIRETO, INDIRETO, SANDUÍCHE E COMPETITIVO).....	26
FIGURA 4 – ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DE UM DISPOSITIVO LFIA COM MONTAGEM TIPO SANDUICHE.....	29
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DAS COMPONENTES DE UM SENSOR QUÍMICO .....	30
FIGURA 6 - ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DE UM IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS, UTILIZANDO GRUPOS CARBOXÍLICOS JÁ PRESENTES NO MATERIAL. ....	33
FIGURA 7 - DISPOSITIVO MULTIPLEX 3D E SISTEMA DE DETECÇÃO ELETROQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE TRÊS BIOMARCADORES PARA COVID-19.....	37
FIGURA 8 - DISPOSITIVO MULTIPLEX DE IMPRESSÃO 3D. ....	40
FIGURA 9 - MONTAGEM DA CAMADA SELETIVA UTILIZANDO ELETRODO IMPRESSO POR 3D MODIFICADO COM ErGO UTILIZANDO PHB PARA DETECÇÃO DE Ab DENV-1. ....	44
FIGURA 10 - MONTAGEM DA CAMADA SELETIVA UTILIZANDO ELETRODO IMPRESSO POR 3D MODIFICADO COM ErGO UTILIZANDO PHB PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENO (NS1 DENV-1). ....	46
FIGURA 11 - FOTO DA CELA ELETROQUÍMICA POR IMPRESSÃO 3D MONTADA E PREENCHIDA COM SOLUÇÃO DE $K_3[Fe(CN)_6]$ 2,0 mmol L <sup>-1</sup> EM KCl pH 3,0. ....	48
FIGURA 12 – REAÇÃO DE HIDRÓLISE ALCALINA DO ÁCIDO POLILÁTICO (PLA). ....	49

FIGURA 13 – PERFIS VOLTAMÉTRICO DOS ELETRODOS DE TRABALHOS SEM TRATAMENTO E TRATADO EM HIDRÓXIDO DE SÓDIO 1,00 mol L <sup>-1</sup> a 60 °C POR 30 min FRENTE A SONDA [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> EM KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 3,0, APLICAÇÃO DE POTENCIAL DE -0,8 A 0,6 V, VELOCIDADE DE VARREDURA De 50 mV s <sup>-1</sup> , COM 3 CICLOS. ....	50
FIGURA 14 – IMAGENS DE MICROSCOPIO DIGITAL PARA OBTENÇÃO DE ÂNGULO DE CONTATO A) ELETRODO SEM TRATAMENTO B) ELETRODO TRATADO EM MEIO DE NaOH 1,0 mol L <sup>-1</sup> POR 30 min A 60 °C. ....	52
FIGURA 15 - IMAGENS DE MEV DA SUPERFÍCIE DO ELETRODO DE TRABALHO, MAGNIFICAÇÃO DE 20 kx A) SEM TRATAMENTO, B) COM TRATAMENTO. ....	53
FIGURA 16 - ESTUDO DE MODIFICAÇÃO DO ELETRODO DE TRABALHO COM ErGO A) PERFIL CV FRENTE SONDA A [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> 5,0 mmol L <sup>-1</sup> em PBS 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,4, APLICAÇÃO DE POTENCIAL DE -0,8 A 0,6 V, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 50 mV s <sup>-1</sup> , COM 3 CICLOS B) RESULTADOS DE CV SUMARIZADOS PARA A COMPARAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO ANÓDICA E DIFERENÇA DE POTENCIAL DE PICO DA SONDA FRENTE A MODIFICAÇÃO DO ELETRODO.....	54
FIGURA 17 – ESPECTROS DE FTIR OBTIDOS PARA PROTO-PASTA, PROTO-PASTA MODIFICADA COM ERGO E PROTO-PASTA MODIFICADA COM ErGO E PHB.....	56
FIGURA 18 - IMAGENS DE MEV DA SUPERFÍCIE DO ELETRODO DE TRABALHO, MAGNIFICAÇÃO DE 10 kx A) TRATADO, B) TRATADO E MODIFICADO COM ErGO E PHB.....	57
FIGURA 19 – GRÁFICO DA DISTRIBUIÇÃO DO DIAMETRO DE 200 NANOPARTÍCULAS DE PHB.....	58
FIGURA 20 - CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR PHB + NS DENV-1 + BSA ETAPA A ETAPA FRENTE SONDA A [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> 5,00 mol L <sup>-1</sup> EM PBS 0,1 MOL L <sup>-1</sup> pH 7,4, A) PERFIL SWV, -0,8 A 0,6 V, 150 mV DE AMPLITUDE PULSO, FREQUENCIA DE PULSO DE 2 Hz, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s <sup>-1</sup> , B) RESULTADOS DE SWV SUMARIZADOS PARA A COMPARAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO ANÓDICA. ....	59

- FIGURA 21 - CONSTRUÇÃO DO IMUNOSENSOR PHB + NS DENV-1 + BSA ETAPA A ETAPA FRENTE SONDA A  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5,00 mol L<sup>-1</sup> EM PBS 0,1 MOL L<sup>-1</sup> pH 7,4, A) PERFIL EIS, 100 kHz A 50 mHz, 10 mV DE AMPLITUDE, CONDIÇÃO DE CIRCUITO ABERTO, B) RESULTADOS DE EIS SUMARIZADOS PARA A COMPARAÇÃO DOS  $R_{ct}$  CALCULADO. ....61
- FIGURA 22 – CURVA ANALÍTICAS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA DENV-1 FRENTE SONDA A  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5,00 mmol L<sup>-1</sup> EM PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> PH 7,4 A) EIS, 100 kHz A 50 mHz, 10 mV DE AMPLITUDE, CONDIÇÃO DE CIRCUITO ABERTO B) SWV , -0,8 A 0,6 V, 150 mV DE AMPLITUDE PULSO, FREQUENCIA DE PULSO DE 2 Hz, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s<sup>-1</sup>. ....63
- FIGURA 23 – TESTE DE SELETIVIDADE PARA DETECÇÃO DE AB DENV-1 COM Ab YFV E Ab CHIKV FRENTE A SONDA  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5,00 mmol L<sup>-1</sup> EM PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 A) RESUTADOS SWV SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS CORRENTES DE PICO ANÓDICAS, -0,8 A 0,6 V, 150 mV DE AMPLITUDE PULSO, FREQUENCIA DE PULSO DE 2 Hz, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s<sup>-1</sup>. B) RESULTADOS DE EIS SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE OS  $R_{ct}$  CALCULADOS, 100 kHz A 50 mHz, 10 mV DE AMPLITUDE, CONDIÇÃO DE CIRCUITO ABERTO. ....65
- FIGURA 24 – ESTUDO DE AMOSTRAS DE SORO COMERCIAL DILUÍDO 1:1000 EM PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 NEGATIVO E FORTIFICADO COM 2,5 µg mL<sup>-1</sup> DE Ab DENV-1 FRENTE SONDA A  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5,00 mol L<sup>-1</sup> EM PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4, A) RESUTADOS SWV SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS CORRENTES DE PICO ANÓDICAS, -0,8 A 0,6 V, 150 mV DE AMPLITUDE PULSO, FREQUENCIA DE PULSO DE 2 Hz, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s<sup>-1</sup>. B) RESULTADOS DE EIS SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE OS  $R_{ct}$  CALCULADOS, 100 kHz A 50 mHz, 10 mV DE AMPLITUDE, CONDIÇÃO DE CIRCUITO ABERTO. ....68
- FIGURA 25- CONSTRUÇÃO DO IMUNOSENSOR PHB + Ab DENV-1 ETAPA A ETAPA FRENTE SONDA A  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5,00 mmol L<sup>-1</sup> EM PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4, A) PERFIL SWV, -0,8 A 0,6 V, 150 mV DE AMPLITUDE

	PULSO, FREQUENCIA DE PULSO DE 2 Hz, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s <sup>-1</sup> , B) RESULTADOS DE SWV SUMARIZADOS PARA A COMPARAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO. ....	70
FIGURA 26-	CONSTRUÇÃO DO IMUNOSENSOR PHB + Ab DENV-1 ETAPA A ETAPA FRENTE SONDA A [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> 5,00 mmol L <sup>-1</sup> EM PBS 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,4, A) PERFIL EIS, 100 kHz A 50 mHz, 10 mV DE AMPLITUDE, CONDIÇÃO DE CIRCUITO ABERTO, B) RESULTADOS DE EIS SUMARIZADOS PARA A COMPARAÇÃO DOS R <sub>ct</sub> CALCULADO. ....	71
FIGURA 27 –	CURVA ANALÍTICAS PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNA NS1 DENV-1 FRENTE SONDA A [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> 5,00 mmol L <sup>-1</sup> EM PBS 0,1 mol L <sup>-1</sup> PH 7,4 A) EIS, 100 kHz A 50 mHz, 10 mV DE AMPLITUDE, CONDIÇÃO DE CIRCUITO ABERTO B) SWV , -0,8 A 0,6 V, 150 mV DE AMPLITUDE PULSO, FREQUENCIA DE PULSO DE 2 Hz, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s <sup>-1</sup> . ....	72
FIGURA 28 –	TESTE DE SELETIVIDADE PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNA NS1 DENV-1 COM PROTEÍNAS DE YFV E CHIKV A FRENTE SONDA [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> 5,00 mmol L <sup>-1</sup> EM PBS 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,4 A) RESUTADOS SWV SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS CORRENTES DE PICO ANÓDICAS, -0,8 A 0,6 V, 150 mV DE AMPLITUDE PULSO, FREQUENCIA DE PULSO DE 2 Hz, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s <sup>-1</sup> . B) RESULTADOS DE EIS SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE OS R <sub>ct</sub> CALCULADOS, 100 kHz A 50 mHz, 10 mV DE AMPLITUDE, CONDIÇÃO DE CIRCUITO ABERTO. ....	74
FIGURA 29 –	ESTUDO DE AMOSTRAS DE SORO COMERCIAL DILUÍDO 1:1000 EM PBS 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,4 NEGATIVO E FORTIFICADO COM 2,5 µg mL <sup>-1</sup> DE NS1 DENV-1 FRENTE SONDA A [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> 5,00 mol L <sup>-1</sup> EM PBS 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 7,4, A) RESUTADOS SWV SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS CORRENTES DE PICO ANÓDICAS, -0,8 A 0,6 V, 150 mV DE AMPLITUDE PULSO, FREQUENCIA DE PULSO DE 2 Hz, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s <sup>-1</sup> . B) RESULTADOS DE EIS SUMARIZADOS PARA	

COMPARAÇÃO ENTRE OS  $R_{ct}$  CALCULADOS, 100 kHz A 50 mHz, 10 mV DE AMPLITUDE, CONDIÇÃO DE CIRCUITO ABERTO. ....76

FIGURA 30 – AVALIAÇÃO DO DISPOSITIVO MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE Ab DENV-1 EM AMOSTRAS DE SORO COMERCIAL DILUÍDO 1:1000 EM PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 NEGATIVO E FROTIFICAÇÕES COM NS1 DENV-1 (100 ng mL<sup>-1</sup>), Ab DENV-1 (100 ng mL<sup>-1</sup>) e NS1 DENV-1 E Ab DENV-1 ( AMBOS 100 ng mL<sup>-1</sup>) FRENTE SONDA A [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 5,00 mol L<sup>-1</sup> EM PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4, A) RESULTADOS SWV SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS CORRENTES DE PICO ANÓDICAS, -0,8 A 0,6 V, 150 mV DE AMPLITUDE PULSO, FREQUENCIA DE PULSO DE 2 Hz, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s<sup>-1</sup>. B) RESULTADOS DE EIS SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE OS  $R_{ct}$  CALCULADOS, 100 kHz A 50 mHz, 10 mV DE AMPLITUDE, CONDIÇÃO DE CIRCUITO ABERTO. ....78

FIGURA 31 – AVALIAÇÃO DO DISPOSITIVO MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE NS1 DENV-1 EM AMOSTRAS DE SORO COMERCIAL DILUÍDO 1:1000 EM PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 NEGATIVO E FROTIFICAÇÕES COM NS1 DENV-1 (100 ng mL<sup>-1</sup>), Ab DENV-1 (100 ng mL<sup>-1</sup>) e NS1 DENV-1 E Ab DENV-1 ( AMBOS 100 ng mL<sup>-1</sup>) FRENTE SONDA A [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 5,00 mol L<sup>-1</sup> EM PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4, A) RESULTADOS SWV SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS CORRENTES DE PICO ANÓDICAS, -0,8 A 0,6 V, 150 mV DE AMPLITUDE PULSO, FREQUENCIA DE PULSO DE 2 Hz, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s<sup>-1</sup>. B) RESULTADOS DE EIS SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE OS  $R_{ct}$  CALCULADOS, 100 kHz A 50 mHz, 10 mV DE AMPLITUDE, CONDIÇÃO DE CIRCUITO ABERTO. ....79

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

- Ab CHIV** - Anticorpos contra Chikungunya ( do inglês *Chikungunya virus antibody*)
- Ab DENV** - Anticorpos contra Dengue (do inglês *Dengue virus antibody*)
- Ab YFV** - Anticorpos contra Febre Amarela (do inglês *Yellow Fever virus antibody*)
- ABS** - acrilonitrila butadieno estireno (do inglês *acrylonitrile butadiene styrene*)
- ANVISA** - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
- BSA** - Albumina de soro bovino (do inglês *bovine serum albumin*)
- CHIKV** - Vírus da Chikungunya (do inglês *Chikungunya virus*)
- CPE** - Elemento de constante de fase (do inglês *constant phase element*)
- CV** - Voltametria cíclica (do inglês *cyclic voltammetry*)
- DENV** - Virus da Dengue (do ingles *Dengue virus*)
- DPV** - Voltametria de pulso diferencial (do inglês *differential pulse voltammetry*)
- EDC/NHS** - N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida e N-hidroxisulfosuccinimida
- EIS** - Espectroscopia de impedancia eletroquímica (do inglês *electrochemical impedance spectroscopy*)
- ELISA** - Ensaio de imunoabsorção enzimática (do ingles *Enzyme-Linked Immunosorbant Assay*)
- EQM** - Eletrodo quimicamente modificado
- ErGO** - Óxido de grafeno eletroquimicamente reduzido (do inglês *electrochemical reduced graphene oxide*)
- FTIR** - Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*)
- GO** - Óxido de grafeno (do inglês *graphene oxide*)
- GQD** - *Quantum dot* grafeno
- GQM** - Grupo de Química de Materiais da Universidade Federal do Paraná
- IgG** - Imunoglobulina G
- IgM** - Imunoglobulina M
- LaMIV** - Laboratório Multiusuário de Espectrometria no Infravermelho UFPR
- LOQ** - Limite de quantificação (do inglês *Limit of quantification*)
- MEV** - Microscopia eletrônica de varredura

**NFIX** - Núcleo de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná

**NS** - Proteína não estrutural (do inglês *non-structural protein*)

**NTD** - Doenças tropicais negligenciadas (do inglês *Neglected Tropical Diseases*)

**PHB** - polihidroxitirato

**PLA** - Ácido polilático (do inglês *polylactic acid*)

**Rct** - resistência a transferência de carga (do inglês *charge transference resistance*)

**Rs** - Resistência da solução

**RT-PCR** - Transcriptase reversa seguida por reação em cadeia da polimerase (do inglês *reverse transcription polymerase chain reaction*)

**SAM** - Monocamada auto-organizada (do inglês *self assemble monolayer*)

**SWV** - Voltametria de pulso diferencial (do inglês *square wave voltammetry*)

**YFV** - Vírus da Febre Amarela (do inglês *Yellow Fever virus*)

**ZIKV** - Vírus da Zika (do inglês *Zika virus*)

**Zw** - impedância de Walburg

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
2.1 DENGUE .....	21
2.2 ESTRATÉGIAS DE DIAGNÓSTICO .....	24
2.3 SENSORES ELETROQUÍMICOS .....	30
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
3.1 REAGENTES .....	39
3.2 IMPRESSÃO 3D DOS DISPOSITIVO MULTIPLEX E ELETRODOS.....	39
3.3 PREPARAÇÃO DO POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) .....	41
3.4 SÍNTESE OXIDO DE GRAFENO (GO).....	41
3.5 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS .....	41
3.6 TRATAMENTO E MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS .....	42
3.7 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE POR ÂNGULO DE CONTATO.....	42
3.8 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA ...	42
3.9 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTOMETRIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER.....	43
3.10 CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DOS IMUNOSENSORES PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA DENGUE .....	43
3.11 CURVA ANALÍTICA PARA DETECÇÃO AB DENV-1 .....	44
3.12 TESTE DE SELETIVIDADE NA PRESENÇA DE ANTICORPOS DE CHIKUNGUNYA (AB CHIKV) E FEBRE AMARELA (AB YFV) .....	45
3.13 AMOSTRA DE SORO FORTIFICADO COM AB DENV-1 .....	45
3.14 CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DOS IMUNOSENSORES PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENO DE DENGUE (NS1 DENV-1) .....	45
3.15 CURVA ANALÍTICA PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNA NS1 DENV-1.....	46
3.16 TESTE DE SELETIVIDADE FRENTE PROTEÍNAS DE CHIKV E YFV .....	46
3.17 AMOSTRA DE SORO FORTIFICADO COM PROTEÍNA DENV-1 .....	47
3.18 AVALIAÇÃO DO DISPOSITIVO MULTIPLEX .....	47
3.19 TRATAMENTO ESTATÍSTICO .....	47

<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
4.1 CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DOS ELETRODOS IMPRESSOS EM 3D. ....	48
4.2 AVALIAÇÃO DO ELETRÓLITO E MODIFICAÇÃO DO ELETRODO COM ERGO.....	54
4.3 CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DOS IMUNOSENSORES PARA DETECÇÃO DE AB DENV-1 .....	55
4.4 CURVA ANALÍTICA PARA DE DETECÇÃO DE AB DENV-1 .....	62
4.5 TESTE DE SELETIVIDADE FRENTE AB CONTRA CHIKV E YFV .....	64
4.6 AMOSTRA DE SORO FORTIFICADO COM AB DENV-1.....	67
4.7 CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DOS IMUNOSENSORES PARA DENV-1.....	69
4.8 CURVA ANALÍTICA PARA DE DETECÇÃO DE NS1 DENV-1 .....	72
4.9 TESTE DE SELETIVIDADE FRENTE PROTEÍNAS DE CHIKV E YFV .....	73
4.10 AMOSTRA DE SORO FORTIFICADO COM NS1 DENV-1.....	75
4.11 AVALIAÇÃO DO DISPOSITIVO MULTIPLEX .....	77
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXO 1 – DISCIPLINAS CURSADAS.....</b>	<b>93</b>
<b>ANEXO 2 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....</b>	<b>94</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Dengue corresponde a uma arbovirose com quatro sorotipos, que tem como vetor o mosquito *Aedes aegypti*, e pertence ao grupo de doenças tropicais negligenciadas. Estas doenças apresentam elevada prevalência em regiões de clima tropical e subtropical e afetam principalmente populações de baixa renda. O crescente número de casos de Dengue somado aos riscos à saúde causados por sua forma grave, que tende a ocorrer em casos de reinfecção por diferentes sorotipos, impulsionam os setores de saúde e pesquisa no desenvolvimento de novas dispositivos para diagnóstico [1–3].

Os ensaios de imun absorção enzimática e transcriptase reversa combinada com reação em cadeia da polimerase são atualmente os principais testes e com maior confiabilidade para o diagnóstico para dengue tanto para detecção de antígenos quanto anticorpos [4,5]. Contudo esses testes apresentam um elevado custo, necessitam de infraestrutura adequada e elevado tempo no seu desenvolvimento. Isso faz com que o processo de descentralização do diagnóstico seja dificultado, o que limita o acesso de populações de baixa renda ao diagnóstico e tratamento adequada [6]. Os ensaios imunocromatográficos, que servem como testes mais rápido e menor custo, vem como uma ferramenta no auxílio no processo de triagem e consequentemente descentralização do diagnóstico [7]. Embora os testes rápidos apresentem uma maior facilidade no diagnóstico, tais testes apresentam menor sensibilidade e confiabilidade [8]. Frente a isso imunossensores eletroquímicos surgem como uma forma de contornar as dificuldades no processo de triagem.

Imunossensores eletroquímicos, de forma similar aos ensaios de imun absorção enzimática, se beneficiam da elevada estabilidade e seletividade da ligação entre o par antígeno/anticorpo para fazer a detecção do alvo quando comparados aos testes padrões de diagnóstico, além disso contornam os problemas de sensibilidade encontrados nos testes imunocromatográficos. Dessa maneira se mostram como potencial ferramenta auxiliar no processo de descentralização do diagnóstico. Além disso esses dispositivos podem ser combinados com técnicas de impressão 3D na confecção de dispositivos multiplex com diferentes formas e tamanhos atendendo as necessidades do problema a ser enfrentado [9,10].

As técnicas de impressão 3D, por deposição de filamento fundido e litográfica, já são amplamente empregadas na área da saúde por permitirem a prototipagem de dispositivos de elevada complexidade e permitirem a confecção de próteses,

implantes, tecidos, órgãos e modelos anatômicos [11]. Na eletroquímica a impressão 3D permite a confecção de celas miniaturizadas que comportem mais de um eletrodo de trabalho e com isso é possível preparar eletrodos para determinar diferentes analitos num mesmo dispositivo [12]. Além disso, por meio de materiais condutores é possível também imprimir eletrodos para serem empregados nesses dispositivos o que permite a construção de imunossensores eletroquímicos para detecção de diferentes biomarcadores, como antígenos e anticorpos de forma sequencial ou até mesmo simultânea [13].

Sendo assim o presente trabalho tem como visa a construção de um imunossensor eletroquímico multiplex impresso em 3D para detecção de antígeno e anticorpos da Dengue.

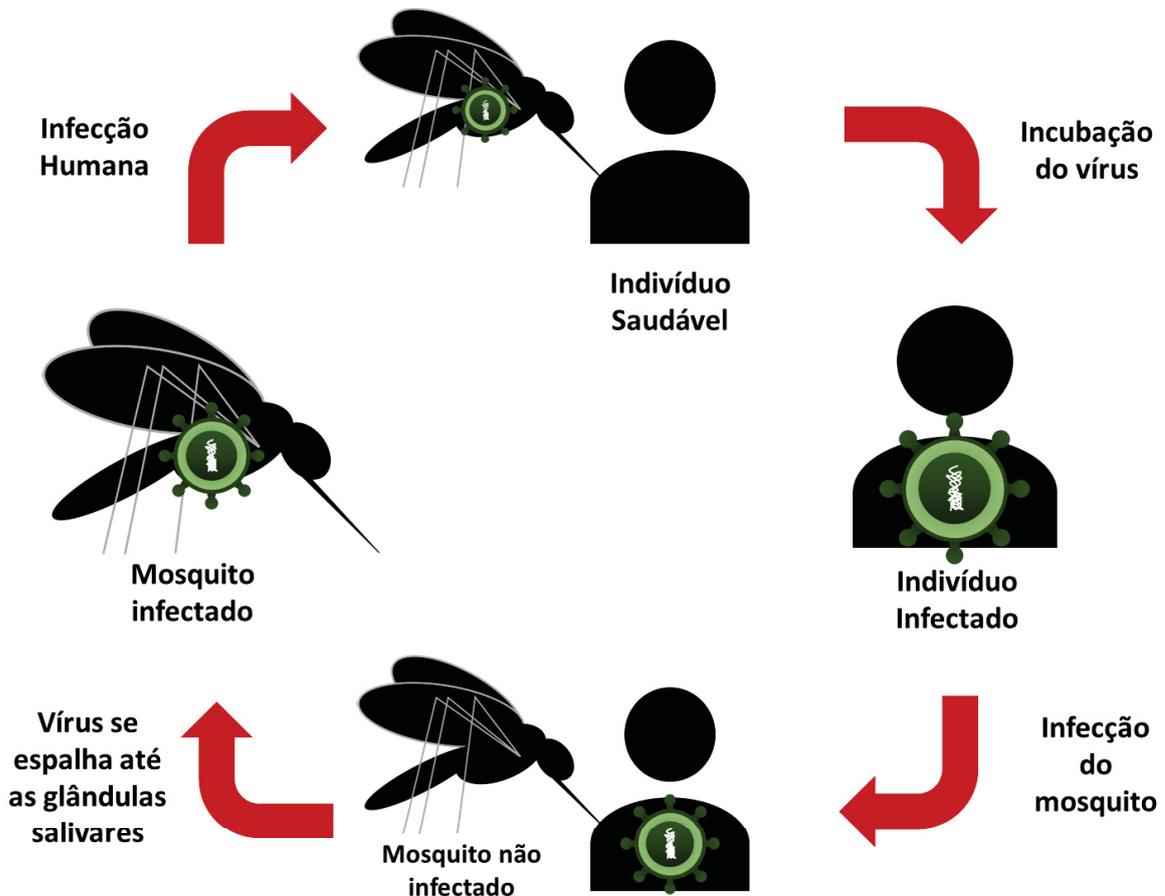
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DENGUE

As doenças tropicais negligenciadas (NTD, do inglês *Neglected Tropical Diseases*), de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), correspondem a um grupo de 20 doenças que prevalecem em regiões de clima tropical e afetam principalmente as populações de baixa renda. Historicamente as NTDs ganham pouca atenção na agenda global de políticas de saúde, sendo reconhecidas apenas em 2015, na meta nº3.3 dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentáveis, como um problema de saúde global [1].

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica as doenças negligenciadas como aquelas que não são economicamente atrativas para o desenvolvimento de fármacos, diagnósticos e/ou vacinas, devido à baixa prevalência e/ou por afetarem regiões em desenvolvimento [14]. Nesse sentido, doenças como a Dengue (DENV, do inglês *Dengue Virus*), Chikungunya (CHIKV, do inglês *Chikungunya Virus*), Chagas, Hanseníase, Leishmaniose são enquadradas como NDTs [1]. O conjunto de doenças classificadas como NDTs ainda se mostra insuficiente, visto que doenças como a Febre Amarela (YFV, do inglês *Yellow Fever Virus*) e a Zika (ZIKV, do inglês *Zika Virus*) apresentam a premissa de NDTs, mas ainda não estão incluídas nessa categoria. Dentre as NTDs, as arboviroses, doenças virais transmitidas por artrópodes, se destacam no Brasil devido à presença do mosquito *Aedes aegypti* em ambientes urbanos, que culmina com a propagação do DENV, CHIKV, YFV e ZIKV em, praticamente, e todo o território nacional [15,16].

O mosquito *Aedes aegypti* é adaptado ao ambiente urbano e apresenta uma relação ecológica de parasitismo exclusivo com o ser humano, no qual a fêmea se alimenta do sangue humano para a maturação de seus ovários e desenvolvimento dos ovos [17]. Como relatado anteriormente, o *Aedes aegypti* pode ser o vetor dos vírus causadores de DENV, CHIKV, YFV e ZIKV. O processo de transmissão desses vírus ocorre de maneira cíclica, como ilustrado na FIGURA 1.

FIGURA 1 - ESQUEMA DO PROCESSO DE TRANSMISSÃO VIRAL PELO *Aedes Aegypti*.

FONTE: AUTOR (2025).

O ciclo de transmissão começa com a infecção da fêmea do mosquito, que se alimenta do sangue de indivíduos portadores do vírus durante a fase de viremia. Após a ingestão, o vírus passa por um processo de disseminação e replicação dentro do organismo do mosquito. Inicialmente, o vírus se multiplica no intestino médio do mosquito e, posteriormente, se espalha para outros tecidos até atingir as glândulas salivares. Uma vez que as glândulas salivares estão infectadas, o mosquito se torna um vetor capaz de transmitir o vírus para novos hospedeiros humanos durante futuras picadas. Mosquitos fêmeas infectadas podem também transmitir de forma vertical o vírus para seus ovos, dando origem a novos mosquitos adultos com potencial de propagação do vírus. Esse processo de infecção e transmissão cíclica é essencial para a perpetuação do ciclo de vida dos vírus, contribuindo para a disseminação contínua dessas doenças [2]. A dengue se destaca das demais doenças transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti* na América por ser a arbovirose com maior incidência nessa região, no ano de 2024 foram relatados 13.017.982 casos, dentre eles

6.895.760 foram confirmados em laboratório. 10.223.107 casos foram reportados no Brasil e 5.878.756 foram confirmados em laboratório. Esse número de casos no país corresponde a um aumento de cerca de 334 % quando comparado com o ano de 2023 [18]. O vírus da DENV possui 4 tipos de sorotipo (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), a co-circulação dos quatro sorotipos já foi reportada em diversos países da América Latina, entre eles o Brasil. A nível nacional, os sorotipos 1 e 2 apresentam prevalência na co-circulação, majoritariamente DENV-1 [19].

Os principais sintomas de indivíduos acometidos por dengue são: febre alta, dores no corpo e articulações, dor na região posterior dos olhos, falta de apetite, dor de cabeça e manchas no corpo. Em casos mais graves, são observadas: dores abdominais intensas, vômito persistente, hepatomegalia, sangramento da mucosa, aumento progressivo do hematócrito, acúmulo de líquidos, hipotensão postural, letargia e/ou irritabilidade. Durante a fase grave o extravasamento do plasma e a hemorragia podem levar ao óbito [20].

