



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Tiago Dellatorre Toigo

Imunossensor eletroquímico *label-free* baseado em ácido polilático/grafeno e impresso 3D para a detecção de microcistina-LR

Florianópolis

2022

Tiago Dellatorre Toigo

Imunossensor eletroquímico *label-free* baseado em ácido polilático/grafeno e impresso 3D para a detecção de microcistina-LR

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharelado em Química.

Orientador: Prof. Almir Spinelli.
Coorientadora: Dra. Pâmyla Layane dos Santos.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Toigo, Tiago Dellatorre

Imunossensor eletroquímico label-free baseado em ácido polilático/grafeno e impresso 3D para a detecção de microcistina-LR : Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Imunossensor eletroquímico label-free baseado em ácido polilático/grafeno e impresso 3D para a detecção de microcistina-LR e aprovado em sua forma final pelo Curso de Química. / Tiago Dellatorre Toigo ; orientador, Almir Spinelli, coorientador, Pamyly Layene dos Santos, 2022.
42 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Graduação em Química, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Química. 2. impressão 3D. 3. grafeno. 4. imunossensor. 5. microcistina. I. Spinelli, Almir. II. Santos, Pamyly Layene dos. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Química. IV. Título.




**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Campus Universitário-Trindade - 88040-900 - Florianópolis - SC – Brasil
Fone: +55 48 3721-6853 - E-mail: quimica@contato.ufsc.br


Ata da Sessão de Apresentação e defesa do Trabalho de conclusão de Curso, na de disciplina de Estágio II (QMC 5512) da Universidade Federal de Santa Catarina, realizada perante a Banca avaliadora designada pelo Coordenador de estágios.

Aos **[16]** dias do mês de **[dezembro]** do ano de 2022, às **[14]** horas e **[00]** minutos, foi realizada a sessão de apresentação e defesa do Trabalho de Conclusão de Curso, como requisito parcial para a obtenção do título de **Bacharel em Química** de **[Tiago Dellatorre Toigo]**, intitulado **[Imunossensor eletroquímico label-free baseado em ácido polilático/grafeno e impresso 3D para a detecção de microcistina-LR]**, sob orientação de **[Almir Spinelli]** e coorientação de **[Pâmyla Layane dos Santos]**. Após a apresentação em sessão fechada, o candidato(a) foi arguido pela Banca composta pelos membros **[Profa. Iolanda Cruz Vieira]** e **[Prof. Thiago da Conceição]** que, após deliberarem, julgaram o trabalho **[APROVADO]**. Às **[15]** horas e **[20]** minutos foi encerrada a sessão, e eu **[Almir Spinelli]**, lavrei a presente ata que assino com os demais membros da Banca e o candidato.


Florianópolis, **[16]** de **[dezembro]** de 2022.

 Documento assinado digitalmente
Tiago Dellatorre Toigo
Data: 16/12/2022 16:06:29-0300
CPF: ***.753.568-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>


Assinatura digital do aluno

 Documento assinado digitalmente
Almir Spinelli
Data: 16/12/2022 15:40:50-0300
CPF: ***.184.770-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Assinatura digital do orientador

 Documento assinado digitalmente
Iolanda da Cruz Vieira
Data: 16/12/2022 20:43:30-0300
CPF: ***.917.633-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Assinatura digital do professor 1

 Documento assinado digitalmente
Thiago Ferreira da Conceicao
Data: 16/12/2022 16:10:30-0300
CPF: ***.178.719-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Assinatura digital do professor 2

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele nada seria possível, e também imensamente a minha família. Principalmente a minha Mãe e meu Pai, Meire e Ricardo, e ao meu irmão Felipe, que me deram forças e acreditaram em mim.

Ao professor Dr. Almir Spinelli, por toda confiança, amizade e orientação durante a realização deste trabalho.

À minha co orientadora Dra. Pamyly L. do Santos, por todos os ensinamentos, companheirismo, orientação e amizade que me fizeram crescer academicamente. Um beijo especial à Elis, filha iluminada da Pamyly, onde acompanhamos todo o crescimento desta que nos inspira.

Aos meus amigos de laboratório, Edson R. Santana, João P. Winiarski, Everton, Caio, Francisco e Eduardo Constante.

Agradeço muito pelo incentivo e indicações, ao Eduardo Constante. Este que além de grande parceiro laboratorial, é um amigo da Graduação e para vida. Assim como a Helena Cruz, Christopher, Kevin e Antônio muito obrigado.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina, ao Centro de Ciências Físicas e Matemáticas e ao Departamento de Química. Aos Professores Almir Spinelli e Iolanda Cruz Vieira pela colaboração e por disponibilizarem seus laboratórios GEPEEA (Grupo de Estudos de Processos Eletroquímicos e Eletroanalíticos) e LABios (Laboratório de Biossensores) para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço às agências de fomento e à UFSC pela bolsa concedida. Agradeço totalmente, também, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo suporte financeiro.