A razão da manifestação da forma hemorrágica da dengue ainda não foi elucidada, há evidências da tendência de indivíduos manifestarem a forma grave durante um processo de reinfecção por um sorotipo diferente. Embora a infecção por um dos sorotipos gere uma resposta imune de longo prazo, a imunidade adquirida é baixa para outros sorotipos [3]. Isso faz com que no caso da DENV infecções por outros sorotipos possam sofrer um processo de aprimoramento dependente de anticorpos. Ou seja ocorre um agravamento da doença uma vez que os anticorpos de memória são capazes de se ligar com o novo sorotipo, contudo não conseguem neutralizá-los [21].

O DENV é um vírus de RNA de fita única, seus quatro sorotipos apresentam uma sequência de nucleotídeos com uma similaridade entre 65 a 75%. Esse RNA é responsável por codificar 10 proteínas. Dentre elas três são responsáveis pela estrutura viral, sendo elas a proteína de membrana (M), proteína envelope (E) e proteína capsídeo (C). As demais sete proteínas são classificadas como proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5, do inglês *non-structural protein*), que são responsáveis pelo processo de replicação viral, além disso proteína NS1 é o principal patógeno da DENV [22].

Ao invadir a célula hospedeira o vírus libera seu RNA e passa a produzir suas proteínas. A proteína NS1 adentra o retículo endoplasmático e sofre um processo de dimerização, após isso ela pode se deslocar para os sítios de replicação,

compartimentos extracelulares e ou para a membrana plasmática. Ao se deslocar para membrana plasmática a proteína NS1 pode se ancorar em sua superfície ou ser secretada, ao ser secretada a proteína passa para sua forma de hexâmetro [2,23]. Assim, a detecção dessa proteína permite o diagnóstico a partir do primeiro dia de manifestação dos sintomas até o nono dia, uma vez que durante a fase aguda da doença a proteína NS1 está presente em elevada concentração [22]. Outra estratégia de diagnóstico é a detecção de anticorpos do tipo imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG). Em casos de infecção por um segundo sorotipo do vírus da dengue o efeito de memória da resposta imune reduz o período de circulação da proteína não estrutural no sangue, dificultando sua detecção, sendo necessárias análises combinadas de detecção de proteínas NS e anticorpos [4].

## 2.2 ESTRATÉGIAS DE DIAGNÓSTICO

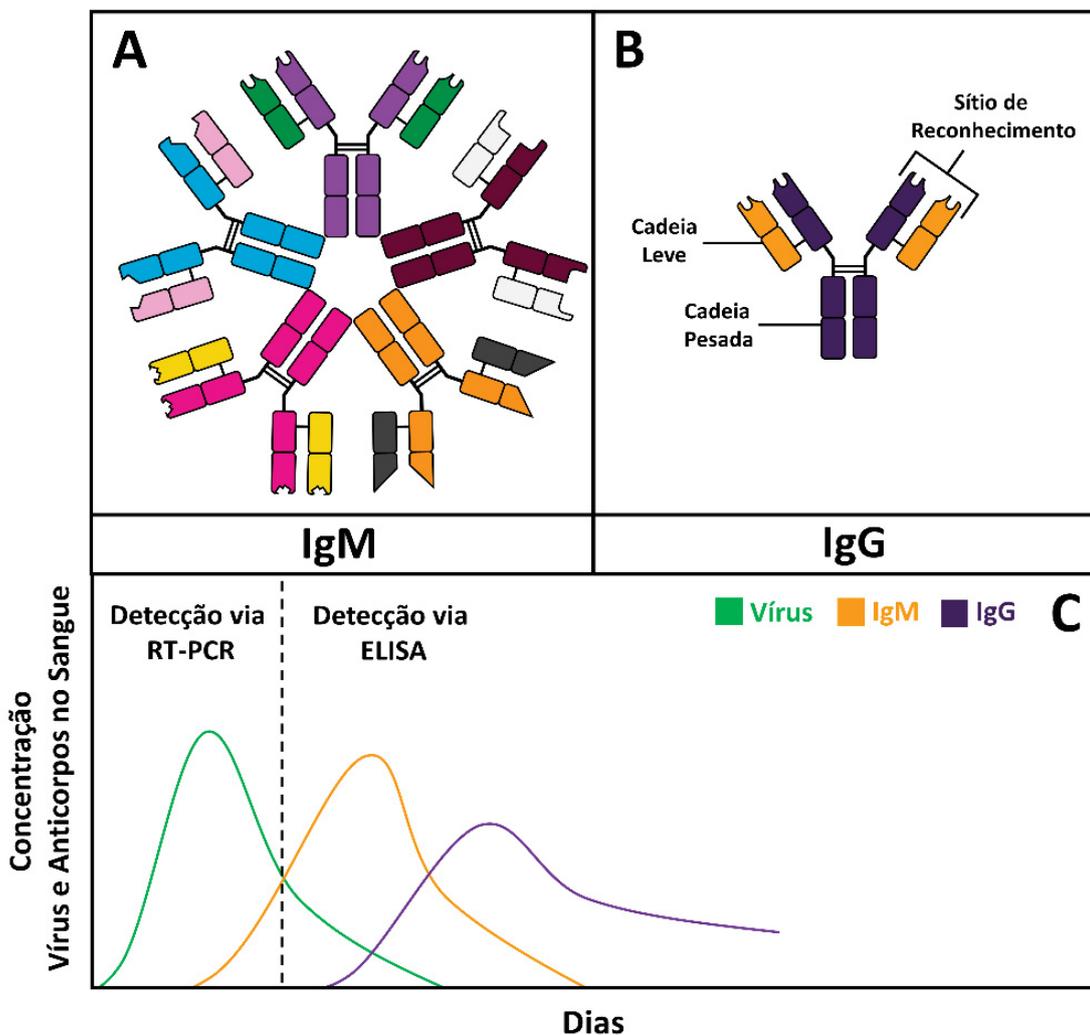
O diagnóstico clínico da dengue apresenta elevada dificuldade devido à similaridade de diversos sintomas. Além disso, as regiões endêmicas se interseccionam com outras doenças vetorizadas pelo mesmo hospedeiro (YFV, CHIKV e ZIKV). Sendo assim, o diagnóstico confirmatório é necessário e realizado por meio de técnicas moleculares. As técnicas mais empregadas para detecção viral são a técnica de transcriptase reversa seguida por reação em cadeia da polimerase (RT-PCR, do inglês *reverse transcription polymerase chain reaction*) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA do inglês *enzyme-linked Immunosorbent assay*).

O RT-PCR consiste na detecção do RNA viral por meio de sua amplificação através da reação em cadeia da enzima polimerase. Já o ensaio ELISA, por sua vez, detecta, colorimetricamente, a ligação entre antígeno e anticorpo por meio de reações enzimáticas associadas ao sistema de reconhecimento biológico. Os anticorpos normalmente detectados pelo teste ELISA são as imunoglobulinas M e imunoglobulinas G. Esses dois anticorpos atuam na resposta imune inata e adquirida. [4,5,24].

Mesmo que existam diferentes tipos de anticorpos, sua estrutura básica permanece igual. Em essência são compostos por duas cadeias carbônicas, uma invariável classificada como pesada e outra leve, que é variável. Os anticorpos IgM são constituídos por pentâmeros com diferentes sítios de reconhecimento das estruturas dos antígenos, chamadas de epítopos. Esses diferentes sítios estão relacionados ao processo de reconhecimento, logo, estão relacionados com a

imunidade e inata e apresentam baixa especificidade. A interação entre as IgM e antígeno induz a produção anticorpos constituído de apenas monômeros, que apresentam maior especificidade para o antígeno combatido. Esses anticorpos mais específicos são denominados de IgG e estão associados a resposta imune adquirida e protegem o organismo em processos de reinfeção [25]. A FIGURA 2 apresenta uma estrutura representativa dos anticorpos IgM, IgG e de forma representativa a “janela” de circulação de vírus e anticorpos no sangue.

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE ANTICORPOS A) IgM E B) IgG E C) GRÁFICO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE VÍRUS E ANTICORPOS NO SANGUE FUNÇÃO DOS DIAS TRANSCORRIDOS.



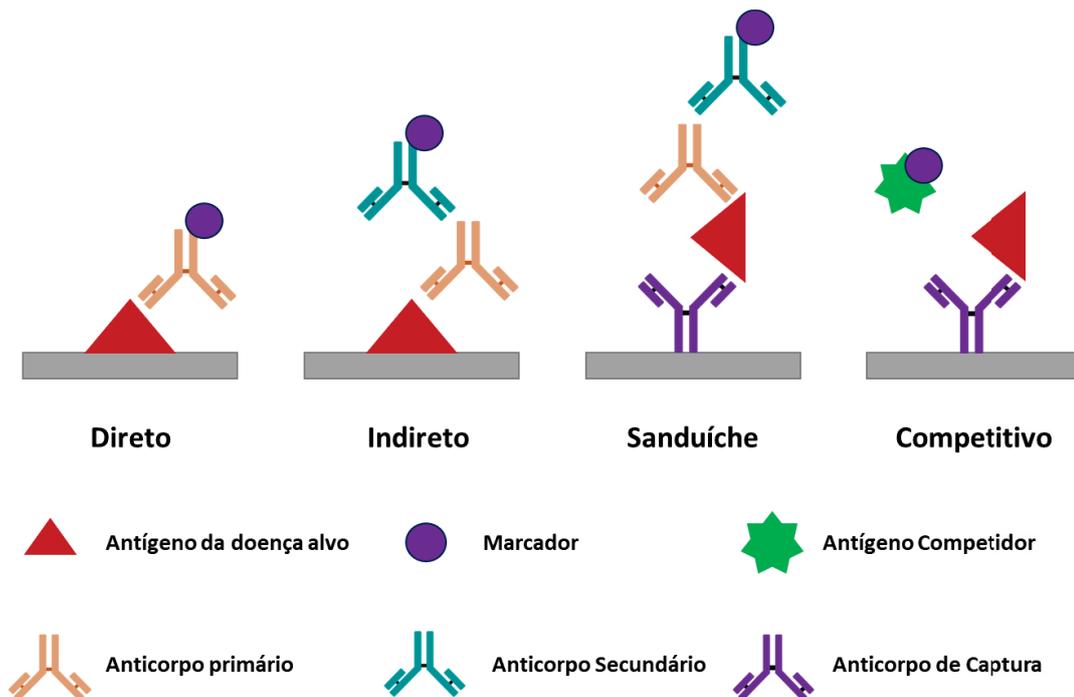
FONTE: O AUTOR (2025).

A estrutura básica de um anticorpo é comum à todas as classes, uma cadeia pesada, que para fins de diagnóstico é utilizada como base para ancoramento do anticorpo na superfície selecionada e uma cadeia leve que apresenta o sítio de reconhecimento biológico. Em linhas gerais, anticorpos do tipo IgM são constituídos de um aglomerado (*cluster*), de diferentes anticorpos IgG, cada qual com um sítio de reconhecimento diferente. Por esse motivo apresenta menor especificidade, mas é importante para o reconhecimento proteico e produção dos anticorpos específicos e memoriais [25].

Vírus por serem parasitas intracelulares obrigatórios tornam a janela de emprego do RT-PCR limitada, uma vez que sua circulação no sangue é reduzida quando o vírus passa a invadir a célula para realizar sua replicação. O mesmo pode ser dito para os ensaios ELISA que visam a detecção de anticorpos, visto que dependem do sistema imune identificar o antígeno e iniciar o processo de produção de anticorpos [4,26].

Os ensaios ELISA apresentam quatro estratégias principais: ensaio direto, indireto, sanduíche e competitivo. A FIGURA 3 ilustra de forma representativa a montagem dessas estratégias.

FIGURA 3 - ILUSTRAÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE TESTE ELISA (DIRETO, INDIRETO, SANDUÍCHE E COMPETITIVO).



FONTE: AUTOR (2025).

O ensaio direto corresponde a fixação do antígeno da doença alvo na placa de ensaio, seguido da ligação de um anticorpo primário marcado com uma enzima sinalizadora, esse tipo de ensaio é costumeiramente utilizado como triagem uma vez que apresenta baixa especificidade no ensaio, visto que usa apenas um componente biológico específico. Vale ressaltar que esse ensaio pode ser montado para detecção antígeno ao mudar o elemento de reconhecimento [25,27].

Na abordagem indireta por sua vez, o antígeno é fixado a placa e serve como elemento de reconhecimento biológico. Neste caso, os anticorpos advindos da amostra (IgM ou IgG) interagem com a camada seletiva formando um imunocomplexo estável. Por fim um anticorpo secundário marcado (anti-anticorpo) é introduzido para interagir com os anticorpos primários presentes no imunocomplexo permitindo sua detecção mediada por uma reação enzimática [25,27].

Mais usualmente utilizado, o ensaio sanduíche corresponde a fixação de um anticorpo de captura na placa, seguido da imobilização do antígeno alvo por esse anticorpo, então é realizada a ligação do antígeno alvo com um anticorpo primário marcado (com uma enzima, por exemplo) ou ligado a um anti-anticorpo marcado, como mostra a figura. A detecção é feita através do produto da reação enzimática. Esse ensaio se mostra vantajoso, apesar do aumento substancial do tempo envolvendo a montagem, por aumentar a seletividade do ensaio, visto que envolve três componentes biológicos com elevada especificidade [25,27].

Além disso, os imunoenaios podem seguir um modelo competitivo, uma abordagem frequentemente utilizada quando o antígeno é pequeno e possui apenas um epítopo ou ocupa apenas um sítio de ligação do anticorpo. Nesse método, marca-se o antígeno competidor, e não o anticorpo. O antígeno não marcado, proveniente da amostra, compete com o antígeno marcado pela ligação ao anticorpo de captura. A redução do sinal do antígeno purificado, previamente medido, indica a presença do antígeno na amostra [25,27].

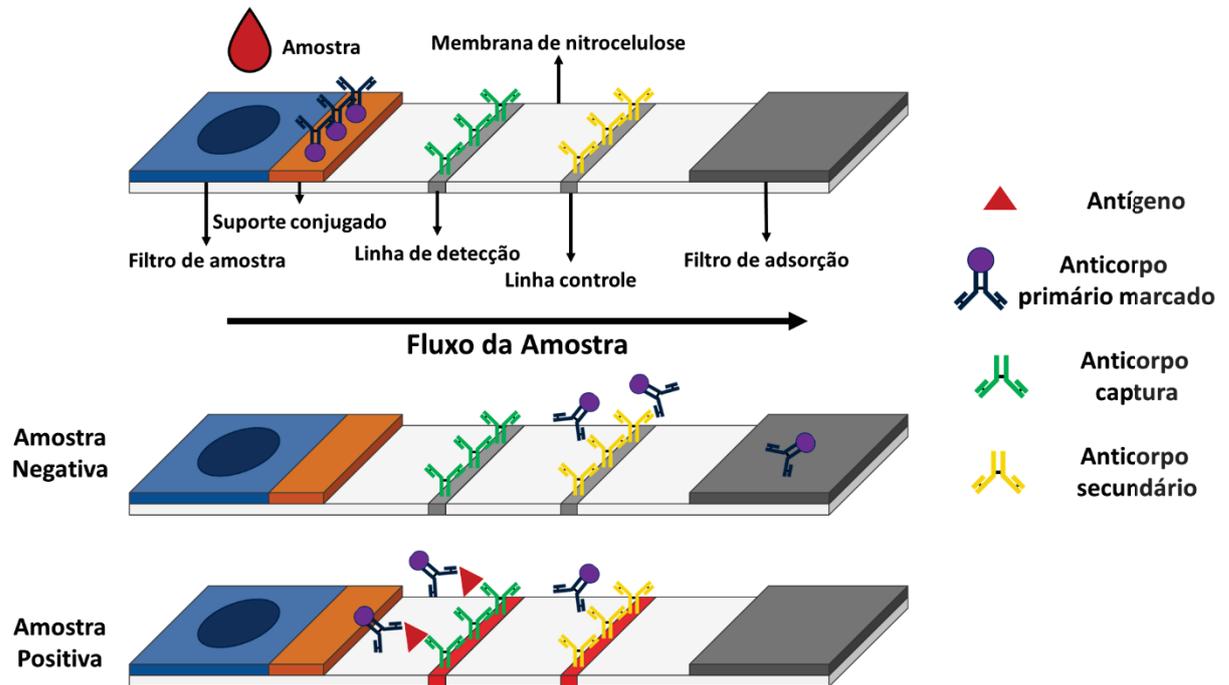
Apesar da alta confiabilidade nos ensaios citados, ELISA e RT-PCR, os equipamentos e reagentes necessários para realização dos ensaios apresentam elevado custo, os procedimentos são complexos e requerem elevado tempo de amostragem, o que dificulta o atendimento médico devido à centralização dos ensaios em laboratórios farmacêuticos [6].

Alternativamente, a literatura já relata diversas pesquisas voltadas para desenvolvimento de métodos para diagnóstico a fim de auxiliar no processo de

triagem [9]. Nesse sentido, as novas metodologias visam majoritariamente acessibilidade e descentralização, aumentando o acesso e acelerando o diagnóstico preliminar, permitindo uma melhor diferenciação e isolamento de indivíduos suspeitos. Uma alternativa aos testes padrão são os imunoenaios cromatográficos, mais especificamente os imunoenaios de fluxo lateral (LFIA, do inglês *lateral flow immunoassay*) [7].

Essa técnica utiliza um sistema a base de papel para ser realizada, seu dispositivo é composto por um filtro de amostra, um suporte conjugado, uma membrana de nitrocelulose e um filtro de adsorção. Assim como os testes ELISA os LFIA apresentam diferentes tipos de montagem, sendo o ensaio do tipo sanduiche o mais comumente usado. Em imunoenaios de fluxo lateral a amostra é inserida no filtro de amostra e transportada por capilaridade impulsionada pelo filtro de adsorção disposto na extremidade oposta do dispositivo. Ao chegar no suporte conjugado, a amostra entra em contato com anticorpo ou antígenos marcados, após isso, se o analito está presente, ele é ligado ao seu conjugado marcado, percorre a membrana de nitrocelulose e se liga a um anticorpo primário empregado para detecção e fixado em uma linha ao final da plataforma. Ao chegar na linha teste o alvo conectado a seu conjugado marcado gera um sinal colorimétrico que indica a detecção da espécie alvo. Além disso há uma segunda linha que serve de controle, que possui um anticorpo secundário para se liga aos conjugados marcados não ligados ao alvo e gerar um sinal de controle e indicar que o dispositivo está funcionando adequadamente [28]. A FIGURA 4 ilustra de forma esquemática um dispositivo LFIA.

FIGURA 4 – ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DE UM DISPOSITIVO LFIA COM MONTAGEM TIPO SANDUICHE.



FONTE: O AUTOR (2025).

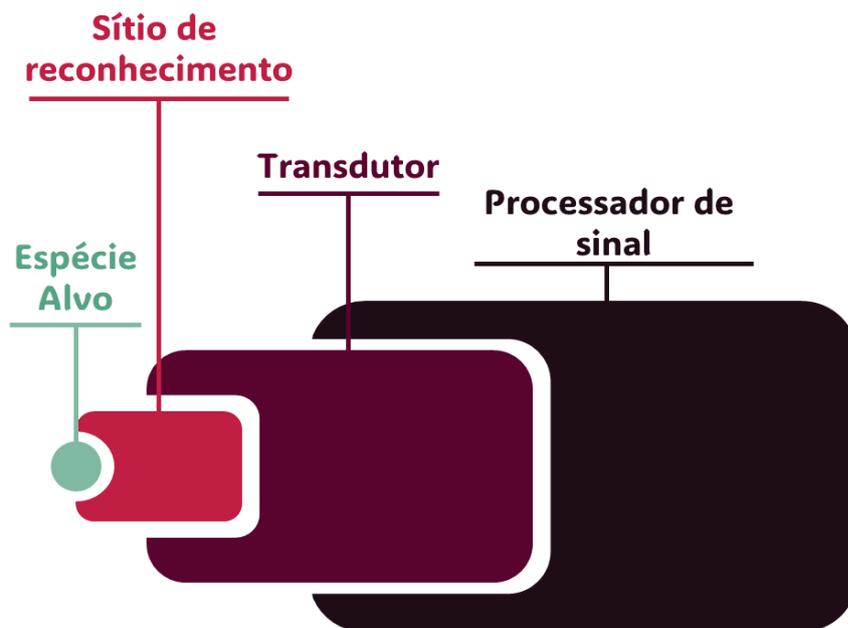
Por mais que os testes LTFA se mostrem rápidos, portáteis, de baixo custo e de fácil manuseio, no geral esses dispositivos apresentam problemas envolvendo sua sensibilidade e confiabilidade. Além disso, no caso do diagnóstico da Dengue, kits comerciais ainda apresentam dificuldades na diferenciação dos quatro sorotipos e no desenvolvimento de dispositivos multiplex empregando o LTFA [8].

Em crescente expansão, sensores eletroquímicos se mostram como uma alternativa viável para a construção de imunossensores. Tais sensores apresentam a premissa de montagem e detecção similar aos ensaios ELISA, reações imunobiológicas são utilizadas associadas às técnicas eletroquímicas para a formação de uma camada seletiva para detectar a espécie alvo. Esses sensores se mostram vantajosos pela possibilidade de não utilizar o anti-anticorpo marcado, o que simplifica o sistema. Além disso, por atenderem as demandas de acessibilidade e descentralização, já é relatado o uso de imunossensores eletroquímicos para a detecção de vírus como SARS-CoV-2 [29], HIV [30], DENV [31] e anticorpos contra o ZIKV [32]. Além disso, as características inerentes aos sensores eletroquímicos permitem o desenvolvimento de plataformas multiplex, que possibilitam a realização da detecção simultânea de múltiplos analitos, auxiliando na diferenciação de doenças que apresentam difícil distinção sintomática [33].

### 2.3 SENSORES ELETROQUÍMICOS

Para entender melhor a importância e o funcionamento dos sensores eletroquímicos no contexto dos imunossensores, é essencial compreender primeiro o que são sensores químicos de maneira geral. Sensores químicos correspondem a dispositivos que transformam informações químicas, como concentração de um analito, pela interação do alvo (analito) com um sítio de reconhecimento imobilizado sobre um suporte. Essa interação pode ser transduzida por algumas propriedades físicas do sistema, em um sinal analítico mensurável, que é relacionado ao alvo investigado [34]. Tais sensores são constituídos de três componentes básicos, que podem ser identificados de forma esquemática pela FIGURA 5:

FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DAS COMPONENTES DE UM SENSOR QUÍMICO



FONTE: O AUTOR (2025).

O sítio de reconhecimento transforma uma informação química em uma forma de energia, que é convertida em um sinal mensurável pelo segundo componente o transdutor, esse sinal por sua vez é armazenado e exibido pelo processador de sinal. Sensores químicos podem ser classificados de acordo com o princípio de operação do transdutor, ou seja, a propriedade física mensurada, como por exemplo, ópticas, magnéticas e eletroquímicas [34]. Sensores eletroquímicos tem como característica transformar uma interação entre o analito e o receptor em um sinal elétrico mensurável

como: corrente, potencial e carga. Esses dispositivos são comumente compostos por um arranjo de dois eletrodos (indicador e referência) ou compostos por três eletrodos (trabalho, referência e contra/auxiliar). Esses sensores se mostram versáteis e podem ser aplicados na detecção e determinação de diversos tipos de analitos em uma ampla variedade de amostras [35].

A incorporação de espécies na superfície do eletrodo de trabalho permite a melhora da sensibilidade e seletividade de sensores eletroquímicos, uma vez que modificam a natureza físico-química na interface eletrodo/solução, denominados de eletrodos quimicamente modificados (EQM) [36]. Diversos materiais são empregados para construção de EQM como por exemplo nanopartículas de ouro [37], nanotubos de carbono [38] e compósitos de grafeno e polianilina [39]. Vale ressaltar que quando interações biológicas ou processos bioquímicos são fontes do sinal analítico gerado no sítio de reconhecimento, tais sensores são classificados como biossensores, pode-se citar o uso de enzimas, células, microorganismos, proteínas e tecidos como bioreceptores [40].

Dentre as aplicações dos biossensores eletroquímicos se pode citar o uso para detecção de antígenos ou anticorpos, ou seja, classificados como imunossensores eletroquímicos. Tais sensores tem a resposta balizada na afinidade da interação antígeno-anticorpo e consequente formação de um imunocomplexo. Baseado nisso, a construção de imunossensores eletroquímicos consiste na imobilização de um elemento de reconhecimento biológico, que pode ser uma proteína ou um anticorpo. Interações imunológicas (antígeno-anticorpo) apresentam elevada seletividade, sensibilidade e permitem a detecção de concentrações extremamente baixas das espécies de interesse [9,10].

O processo de detecção eletroquímica da formação do imunocomplexo na superfície do sensor é comumente realizado de duas formas, com uso de um marcador ou sem marcação (*label-free*). A detecção com uso de marcador consiste no monitoramento da interação antígeno/anticorpo por meio de algum processo envolvendo o marcador, que produz um sinal eletroquímico, de forma direta ou indireta, permitindo verificar a formação do imunocomplexo. Podem-se citar como exemplos de marcadores enzimáticos, como a peroxidase, ou nanopartículas metálicas, como ouro. [9]. A detecção eletroquímica sem marcador realizada pelo monitoramento do aumento da dificuldade de uma sonda redox transferir carga com a superfície do eletrodo. Essa sonda se caracteriza por apresentar um comportamento

eletroquímico bem definido e devido as alterações das propriedades eletroquímicas da superfície do dispositivo antes e após incubação na presença do alvo é possível aferir alguma informação sobre a presença do analito na amostra. Normalmente, um exemplo de sonda são os íons ferricianeto ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ) e ferrocianeto ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ) [35].

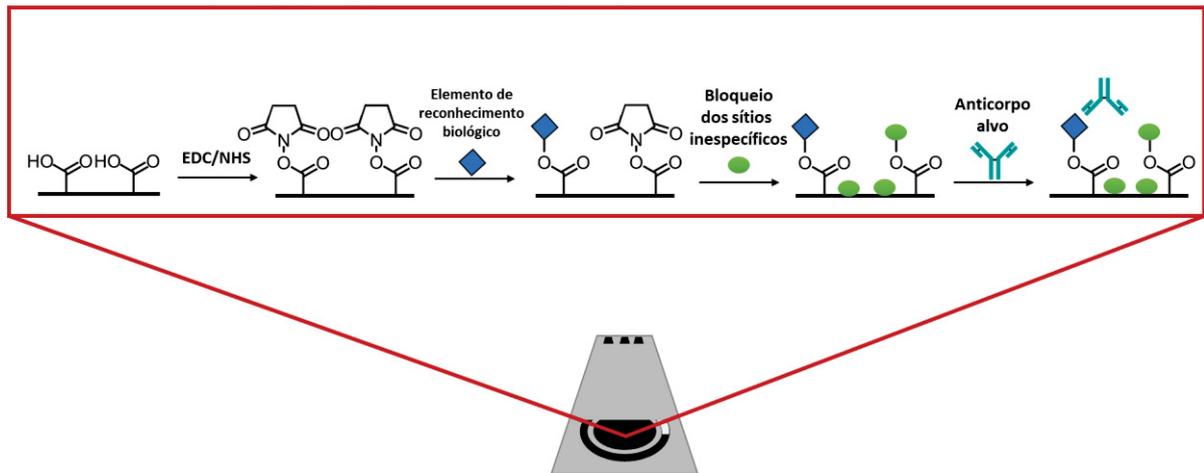
O uso dessa sonda ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ) permite, também, monitorar o processo de montagem do imunossensor. Conforme é ancorada cada espécie na superfície do eletrodo, ocorre um aumento na obstrução da superfície do eletrodo que dificulta a interação da sonda, para que ocorra o processo redox. Por exemplo, técnicas voltamétricas, onde é monitorada a corrente elétrica em função do potencial aplicado, é esperado reduções sucessivas das correntes de pico à medida que cada espécie biológica é ancorada. Outro exemplo, é a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, do inglês *electrochemical impedance spectroscopy*) cujo bloqueio na superfície gera aumentos na resistência a transferência de carga ( $R_{ct}$ ) entre a sonda e a superfície [35,41].

Classicamente, na construção de imunossensores eletroquímicos, o ouro é usado como eletrodo base de trabalho, dado sua biocompatibilidade. Como a interação entre uma biomolécula e a superfície do eletrodo não ocorre de maneira espontânea se mostra necessário a utilização de uma monocamada auto-organizada (SAM, do inglês *self assemble monolayer*). A utilização das SAM permite a formação de uma ponte entre a superfície do eletrodo de ouro e a proteína. Isso acontece através dos grupos funcionais presentes na estrutura da SAM, costumeiramente um grupo tiol e um ácido carboxílico ou uma amina. Dessa maneira, o grupamento tiol, advindo da SAM, se liga ao ouro e deixa seus grupos funcionais expostos e passivos de reações de ligação cruzada, que permitem a imobilização de biomoléculas [10,42].

Essa abordagem, apesar de funcional, apresenta diversas problemáticas como a dificuldade no arranjo da SAM e tempo de preparo. Com o propósito de minimizar as etapas de construção do imunossensor, outros materiais, como por exemplo, os carbonáceos podem ser explorados uma vez que podem apresentar grupos ácidos superficiais permitindo o ancoramento das bioestruturas na superfície do eletrodo de maneira direta, sem a necessidade da utilização da SAM. A literatura já relata o uso de materiais como biochar [43], *quantum dots* de grafeno (GQD) [44], óxido de grafeno (GO, do inglês *graphene oxide*) [45], dentre outros para a construção de imunossensores. Baseado nisso, são diversos os materiais investigados na

construção de imunossensores sem a necessidade da SAM. A FIGURA 6 esquematiza a construção de um imunossensor para detecção de anticorpos, utilizando grupos carboxílicos já presentes no material.

FIGURA 6 - ESQUEMA DE CONSTRUÇÃO DE UM IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS, UTILIZANDO GRUPOS CARBOXÍLICOS JÁ PRESENTES NO MATERIAL.



FONTE: AUTOR (2025).

A construção da camada seletiva pode ser feita através de reações de ligação cruzada. O mecanismo envolve a ativação dos grupos carboxílicos pelo par N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida e N-hidroxisulfosuccinimida (EDC/NHS), que são facilmente substituídos por aminas primárias volumosas. Sendo assim, uma vez em contato com estruturas proteicas, as moléculas EDC/NHS que se apresentam ligadas aos grupos carboxílicos são substituídas. Esse processo permite a imobilização covalente de proteínas na superfície do dispositivo. Contudo, a eficiência do processo de substituição e ligação depende de diversos aspectos (pH, tempo de exposição, temperatura, etc) e, portanto, podem restar EDC/NHS residuais não substituídos. Esses grupos não substituídos geram sítios de ligação inespecífica, que podem interagir e ou se ligar paralelamente com proteínas indesejadas. A fim de minimizar tal efeito pode ser utilizado uma proteína inerte, como é o caso da albumina de soro bovino (BSA), que bloqueia os sítios de ligação inespecíficos, sendo assim interações proteicas ocorrem majoritariamente através da interação com os anticorpos ligados a superfície do dispositivo, garantindo maior seletividade na detecção [43,46].

O uso de eletrodos convencionais, como pasta de carbono ou metálicos, leva a algumas limitações de ordem prática associadas a disponibilidade de eletrodos e, conseqüentemente, o tempo de preparo e avaliação dos imunossensores. Visando superar essas limitações a utilização de eletrodos impressos de carbono (SPE, do inglês *screen-printed electrode*), em substituição à eletrodos convencionais, vem sendo muito explorada na literatura. Muitas vezes essas plataformas são combinadas à nanoestruturas de carbono como material modificador, como reportado por Gogola et. al [30]. Nesse trabalho, em imunossensores eletroquímicos para detecção da proteína p24, associada ao HIV, foram desenvolvidos usando SPE modificados com GQD para melhorar o ancoramento do sítio de reconhecimento e a transdução do sinal eletroquímico da sonda.

Além do uso de novos materiais e plataformas de baixo custo e/ou descartáveis é importante explorar a rota de preparação dos dispositivos. Assim, os processos comumente empregados para a construção do imunossensores apresentam diversas etapas e requerem um elevado tempo de realização, que pode gerar variações no processo de montagem, seja por falhas no processo de adição dos materiais em cada etapa de incubação ou pela perda de material durante as lavagens.

Tendo em vista isso, pesquisas desenvolvidas foram direcionadas a investigar procedimentos visando reduzir o tempo de construção de imunossensores [47–49]. Nesse caso, estratégias de ancoramento de bioestruturas em materiais compatíveis, prévio a montagem do sensor, podem ser empregadas. Além disso, condições de incubação e interação da amostra podem ser alteradas visando minimizar os tempos de ensaio.

Baseado nisso, pode-se citar o uso do polihidroxibutirato (PHB) para síntese de nanopartículas com estrutura tipo *core-shell* com afinidade proteica. No caso do PHB, seu núcleo apresenta carácter hidrofóbico e sua estrutura externa apresenta sítios de ligação, que permitem o ancoramento de biomoléculas [50,51]. Essa sua afinidade com proteínas e também biocompatibilidade permite com que o PHB seja usado na área da saúde no desenvolvimento de vacinas, uma vez que fragmentos virais podem encapsulados ou incorporados em sua superfície com a finalidade de serem dispersos de forma segura no organismo, além de induzir o sistema imunológico a produzir anticorpos contra o antígeno alvo [52,53]. Pode-se citar também o uso do PHB na produção de fármacos, visto que de forma similar as vacinas

esse material permite com que fármacos sejam incorporados em sua superfície ou encapsulados para uma melhor distribuição dentro do organismo [51,54].

Na área de sensores é possível preparar o PHB de forma que sua superfície seja decorada com elementos de bioreconhecimento e dessa forma preparando uma camada seletiva a partir de uma única etapa, contornando problemas envolvendo de elevado tempo de construção e erros acumulados durante as etapas de montagem [47]. Inicialmente, o PHB empregado em imunossensores eletroquímicos foi utilizado de maneira etapa-a-etapa em comparação, paralela, com o EDC/NHS para as etapas de imobilização, como descrito por Martins et. [55]. O trabalho confirmou a possibilidade de ancoramento das proteínas no PHB, o qual foi posteriormente utilizado como plataforma de ancoramento em etapa única [47]. Em paralelo a isso, é importante ressaltar dispositivos impressos com impressão 3D para montagem de imunossensores e plataformas multiplex [56].

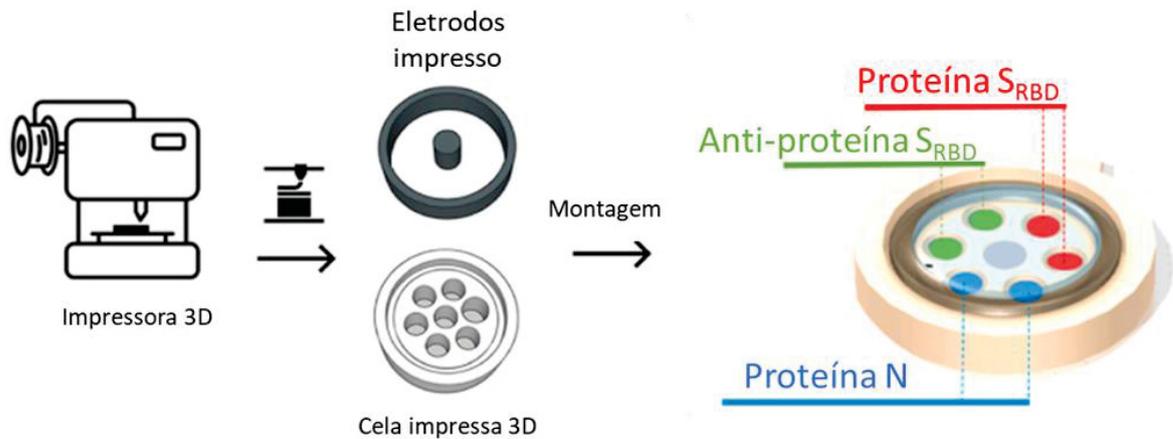
A impressão 3D corresponde a técnica de fabricação controlada de objetos tridimensionais com formas estruturais pré-definidas. Existem dois princípios básicos de impressão: (i) impressão aditiva, em que é realizada a adição de um material camada por camada até a formação do objeto 3D desejado e (ii) impressão subtrativa, corresponde ao desgaste de um material para formar o objeto 3D desejado. O princípio de impressão aditiva apresenta vantagens no quesito geração de menores quantidades de resíduos quando comparada com a técnica subtrativa. Dentro do princípio de impressão aditiva, o método de extrusão por deposição de material fundido representa o método de impressão mais comum utilizado por impressoras 3D, devido a sua simplicidade e disponibilidade a um baixo custo. Essa técnica se baseia no aquecimento de um material termoplástico até um estado semiderretido, seguido de sua extrusão camada por camada sobre uma superfície, após sua deposição o material resfria e se solidifica criando uma camada rígida e uniforme [57].

Materiais termoplásticos na forma de filamentos são normalmente empregados na impressão 3D podendo ser citado como exemplo ácido polilático (PLA), acrilonitrila butadieno estireno (ABS), policarbonato, poliamida. Para a produção de filamentos condutores alótropos de carbono (exemplo grafeno e negro de fumo) são misturados normalmente com PLA e ABS para formação de compósitos de carbono. A diversidade de materiais permite uma ampla gama de aplicações da técnica de impressão 3D [58,59].

A criação da impressora 3D representa um marco para o processo de fabricação e pesquisa, sendo aplicada nas mais diversas áreas, por exemplo nas áreas automobilística e aeroespacial através da prototipagem de peças de carros e aviões, desenvolvimento de modelos estruturais na arquitetura, prototipagem de armas na área militar e na área médica no desenvolvimento de implantes dentários e próteses [11]. Além disso a impressão vem sendo amplamente utilizada no desenvolvimento de sensores nas áreas biomédicas e monitoramento ambiental [59]. A associação da impressão 3D com a construção de sensores eletroquímicos se mostra vantajosa, uma vez que a elevada versatilidade da técnica de impressão 3D permite o desenvolvimento de sistemas de detecção complexos com baixo custo. Nesse caso, destaca-se a produção de eletrodos com diferentes formatos e composições para serem empregados em processos redox e eletrocatalíticos. Além disso, a construção de sistemas microfluídicos e células eletroquímicas [57]. Existe uma demanda crescente na área da saúde por dispositivos capazes de obter o máximo de informações biológicas possível dentro de quantidades mínimas de amostra. O desenvolvimento de dispositivos multiplex mostra-se uma ferramenta eficaz para a indústria biofarmacêutica identificar e quantificar biomarcadores de produtos farmacêuticos e epidemiológicos [6].

A impressão 3D associada as técnicas eletroquímicas já mostraram resultados para construção de dispositivos para diagnóstico de doenças virais, um exemplo envolve a confecção de um sistema de 3 eletrodos (trabalho, contra e pseudo-referência) com uso de filamento de PLA e grafite para detecção de proteína S do vírus SARS-CoV-2 em amostra de saliva, por meio de técnica voltamétrica [60]. Outro exemplo é confecção de um suporte 3D para eletrodos impressos empregado para construção de um imunossensor de uma etapa com uso de nanopartículas magnéticas decoradas com anticorpos para detecção de amoxicilina em amostras leite cru, com a finalidade de averiguar o abuso do uso de antibióticos. Pode-se citar também a construção de um dispositivo miniaturizado de 6 eletrodos de trabalho impressos 3D, utilizado para a detecção voltamétrica de três biomarcadores do COVID-19 (proteína S, proteína N e anticorpo para proteína S do vírus SARS-CoV-2) em amostras de soro e saliva. A FIGURA 7 apresenta de forma esquematizada a cela eletroquímica e o sistema de detecção proposto [13].

FIGURA 7 - DISPOSITIVO MULTIPLEX 3D E SISTEMA DE DETECÇÃO ELETROQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE TRÊS BIOMARCADORES PARA COVID-19.



FONTE: ADAPTADO DE MORAWSKI (2025) [13].

Os sensores eletroquímicos se mostram vantajosos no desenvolvimento de imunossensores, visto que permitem a produção de dispositivos simples, com elevada sensibilidade, miniaturizados e de baixo custo, conferindo maior acessibilidade e descentralização ao processo de diagnóstico [61]. Além disso, o uso de sistemas multiplex ou multianálito possibilitam um aumento na precisão e exatidão de um teste quando comparado com análises isoladas de biomarcadores, necessitam de menores quantidades de amostra, reagentes e tempo de análise [10]. Nesse sentido, o uso de técnicas de impressão 3D se mostra vantajoso na construção de dispositivos multiplex, uma vez que apresentam elevada versatilidade em construir dispositivos com diversos formatos, sendo já reportado seu uso na construção de biossensores eletroquímicos [13,62].

Frente a tudo que foi exposto e tendo como base o sistema de detecção multiplex desenvolvido por Morawski et al. [13] e processo de construção de imunossensor de uma etapa utilizando PHB de Martins et al. [47] o presente projeto propõe o desenvolvimento de uma cela impressa em 3D, em geometria multiplex com 6 eletrodos que foram modificados com oxido de grafeno reduzido (ErGO, do inglês *electrochemical reduced graphene oxide*) para o ancoramento de antígenos e anticorpos da DENV-1, utilizando uma estratégia de montagem de uma etapa com o uso do PHB decorado com o sítio de reconhecimento, visando processo de triagem descentralizado, robusto e acessível.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Construir e avaliar dispositivos projetados com tecnologia de impressão 3D para desenvolver um sistema multiplex baseado em imunossensores eletroquímicos para detecção *label-free* de antígenos e anticorpos de Dengue.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Construir as células eletroquímicas e eletrodos por meio de técnicas de impressão 3D

Investigar as melhores estratégias de construção/detecção de imunossensores eletroquímicos para Dengue tipo 1.

Caracterizar a morfologia e estudar o comportamento eletroquímico dos sensores construídos em relação aos analitos considerando sensibilidade, seletividade e estabilidade das respostas;

Avaliar o desempenho analítico, efeito de concomitantes e a aplicação dos imunossensores construídos, com uso de sondas eletroquímicas com perfil eletroquímico bem definido pela literatura, por exemplo, íons ferricianeto de potássio.

Integrar os imunossensores eletroquímicos construídos na forma de um dispositivo multiplex construídos por meio de impressão 3D.

Aplicar e validar os resultados dos métodos analíticos desenvolvidos para a determinação dos analitos avaliados.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES

A TABELA 1 apresenta a lista dos reagentes utilizados no trabalho.

TABELA 1 – LISTA DE REAGENTES

Reagentes	Procedência	Grau / Concentração
Ferricianeto de potássio	Vetec	P.A
Cloreto de potássio	Exodo Científica	P.A
Cloreto de sódio	Dinâmica	P.A
Hidróxido de sódio	Dinâmica	P.A
Ácido clorídrico	J. T. Baker	36,5 %
Fosfato de potássio monobásico anidro	Synth	P.A
Fosfato de sódio dibásico anidro	Vetec	P.A
Albumina de soro bovino	Fundação Instituto Oswaldo Cruz	1,00 mg mL <sup>-1</sup>
Proteína NS1 DENV-1	Native Antigen	1,00 mg mL <sup>-1</sup>
Anticorpos IgG monoclonal contra NS1 DENV-1	Native Antigen	1,50 mg mL <sup>-1</sup>
Proteína YFV	Native Antigen	2,96 mg mL <sup>-1</sup>
Anticorpos IgG monoclonal contra YFV	Native Antigen	1,00 mg mL <sup>-1</sup>
Proteína CHIKV	Native Antigen	0,13 mg mL <sup>-1</sup>
Anticorpos IgG monoclonal contra CHIKV	Native Antigen	1,00 mg mL <sup>-1</sup>

FONTE: AUTOR (2025).

#### 3.2 IMPRESSÃO 3D DOS DISPOSITIVO MULTIPLEX E ELETRODOS

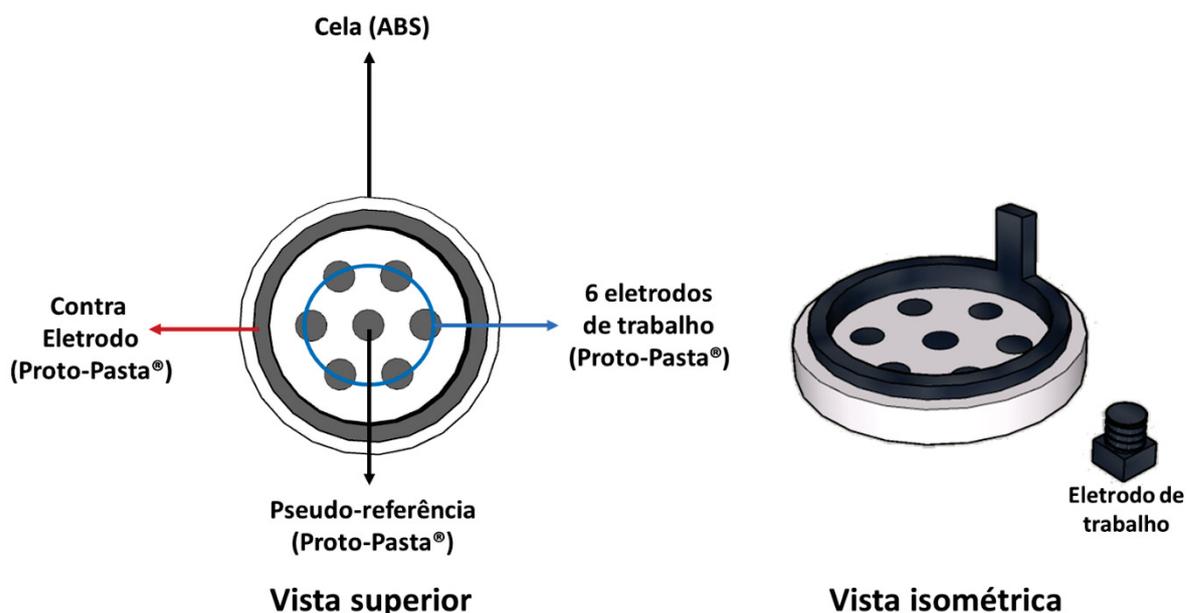
As peças 3D foram impressas com uma impressora GTMax 3D CORE A1V2 dual, que apresenta dois bicos extrusores, que permitem o uso de dois materiais diferentes simultaneamente. A área de impressão corresponde a 250 mm de comprimento, 200 mm de largura e 250 mm de altura, sendo uma área de trabalho adequada para o desenvolvimento dos dispositivos multiplex desejados. Para elaboração das peças 3D foi utilizado o programa SketchUp 3D – 2019, sendo

exportados os arquivos em formato *.stl* e impressos com o gerenciamento do programa Simplify3D®.

Para a construção do dispositivo multiplex foi utilizado polímeros comumente utilizados em impressão 3D, sendo que para a estrutura base foi empregado o acrilonitrila butadieno estireno (ABS), a temperatura do bico de extrusão foi ajustada para 220 °C, a mesa de impressão em 90 °C e preenchimento de 100%. A cela desenvolvida apresenta formato circular com dimensões de 3,95 cm de comprimento 3,95 cm de largura e 0,6 cm de altura, com furos com rosca para a inserção dos eletrodos de trabalho e referência e um encaixe para o contra eletrodo no formato de anel.

Já para os eletrodos foi empregado filamento condutor comercial Proto-Pasta®, constituído de PLA e negro de fumo (elemento condutor), o bico de extrusão foi ajustado para 200 °C, a mesa de impressão 60 °C e o preenchimento foi de 100%. Os eletrodos de trabalho e referência foram desenvolvidos no formato de parafuso com dimensões de 4,3 mm de comprimento 4,1 mm de largura e 1,00 cm altura e o contra eletrodo apresenta o formato de um anel de 3,39 cm de diâmetro e 5,0 mm de altura de dimensões, com um pino de 0,8 cm de altura e 3,90 cm de largura para realizar o contato elétrico. A FIGURA 8 apresenta a proposta inicial do dispositivo.

FIGURA 8 - DISPOSITIVO MULTIPLEX DE IMPRESSÃO 3D.



FONTE: AUTOR (2025).

### 3.3 PREPARAÇÃO DO POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)

O Núcleo de Fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (NFI), coordenado pelo professor Dr. Marcelo Mueller dos Santos, produziu partículas de polihidroxibutirato (PHB) usando o método de nanoprecipitação [63]. Para a síntese, 10 mg de PHB foram dissolvidos em 10 mL de TFE (2,2,2-trifluoroetanol) sob agitação à temperatura ambiente. A solução foi então dialisada através de uma membrana de celulose (12 kDa) contra 2 L de água destilada por 24 horas. Ao final foi obtido uma dispersão de nanopartículas de PHB com concentração de 3,0 mg mL<sup>-1</sup>.

### 3.4 SÍNTESE OXIDO DE GRAFENO (GO)

O GO utilizado nesse trabalho foi fornecido pelo Grupo de Química de Materiais da Universidade Federal do Paraná (GQM), coordenado pelo professor Dr. Aldo José Gorgatti Zarbin. Para isso, 2,0 g de grafite, 1,0 g de NaNO<sub>3</sub> e 46 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% foram misturados sob forte agitação e baixa temperatura por 15 minutos. Em seguida, 6,0 g de KMnO<sub>4</sub> foram adicionados gradualmente, e a mistura agitada vigorosamente por 75 minutos. Após isso, 92 mL de água destilada à temperatura ambiente foram adicionados lentamente, seguidos por 280 mL de água destilada a 100 °C. Para concluir a reação, 10 mL de solução aquosa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) foram adicionadas para consumir o permanganato remanescente, e a mistura final agitada por mais 30 minutos. O sólido resultante foi filtrado, lavado com uma solução aquosa de HCl (10 %) e água destilada várias vezes, e então seco a 60 °C por 24 horas. Na segunda etapa, o GO é obtido foi dispersado em água deionizada na proporção de 1,0 mg mL<sup>-1</sup>, utilizando um banho de ultrassom por 90 minutos. A dispersão resultante foi centrifugada a 3000 rpm por 90 minutos, resultando em uma dispersão de cor marrom, característica do GO [64,65].

### 3.5 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato µAutolab tipo III da Metrohm Autolab (Utrecht, Holanda) controlado pelo programa NOVA 2.10. Foram utilizadas técnicas de voltametria cíclica (CV, do inglês *cyclic voltammetry*) e voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *square wave voltammetry*) e EIS. Para as técnicas de CV e SWV foi realizado um

processo de pré-condicionamento aplicando -0,8 V por 10 s, seguida da varredura de -0,8 a 0,6 V, para a CV foi utilizada uma velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup> e 3 ciclos e para SWV foi utilizada uma amplitude de pulso de 150 mV com frequência de pulso de 2 Hz e velocidade de varredura de 10 mV s<sup>-1</sup>. A medida de EIS foi executada para frequências variando de 100 kHz a 50 mHz com amplitude de 10 mV em condição de potencial de circuito aberto. Foram também realizadas medidas de cronoamperometria, com aplicação de -1,8 V por 30 s.

### 3.6 TRATAMENTO E MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS

Os eletrodos foram tratados numa condição adaptada a estudada por Kalinke *et. al* [66]. Esse tratamento consiste em submergir os eletrodos em hidróxido de sódio, sendo que os parâmetros de concentração, temperatura e tempo foram estudados na faixa de 0,25 a 1,00 mol L<sup>-1</sup>; 25 a 60 °C e 5 a 60 min sob agitação, a fim de remover o PLA superficial e expor o negro de fumo, melhorando aumentando a área eletroativa do eletrodo. Foram estudadas diferentes concentrações de hidróxido de sódio, temperatura e tempo de tratamento dos eletrodos, avaliando o perfil voltamétrico frente a sonda redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> (2,0 mmol L<sup>-1</sup>) em KCl (0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 3,0).

Para a modificação do eletrodo foi adicionada a cela eletroquímica uma dispersão de GO com concentração inicial de 0,12 mg mL<sup>-1</sup>, que foi diluído 1:1 numa solução de KCl pH 3,0. Foi então reduzido eletroquimicamente o GO na superfície dos eletrodos de trabalho por meio da aplicação de -1,8 V por 60 s.

### 3.7 CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE POR ÂNGULO DE CONTATO

Para as medidas de ângulo de contato os eletrodos em formato de parafuso foram fixados em uma placa com rosca impressa em ABS. As imagens foram capturadas utilizando um microscópio digital da marca *NovaDigital*®. Nos testes, adicionou-se 10 µL de água destilada sobre a área de trabalho do eletrodo, foram comparados os ângulos para o eletrodo sem tratamento e tratado em meio de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> por 30 min a 60 °C. Os ângulos de contato foram mensurados por meio do programa *ImageJ*.

### 3.8 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem como objetivo avaliar as características morfológicas do eletrodo de trabalho sem tratamento e

tratado. Também foi avaliada a superfície do eletrodo tratado em comparação com a superfície do eletrodo tratado e modificado com ErGO e com PHB depositado na superfície. Para essas análises de MEV foi utilizado um Microscópio Eletrônico de Varredura de Alta Resolução FEI, modelo Quanta 450, com fonte de elétrons FEG (do inglês *field emission gun*), que possui resolução de 1,0 nm. O equipamento utilizado para tais caracterização foram disponibilizados pelo Centro de Microscopia Eletrônica UFPR. Para a contagem do tamanho de partícula de PHB foi utilizado o programa *ImageJ*

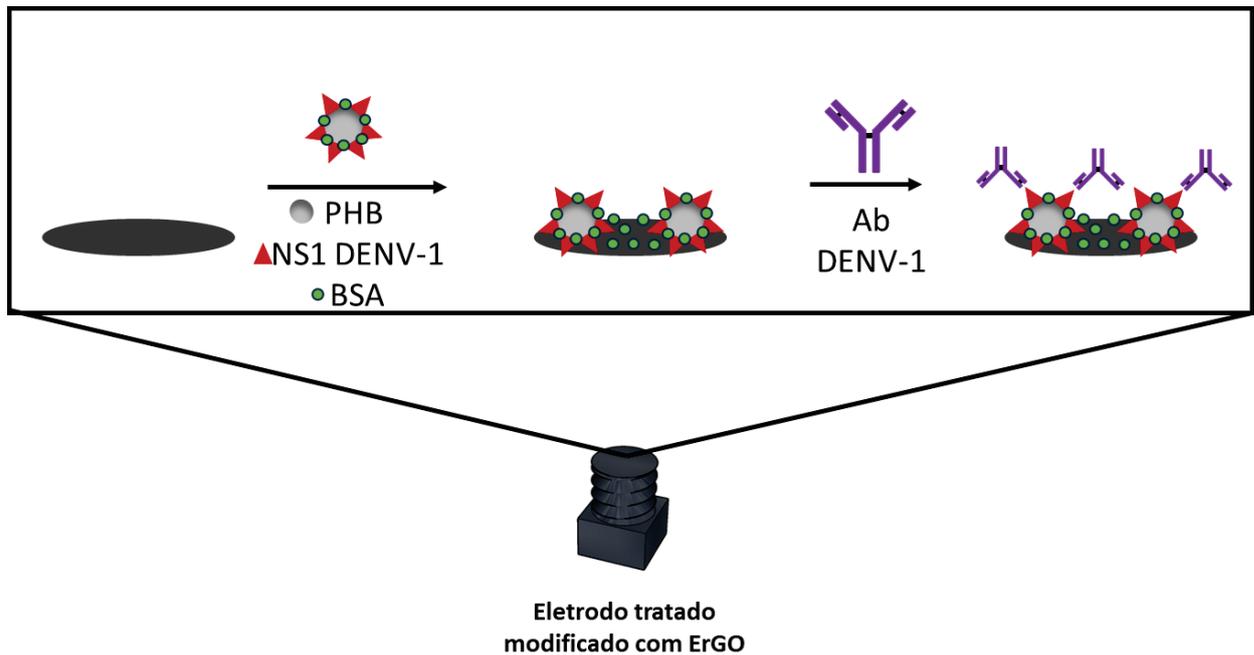
### 3.9 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTOMETRIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

Os espectros na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*) foram obtidos com o uso de um espectrômetro Bruker Alpha II. As medidas foram realizadas com pastilhas de KBr, com varredura de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , que possuía 4  $\text{cm}^{-1}$  de resolução e aquisição de 64 scans. O equipamento foi disponibilizado pelo Laboratório Multiusuário de Espectrometria no Infravermelho UFPR (LaMIV).

### 3.10 CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DOS IMUNOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA DENGUE

A imobilização do sítio de reconhecimento foi realizada com uma mistura de uma solução contendo PHB decorado com DENV-1 e BSA em tampão PBS pH 7,4. Essa mistura foi preparada primeiramente pela mistura de PHB e proteína NS1 de DENV-1 com concentrações respectivas de 3,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em solução de PBS (0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 7,4), essa solução foi mantida sob agitação por 1 h a 4 °C. A partir dessa mistura foi preparada uma segunda dispersão contendo 10 % (v/v) de BSA (1,0 mg  $\text{mL}^{-1}$ ), mantida sob agitação por 1 h a 4 °C. Um volume de 10  $\mu\text{L}$  dessa dispersão final foi adicionado a superfície do eletrodo de trabalho e deixado em estufa a 37 °C até total evaporação do solvente (20 min). Após a preparação do sítio de reconhecimento sobre o eletrodo de trabalho, o sensor está pronto para incubação na presença do alvo, anticorpo contra NS1 DENV-1 (Ab DENV-1). Essa etapa foi realizada em estufa a 37 °C por 1 h. A FIGURA 9 mostra ilustra o processo de construção da camada seletiva.

FIGURA 9 - MONTAGEM DA CAMADA SELETIVA UTILIZANDO ELETRODO IMPRESSO POR 3D MODIFICADO COM ErGO UTILIZANDO PHB PARA DETECÇÃO DE Ab DENV-1.



FONTE: O AUTOR (2025).

Após cada etapa da construção foi feita a lavagem dos eletrodos com solução tampão de PBS ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4), para remover o excesso de material não ligado à superfície eletródica. Cada etapa envolvida na construção do imunossensor foi avaliada por medidas de SWV e/ou EIS frente a sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  ( $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em PBS ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4). Medidas eletroquímicas (SWV ou EIS) na presença dos íons  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  após a imobilização do sítio de reconhecimento foram empregadas como controle e comparadas com os resultados obtidos após a etapa de incubação. Os resultados foram expressos em termos de variação percentual das correntes de pico ( $I_p$ ) e de resistência a transferência de carga ( $R_{ct}$ ) antes (controle) e após incubação.

### 3.11 CURVA ANALÍTICA PARA DETECÇÃO Ab DENV-1

Para avaliar a relação entre a concentração de Ab DENV-1 e o sinal eletroquímico foram realizadas medidas de SWV e EIS variando a concentração de anticorpo alvo numa faixa de  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  a  $2,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . A partir desses resultados foi construída uma curva analítica para determinar a relação entre resposta eletroquímica e concentração dos analitos.

### 3.12 TESTE DE SELETIVIDADE NA PRESENÇA DE ANTICORPOS DE CHIKUNGUNYA (Ab CHIKV) E FEBRE AMARELA (Ab YFV)

Para avaliar a seletividade do sensor foram realizados testes de EIS e SWV utilizando anticorpos contra YFV e CHIKV em diferentes combinações, visto que são doenças em que o vírus pode ser transmitido pelo *Aedes aegypti*. Foram preparadas soluções com concentração  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada anticorpo.

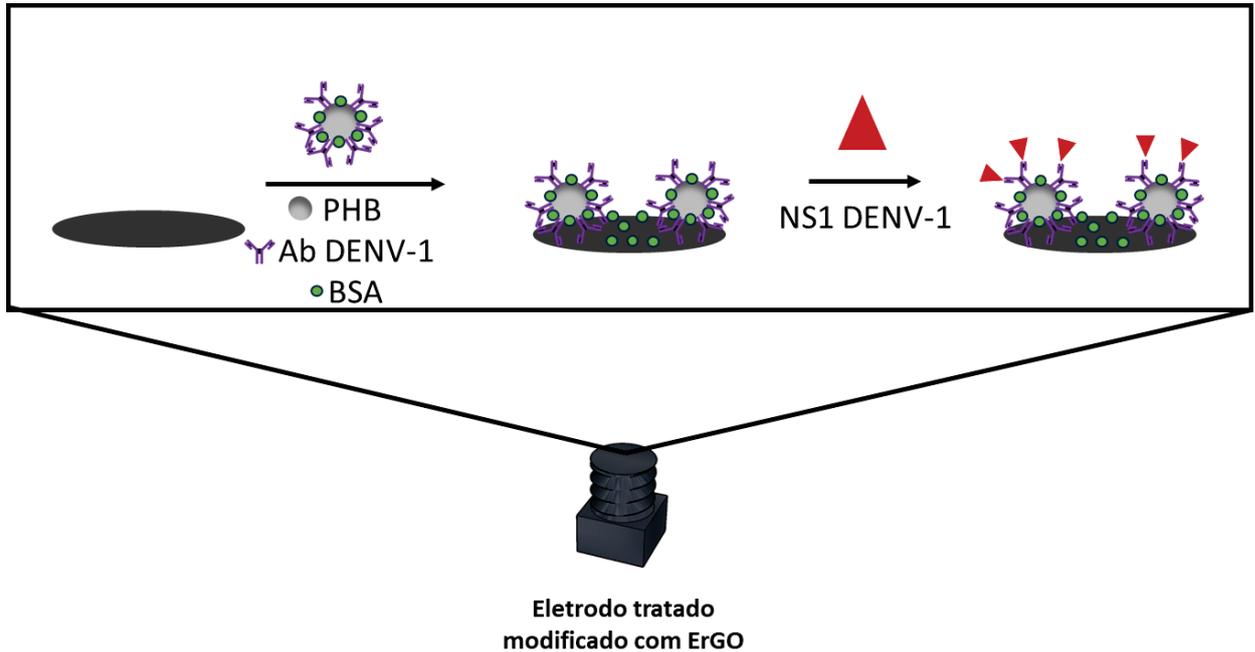
### 3.13 AMOSTRA DE SORO FORTIFICADO COM Ab DENV-1

Para os estudos envolvendo soro fortificado foram preparadas duas diluições na proporção de 1:1000 em tampão PBS de uma amostra de soro comercial fornecido pela SIGMA ALDRICH, obtidos a partir do sangue total coagulado de um homem com sorotipo AB, com teor de hemoglobina menor que  $250 \text{ mg L}^{-1}$ . Uma das amostras foi fortificada com  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Ab DENV-1. Essas amostras foram avaliadas por meio das técnicas de EIS e SWV.

### 3.14 CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DOS IMUNOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENO DE DENGUE (NS1 DENV-1)

Similar a etapa de construção camada seletiva para detecção de Ab contra DENV-1. Uma mistura de uma solução contendo PHB, Ab contra DENV-1 e BSA em tampão PBS pH 7,4 foi preparada, para isso foi primeiramente foi misturado PHB e anticorpo contra a proteína NS de DENV-1 com concentrações respectivas de  $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  em solução de PBS ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4), essa solução foi mantida sob agitação por 1 h a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . A partir dessa mistura foi preparada uma segunda mistura contendo BSA ( $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ), mantida sob agitação por 1 h a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .  $10 \mu\text{L}$  dessa mistura final foi adicionada a superfície do eletrodo de trabalho e deixada em estufa a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  até total evaporação do solvente (20 min). Após a incubação do sítio de reconhecimento o eletrodo de trabalho estava pronto para incubação do anticorpo contra DENV-1, que foi deixado em estufa a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 h. A FIGURA 10 mostra ilustra o processo de construção da camada seletiva

FIGURA 10 - MONTAGEM DA CAMADA SELETIVA UTILIZANDO ELETRODO IMPRESSO POR 3D MODIFICADO COM ErGO UTILIZANDO PHB PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENO (NS1 DENV-1).



FONTE: O AUTOR (2025)

Após cada etapa da construção foi feita a lavagem dos eletrodos com solução tampão de PBS ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4), para remover o excesso de biomoléculas não ligadas. A construção foi avaliada por meio do perfil de resposta da sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  ( $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em PBS ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4).

### 3.15 CURVA ANALÍTICA PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNA NS1 DENV-1

Para avaliar a relação entre a concentração de proteína NS1 DENV-1 e o sinal eletroquímico foram realizadas medidas de SWV e EIS. A concentração da proteína alvo foi variada numa faixa de concentração de  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  a  $1,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  para a técnica de EIS e para técnica de SWV foi variada numa faixa de  $20 \text{ ng mL}^{-1}$  a  $1,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . A partir desses resultados foi construída uma curva de calibração para determinar a relação de linearidade do sensor.

### 3.16 TESTE DE SELETIVIDADE FRENTE PROTEÍNAS DE CHIKV E YFV

Para avaliar a seletividade do sensor foram realizados testes de EIS e SWV utilizando proteína YFV e CHIKV em diferentes combinações, visto que são doenças em que o vírus pode ser transmitido pelo *Aedes aegypti*. Foram preparadas soluções com concentração  $1,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada anticorpo.

### 3.17 AMOSTRA DE SORO FORTIFICADO COM PROTEÍNA DENV-1

Para os estudos envolvendo soro fortificado foram preparadas duas amostras de soro diluídas na proporção de 1:1000 em tampão PBS de um estoque de soro comercial fornecido pela SIGMA ALDRICH, obtidos a partir do sangue total coagulado de um homem com sorotipo AB, com teor de hemoglobina menor que 25 mg dL<sup>-1</sup>. Uma das amostras era composta apenas do soro diluído, que serviu de soro negativo e a outra amostra foi fortificada com 1,0 µg mL<sup>-1</sup> de DENV-1. Essas amostras foram avaliadas por meio das técnicas de EIS e SWV.

### 3.18 AVALIAÇÃO DO DISPOSITIVO MULTIPLEX

O sistema foi montado com três eletrodos trabalho preparados para detecção sequencial de Ab DENV-1 e três para a detecção de NS1 DENV-1 e foram preparadas amostras contendo soro comercial diluído numa proporção de 1:1000 em tampão PBS: soro negativo, soro fortificado com 100 ng mL<sup>-1</sup> Ab DENV-1 e soro fortificado com 100 ng mL<sup>-1</sup> NS1 DENV-1.

### 3.19 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

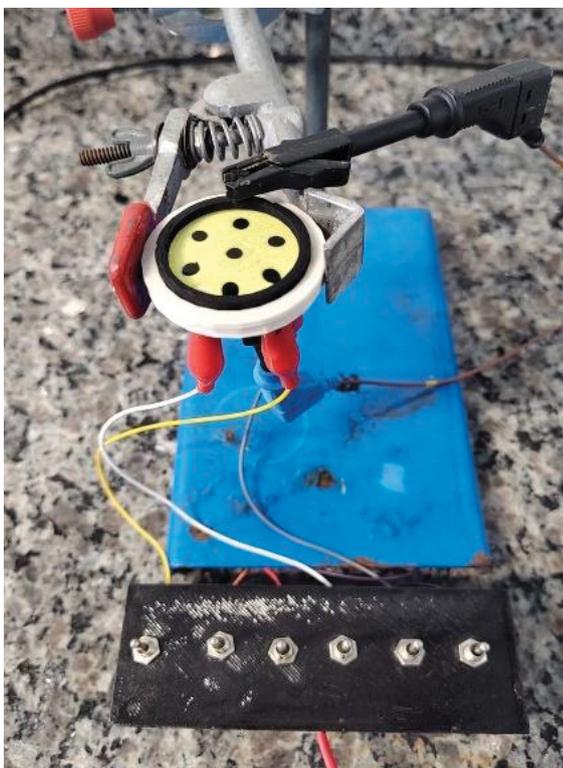
Todas as medidas foram realizadas em triplicata. Para comparar as médias dos resultados entre os diferentes grupos, foram aplicados o teste t bicaudal (para dois grupos) ou a Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey (para três ou mais grupos). Essa abordagem teve como objetivo avaliar a existência de diferenças significativas entre os resultados comparados. Para dois grupos, o teste t bicaudal foi utilizado, pois é mais adequado para comparar as médias de dois conjuntos de dados. Para três ou mais grupos, foi realizada uma ANOVA de fator único. Quando a ANOVA indicou diferenças significativas entre as médias, o teste de Tukey foi aplicado para identificar quais pares de grupos diferiam entre si. Esse teste utiliza a variabilidade dentro dos grupos (fornecida pela ANOVA) e o número de réplicas para calcular a diferença mínima significativa (DMS), permitindo identificar grupos com médias estatisticamente diferentes. Em todas as análises, foi considerado um nível de confiança de 95%. Os cálculos foram realizados utilizando o programa Origin® versão 2019.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DOS ELETRODOS IMPRESSOS EM 3D.

A construção de sensores eletroquímicos por meio da impressão 3D oferece uma série de benefícios significativos, o que permite a fabricação de dispositivos com designs altamente personalizados e geometrias complexas [67]. Sendo assim foi desenvolvida uma plataforma impressa em 3D miniaturizada e portátil que comportasse múltiplos eletrodos de trabalho. A FIGURA 11 apresenta a cela eletroquímica multiplex construída por impressão 3D já montada e pronta para uso.

FIGURA 11 - FOTO DA CELA ELETROQUÍMICA POR IMPRESSÃO 3D MONTADA E PREENCHIDA COM SOLUÇÃO DE  $K_3[Fe(CN)_6]$  2,0 mmol L<sup>-1</sup> EM KCl pH 3,0.



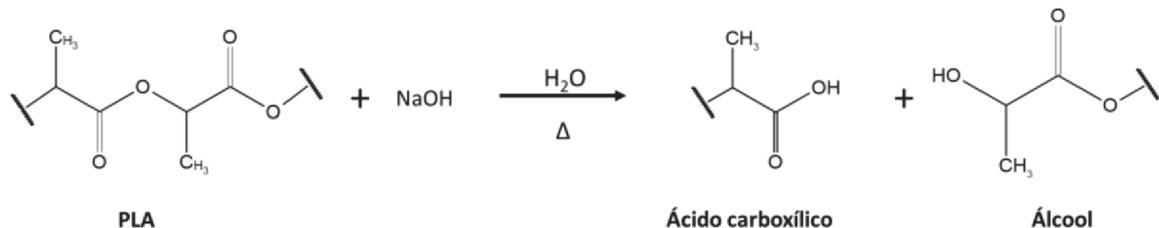
FONTE: O AUTOR (2025).

A FIGURA 11 mostra uma cela eletroquímica feita por impressão 3D com formato circular, que comporta um volume mínimo de operação de 1,00 mL e máximo de 4,00 mL. Essa geometria foi escolhida para manter os eletrodos de trabalho equidistantes dos eletrodos de referência e contra eletrodo, a fim de minimizar efeitos de potencial elétrico não compensado devido a efeitos ôhmicos entre o eletrodo de trabalho e de referência [43]. Foi utilizado um sistema de conexão analógico para

conectar os eletrodos de trabalho ao potenciostato e dessa forma facilitar a realização das medidas.

Filamentos condutores, de modo geral, se apresentam como materiais compósitos, sendo essencialmente constituídos de um material aglutinante, nesse caso o polímero termoplástico, associado a um material condutor. Sendo assim, a superfície eletroativa pode ser comprometida devido a presença do material aglutinante, não condutor, superficialmente, tornando necessário o tratamento da superfície para remover o material isolante. Pode-se citar como um exemplo de tratamento a imersão do eletrodo polimérico em uma solução de NaOH por um período determinado. Durante esse processo, o NaOH reage com grupos funcionais na superfície do polímero, como grupos ácidos carboxílicos ou hidroxilas, levando à formação de grupos hidroxilados livres da rede polimérica, que podem ser removidos através da lavagem com água e etanol [66]. A FIGURA 12 ilustra a reação de hidrólise alcalina do PLA

FIGURA 12 – REAÇÃO DE HIDRÓLISE ALCALINA DO ÁCIDO POLILÁTICO (PLA).



FONTE: O AUTOR (2025).

Nesse sentido, o efeito da concentração de NaOH, temperatura e tempo de tratamento desses eletrodos é significativo e pode influenciar diversas propriedades do eletrodo. Afetando diretamente a taxa e a extensão da reação química que ocorre na superfície do eletrodo durante o processo [68]. Então, estudos iniciais consistiram na avaliação da superfície do eletrodo recém impresso e de possíveis tratamentos superficiais, que visam a exposição do material condutor. Para avaliar a melhora do dispositivo foram realizadas medidas de CV frente a uma sonda de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  em meio de KCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> pH 3,0.

A TABELA 2 sumariza os parâmetros de tratamento avaliado, juntamente com os parâmetros que apresentaram melhor desempenho.

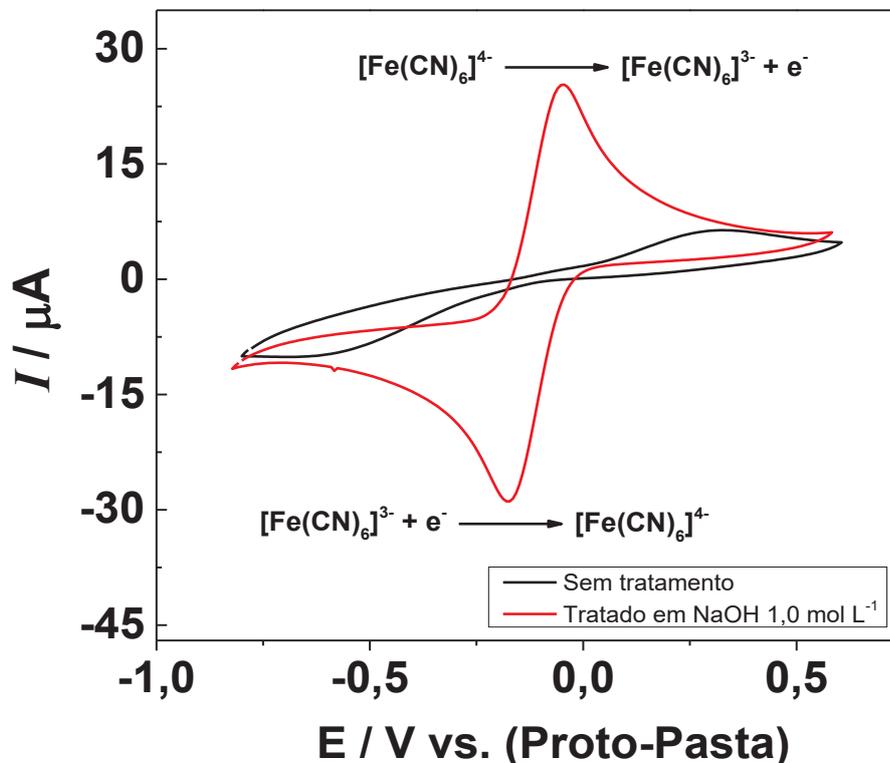
TABELA 2 – PARÂMETROS AVALIADOS PARA O TRATAMENTO DO ELETRODOS 3D.

Parâmetro	Faixa de estudo	Condição escolhida
Concentração de NaOH / mol L <sup>-1</sup>	0,25 – 1,50	1,00
Temperatura / °C	25 - 100	60
Tempo / min	5 a 60	30

FONTE: O AUTOR (2025).

A FIGURA 13 apresenta os perfis representativos da CV frente a sonda  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  em meio de KCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> pH 3,0 obtidos para os eletrodos sem tratamento e tratado em meio de NaOH 1,00 mol L<sup>-1</sup> a 60°C por 30 min.

FIGURA 13 – PERFIS VOLTAMÉTRICO DOS ELETRODOS DE TRABALHOS SEM TRATAMENTO E TRATADO EM HIDRÓXIDO DE SÓDIO 1,00 mol L<sup>-1</sup> a 60 °C POR 30 min FRENTE A SONDA  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  EM KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 3,0, APLICAÇÃO DE POTENCIAL DE -0,8 A 0,6 V, VELOCIDADE DE VARREDURA De 50 mV s<sup>-1</sup>, COM 3 CICLOS.



FONTE: AUTOR (2025).

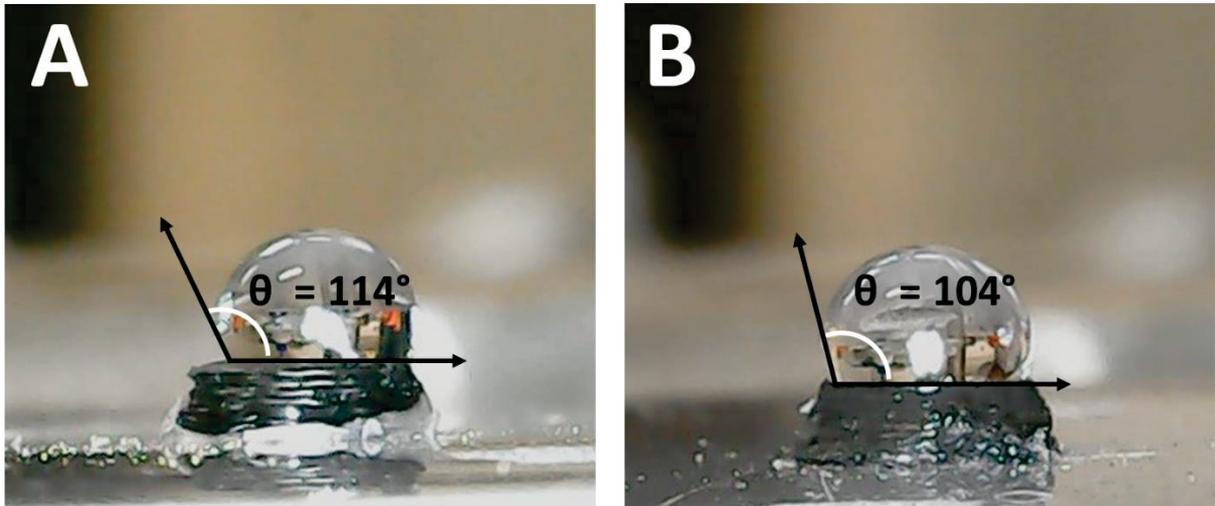
A partir do voltamograma da FIGURA 13 é possível observar o perfil redox da sonda  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , que apresenta dois sinais de picos característicos, sendo o pico

no sentido positivo de varredura referente ao processo de oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  para  $\text{Fe}^{3+}$  e o pico no sentido de varredura negativa o processo de redução do  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$ .

O eletrodo sem tratamento apresenta baixa condutividade, visto que seu perfil voltamétrico tem picos de corrente com pouca definição e de baixa intensidade de corrente, além disso picos com potencial muito distantes, indicando baixa reversibilidade do processo redox, vale ressaltar também que o pico do processo catódico não se formou completamente. Esse resultado reforça a necessidade de um tratamento químico prévio no eletrodo para ser utilizado. O PLA presente na superfície do filamento é facilmente removido da superfície do eletrodo por uma reação de saponificação em meio básico expondo o negro de fumo (elemento condutor) e aprimorando a performance eletroquímica do eletrodo [69]. Para o eletrodo tratado em hidróxido de sódio  $1,00 \text{ mol L}^{-1}$  por 30 min a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , apresentou um aumento na corrente de pico anódica de 1009 % e uma redução de 85,0 % na separação dos picos, mostrando a melhora na performance eletroquímica do eletrodo de trabalho devido a exposição do elemento condutor e conseqüentemente o aumento da área eletroativa, justificando a necessidade de um estudo de tratamento dos eletrodos de trabalho.

Para averiguar os efeitos do tratamento químico com NaOH sobre a superfície do eletrodo foram realizadas medidas de ângulo de contato. Esse experimento é uma forma a verificar a interação da superfície do eletrodo com água e assim obter informações sobre hidrofobicidade e hidrofilicidade promovidas pelo tratamento. A partir da FIGURA 14 verificar os ângulos médios obtidos para os eletrodos de trabalho sem tratamento e tratados na condição otimizada de  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  de NaOH por 30 min a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ .

FIGURA 14 – IMAGENS DE MICROSCÓPIO DIGITAL PARA OBTENÇÃO DE ÂNGULO DE CONTATO A) ELETRODO SEM TRATAMENTO B) ELETRODO TRATADO EM MEIO DE NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> POR 30 min A 60 °C.



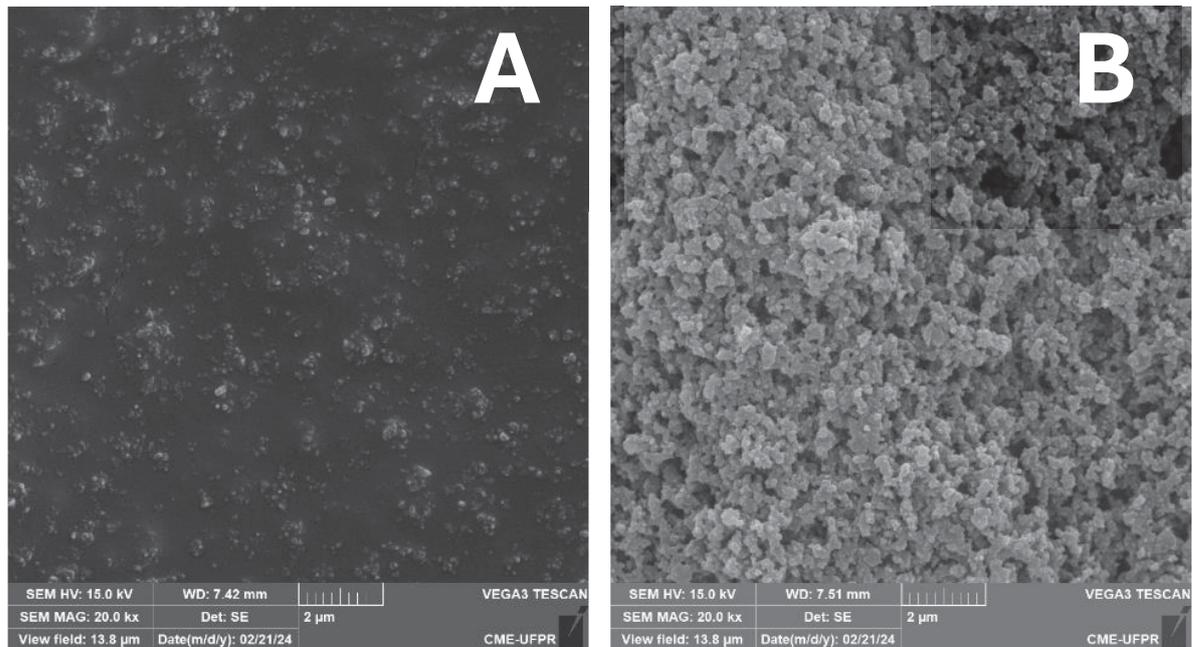
FONTE: AUTOR (2025).

A partir das imagens feitas para medida do ângulo de contato foi observado que a superfície do eletrodo não tratado o ângulo médio foi de 114° (FIGURA 14A), já para o eletrodo tratado em NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> por 30 min a 60 °C foi verificado um ângulo médio de 104° (FIGURA 14B). Ambos os eletrodos com características superficiais hidrofóbicas. Porém, ao realizar um teste-t foi verificado que essas diferenças entre as médias foram significativas ( $t_{\text{calc}} = 7,76 > t_{\text{crítico}(0,05;2)} = 4,30$ ). Essa diminuição no ângulo de contato sugere a modificação da superfície do eletrodo após o tratamento. O PLA apresenta um caráter apolar e tende a ter interações menos favoráveis com a gota de água (hidrofóbico). Com o tratamento do eletrodo ocorre uma remoção do PLA da superfície e maior exposição do negro de fumo. Esse material condutor a base de carbono possui grupos funcionais oxigenados apresentando uma maior polaridade quando comparado ao aglutinante, dessa maneira a superfície passa a interagir de forma mais favorável com a água, resultando num aumento da molhabilidade da superfície e em um ângulo de contato menor [60,70].

Medidas de MEV com magnificações de 20kx para os eletrodos impressos não tratados e tratados em NaOH a 60°C por 30 min foram realizadas, uma vez que a técnica de MEV permite a caracterização de eletrodos impressos 3D, fornecendo informações detalhadas da morfologia como: rugosidade, padrões de deposição de material e qualquer outra irregularidade que possa afetar o desempenho do eletrodo.

Essa capacidade de observação detalhada é fundamental para avaliar a qualidade da impressão e identificar áreas que podem precisar de ajustes para melhorar o desempenho do eletrodo. As imagens de MEV estão dispostas na FIGURA 15.

FIGURA 15 - IMAGENS DE MEV DA SUPERFÍCIE DO ELETRODO DE TRABALHO, MAGNIFICAÇÃO DE 20 kx A) SEM TRATAMENTO, B) COM TRATAMENTO.



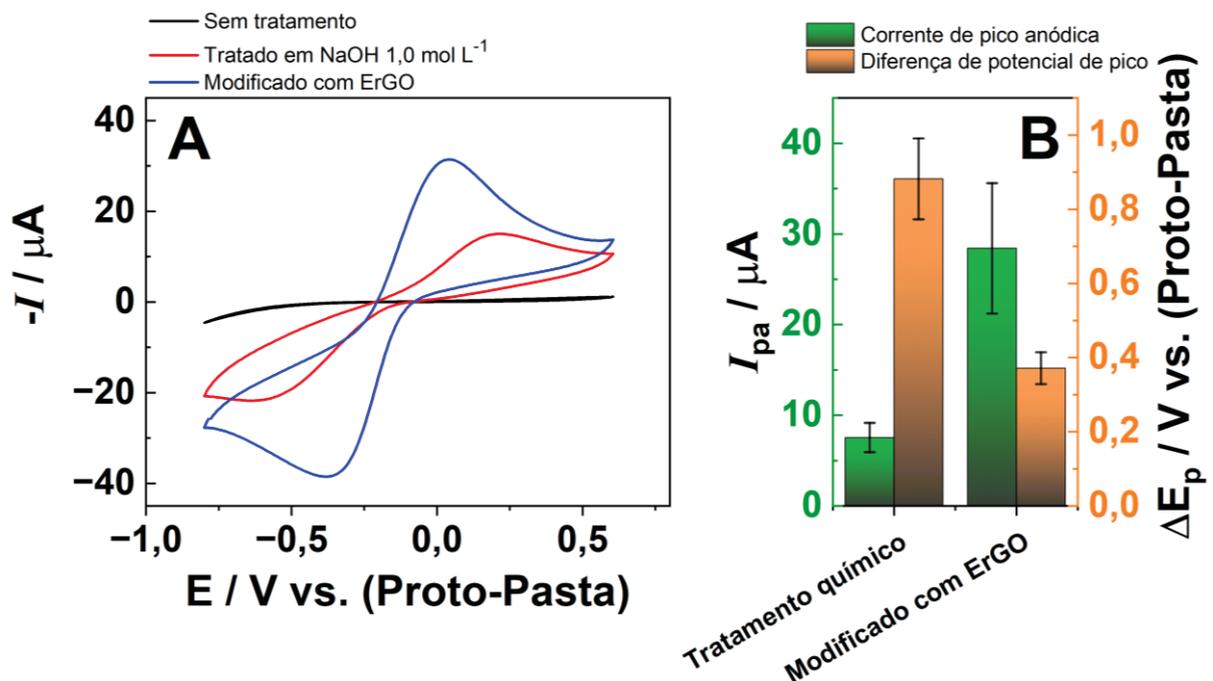
FONTE: O AUTOR (2025).

Como pode ser visto na FIGURA 15A o eletrodo apresenta uma superfície uniforme com aparência lisa característica de materiais poliméricos como PLA. Além disso é possível verificar aglomerados distribuídos sem padrão aparente pela superfície, que podem ser atribuídos ao negro de fumo. Já quando avaliada a superfície do eletrodo tratado na FIGURA 15B fica evidente o aparente aumento (qualitativo) nos defeitos da superfície, provavelmente associado à rugosidade do eletrodo, que serve de indicativo da remoção do PLA na superfície do eletrodo e conseqüentemente o aumento dos aglomerados de negro de fumo, devido sua exposição [71]. Essas observações corroboram com a melhora no desempenho eletroquímico observada nos estudos de tratamento dos eletrodos, visto que a exposição do elemento condutor aumenta a área eletroativa do eletrodo garantindo um maior número de sítios de transferência de carga para interagir com a sonda redox.

#### 4.2 AVALIAÇÃO DO ELETRÓLITO E MODIFICAÇÃO DO ELETRODO COM ErGO

O uso do PBS em pH 7,4 é fundamental em ensaios biológicos por sua capacidade de manter o pH constante e replicar as condições fisiológicas. Isso assegura a estabilidade das amostras e a eficiência das reações, evitando interferências que possam distorcer os resultados. Além disso, o PBS em pH 7,4 é compatível com diversas enzimas e proteínas, otimizando sua atividade e estabilidade durante os experimentos. Sua utilização padronizada facilita comparações entre diferentes estudos e laboratórios [72]. Nesse sentido, foi avaliado o desempenho do dispositivo tratado frente à essa condição de pH e eletrólito, para a leitura dos sinais redox do ferricianeto de potássio e foi investigada a modificação superficial dos eletrodos visando melhoria do sinal voltamétrico. Os resultados obtidos estão representados na FIGURA 16.

FIGURA 16 - ESTUDO DE MODIFICAÇÃO DO ELETRODO DE TRABALHO COM ErGO A) PERFIL CV FRENTE Sonda A  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5,0 mmol L<sup>-1</sup> em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4, APLICAÇÃO DE POTENCIAL DE -0,8 A 0,6 V, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 50 mV s<sup>-1</sup>, COM 3 CICLOS B) RESULTADOS DE CV SUMARIZADOS PARA A COMPARAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO ANÓDICA E DIFERENÇA DE POTENCIAL DE PICO DA Sonda FRENTE A MODIFICAÇÃO DO ELETRODO.



FONTE: AUTOR (2025).

Nessa condição de pH é comum que medidas eletroquímicas da sonda ferricianeto de potássio apresentem perfil voltamétrico pouco definido, com baixa

intensidade de corrente e maiores diferenças entre os potenciais de pico anódico e catódico. Isso pode ser atribuído a desprotonação de grupos oxigenados superficiais presentes na superfície do eletrodo, o que leva a formação de cargas negativas que dificultam os processos redox da sonda, também carregada negativamente. A FIGURA 16A evidencia a queda de desempenho do eletrodo sem tratamento, que não apresenta sinais de pico referente ao processo redox da sonda e tratado o eletrodo tratado que apesar de apresentar sinais de pico redox apresentou uma queda de seu desempenho. Uma possível causa para um pior desempenho dos eletrodos de Proto-Pasta® está associada a estrutura que compõe o negro de fumo, que é composta majoritariamente por carbono puro, na forma de pequenas esferas, aglomeradas formando clusters, apresentando sua superfície grupamentos ácidos carboxílicos, fenóis, lactonas e cetonas [70]. Nessa condição, ocorre, provavelmente, a desprotonação dos grupos carboxílicos na superfície do negro de fumo. Isso resulta em um acúmulo de carga negativa na superfície do eletrodo, o que dificulta a chegada da sonda, que também é carregada negativamente. A repulsão eletrostática entre as cargas negativas na superfície do eletrodo e da sonda contribui para esse menor desempenho, quando comparado à ensaios utilizando a sonda em eletrólito pH 3,0. Com base nos resultados expostos na FIGURA 16B foi possível verificar que ao modificar o eletrodo de trabalho com ErGO houve um aumento na corrente de pico anódico de 376 % e uma redução na separação dos picos de 42,3 %. O filme de ErGO minimiza o efeito de carga negativa na superfície resultando na melhora do desempenho do eletrodo na condição de pH 7,4. Essa modificação também contribui para uma superfície mais homogênea e funcionalizada que permite a imobilização das proteínas, em etapas futuras, de maneira mais adequada para construção de um imunossensor eletroquímico.

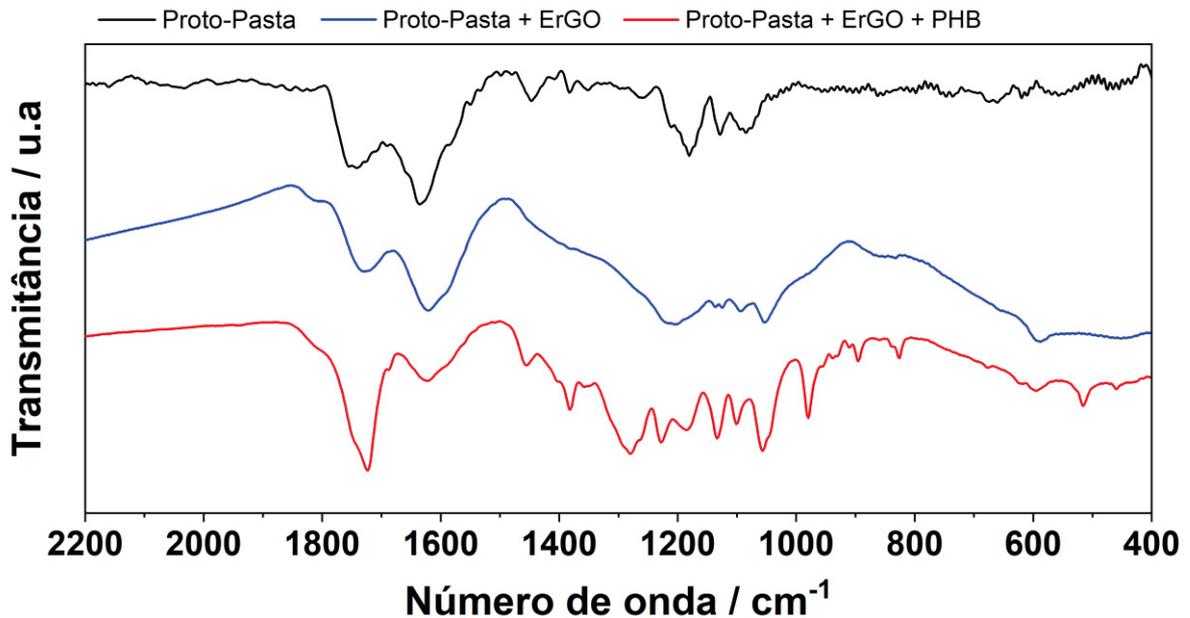
#### 4.3 CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DOS IMUNOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE Ab DENV-1

A detecção de anticorpos permite entender a epidemiologia de uma região, identificar surtos e determinar a prevalência de doenças. Isso permite implementar medidas preventivas adequadas. Além disso, ajuda a investigar a resposta imunológica dos pacientes infectados, monitorando a prevalência de anticorpos [47].

Para avaliar a viabilidade dos eletrodos impressos em 3D foram realizados estudos preliminares da construção da camada seletiva por meio medidas de FTIR

das etapas de construção a fim de verificar mudanças de grupos funcionais na superfície. Essas alterações servem de indicativo da modificação da superfície do eletrodo e ancoramento do elemento de reconhecimento. Os resultados comparativos de FTIR para Proto-pasta®, Proto-pasta® modificada com ErGO e PHB estão dispostas na FIGURA 17.

FIGURA 17 – ESPECTROS DE FTIR OBTIDOS PARA PROTO-PASTA, PROTO-PASTA MODIFICADA COM ERGO E PROTO-PASTA MODIFICADA COM ERGO E PHB.



FONTE: AUTOR (2025).

Quando avaliado o perfil do espectro da Proto-Pasta® é possível observar a presença banda na região de  $1750 \text{ cm}^{-1}$  que pode ser atribuída a absorção do estiramento assimétrico de carbonilas proveniente de ácidos, provenientes do negro de fumo e PLA residual do tratamento, além disso próximo de  $1600 \text{ cm}^{-1}$  há uma banda de absorção que está relacionado a grupos C=C [73,74]. Na região entre  $1500$  a  $1000 \text{ cm}^{-1}$  estão bandas de absorção de grupos O-H, C-O e C-H, que possivelmente estão associados ao PLA residual após o tratamento dos eletrodos [74].

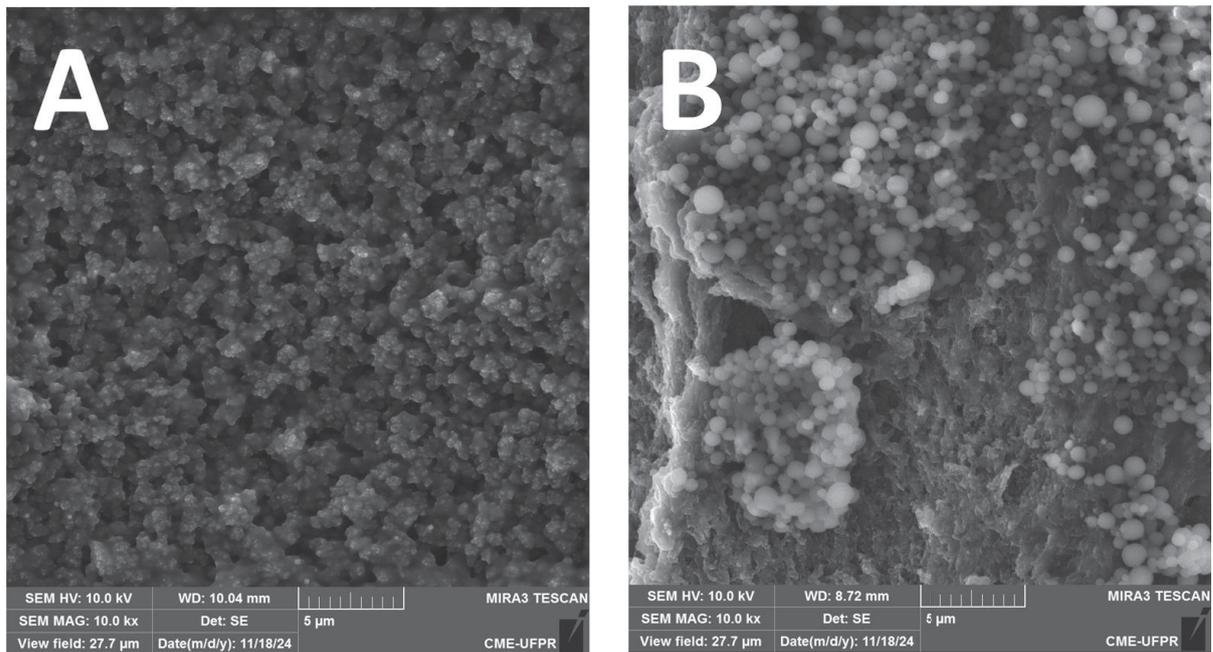
Já na presença do ErGO ainda é evidente as bandas de absorção de carbonilas e C=C, que estão presentes na composição do eletrodo quanto os grupos funcionais residuais do ErGO, uma vez que a redução não foi realizada de forma exaustiva, pois PHB tende a interagir predominantemente com grupos carboxílicos. Contudo o perfil na região de  $1500$  a  $1000 \text{ cm}^{-1}$  se tornou menos evidente e deu lugar

ao perfil de absorção mais similar ao esperado para grupos funcionais do ErGO [75], o que serve de indicativo do recobrimento da superfície do eletrodo com o modificador.

Por fim, com a adição do PHB novamente há uma mudança no perfil do espectro. A região de absorção de 1500 a 1000  $\text{cm}^{-1}$  apresenta um maior número de bandas de absorção que são características para o PHB. Contudo é possível observar que as bandas de absorção da carbonila e C=C continuam presentes [76,77]. Esses resultados servem de indicativo para a ocorrência da modificação do eletrodo e ancoramento do elemento de reconhecimento.

Para compreender o efeito do PHB sobre a superfície do eletrodo foram realizadas medidas de MEV comparando a superfície do eletrodo apenas tratado com a do eletrodo modificado com ErGO e PHB. A FIGURA 18 apresenta as imagens MEV.

FIGURA 18 - IMAGENS DE MEV DA SUPERFÍCIE DO ELETRODO DE TRABALHO, MAGNIFICAÇÃO DE 10 kx A) TRATADO, B) TRATADO E MODIFICADO COM ErGO E PHB.

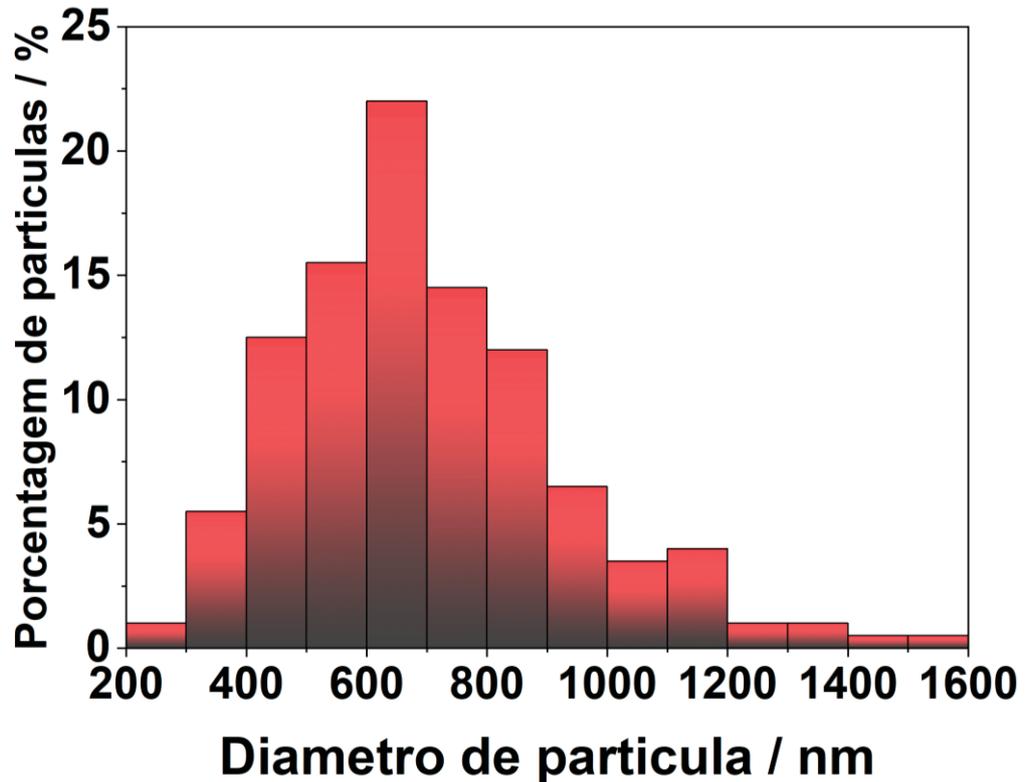


FONTE: AUTOR (2025)

É possível observar a partir da FIGURA 18 a superfície de aparência porosa com aglomerados de negro de fumo como já observado anteriormente. Já na FIGURA 17B os aglomerados esféricos observados, podem ser atribuídos ao PHB e auxiliam na confirmação da incorporação das nanopartículas na superfície do eletrodo. É evidente uma ausência de uniformidade na distribuição das partículas que se dá pelo

processo de deposição via *drop-casting* [47]. A partir da FIGURA 18B foi possível realizar a contagem do diâmetro das partículas, na FIGURA 19 é apresentada a distribuição percentual dos diâmetros das nanopartículas de PHB.

FIGURA 19 – GRÁFICO DA DISTRIBUIÇÃO DO DIÂMETRO DE 200 NANOPARTÍCULAS DE PHB



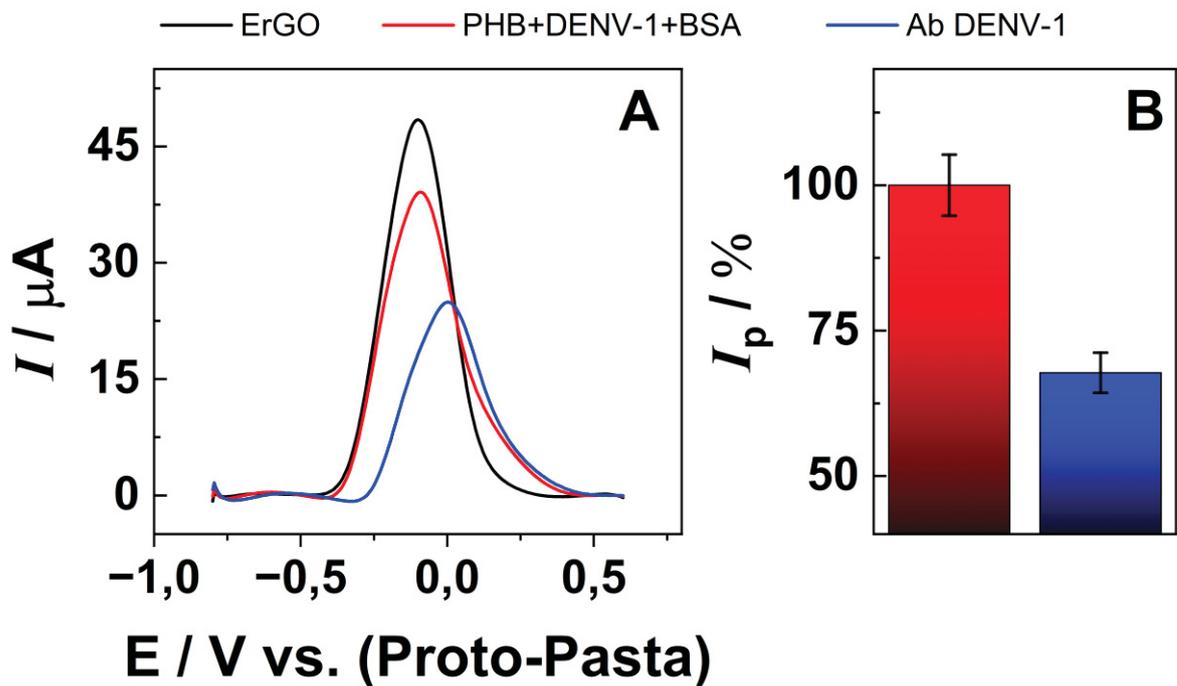
FONTE: AUTOR (2025).

Foi observado a partir dos resultados da FIGURA 18 que os tamanhos das 200 partículas contadas variaram de 200 a 1600 nm tendo um diâmetro médio de 700 nm com desvio de 230 nm. O hexâmero da proteína NS1, que normalmente é secretado pelas células infectadas, apresenta um diâmetro de 10 nm e altura de 9 nm [78]. Já os anticorpo IgG apresentam um tamanho médio de 12 nm de altura e 12 nm de diâmetro [79]. O que sugere a possibilidade de recobrir o PHB com anticorpos ou proteína NS1 como elemento de reconhecimento.

A partir desses resultados foi possível verificar a viabilidade dos eletrodos para a construção de um imunossensor e com isso foi possível avançar para a caracterização da camada seletiva por meio de técnicas eletroquímicas. Para avaliar a construção da camada seletiva utilizando ErGO e PHB decorado com a proteína NS DENV-1 e BSA, assim como a detecção dos anticorpos contra DENV-1 foram

utilizadas as técnicas de SWV e EIS e o perfil da sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  como parâmetro comparativo. Os resultados voltamétricos desse estudo estão dispostos na FIGURA 20.

FIGURA 20 - CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR PHB + NS DENV-1 + BSA ETAPA A ETAPA FRENTE SONDA A  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5,00 mol L<sup>-1</sup> EM PBS 0,1 MOL L<sup>-1</sup> pH 7,4, A) PERFIL SWV, -0,8 A 0,6 V, 150 mV DE AMPLITUDE PULSO, FREQUENCIA DE PULSO DE 2 Hz, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s<sup>-1</sup>, B) RESULTADOS DE SWV SUMARIZADOS PARA A COMPARAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO ANÓDICA.



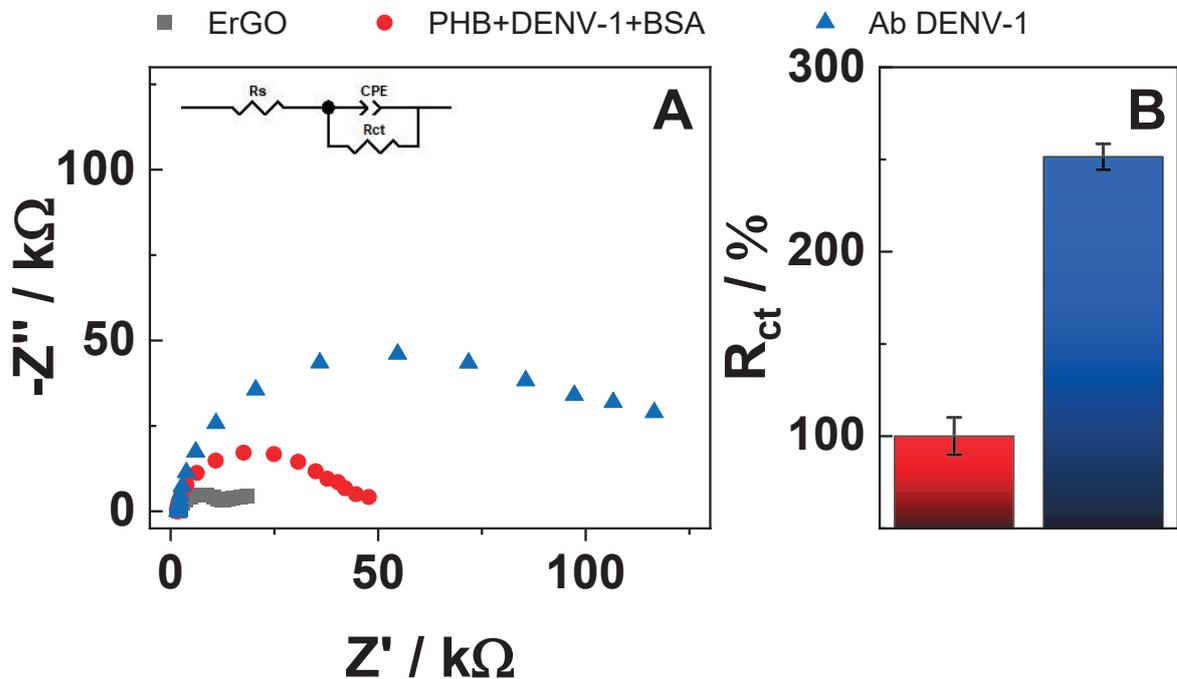
FONTE: AUTOR (2025).

Por meio do perfil representativo de SWV da FIGURA 20A é possível observar que o perfil do eletrodo entre as etapas de modificado com ErGO e ancoramento do elemento de reconhecimento apresenta uma redução na corrente de pico anódica, o que serve de indício da imobilização do PHB decorado com NS DENV-1 e BSA na superfície do eletrodo. Esse efeito está relacionado com a diminuição dos sítios eletroativos, que são bloqueados pela imobilização do PHB decorado com proteínas. Quando os anticorpos são incubados, ocorre novamente uma redução na corrente, o que corrobora que os anticorpos se ligaram ao sítio de reconhecimento. Essa mudança de perfil que ocorre entre etapas pode ser atribuída a um segundo aumento na obstrução espacial na superfície do eletrodo causada pela formação do imunocomplexo antígeno/anticorpo, que dificulta ainda mais a aproximação da sonda a superfície do dispositivo para que ocorra a transferência de elétrons e

consequentemente o processo redox. Utilizando os resultados expostos na FIGURA 20B foi possível verificar que houve uma queda significativa entre a corrente pico anódica percentual entre as etapas de ancoramento do elemento de reconhecimento com BSA e a detecção do Ab DENV-1 ( $t_{cal} = 12,0 > t_{crítico(0,05;2)} = 4,30$ ). Foi obtido uma variação de corrente percentual entre as etapas de incubação do elemento de reconhecimento e anticorpos de 32,4 %.

A confirmação das etapas de imobilização foi realizada através da análise da técnica de EIS. Para essa técnica se espera uma variação de perfil que corrobora o observado para as técnicas voltamétricas uma vez que para a impedância eletroquímica é calculada a resistência a transferência de carga ( $R_{ct}$ ) na interface eletrodo/solução. Para isso os resultados são correlacionados com um circuito equivalente de Randles, que é composto por uma resistência da solução ( $R_s$ ), ligada em série com um elemento constante de fase (CPE), que está em paralelo com o  $R_{ct}$  que por sua vez está associada em série com a impedância de Warburg ( $Z_w$ ) [80]. A FIGURA 21 apresenta os resultados da EIS.

FIGURA 21 - CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR PHB + NS DENV-1 + BSA ETAPA A ETAPA FRENTE Sonda A  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5,00 mol L<sup>-1</sup> EM PBS 0,1 MOL L<sup>-1</sup> pH 7,4, A) PERFIL EIS, 100 kHz A 50 mHz, 10 mV DE AMPLITUDE, CONDIÇÃO DE CIRCUITO ABERTO, B) RESULTADOS DE EIS SUMARIZADOS PARA A COMPARAÇÃO DOS  $R_{ct}$  CALCULADO.



FONTE: AUTOR (2025).

Sendo assim, entre as etapas de deposição do ErGO e ancoramento do elemento de reconhecimento é observado o aumento no raio o semicírculo uma vez que o ancoramento da proteína viral obstrui os sítios eletroativos do eletrodo, que resulta num aumento na resistência a transferência de carga na interface eletrodo/solução. Esse comportamento de aumento no raio do semicírculo ocorre novamente com a formação do imunocomplexo durante a incubação do anticorpo alvo, visto que há um aumento na resistência a transferência de carga associada a obstrução espacial na superfície do eletrodo [81]. Esse perfil de resposta é evidenciado pelos resultados apresentados na FIGURA 21A.

Com base nos resultados da FIGURA 21B foi possível verificar que existia um aumento significativo do  $R_{ct}$  de 151 % entre as etapas de ancoramento do sítio de reconhecimento e incubação do anticorpo alvo ( $t_{\text{calc}} = 17,8 > t_{\text{critico}(0,05;2)} = 4,30$ ). A partir dos resultados de EIS em associação com a análise voltamétrica foi possível

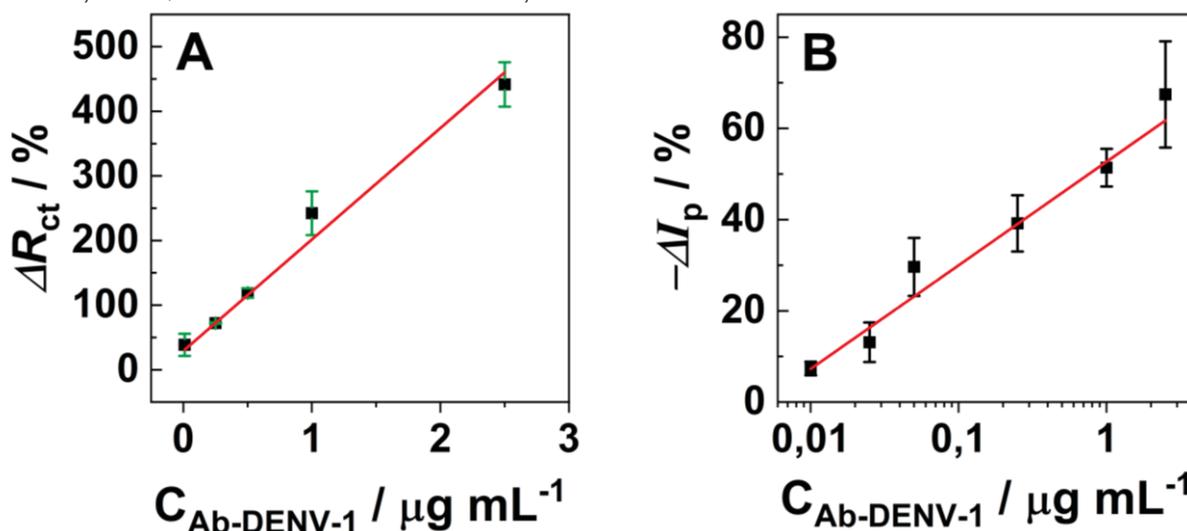
especular a imobilização de cada etapa de construção do imunossensor, e também da detecção do anticorpo alvo.

Com isso foi possível avançar para o estudo de correlação entre a concentração de anticorpo contra DENV-1 e o sinal de SWV e EIS, que consiste na construção de uma curva analítica. Como condições estabelecidas para o eletrodo de trabalho foi definido o tratamento em NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> a 60 °C por 30 min seguido de sua modificação com ErGO. Para construção da camada seletiva foi realizada pelo *drop-cast* a 37 °C de uma mistura de 10 µL de PHB 3,0 µg mL<sup>-1</sup> decorado com 1,0 µg mL<sup>-1</sup> de NS1 DENV-1 e BSA (0,1 mg mL<sup>-1</sup>).

#### 4.4 CURVA ANALÍTICA PARA DE DETECÇÃO DE Ab DENV-1

A determinação da concentração de anticorpos é um parâmetro biológico importante pois permite prever a taxa de imunização do indivíduo, além de permitir monitorar a progressão da doença. A fim de avaliar a relação entre o sinal eletroquímico e a concentração de anticorpo foram realizadas medidas de SWV e EIS variando a concentração de Ab DENV-1 para construir curvas analíticas. Para esses estudos foram preparados três eletrodos para cada valor de concentração avaliado. Os sensores foram submetidos a leitura na presença da sonda após a etapa de bloqueio com BSA (controle). Em seguida, foram incubados na presença do alvo (anticorpos), lavados e novamente submetidos às medidas eletroquímicas, os sinais são comparados com o controle de forma percentual. Foi avaliada uma faixa de concentração entre 10 ng mL<sup>-1</sup> a 2,50 µg mL<sup>-1</sup>. A FIGURA 22 apresenta os resultados obtidos para as curvas analítica.

FIGURA 22 – CURVA ANALÍTICAS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA DENV-1 FRENTE Sonda A  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5,00 mmol L<sup>-1</sup> EM PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> PH 7,4 A) EIS, 100 kHz A 50 mHZ, 10 mV DE AMPLITUDE, CONDIÇÃO DE CIRCUITO ABERTO B) SWV, -0,8 A 0,6 V, 150 mV DE AMPLITUDE PULSO, FREQUENCIA DE PULSO DE 2 Hz, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s<sup>-1</sup>.



FONTE: AUTOR (2025).

Foi possível observar que para ambas as curvas construídas empregando dados de EIS (FIGURA 22A) e SWV (FIGURA 22B) houve uma mudança percentual do sinal em função da variação da concentração de anticorpos. Além disso foi observado que para a curva usando a técnica de SWV a relação de linearidade foi estabelecida entre o logaritmo da concentração de anticorpos, apresentando uma equação de reta descrita pela equação:  $-\Delta I_p(\%) = 52,7 + 22,7 \log(C_{Ab \text{ DENV-1}})$  ( $R^2 = 98,3 \%$ ). Essa relação logarítmica se dá provavelmente pela natureza de interação antígeno-anticorpo, dado a grande afinidade entre esses dois elementos, o que resulta em muitos casos na rápida saturação do elemento de reconhecimento, com isso, o ajuste logarítmico pode apresentar maior linearidade. A literatura relata trabalhos que apresentam comportamento semelhante [82–84].

Já para a técnica de EIS foi possível observar uma relação linear direta entre a concentração de anticorpos com a variação percentual do sinal eletroquímico, sendo a equação de reta descrita pela equação:  $\Delta R_{ct}(\%) = 29,2 + 172,4 C_{Ab \text{ DENV-1}}$ . ( $R^2 = 98,4 \%$ ). Tendo em vista a elevada variância do sistema foi optado por apresentar a menor concentração detectável como o limite inferior de resposta, sendo definido como o primeiro ponto da curva ( $10 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Vale ressaltar que ao avaliar a resposta eletroquímica para concentração mais elevada, de  $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de anticorpo, o sinal obtido foi abaixo do esperado o que pode ser um indicativo da ocorrência do efeito Hook. Isso ocorre uma vez que há uma grande quantidade de proteínas no sistema,

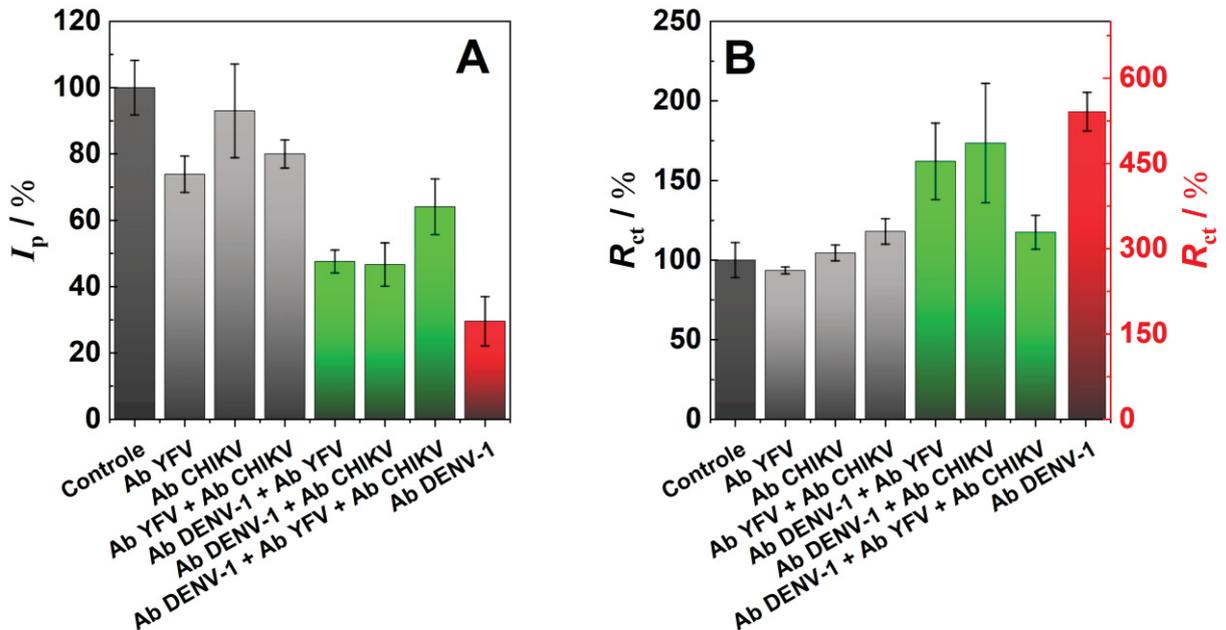
o excesso de anticorpos faz com que eles interajam preferencialmente entre si e não com o sítio de reconhecimento na superfície do imunossensor, levando a uma variação de sinal menor que a esperada [9].

#### 4.5 TESTE DE SELETIVIDADE FRENTE Ab CONTRA CHIKV E YFV

A seletividade é fundamental para garantir que os imunossensores sejam capazes de identificar e detectar com precisão o analito em meio a uma variedade de concomitantes presentes na amostra. Através desse teste, é possível confirmar a “especificidade” da resposta do imunossensor, minimizando assim o risco de resultados falsos positivos ou negativos. Em amostras biológicas complexas, como sangue ou urina, a presença de outras biomoléculas pode interferir na detecção, destacando a importância de garantir a seletividade do imunossensor [57].

Considerando que o mosquito *Aedes aegypt* é vetor para transmissão do CHIKV, YFV e ZIKV, além do DENV, contudo o ZIKV manifesta sintomas muito distintos dessas demais arborvíruses, sendo seu diagnóstico mais fácil [85]. Sendo assim foi realizado um estudo para a possível interferência anticorpos contra CHIKV e YFV na detecção dos anticorpos contra o DENV-1. A FIGURA 23 expõe os resultados para os testes de seletividade, considerando todas as possíveis misturas de anticorpos para esses três vírus.

FIGURA 23 – TESTE DE SELETIVIDADE PARA DETECÇÃO DE AB DENV-1 COM Ab YFV E Ab CHIKV FRENTE A Sonda  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5,00 mmol L<sup>-1</sup> EM PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 A) RESULTADOS SWV SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS CORRENTES DE PICO ANÓDICAS, -0,8 A 0,6 V, 150 mV DE AMPLITUDE PULSO, FREQUENCIA DE PULSO DE 2 Hz, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s<sup>-1</sup>. B) RESULTADOS DE EIS SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE OS  $R_{ct}$  CALCULADOS, 100 kHz A 50 mHz, 10 mV DE AMPLITUDE, CONDIÇÃO DE CIRCUITO ABERTO.



FONTE: AUTOR (2025).

Com base na FIGURA 23A é possível verificar que as médias dos resultados apresentam diferenças, é possível observar que amostras contendo apenas os interferentes não apresentam diferenças do controle, já amostras contendo o alvo podem ser diferenciadas do controle e interferentes. Ao realizar ANOVA com esses resultados é comprovada que há diferenças significativas entre as médias das amostras estudadas ( $F_{\text{calc}} = 31,6 > F_{\text{crítico}}(0,05;7;16) = 2,66$ ). Para identificar quais médias apresentam diferenças entre si e como esses conjunto de resultados se agrupam foi realizado o teste de Tukey. A partir disso foi observado que o controle, a amostra contendo Ab CHIKV, amostra de Ab YFV e a mistura de Ab YFV e Ab CHIKV se agrupam e não são diferenciadas entre si, o que indica que não houve interferência significativa tanto dos anticorpos interferentes isolados quanto a suas misturas. Outro grupo foi composto pelas amostras de Ab DENV-1, a mistura de Ab DENV-1 e Ab YFV e a mistura de Ab DENV-1 e Ab CHIKV, o que indica que essas amostras a média dessas amostras não diferem entre si e são significativamente diferentes do controle e interferentes isolados. Esse resultado sugere sucesso da detecção apenas de Ab

DENV-1 e também na presença dos concomitantes quando comparadas ao controle. Contudo um grupo é composto pelas amostras de Ab YFV, a mistura de Ab YFV e Ab CHIKV e da mistura dos três anticorpos. Esse resultado indica uma limitação do dispositivo ao detectar os anticorpos alvos na presença dos dois interferentes ao mesmo tempo, visto que por mais que o alvo possa ser diferenciado do controle, não pode ser diferenciado dos interferentes, nesse caso, possivelmente os anticorpos contra Febre Amarela causam um efeito mais significativo uma vez que a mistura dos três anticorpos pode ser diferenciada da amostra contendo apenas anticorpos contra Chikungunya. Uma possível explicação para essa diminuição da sensibilidade da resposta do dispositivo na presença de interferentes pode ser resultado da ocorrência do efeito Hook. A concentração elevada de anticorpos no sistema durante a incubação das amostras, fazendo com que haja uma interação preferencial entre os anticorpos de DENV-1 com os demais anticorpos presentes. Assim não há uma efetiva interação com o sítio de reconhecimento, levando uma variação menor no sinal observado.

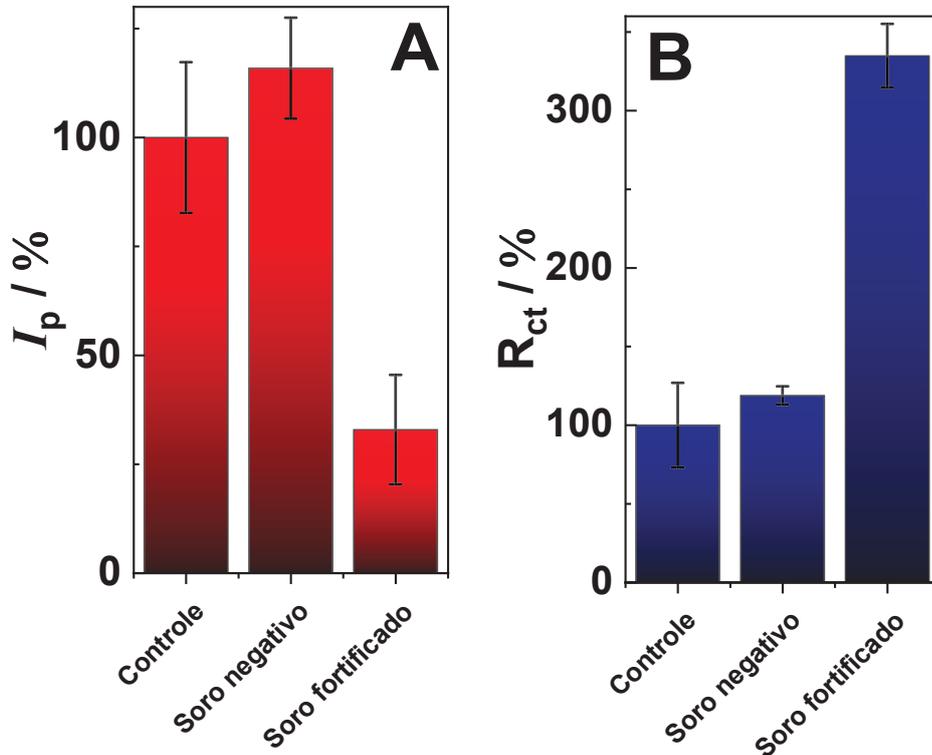
Já quando são considerados os resultados obtidos por espectroscopia de impedância eletroquímica, FIGURA 23B, foi observado novamente que as médias apresentavam diferenças significativas ( $F_{\text{calc}} = 156 < F_{\text{crítico}(0,05;2)} = 2,66$ ), nesse caso as médias puderam ser agrupadas em três grupos. O primeiro grupo sendo composto pelo controle, Ab CHIKV, Ab YFV, a mistura de Ab CHIKV e Ab YFV e a mistura contendo os três anticorpos. Esse agrupamento sugere que os interferentes isolados e misturados não podem ser distinguidos do controle, o que sugere que sua interferência é pouco expressiva, porém a mistura dos três anticorpos que contém a espécie alvo também não pode ser diferenciada, o que reforça a suposição do efeito Hook. O segundo grupo é composto pela mistura de Ab CHIKV e Ab YFV, a mistura contendo os três anticorpos, a mistura de Ab DENV-1 e Ab CHIKV e a mistura contendo Ab DENV-1 e Ab YFV, que sugere a possibilidade da distinção do controle das amostras contendo os anticorpos alvos, mas a dificuldade de distinguir o alvo da mistura contendo a mistura com apenas os anticorpos interferentes. Contudo o terceiro grupo é composto apenas pela amostra contendo Ab DENV-1, que indica que isoladamente os anticorpos alvo pode ser diferenciado tanto do controle, quanto dos interferentes quando não há uma alta concentração de anticorpos durante a etapa de incubação da amostra.

Tendo em vista isso foi possível observar uma seletividade satisfatória para detecção de anticorpos contra DENV-1, por mais que em caso de mistura ocorra uma queda na sensibilidade do sistema. Estas condições de múltiplos anticorpos são muito singulares e pouco prováveis de ocorrerem num mesmo paciente. Sendo assim foi possível avançar para estudos em amostras de soro comercial para verificar o desempenho do sensor em meios mais similares aos de amostras reais.

#### 4.6 AMOSTRA DE SORO FORTIFICADO COM Ab DENV-1

Ao estudar amostras simuladas é possível identificar e corrigir potenciais efeitos de matriz ou influência de espécies concomitantes nos imunoenaios, melhorando assim a sensibilidade e a seletividade dos testes. Isso é crucial para garantir a precisão no diagnóstico e a eficácia dos resultados na detecção de proteínas alvo e na monitorização de doenças [86]. Além disso, o estudo de amostras simuladas também desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e na validação de imunoenaios, fornecendo uma plataforma controlada para avaliar o desempenho e a robustez dos métodos propostos antes de sua aplicação em amostras reais. Sendo assim, foram avaliadas duas amostras de soro diluído numa proporção 1:1000 em tampão PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4, sendo um fortificado com 2,5 µg mL<sup>-1</sup> e outro não. O estudo foi realizado por meio das técnicas SWV e EIS. Os resultados obtidos estão sumarizados na FIGURA 24.

FIGURA 24 – ESTUDO DE AMOSTRAS DE SORO COMERCIAL DILUÍDO 1:1000 EM PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 NEGATIVO E FORTIFICADO COM 2,5 µg mL<sup>-1</sup> DE Ab DENV-1 FRENTE Sonda A [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 5,00 mol L<sup>-1</sup> EM PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4, A) RESULTADOS SWV SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS CORRENTES DE PICO ANÓDICAS, -0,8 A 0,6 V, 150 mV DE AMPLITUDE PULSO, FREQUENCIA DE PULSO DE 2 Hz, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s<sup>-1</sup>. B) RESULTADOS DE EIS SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE OS R<sub>ct</sub> CALCULADOS, 100 kHz A 50 mHz, 10 mV DE AMPLITUDE, CONDIÇÃO DE CIRCUITO ABERTO.



FONTE: AUTOR (2025).

Com base nos resultados expostos na FIGURA 24A foi possível verificar que há diferenças significativas entre as médias dos resultados ( $F_{\text{calc}} = 29,5 > F_{\text{critico}(0,05;2;2)} = 5,14$ ) e com base no teste de Tukey foi possível verificar que a amostra de soro negativo não apresentou diferenças significativas quando comparada ao controle, já a amostra de soro fortificado se apresentou diferenças significativas quando comparadas com o controle e soro negativo. Os resultados obtidos com a técnica de EIS (FIGURA 24B) corroboram com esses resultados. Foi observada diferenças significativas entre as médias ( $F_{\text{calc}} = 131 > F_{\text{crit}} = 5,14$ ) e quando comparadas as médias foi possível novamente observar que houve diferenças significativas entre o controle e a amostra de soro negativo, mas o soro fortificado apresentou diferença significativas quando comparado ao controle e amostra de soro negativo.

A partir dos resultados até o momento foi possível desenvolver um imunossensor eletroquímico modificado com ErGO de uma etapa com uso de PHB

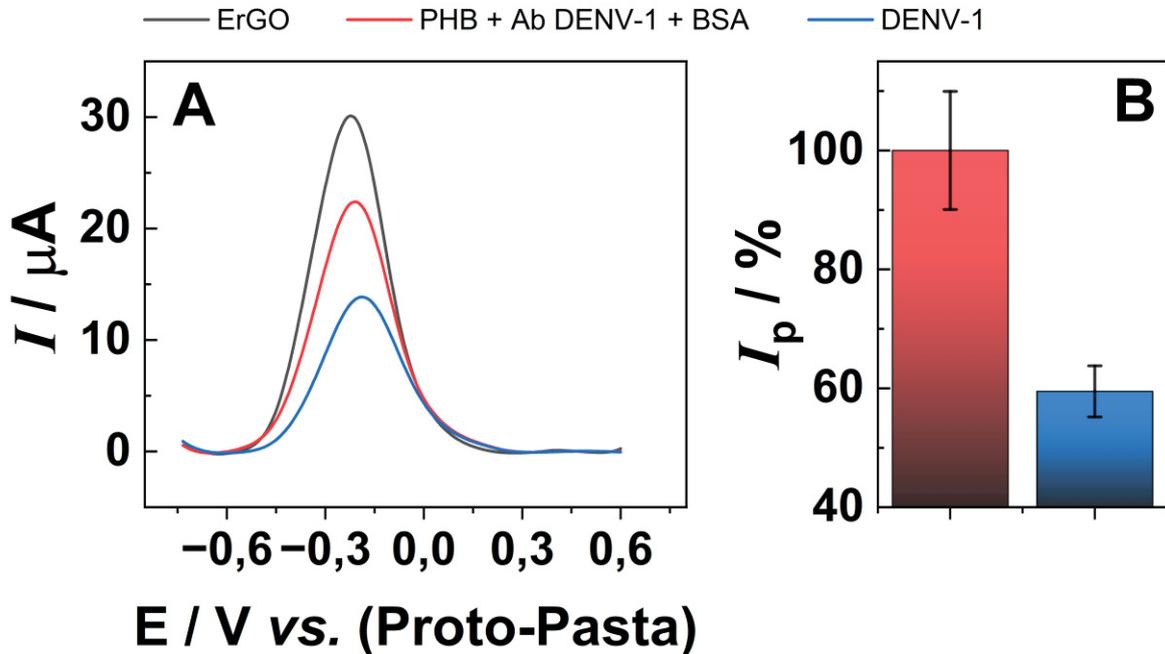
decorado com proteína NS1 DENV-1, utilizando uma plataforma de impressão 3D com geometria composta por 6 eletrodos de trabalho para detecção de Ab DENV-1.

#### 4.7 CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DOS IMUNOSENSORES PARA DENV-1.

A detecção de antígenos permite o diagnóstico da doença durante a fase de viremia, quando o vírus está circulando, desta maneira complementa a detecção de anticorpos uma vez que a produção de anticorpos ocorre em estágios mais avançados da doença. Vale ressaltar que durante o processo de replicação do vírus e a ocorrência da apoptose da célula infectada ocorre a liberação de proteínas virais na corrente sanguínea, como por exemplo no caso da Dengue a proteína NS1 [3]. Sendo assim essas proteínas podem ser utilizadas como biomarcadores para o diagnóstico da doença. Além disso, combinadas essas duas detecções permitem um diagnóstico mais preciso e permitem averiguar processos de reinfecção que podem resultar na evolução para forma grave da Dengue [4].

Sendo assim, de forma similar ao que foi realizado para a etapa de construção para detecção de anticorpos, foi realizado o tratamento dos eletrodos em meio de hidróxido de sódio, seguido da modificação dos eletrodos ErGO. Após isso foi realizado ancoramento do PHB decorado com anticorpos contra DENV-1 e BSA para servirem de elemento de reconhecimento. Para averiguar o perfil de resposta da formação da camada seletiva foram utilizadas as técnicas de SWV e EIS, frente a sonda  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . O perfil foi avaliado a partir da etapa de deposição do ErGO. A FIGURA 25 sumariza os resultados obtidos para esse estudo.

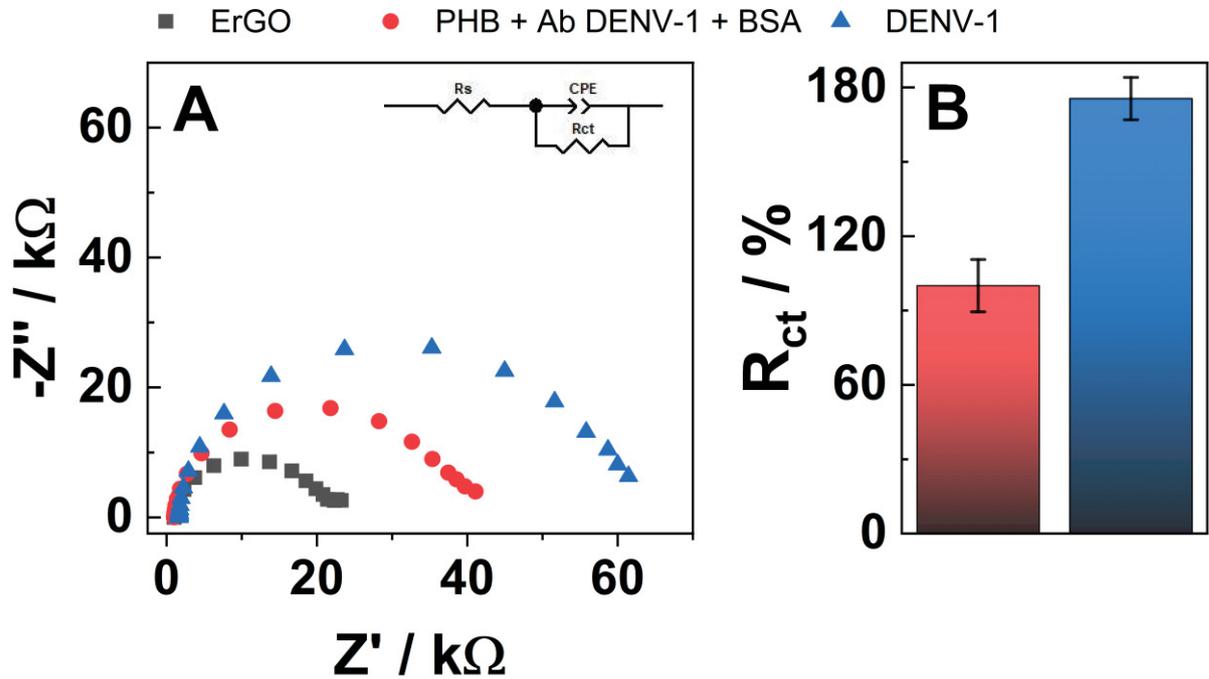
FIGURA 25- CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR PHB + Ab DENV-1 ETAPA A ETAPA FRENTE SONDA A  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5,00 mmol L<sup>-1</sup> EM PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4, A) PERFIL SWV, -0,8 A 0,6 V, 150 mV DE AMPLITUDE PULSO, FREQUENCIA DE PULSO DE 2 Hz, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s<sup>-1</sup>, B) RESULTADOS DE SWV SUMARIZADOS PARA A COMPARAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO.



FONTE: AUTOR (2025)

Similar ao já observado no estudo de construção para detecção de anticorpos contra DENV-1, o perfil voltamétrico (FIGURA 25A) apresenta uma diminuição no valor da corrente de pico após a etapa de modificação do eletrodo e de imobilização do elemento de reconhecimento. Isso, provavelmente, ocorre devido a obstrução da superfície do eletrodo pelo PHB decorado com anticorpos, que dificultam a transferência de carga entre a sonda e a superfície do eletrodo. Na etapa de detecção de proteína NS de DENV-1 foi observada uma segunda queda de corrente, associada ao aumento da obstrução na superfície do eletrodo associada a formação do imunocomplexo. Comparando as correntes de pico normalizadas a partir da etapa de imobilização do elemento de reconhecimento (FIGURA 25B) foi observada uma queda significativa de 40,5% ( $t_{\text{calc}} = 6,74 > t_{\text{crítico}(0,05;2)} = 4,30$ ). A técnica EIS (FIGURA 26) complementa os resultados obtidos na SWV.

FIGURA 26- CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR PHB + Ab DENV-1 ETAPA A ETAPA FRENTE Sonda A  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5,00 mmol L<sup>-1</sup> EM PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4, A) PERFIL EIS, 100 kHz A 50 mHz, 10 mV DE AMPLITUDE, CONDIÇÃO DE CIRCUITO ABERTO, B) RESULTADOS DE EIS SUMARIZADOS PARA A COMPARAÇÃO DOS  $R_{ct}$  CALCULADO.



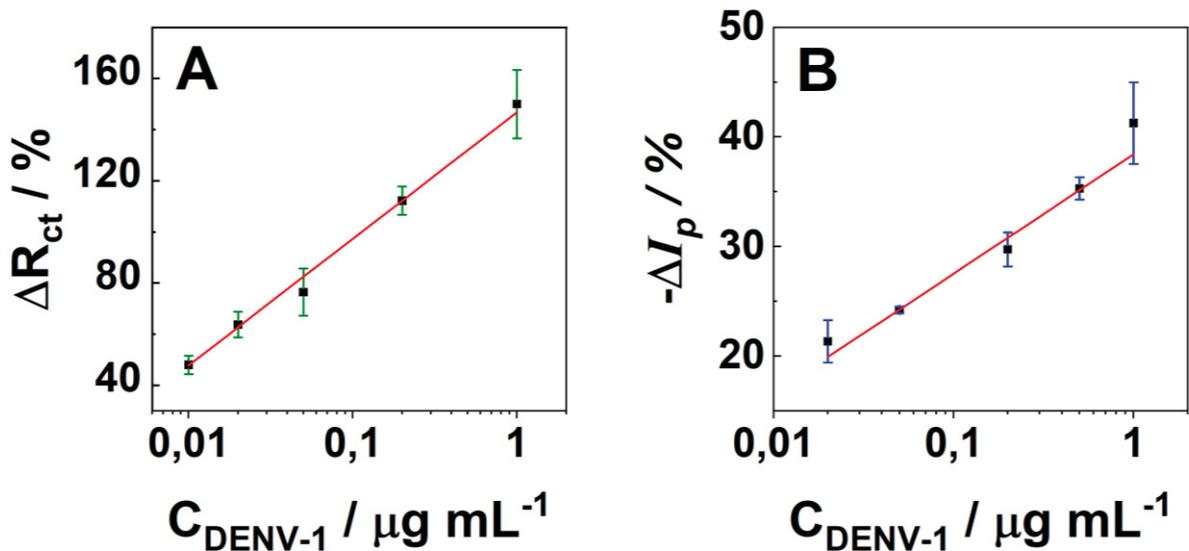
FONTE: AUTOR (2025).

A partir da FIGURA 26A é possível observar que entre a etapa de deposição do ErGO e a imobilização do elemento de reconhecimento foi observado um aumento do semicírculo, referente ao aumento na resistência à transferência de carga, o que serve de indicativo da incorporação do PHB decorado com anticorpo e BSA. Esse aumento ocorre novamente na etapa de detecção da proteína NS DENV-1, o que sugere a formação do imunocomplexo entre o antígeno alvo e o anticorpo de reconhecimento. Quando comparados os  $R_{ct}$  calculados (FIGURA 26B) entre as etapas de imobilização e detecção da proteína viral foi observado um aumento significativo de 75,5 % ( $t_{calc} = 11,8 > t_{crítico(0,05;2)} = 4,30$ ). Esses resultados obtidos para técnica de EIS corroboram com os observados para SWV e servem de indicativo da viabilidade da montagem do dispositivo para detecção de proteína NS1 da DENV-1. Isso permite que o trabalho avance para construção da curva analítica para proteína viral

#### 4.8 CURVA ANALÍTICA PARA DE DETECÇÃO DE NS1 DENV-1

Para a construção das curvas analíticas para o sistema de detecção de anticorpos, foram preparados três imunossensores para cada valor de concentração avaliado. Após a construção do imunossensor foi realizada uma medida na etapa de incorporação do PHB decorado com o elemento de reconhecimento e agentes bloqueadores como etapa de controle. Em seguida, foram incubados na presença do antígeno, lavados e novamente submetidos às medidas eletroquímicas, os sinais são comparados com o controle de forma percentual. Foi avaliada uma faixa linear entre  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  a  $1,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  para a técnica de EIS, já para a técnica de SWV foi avaliada um linear entre  $20 \text{ ng mL}^{-1}$  a  $1,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . A FIGURA 27 apresenta os resultados obtidos para as curvas analítica.

FIGURA 27 – CURVA ANALÍTICAS PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNA NS1 DENV-1 FRENTE SONDA A  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$   $5,00 \text{ mmol L}^{-1}$  EM PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  PH 7,4 A) EIS,  $100 \text{ kHz}$  A  $50 \text{ mHz}$ ,  $10 \text{ mV}$  DE AMPLITUDE, CONDIÇÃO DE CIRCUITO ABERTO B) SWV,  $-0,8$  A  $0,6 \text{ V}$ ,  $150 \text{ mV}$  DE AMPLITUDE PULSO, FREQUÊNCIA DE PULSO DE  $2 \text{ Hz}$ , VELOCIDADE DE VARREDURA DE  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .



FONTE: AUTOR (2025)

É possível observar a partir da curva construída com os resultados de EIS (FIGURA 27A) que a curva apresentou uma relação de linearidade entre o logaritmo da concentração de proteína de DENV-1 e a variação percentual do  $R_{ct}$ . Essa relação de linearidade é descrita pela equação:  $\Delta R_{ct}(\%) = 146,7 + 49,5 \log(C_{\text{DENV-1}})$  ( $R^2 = 99,4 \%$ ). A técnica de SWV (FIGURA 27B) por sua vez apresentou a mesma relação de linearidade que a EIS, que é descrita pela equação:  $-\Delta I(\%) = 38,4 + 10,9 \log(C_{\text{DENV-1}})$ .

1) ( $R^2 = 98,4 \%$ ). Quando comparadas as curvas foi possível observar que a técnica de EIS apresentou uma maior sensibilidade, visto que seu coeficiente angular é maior que o da curva para a técnica SWV. Além disso a curva obtida com EIS apresentou LOQ de  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ , já para a SWV foi obtido um LOQ  $20 \text{ ng mL}^{-1}$ .

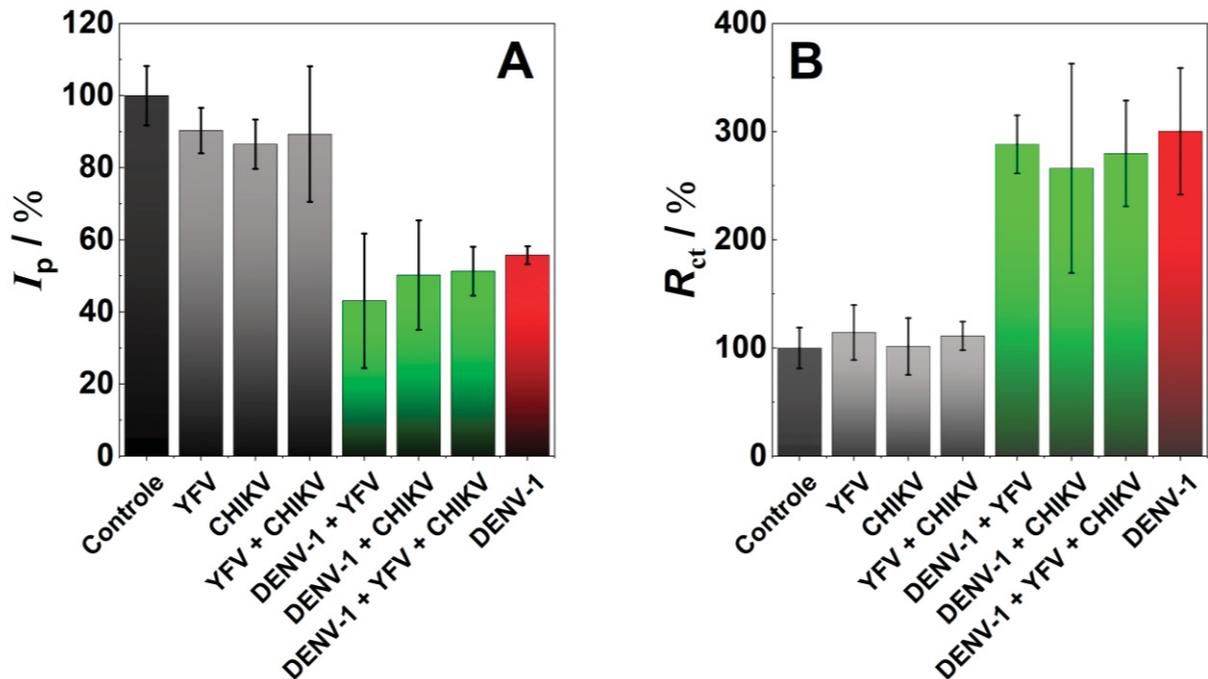
Ao comparar essas curvas com as obtidas no sistema de montagem para detecção de antígenos, foi possível observar uma menor sensibilidade das curvas para a detecção da proteína de DENV-1. Além disso, na técnica de EIS, verificou-se uma relação linear direta entre a concentração de anticorpos e a variação percentual de  $R_{ct}$ . Por outro lado, para a detecção de proteína viral, essa relação era observada entre o logaritmo da concentração da proteína de DENV-1 para a mesma técnica. Outro ponto a ser destacado é que, na curva utilizando a técnica de SWV, a menor concentração que foi experimentalmente detectada foi de anticorpos de DENV-1 foi de  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ . Essa observação registrada na detecção de proteínas virais pode estar associada à montagem do sistema, que utiliza predominantemente a incorporação adsortiva de anticorpos na superfície do PHB. Esse método de incorporação pode causar problemas relacionados à orientação adequada dos anticorpos na superfície, reduzindo a disponibilidade dos seus receptores para a detecção de antígenos [87,88].

Após estabelecer uma relação entre a concentração do alvo e o sinal eletroquímico foi dada sequência ao trabalho para etapa de estudo de interferentes.

#### 4.9 TESTE DE SELETIVIDADE FRENTE PROTEÍNAS DE CHIKV E YFV

A fim de verificar a seletividade do dispositivo foram realizados testes na presença de proteínas de CHIKV e YFV, para isso foram preparadas amostras contendo diferentes misturas de proteínas de DENV-1, CHIKV e YFV em solução tampão de PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4, com todas as proteínas numa concentração fixa de  $1,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . A FIGURA 28 expõe os resultados obtidos para o sistema na presença de diferentes interferentes contendo proteínas DENV-1, CHIKV e YFV por meio das técnicas de SWV e EIS.

FIGURA 28 – TESTE DE SELETIVIDADE PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNA NS1 DENV-1 COM PROTEÍNAS DE YFV E CHIKV A FRENTE SONDA  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5,00 mmol L<sup>-1</sup> EM PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 A) RESULTADOS SWV SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS CORRENTES DE PICO ANÓDICAS, -0,8 A 0,6 V, 150 mV DE AMPLITUDE PULSO, FREQUENCIA DE PULSO DE 2 Hz, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s<sup>-1</sup>. B) RESULTADOS DE EIS SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE OS  $R_{ct}$  CALCULADOS, 100 KHZ A 50 mHz, 10 mV DE AMPLITUDE, CONDIÇÃO DE CIRCUITO ABERTO.



FONTE: AUTOR (2025).

A partir dos resultados obtidos pelas medidas de SWV (FIGURA 28A) foi possível observar que qualitativamente amostras contendo YFV, CHIKV e mistura de YFV e CHIKV apresentam uma pequena queda na corrente quando comparada com o controle, que podem ser decorrentes de processos de adsorção inespecífica. Esses resultados indicam uma baixa interferências desse conjunto de amostras. Já quando comparado o controle com amostras contendo DENV-1 e misturas contendo esse alvo e os interferentes apresentaram de forma qualitativa uma maior queda na corrente, o que sugere inicialmente elevada seletividade do sensor.

Ao comparar as variâncias dentro e entre os conjuntos de amostras estudadas por meio da ANOVA foi possível verificar que as médias apresentaram diferenças significativas ( $F_{\text{calc}} = 10,9 > F_{\text{crítico}}(0,05;7;16) = 2,66$ ). Portanto, há diferença entre os valores observados nos grupos investigados. Por meio do teste de Tukey, foi possível comparar as médias de todos os resultados e agrupar o conjunto de médias das amostras, nos quais as médias não apresentam diferenças significativas. O primeiro grupo é composto pelo controle, YFV, CHIKV e a mistura contendo YFV e CHIKV, que

serve de indicativo que esses interferentes não são distinguíveis do controle. Assim, não há efeito dessas espécies na resposta do imunossensor não afetando a seletividade. O segundo grupo é composto por DENV-1, a mistura contendo DENV-1 e YFV, a mistura contendo DENV-1 e CHIKV e a mistura dos três antígenos. Esse resultado sugere que as amostras que contêm a proteína da Dengue apresentam médias que são significativamente inferiores à do controle, ou seja, a queda de corrente observada é majoritariamente referente a formação do imunocomplexo e não devido a presença dos interferentes.

Os resultados de EIS (FIGURA 28B) corroboram para indicar que há baixas interferências causada pelas proteínas de YFV e CHIKV, visto que foi possível observar um pequeno aumento do  $R_{ct}$  percentual médio para as amostras contendo YFV, CHIKV e mistura de CHIKV quando comparado com o controle. Já para as amostras contendo DENV-1 e sua diferentes misturas com os interferentes apresentaram um maior aumento no  $R_{ct}$  percentual médio comparado ao controle, o que reforça o indicativo de que o sensor apresenta uma elevada seletividade.

Ao comparar esse conjunto de médias por meio da ANOVA foi possível verificar que existe diferenças significativas entre os conjuntos de amostras analisadas ( $F_{calc} = 15,2 > F_{(0,05;7;16)} = 2,66$ ). Quando comparadas as médias, por um teste Tukey, foi possível agrupar os resultados em dois grupos que apresentam médias que são indistinguíveis. O primeiro grupo é composto pelo controle, YFV, CHIKV e a mistura contendo YFV e CHIKV. Já o segundo grupo é composto pelas amostras contendo DENV-1 e suas misturas com interferentes. Esses resultados permitem inferir que os interferentes não são distinguíveis do controle e que é possível diferenciar amostras contendo DENV-1 do controle e dos interferentes. Além disso não há perda de sensibilidade do dispositivo na detecção de proteína de DENV-1 na presença dos interferentes.

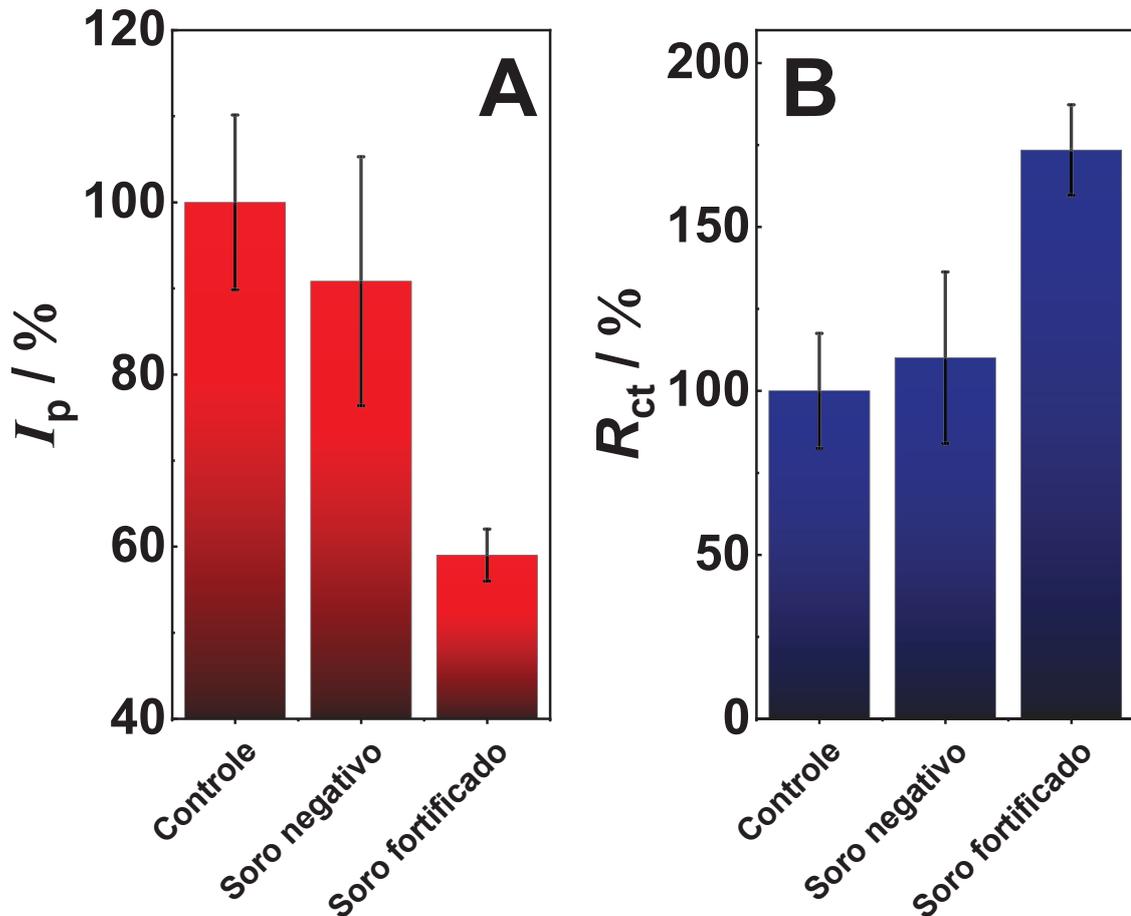
A partir desses resultados foi possível verificar que o sensor apresentou seletividade satisfatória tanto para a técnica de SWV quanto para a técnica de EIS e com isso foi possível avançar para estudos de efeito de matriz em amostras de soro comercial.

#### 4.10 AMOSTRA DE SORO FORTIFICADO COM NS1 DENV-1

Para avaliar o efeito de matriz foram preparadas amostras de soro comercial diluído em tampão PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 numa proporção 1:1000 e uma amostra de

soro comercial diluído nas mesmas condições e fortificado com proteína NS1 DENV-1 na concentração de  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A FIGURA 29 expõem os resultados obtidos para esse estudo.

FIGURA 29 – ESTUDO DE AMOSTRAS DE SORO COMERCIAL DILUÍDO 1:1000 EM PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4 NEGATIVO E FORTIFICADO COM  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  DE NS1 DENV-1 FRENTE SONDA A  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$   $5,00 \text{ mol L}^{-1}$  EM PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4, A) RESULTADOS SWV SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS CORRENTES DE PICO ANÓDICAS,  $-0,8$  A  $0,6 \text{ V}$ ,  $150 \text{ mV}$  DE AMPLITUDE PULSO, FREQUENCIA DE PULSO DE  $2 \text{ Hz}$ , VELOCIDADE DE VARREDURA DE  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . B) RESULTADOS DE EIS SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE OS  $R_{ct}$  CALCULADOS,  $100 \text{ kHz}$  A  $50 \text{ mHz}$ ,  $10 \text{ mV}$  DE AMPLITUDE, CONDIÇÃO DE CIRCUITO ABERTO.



FONTE: AUTOR (2025).

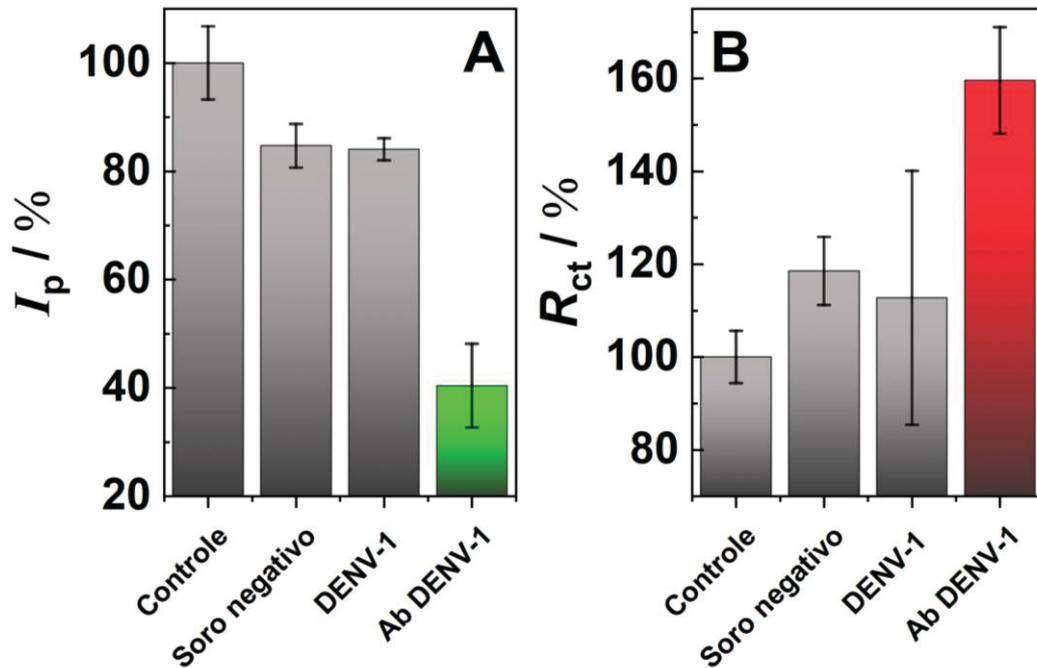
A partir dos resultados obtidos com técnica de SWV (FIGURA 29A) foi possível verificar que as variâncias dos conjuntos de resultados apresentam diferença significativas ( $F_{\text{calc}} = 13,0 > F_{\text{crítico}(0,05;2,2)} = 5,14$ ). A partir disso, quando comparadas as diferenças entre as médias foi possível verificar que os resultados do controle e o soro negativo se agrupavam no mesmo grupo e o resultado do soro fortificado com proteína NS1 DENV-1 apresentava diferença significativa das demais médias. Os

resultados com a técnica EIS (FIGURA 29B) corroboram com os da SWV, o conjunto de dados apresentou resultados semelhantes ( $F_{\text{calc}} = 12,1 > F_{\text{crítico}(0,05;2,2)} = 5,14$ ). Ao comparar as médias foi possível separar os dados em dois grupos distintos. Um deles composto pelo controle e soro negativo e outro composto apenas pelo soro fortificado com proteína NS1 DENV-1. Assim, ambos os resultados (SWV w EIS) sugerem que não há interferência significativa das componentes do soro na detecção da proteína e que o imunossensor foi efetivo para diferenciar as amostras positivas e negativas. A partir de todos os estudos apresentados até esse momento foi possível demonstrar a viabilidade do dispositivo impresso em 3D tanto para detecção para proteína NS1 da Dengue sorotipo 1 quanto para os anticorpos contra proteína NS1 da Dengue sorotipo 1. Isso permitiu com que o trabalho avançasse para que os dois sensores fossem empregados em um mesmo dispositivo para a detecção sequencial de proteína e anticorpos de DENV-1.

#### 4.11 AVALIAÇÃO DO DISPOSITIVO MULTIPLEX

Por fim para avaliar a viabilidade do dispositivo multiplex para a detecção de Ab DENV-1 e NS1 DENV-1 foi realizada a montagem do sistema com três eletrodos visando a detecção de anticorpos (Ab DENV-1) e três para a detecção da proteína viral (NS1 DENV-1). Para isso foram realizadas incubações de amostras de soro comercial diluído na proporção de 1:1000 em tampão PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4. Além disso, foram preparadas amostras de soro fortificadas com Ab DENV-1 (100 ng mL<sup>-1</sup>), soro fortificado com NS1 DENV-1 (100 ng mL<sup>-1</sup>). Essa concentração foi escolhida por ser um ponto intermediário observado nas curvas analíticas construídas anteriormente para ambos os sensores. A FIGURA 30 apresenta os resultados obtidos para a detecção de Ab DENV-1 utilizando as técnicas de SWV e EIS.

FIGURA 30 – AVALIAÇÃO DO DISPOSITIVO MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE Ab DENV-1 EM AMOSTRAS DE SORO COMERCIAL DILUÍDO 1:1000 EM PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 NEGATIVO E FROTIFICAÇÕES COM NS1 DENV-1 (100 ng mL<sup>-1</sup>), Ab DENV-1 (100 ng mL<sup>-1</sup>) e NS1 DENV-1 E Ab DENV-1 (AMBOS 100 ng mL<sup>-1</sup>) FRENTE Sonda A [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 5,00 mol L<sup>-1</sup> EM PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4, A) RESULTADOS SWV SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS CORRENTES DE PICO ANÓDICAS, -0,8 A 0,6 V, 150 mV DE AMPLITUDE PULSO, FREQUENCIA DE PULSO DE 2 Hz, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s<sup>-1</sup>. B) RESULTADOS DE EIS SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE OS R<sub>ct</sub> CALCULADOS, 100 kHz A 50 mHz, 10 mV DE AMPLITUDE, CONDIÇÃO DE CIRCUITO ABERTO.



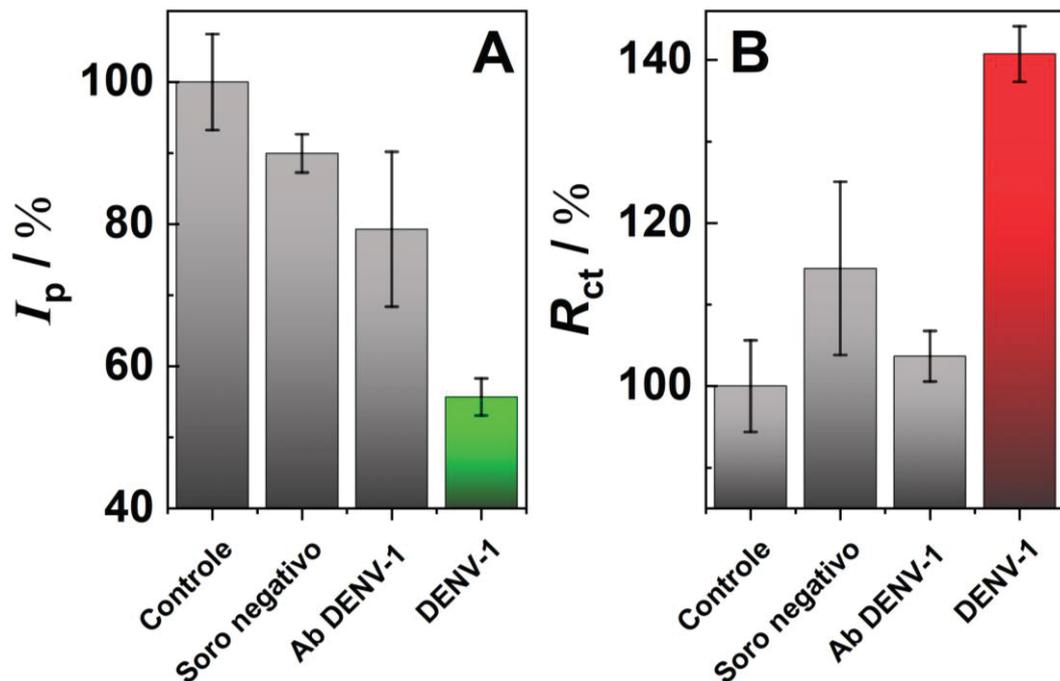
FONTE: AUTOR (2025).

Novamente, a partir dos resultados obtidos por SWV (FIGURA 30A) foi possível observar que os conjuntos de resultados apresentavam diferenças significativas ( $F_{\text{calc}} = 58,2 > F_{\text{crítico}(0,05;3,8)} = 4,07$ ) e portanto, há diferença entre as médias desses conjuntos. Com um teste Tukey foi possível comparar as médias e verificar como os resultados se agrupavam. O primeiro grupo foi composto pelo controle e soro negativo, o que sugere a não efeito dos componentes do soro na detecção de anticorpos. O segundo grupo foi composto pelas amostras de soro negativo e soro fortificado com NS1 DENV-1, que serve de indicativo de uma pequena interferência da proteína NS1 DENV-1 com relação ao controle. Porém, a presença da proteína NS1 DENV-1 não pode ser distinguida do soro negativo, o que reduz a probabilidade de ocorrer um falso positivo para detecção de anticorpos. O terceiro grupo é composto apenas pela amostra de soro fortificado com Ab DENV-1, o que sugere que o resultado obtido para detecção do alvo pode ser distinguido do controle,

soro negativo e soro fortificado com NS1 DENV-1, tais resultados servem de indicativo da funcionalidade do dispositivo multiplex para detecção de anticorpos.

Os resultados obtidos para a técnica EIS (FIGURA 30B) mostram que as variâncias dos conjunto apresentaram diferenças significativas ( $F_{\text{calc}} = 8,25 > F_{\text{critico}(0,05;3,8)} = 4,07$ ) e ao comparar as médias foi possível dividir os resultados em dois grupos. Um grupo foi composto pelo controle e as amostras de soro negativo e fortificado com NS1 DENV-1. Outro grupo é composto pela amostra de soro fortificado com Ab DENV-1. Assim, os resultados obtidos empregando a EIS mostram que a média obtida para a amostra de soro fortificado com Ab DENV-1 é significativamente diferente do controle, soro negativo e soro fortificado com NS1 DENV-1. Estes que por sua vez apresentam médias que não apresentam diferenças significativas e indicam um efeito negligenciável do soro e da proteína NS1 DENV-1 na detecção do anticorpo alvo por EIS. Na FIGURA 31 estão os resultados obtidos para a detecção de proteína NS1 DENV-1 utilizando as técnicas de de SWV e EIS.

FIGURA 31 – AVALIAÇÃO DO DISPOSITIVO MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE NS1 DENV-1 EM AMOSTRAS DE SORO COMERCIAL DILUÍDO 1:1000 EM PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 NEGATIVO E FROTIFICAÇÕES COM NS1 DENV-1 (100 ng mL<sup>-1</sup>), Ab DENV-1 (100 ng mL<sup>-1</sup>) e NS1 DENV-1 E Ab DENV-1 (AMBOS 100 ng mL<sup>-1</sup>) FRENTE SONDA A [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 5,00 mol L<sup>-1</sup> EM PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4, A) RESULTADOS SWV SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE AS CORRENTES DE PICO ANÓDICAS, -0,8 A 0,6 V, 150 mV DE AMPLITUDE PULSO, FREQUENCIA DE PULSO DE 2 Hz, VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s<sup>-1</sup>. B) RESULTADOS DE EIS SUMARIZADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE OS R<sub>ct</sub> CALCULADOS, 100 kHz A 50 mHz, 10 mV DE AMPLITUDE, CONDIÇÃO DE CIRCUITO ABERTO.



FONTE: AUTOR (2025).

Os resultados de SWV (FIGURA 31A) apresentaram diferenças significativas entre as variâncias inter e intra conjuntos ( $F_{\text{calc}} = 21,1 > F_{\text{crítico}(0,05;3,8)} = 4,07$ ). Similar ao observado para detecção de anticorpos, foi possível separar as médias em três grupos. O primeiro foi composto pelo controle e soro negativo, segundo formado pelo soro negativo e soro fortificado com Ab DENV-1 e o terceiro constituído apenas pela proteína NS1 DENV-1. Esses resultados sugerem novamente que o soro negativo não apresenta interferência significativa quando comparado com controle e que o soro fortificado com anticorpos por mais que distinguível do controle não pode ser diferenciado do soro negativo. Somado com isso a amostra média da amostra de soro fortificado com a proteína alvo apresentou média significativamente diferente dos demais resultados, o que permite diferenciar o resultado da espécie alvo de demais interferentes.

Ao analisar os dados obtidos pela técnica de EIS (FIGURA 31B) foi possível verificar que os conjuntos de resultados apresentavam diferenças significativas ( $F_{\text{calc}} = 32,6 > F_{\text{crítico}(0,05;3,8)} = 4,07$ ). Ao comparar as médias foi possível separar os resultados em dois grupos. As médias do controle, soro negativo e soro fortificado com Ab DENV-1 não apresentaram diferenças significativas entre seus resultados e a proteína NS1 DENV-1 apresentou uma média significativamente diferente dos demais resultados, resultado esse que reforça a observação de que tanto o soro como o anticorpo contra DENV-1 não interferem na detecção da proteína alvo.

Sendo assim, foi possível demonstrar viabilidade do dispositivo multiplex proposto para detectar tanto Ab DENV-1 quanto a proteína NS1 DENV-1 sem que houvesse interferências significativas da matriz do soro comercial diluído. Além disso não foram observados falsos positivos, caso fosse incubado Ab DENV-1 no sistema de detecção de proteína viral ou caso incubasse proteína NS1 DENV-1 no sistema de detecção de anticorpos. A literatura já relata diversos trabalhos que visam desenvolver sensores eletroquímicos para detecção tanto de antígeno quanto anticorpos para diagnóstico de Dengue. A TABELA 3 apresenta alguns trabalhos envolvendo diferentes montagens de imunossensores eletroquímicos, junto com seus alvos, técnica de detecção, tempo de montagem da camada seletiva, faixa linear e limite de detecção.

TABELA 3 – Comparativo de diferentes plataformas e seus alvos, técnica de detecção, tempos de construção da camada seletiva, faixa linear e limites de detecção para detecção de DENV-1 (antígeno e/ou anticorpo).

Plataforma	Alvo	Técnica de detecção	Tempo de construção da camada seletiva	Faixa linear	LOD	Ref.
GCE-rGO/pDA/AuNP <sup>a</sup>	Proteína NS1	CV	12,5 h	0,04 – 2 µg mL <sup>-1</sup>	1 ng mL <sup>-1</sup>	[89]
SPCE-BSA <sup>b</sup>	Proteína NS1	EIS	85 min	1 – 200 ng mL <sup>-1</sup>	0,3 ng mL <sup>-1</sup>	[90]
SPGE-pDA <sup>c</sup>	Proteína NS1	DPV	4 h	0,01 – 1 ng mL <sup>-1</sup>	1,63 pg mL <sup>-1</sup>	[91]
GE-DNA Aptamer <sup>d</sup>	Proteína NS1	EIS	21,5 h	0,01 ng mL <sup>-1</sup> – 1 µg mL <sup>-1</sup>	25 pg mL <sup>-1</sup>	[92]
GCE-AuNRs-g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> <sup>e</sup>	Proteína NS1	EIS	~13h	3 – 177ng mL <sup>-1</sup>	0,03 ng mL <sup>-1</sup>	[93]
SPCE-Estreptavidin-biotina <sup>f</sup>	IgM contra NS1	CA	2 h e 35 min	10 <sup>6</sup> – 10 <sup>3</sup> diluições de soro humano	10 <sup>6</sup> diluições de soro humano	[94]
SPCE-G/TiO <sub>2</sub> <sup>g</sup>	IgG contra NS1	EIS	1h	62,5 ng mL <sup>-1</sup> - 2 µg mL <sup>-1</sup>	2,81 ng mL <sup>-1</sup>	[95]
SPCE-Ácido 4-aminobenzoico <sup>h</sup>	IgG contra NS1	EIS	25 min	1280 – 40 diluições de soro humano	1280 diluições de soro humano	[96]
LIG <sup>i</sup>	Ab contra proteína E	DPV	~13 h	25 ng mL <sup>-1</sup> – 20 µg mL <sup>-1</sup>	17,41 ng mL <sup>-1</sup>	[97]
3DPE-ErGO/PHB <sup>j</sup>	Proteína NS1	SWV/EIS	~20 min	20 ng mL <sup>-1</sup> – 1,0 µg mL <sup>-1</sup> / 10 ng mL <sup>-1</sup> – 1,0 µg mL <sup>-1</sup>	20 / 10 ng mL <sup>-1</sup>	*
3DPE-ErGO/PHB <sup>j</sup>	IgG contra proteína NS1	SWV/EIS	~20 min	10 ng mL <sup>-1</sup> – 2,5 µg mL <sup>-1</sup>	10 ng mL <sup>-1</sup>	*

<sup>a</sup> Eletrodo de carbono vítreo modificado com rGO, polidopamina e nanopartículas de ouro,

<sup>b</sup> Eletrodo impresso de carbono modificado com BSA,

<sup>c</sup> Eletrodo impresso de ouro modificado com polidopamina,

<sup>d</sup> Eletrodo de ouro modificado com aptâmero de DNA,

<sup>e</sup> Eletrodo de carbono vítreo modificado com nitreto de carbono grafítico decorado com nanobastões de ouro,

<sup>f</sup> Eletrodo impresso de carbono modificado com estreptavidina e biotina

<sup>g</sup> Eletrodo impresso de carbono modificado com Ácido 4-aminobenzoico eletropolimerizado

<sup>h</sup> Eletrodo impresso de carbono modificado com nanocomposito de grafeno e TiO<sub>2</sub>

<sup>i</sup> Eletrodo de grafeno induzido por laser

<sup>j</sup> Eletrodo impresso 3D de Proto-Pasta modificado com ErGO e nanopartículas de PHB

\* Este trabalho

É evidente que as diferentes abordagens de montagem dos imunossensores eletroquímicos influenciam diretamente nos tempos de preparação da camada seletiva e nos limites de detecção dos dispositivos. Dentre os sensores apresentados na TABELA 3, destaca-se o sensor desenvolvido por Santos *et al.* [96], projetado para

detectar anticorpos IgG contra DENV. Esse dispositivo utiliza eletrodos impressos de carbono modificados com ácido 4-aminobenzoico eletropolimerizado, permitindo uma montagem da camada seletiva em apenas 25 minutos. Nesse sistema, o elemento de reconhecimento, a proteína NS1, é incorporado na superfície do eletrodo por meio de dropcasting, utilizando predominantemente interações adsorptivas para acelerar o processo de montagem do dispositivo – uma estratégia similar à proposta no presente trabalho. Outro sensor que chama atenção também é o desenvolvido por Hasnain *et. al.*, 2018 [90], que propôs um imunossensor para detecção da proteína NS1. Nesse dispositivo, foi utilizado um eletrodo impresso de carbono modificado com BSA eletrodepositado, seguido pela incorporação de anticorpos contra a proteína NS1 com auxílio do par de agentes de ligação EDC/NHS. Apesar de o sensor apresentar um tempo de montagem relativamente rápido em comparação com outros trabalhos listados, o uso de agentes de ligação contribui para o aumento no tempo necessário para a preparação da camada seletiva, contudo essa abordagem garante maior estabilidade do dispositivo e menores LOD.

Tendo em vista os trabalhos apresentados na TABELA 3, o imunossensor eletroquímico multiplex impresso em 3D com montagem de etapa única proposto no presente trabalho se mostra competitivo, quando comparado com a literatura dado sua versatilidade que permite em um mesmo dispositivo detectar dois alvos importantes para o diagnóstico da Dengue. A faixa de resposta linear de trabalho e bem como a menor concentração detectável obtidos se mostram similares a diversos trabalhos descritos na literatura e adequados a realidade clínica de análise em amostras de soro humano. Além disso o tamanho do dispositivo, simplicidade na montagem e tempo de construção da camada seletiva merecem destaque especialmente para aplicação do dispositivo na triagem e, conseqüentemente, auxiliar na descentralização do diagnóstico.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento desse projeto mostraram que é possível realizar a construção do dispositivo eletroquímico usando impressão 3D com seis eletrodos de trabalho e um volume reduzido de amostras, reagentes e soluções. Os estudos relacionados aos eletrodos de Proto-Pasta® mostraram que o tratamento em NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> a 60 °C por 30 min, a fim de remover o PLA superficial e expor o negro de fumo (elemento condutor), é uma estratégia simples e eficiente para melhorar o desempenho eletroquímico dos eletrodos impressos. A modificação dos eletrodos de trabalho com ErGO é importante para melhorar o comportamento eletroquímico da sonda em tampão fosfato PBS pH 7,4 e também para criar uma superfície mais homogênea e funcionalizada. A construção da camada seletiva mostrou a viabilidade da modificação em etapa única utilizando o PHB decorado com os sítios de reconhecimento (a proteína NS1 DENV-1 ou Ab DENV-1) para a detecção de anticorpos ou proteína viral. Das técnicas investigadas na detecção, voltametria de onda quadrada (SWV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), destaque para última que apresentou melhor performance para ambos os sensores. Foi possível construir curvas analíticas utilizando as duas técnicas eletroquímicas para ambas as montagens de sensor, foi observado uma maior sensibilidade para montagem visando a detecção de anticorpos, cujo menor valor detectável experimental foi igual a 10 ng mL<sup>-1</sup> para ambas as técnicas. Já para a detecção de proteína foi observado um menor valor detectável de 10 ng mL<sup>-1</sup> para a técnica de EIS e 20 ng mL<sup>-1</sup> para a SWV. Os estudos de seletividade para as duas montagens imunossensor apresentaram bons resultados de seletividade. Vale ressaltar que para a detecção de anticorpos foi observada uma queda de sensibilidade em casos de misturas anticorpos, devido a elevada concentração de anticorpos levar a ocorrência do efeito Hook. O que não foi observado nos testes para detecção de proteína. Através dos resultados em amostras de soro comercial fortificado foi possível verificar interferências negligenciável de componentes dos soros para detecção do anticorpo e proteína viral quando comparados os resultados do soro negativo com o fortificado. Por fim quando combinadas os dois modos de montagem do imunossensor em um mesmo dispositivo para detecção sequencial de Ab DENV-1 e NS1 DENV-1 foi possível e detectar ambos os alvos sem interferências significativas em amostras preparadas com soro comercial diluído. Como perspectivas para o trabalho é pretendido realizar estudos de estabilidade das nanopartículas de PHB decoradas com os elementos de

reconhecimento e com agente bloqueadores e aplicar o dispositivo em amostras soro de pacientes acometidos com Dengue sorotipo 1. E para trabalhos futuros a construção de um dispositivo multiplex que vise a detecção dos 4 sorotipos da DENV e permita a diferenciação dos diferentes sorotipos.

## REFERÊNCIAS

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neglected tropical diseases, 2021. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1)>. Acesso em: 26 mar. 2023.
- [2] Guzman, M.G.; Gubler, D.J.; et al. Dengue infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 1–26, 2016.
- [3] Uno, N.; Ross, T.M. Dengue virus and the host innate immune response. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 167, p. 1–11, 2018.
- [4] Muller, D.A.; Depelsenaire, A.C.I.; et al. Clinical and laboratory diagnosis of dengue virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. Suppl 2, p. S89–S95, 2017.
- [5] Vairo, F.; Haider, N.; et al. Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 4, p. 1003–1025, 2019.
- [6] Ahsan, H. Monoplex and multiplex immunoassays: approval, advancements, and alternatives. **Comparative Clinical Pathology**, v. 31, n. 2, p. 333–345, 2022.
- [7] Nardo, F. Di; Chiarello, M.; et al. Ten years of lateral flow immunoassay technique applications: Trends, challenges and future perspectives. **Sensors**, v. 21, n. 15, 2021.
- [8] Ma, Z.; Guo, J.; et al. Lateral flow immunoassay (LFIA) for dengue diagnosis: Recent progress and prospect. **Talanta**, v. 267, n. March 2023, p. 125268, 2024.
- [9] Mollarasouli, F.; Kurbanoglu, S.; et al. The Role of Electrochemical Immunosensors in Clinical Analysis. **Biosensors**, v. 86, p. 1–19, 2019.
- [10] Wang, Z.; Guo, Y.; et al. Applications of self-assembly strategies in immunoassays: A review. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 478, p. 214974, 2023.
- [11] Gross, B.C.; Erkal, J.L.; et al. Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 7, p. 3240–3253, 2014.
- [12] Gonçalves, D.A.; Estadulho, G.L.D.; et al. Multi-electrode platform for selective electrochemical sensing: 3D-printed insulating plastic is turned into a five-electrodes chip. **Talanta**, v. 250, n. April, p. 1–5, 2022.
- [13] Matos Morawski, F. de; Martins, G.; et al. A versatile 3D printed multi-electrode cell for determination of three COVID-19 biomarkers. **Analytica Chimica Acta**, v. 1258, n. March, p. 341169, 2023.
- [14] ANVISA. RESOLUÇÃO RDC N° 28, DE 4 DE ABRIL DE 2007. [saude.gov](http://saude.gov),



- from conventional technology to point of care. **Biosensors**, v. 11, n. 7, p. 1–28, 2021.
- [27] Aydin, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. **Peptides**, v. 72, p. 4–15, 2015.
- [28] Bahadır, E.B.; Sezgintürk, M.K. Lateral flow assays: Principles, designs and labels. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 286–306, 2016.
- [29] Zhai, Q.; Wang, X.; et al. Label-free electrochemical immunosensor for highly sensitive COVID-19 spike protein detection. **Sensors and Actuators Reports**, v. 4, n. October, p. 100124, 2022.
- [30] Gogola, J.L.; Martins, G.; et al. Label-free aptasensor for p24-HIV protein detection based on graphene quantum dots as an electrochemical signal amplifier. **Analytica Chimica Acta**, v. 1166, p. 1–7, 2021.
- [31] Alhazmi, H.A.; Ahsan, W.; et al. Development of screen- printed carbon electrode-based immunosensors for the electrochemical detection of dengue virus antigen. **Journal of King Saud University - Science**, v. 35, n. 3, p. 102568, 2023.
- [32] Castro, K.R.; Setti, G.O.; et al. Electrochemical magneto-immunoassay for detection of zika virus antibody in human serum. **Talanta**, v. 256, n. October 2022, 2023.
- [33] Broeders, S.; Garland, L.; et al. A new multiplex RT-qPCR method for the simultaneous detection and discrimination of Zika and chikungunya viruses. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 92, p. 160–170, 2020.
- [34] Hulanicki, A.; Glab, S.; et al. Chemical sensors definitions and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 9, p. 1247–1250, 1991.
- [35] Baranwal, J.; Barse, B.; et al. Electrochemical Sensors and Their Applications: A Review. **Chemosensors**, v. 10, n. 363, p. 1–22, 2022.
- [36] Fátima Brito Souza, M. De Chemically modified electrodes applied to electroanalysis: A brief presentation. **Quimica Nova**, v. 20, n. 2, p. 191–195, 1997.
- [37] Segura, R.; Pizarro, J.; et al. Development of electrochemical sensors for the determination of selenium using gold nanoparticles modified electrodes. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 220, p. 263–269, 2015.
- [38] Yang, J.; He, D.; et al. Disposable carbon nanotube-based antifouling electrochemical sensors for detection of morphine in unprocessed coffee and milk. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 905, n. December 2021, p. 115997, 2022.
- [39] Sha, R.; Komori, K.; et al. Graphene–Polyaniline composite based ultra-sensitive electrochemical sensor for non-enzymatic detection of urea. **Electrochimica Acta**, v.

233, p. 44–51, 2017.

[40] Haleem, A.; Javaid, M.; et al. Biosensors applications in medical field: A brief review. **Sensors International**, v. 2, n. April, p. 100100, 2021.

[41] Chen, H.; Zhang, J.; et al. The Applications of Electrochemical Immunosensors in the Detection of Disease Biomarkers: A Review. **Molecules**, v. 28, n. 8, 2023.

[42] Uddin, M.J.; Hossain, M.K.; et al. Results in Physics Modeling of self-assembled monolayers ( SAMs ) of Octadecanethiol and Hexadecanethiol on gold ( Au ) and silver ( Ag ). **Results in Physics**, v. 7, p. 2289–2295, 2017.

[43] Valenga, M.G.P.; Martins, G.; et al. Biochar: An environmentally friendly platform for construction of a SARS-CoV-2 electrochemical immunosensor. **Science of the Total Environment**, v. 858, n. September 2022, p. 159797, 2023.

[44] Tuteja, S.K.; Chen, R.; et al. A label-free electrochemical immunosensor for the detection of cardiac marker using graphene quantum dots (GQDs). **Biosensors and Bioelectronics**, v. 86, p. 548–556, 2016.

[45] Riberi, W.I.; Zon, M.A.; et al. Impedimetric immunosensor to determine patulin in apple juices using a glassy carbon electrode modified with graphene oxide. **Microchemical Journal**, v. 158, n. February, p. 105192, 2020.

[46] Martins, G.; Gogola, J.L.; et al. Quick electrochemical immunoassay for hantavirus detection based on biochar platform. **Talanta**, v. 204, p. 163–171, 2019.

[47] Martins, G.; Galeski, H.R.; et al. One-step selective layer assemble: A versatile approach for the development of a SARS-CoV-2 electrochemical immunosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 1278, n. July, 2023.

[48] Gevaerd, A.; Carneiro, E.A.; et al. Utilizing COVID-19 as a Model for Diagnostics Using an Electrochemical Sensor. **Sensors**, v. 24, n. 12, p. 3772, 2024.

[49] Sanli, S. Single-drop electrochemical immunosensor with 3D-printed magnetic attachment for onsite smartphone detection of amoxicillin in raw milk. **Food Chemistry**, v. 437, n. P1, p. 137823, 2024.

[50] Parlane, N.A.; Rehm, B.H.A.; et al. Novel particulate vaccines utilizing polyester nanoparticles (bio-beads) for protection against Mycobacterium bovis infection-A review. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 158, n. 1–2, p. 8–13, 2014.

[51] Babos, G.; Rydz, J.; et al. Poly(3-hydroxybutyrate)-based nanoparticles for sorafenib and doxorubicin anticancer drug delivery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 1–17, 2020.

- [52] Russell, F.A.; Hutmacher, D.W.; et al. Vaccine delivery: Overcoming the challenges of vaccinating livestock and wildlife. **Veterinary Vaccine**, v. 3, n. 4, p. 100093, 2024.
- [53] González-Miró, M.; Rodríguez-Noda, L.M.; et al. Bioengineered polyester beads co-displaying protein and carbohydrate-based antigens induce protective immunity against bacterial infection. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018.
- [54] Dourado, L.F.N.; Pierucci, A.; et al. Assessment of implantable drug delivery technology: poly (3-hydroxybutyrate)/polypropylene glycol films containing simvastatin. **Revista Materia**, v. 26, n. 4, 2021.
- [55] Martins, G.; Gogola, J.L.; et al. Novel approach based on GQD-PHB as anchoring platform for the development of SARS-CoV-2 electrochemical immunosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 1232, n. September, 2022.
- [56] Martins, G.; Gogola, J.L.; et al. 3D-printed electrode as a new platform for electrochemical immunosensors for virus detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 1147, p. 30–37, 2021.
- [57] Ambrosi, A.; Pumera, M. 3D-printing technologies for electrochemical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 10, p. 2740–2755, 2016.
- [58] Lee, J.Y.; An, J.; et al. Fundamentals and applications of 3D printing for novel materials. **Applied Materials Today**, v. 7, p. 120–133, 2017.
- [59] Abdalla, A.; Patel, B.A. 3D Printed Electrochemical Sensors. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 14, p. 47–63, 2021.
- [60] Stefano, J.S.; Guterres e Silva, L.R.; et al. New conductive filament ready-to-use for 3D-printing electrochemical (bio)sensors: Towards the detection of SARS-CoV-2. **Analytica Chimica Acta**, v. 1191, 2022.
- [61] Eguilaz, M.R. de; Cumba, L.R.; et al. Electrochemical detection of viruses and antibodies: A mini review. **Electrochemistry Communications**, v. 116, n. May, p. 106762, 2020.
- [62] Ding, X.; Li, Z.; et al. Monolithic, 3D-printed lab-on-disc platform for multiplexed molecular detection of SARS-CoV-2. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 351, n. October 2021, p. 130998, 2022.
- [63] Chiellini, E.; Errico, C.; et al. Poly(hydroxyalkanoates)-based polymeric nanoparticles for drug delivery. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2009.
- [64] Hummers, W.S.; Offeman, R.E. Preparation of Graphitic Oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 6, p. 1339, 1958.

- [65] Mehl, H.; Matos, C.F.; et al. Efeito da variação de parâmetros reacionais na preparação de grafeno via oxidação e redução do grafite. **Quimica Nova**, v. 37, n. 10, p. 1639–1645, 2014.
- [66] Kalinke, C.; Neumsteir, N.V.; et al. Comparison of activation processes for 3D printed PLA-graphene electrodes: Electrochemical properties and application for sensing of dopamine. **Analyst**, v. 145, n. 4, p. 1207–1218, 2020.
- [67] Abdalla, A.; Patel, B.A. 3D-printed electrochemical sensors: A new horizon for measurement of biomolecules. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 20, p. 78–81, 2020.
- [68] Elsayy, M.A.; Kim, K.H.; et al. Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, n. April, p. 1346–1352, 2017.
- [69] Richter, E.M.; Rocha, D.P.; et al. Complete Additively Manufactured (3D-Printed) Electrochemical Sensing Platform. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 20, p. 12844–12851, 2019.
- [70] Fan, Y.; Fowler, G.D.; et al. The past, present and future of carbon black as a rubber reinforcing filler – A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 247, p. 119115, 2020.
- [71] Rocha, D.P.; Squissato, A.L.; et al. Improved electrochemical detection of metals in biological samples using 3D-printed electrode: Chemical/electrochemical treatment exposes carbon-black conductive sites. **Electrochimica Acta**, v. 335, p. 1–11, 2020.
- [72] Yilmaz, B.; Pazarceviren, A.E.; et al. Historical development of simulated body fluids used in biomedical applications: A review. **Microchemical Journal**, v. 155, n. February, p. 104713, 2020.
- [73] Xue, P.; Bao, Y.; et al. Impact of modification of carbon black on morphology and performance of polyimide/carbon black hybrid composites. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 37, p. 11342–11350, 2010.
- [74] Singla, P.; Mehta, R.; et al. Microwave assisted synthesis of poly(lactic acid) and its characterization using size exclusion chromatography. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 963–970, 2012.
- [75] Rochman, R.A.; Wahyuningsih, S.; et al. Preparation of nitrogen and sulphur Co-doped reduced graphene oxide (rGO-NS) using N and S heteroatom of thiourea. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 509, n. 1, 2019.
- [76] Mostafa, Y.S.; Alrumman, S.A.; et al. Bioplastic (poly-3-hydroxybutyrate)

production by the marine bacterium *Pseudodonghicola xiamenensis* through date syrup valorization and structural assessment of the biopolymer. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020.

[77] Kiliay, E.; Demirbilek, M.; et al. Preparation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHX) based nanoparticles for targeted cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, p. 310–320, 2011.

[78] Alcalá, A.C.; Ludert, J.E. The dengue virus NS1 protein; new roles in pathogenesis due to similarities with and affinity for the high-density lipoprotein (HDL)? **PLoS Pathogens**, v. 19, n. 8 August, p. 1–7, 2023.

[79] Yeow, N.; Tabor, R.F.; et al. Mapping the distribution of specific antibody interaction forces on individual red blood cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. August 2016, p. 1–7, 2017.

[80] Ribeiro, J. Electrochemical Impedance Spectroscopy: A tool on the electrochemical investigations. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 6, p. 1626–1641, 2020.

[81] Ribeiro, J.A.; Jorge, P.A.S. Applications of Electrochemical Impedance Spectroscopy in Disease Diagnosis - A Review. **Sensors and Actuators Reports**, v. 8, n. February, p. 100205, 2024.

[82] George, A.; Amrutha, M.S.; et al. Label-Free Detection of Chikungunya Non-Structural Protein 3 Using Electrochemical Impedance Spectroscopy. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 166, n. 14, p. B1356–B1363, 2019.

[83] Silva, B.V.M.; Cordeiro, M.T.; et al. A label and probe-free zika virus immunosensor prussian blue@carbon nanotube-based for amperometric detection of the ns2b protein. **Biosensors**, v. 11, n. 5, 2021.

[84] Nawaz, M.H.; Hayat, A.; et al. Development of a portable and disposable NS1 based electrochemical immunosensor for early diagnosis of dengue virus. **Analytica Chimica Acta**, v. 1026, p. 1–7, 2018.

[85] Butantan Saiba diferenciar os sintomas de dengue, chikungunya e Zika e conheça as possíveis complicações de cada doença. **Cureus**, p. 3, 2024.

[86] Rosenberg-Hasson, Y.; Hansmann, L.; et al. Effects of serum and plasma matrices on multiplex immunoassays. **Immunologic Research**, v. 58, n. 2–3, p. 224–233, 2014.

[87] Gao, S.; Guisán, J.M.; et al. Oriented immobilization of antibodies onto sensing

platforms - A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1189, 2022.

[88] Kim, J.; Park, M. Recent progress in electrochemical immunosensors. **Biosensors**, v. 11, n. 10, 2021.

[89] Chaturvedi, M.; Patel, M.; et al. Electrochimica Acta Bio-inspired graphene nanocomposite enabled electrochemical immunosensor for detection and quantification of NS1 protein of dengue virus. **Electrochimica Acta**, v. 475, n. December 2023, p. 143630, 2024.

[90] Nawaz, M.H.; Hayat, A.; et al. Development of a portable and disposable NS1 based electrochemical immunosensor for early diagnosis of dengue virus. **Analytica Chimica Acta**, v. 1026, p. 1–7, 2018.

[91] Muttaqien, S. El; Khoris, I.M.; et al. Point - of - care dengue detection : polydopamine - modified electrode for rapid NS1 protein testing for clinical samples. **Microchimica Acta**, 2024.

[92] Awan, M.; Rauf, S.; et al. A sandwich electrochemical immunosensor based on antibody functionalized-silver nanoparticles ( Ab-Ag NPs ) for the detection of dengue biomarker protein NS1. **Journal of Molecular Liquids**, v. 317, p. 114014, 2020.

[93] Prakash, R.; Singh, P.; et al. Electrochimica Acta Impedimetric immunosensor for the NS1 dengue biomarker based on the gold nanorod decorated graphitic carbon nitride modified electrode. **Electrochimica Acta**, v. 411, n. February, p. 140069, 2022.

[94] Parkash, O.; Abdullah, M.A.; et al. Development and evaluation of an electrochemical biosensor for detection of dengue-specific igm antibody in serum samples. **Diagnostics**, v. 11, n. 1, 2020.

[95] Yan, Q.; Leen, E.; et al. Biosensors and Bioelectronics Highly sensitive and specific graphene / TiO<sub>2</sub> impedimetric immunosensor based on plant-derived tetravalent envelope glycoprotein domain III ( EDIII ) probe antigen for dengue diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 176, n. November 2020, 2021.

[96] Santos, C.; César, P.; et al. A new tool for dengue virus diagnosis : Optimization and detection of anti- NS1 antibodies in serum samples by impedimetric transducers. **Microchemical Journal**, v. 154, n. December 2019, p. 104544, 2020.

[97] Inlumphan, S.; Wongwiriyan, W.; et al. Laser-induced graphene electrochemical immunosensors for rapid and sensitive serological detection : A case study on dengue detection platform. **Sensors and Actuators Reports**, v. 9, n. December 2024, p. 100276, 2025.

## ANEXO 1 – DISCIPLINAS CURSADAS



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

<b>Nome:</b> THOMAS ANTONIO CARDOZO MARTINS		<b>Documento:</b> ██████████
<b>Data de Nascimento:</b> 29/06/1998	<b>Sexo:</b> Masculino	<b>Naturalidade:</b> Jaraguá do Sul - Santa Catarina
<b>Filiação:</b> João Martins e Daezi Terezinha Cardozo Martins		

<b>Curso:</b> Mestrado em QUÍMICA	<b>Data de Matrícula:</b> 01/03/2023	<b>Previsão de Titulação:</b> 01/03/2025
Curso Reconhecido pelo Parecer nº 487/2018 CNE/CES - Portaria MEC 609, D.O.U de 18/03/2019		
<b>Área de Concentração:</b> QUÍMICA ANALÍTICA	<b>Linha de Pesquisa:</b> Desenvolvimento de Metodologias, Sensores Analíticos e Quimiometria	
<b>Língua Estrangeira:</b> Inglês		
<b>Orientador:</b> MÁRCIO FERIANDO BERGAMINI Co-Orientador: GUSTAVO MARTINS, LUIZ HUMBERTO MARCOLINO JUNIOR		
<b>Título da Dissertação:</b>		

### HISTÓRICO ESCOLAR

Data de emissão: 06/08/2024

Código	Disciplina - Turma	CH/CR	Conceito	Frequência (%)	Per./Ano	Docente
<b>Obrigatórias</b>						
QUIM-7042	SEMINÁRIOS M1 - A	15/1	A	100	1º Sem./2023	KAHLIL SCHWANKA SALOME
QUIM-7043	SEMINÁRIOS M2 - A	15/1	9.7/A	100	2º Sem./2023	CLARICE DIAS BRITTO DO AMARAL
<b>Eletivas</b>						
QUIM-7026	QUÍMICA ANALÍTICA AVANÇADA - A	60/4	9.9/A	100	1º Sem./2023	CLARICE DIAS BRITTO DO AMARAL, DÊNIO EMANUEL PIRES SOUTO, NOEMI NAGATA
QUIM-7017	MÉTODOS ANALÍTICOS DE SEPARAÇÃO - A	60/4	A	100	1º Sem./2023	BRUNO JOSÉ GONÇALVES DA SILVA, GILBERTO ABATE
QUIM-7024	PRÁTICA DE DOCÊNCIA EM QUÍMICA - A	15/1	10.0/A	100	2º Sem./2023	MÁRCIO FERNANDO BERGAMINI
<b>Validações de Créditos</b>						
Código	Disciplina	CH/CR	Conceito	Frequência (%)	Crédito (Tipo)	Ano - Instituição
-	ESCRITA ACADÊMICA EM INGLÊS - EAI - REMOTA - 2023.2	60/4	A	83	Eletivo (Aproveitamento)	2024 - UFPR
-	MÉTODOS ESPECTROQUÍMICOS DE ANÁLISE - A	60/4	A	100	Eletivo (Aproveitamento)	2023 - UFPR
Créditos de Disciplinas para Titulação (necessários/concluídos) - Obrigatórios: 2/2 Eletivos: 16/17 Total: 18/19						

Resolução no. 32/17 - CEPE Conceito: A = Excelente (9.0 a 10.0) B = Muito Bom (8.0 a 8.9) C = Bom (7.0 a 7.9) D = Insuficiente (0.0 a 6.9)

MÁRCIO PERES DE ARAUJO  
 Coordenação do Programa de Pós Graduação em  
 QUÍMICA

CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil  
 CEP 81531-990 - Tel: (41) 0000-00000 - E-mail: cpqquim@ufpr.br  
<https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacao.jsp> - Código para autenticação: Vwatceary

## ANEXO 2 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Science of the Total Environment 858 (2023) 159797



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scitotenv](http://www.elsevier.com/locate/scitotenv)

## Biochar: An environmentally friendly platform for construction of a SARS-CoV-2 electrochemical immunosensor



Marcia Gabriela Pianaro Valenga<sup>a</sup>, Gustavo Martins<sup>a</sup>, Thomas A.C. Martins<sup>a</sup>, Lorena Klippe Didek<sup>a</sup>, Ava Gevaerd<sup>a,b</sup>, Luiz Humberto Marcolino-Junior<sup>a</sup>, Márcio F. Bergamini<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Sensores Eletroquímicos (LabSense), Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), CEP 81531-980 Curitiba, PR, Brazil

<sup>b</sup> Hilab, Rua José Altair Possobom, 800, CEP 81270-185 Curitiba, PR, Brazil

ANALYTICAL LETTERS

2023, VOL. 56, NO. 18, 2882–2897

<https://doi.org/10.1080/00032719.2023.2187816>

Taylor & Francis  
Taylor & Francis Group

CLINICAL ANALYSIS



## Electrochemical Determination of Vitamin B12 (Cyanocobalamin) using Mercury Nanodroplets Supported at Montmorillonite on a Carbon Paste Electrode (CPE)

Lismery P. Souza<sup>a</sup>, Alan R. F. Lima<sup>b</sup>, Thomas A. C. Martins<sup>a</sup>, Fernando Campanhã Vicentini<sup>b</sup>, Luiz Humberto Marcolino-Junior<sup>a</sup>, and Márcio F. Bergamini<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Sensores Eletroquímicos (LabSense), Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil; <sup>b</sup> Center of Nature Sciences, Federal University of São Carlos, Buri, SP, Brazil

ACS **APPLIED**  
NANO MATERIALS

Open Access

This article is licensed under [CC-BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) [www.acsanm.org](http://www.acsanm.org)

Article

## Nitrogen-Doped Graphene Quantum Dots (N-GQDs): A Promising Material for the Development of Electrochemical Immunosensors

Gustavo Martins, Ana Laura S. Galvan, Marcia G. P. Valenga, Thomas Antonio Cardozo Martins, Márcio F. Bergamini,\* and Luiz Humberto Marcolino-Junior\*

Cite This: *ACS Appl. Nano Mater.* 2025, 8, 5908–5918

Read Online