Finalizo agradecendo extremamente a Empresa Júnior da Química, da Universidade Federal de Santa Catarina, a Reação Jr.

RESUMO

A contaminação ambiental das águas naturais, ocasionada pelo gerenciamento inadequado de resíduos industriais, agrícolas e urbanos, causa um grande impacto à saúde pública. Como consequência, ocorre a eutrofização da água, favorecendo a proliferação excessiva de cianobactérias. Além de causarem sabor e odor desagradáveis na água, as cianobactérias podem produzir algumas toxinas chamadas de microcistinas, que podem causar câncer hepático ou levar à óbito. Tais cianobactérias também são caracterizadas pela propriedade de bioacumulação, podendo ser encontrada no fígado e músculo de peixes, intoxicando os que deles se alimentam. Assim, a OMS estabelece um limite de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ou $1,0 \text{ng mL}^{-1}$ de microcistina-LR na água potável. Dentre as formas de detecção de microcistinas, a utilização de sensores eletroquímicos oferece vantagens como elevada sensibilidade, simplicidade instrumental, relativo baixo custo e possibilidade de miniaturização. Nos últimos anos, com o desenvolvimento da tecnologia de impressão 3D, uma nova classe de eletrodos plásticos com aplicações em eletroanálise tem sido estudada. Nesse tipo de eletrodo, materiais como grafeno são adicionados ao polímero ácido polilático, tornando-o condutor. Entretanto, devido à baixa concentração do material condutor, pré-tratamentos como a ativação eletroquímica em NaOH são aplicados para melhorar o desempenho dos eletrodos. Neste projeto, o eletrodo 3D foi ativado eletroquimicamente em NaOH $1,0 \text{mol L}^{-1}$ pela aplicação de $+1,6 \text{V vs. Ag/AgCl, KCl(saturado)}$ por 1800 s. Após ativado, um imunossensor 3D para a detecção de microcistina-LR foi construído através da imobilização covalente do anticorpo anti-microcistina-LR *via* EDC/NHS. Com a realização da otimização dos parâmetros da técnica eletroanalítica de voltametria de onda quadrada, uma curva de calibração foi construída. Os limites de detecção e de quantificação foram de $1,28$ e $3,88 \text{ng mL}^{-1}$, respectivamente.

Palavras-chave: impressão 3D, eletrodo impresso em 3D, grafeno, ácido polilático, imunossensor, microcistina.

ABSTRACT

The environmental contamination of natural waters, caused by inadequate management of industrial, agricultural and urban waste, has a major impact on public health. As a consequence, water eutrophication occurs, favoring the excessive proliferation of cyanobacteria. In addition to causing unpleasant taste and odor in water, cyanobacteria can produce some toxins called microcystins, which can cause liver cancer or lead to death. Such cyanobacteria are also characterized by the property of bioaccumulation, and can be found in the liver and muscle of fish, intoxicating those who feed on them. Thus, the WHO establishes a limit of $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ or 1.0 ng mL^{-1} of microcystin-LR in drinking water. Among the ways of detecting microcystins, the use of electrochemical sensors offers advantages such as high sensitivity, instrumental simplicity, relatively low cost and the possibility of miniaturization. In recent years, with the development of 3D printing technology, a new class of plastic electrodes with applications in electroanalysis has been studied. In this type of electrode, materials such as graphene are added to the polylactic acid polymer, making it conductive. However, due to the low additive concentration, pre-treatments such as electrochemical activation in NaOH are applied to improve the performance of the electrodes. In this project, the 3D electrode was electrochemically activated in 1.0 mol L^{-1} NaOH by applying $+1.6 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl, KCl(saturated) for 1800 s. After activation, a 3D immunosensor for the detection of microcystin-LR was constructed through covalent immobilization of the anti-microcystin-LR antibody via EDC/NHS. With the optimization of the parameters of the electroanalytical technique of square wave voltammetry, a calibration curve was constructed. The limits of detection and quantification were 1.28 and 3.88 ng mL^{-1} , respectively.

Keywords: 3D printing, 3D printed electrode, graphene, polylactic acid, immunosensor, microcystin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química das microcistinas –RR, –LR e –YR. Figura retirada da referência [3].....	14
Figura 2 - Comparação entre os métodos de (A) manufatura subtrativa e (B) manufatura subtrativa. Figura adaptada da referência [15].....	16
Figura 3 - Forma e dimensões (A) do eletrodo 3D e (B) 1 eletrodo, 2 suporte para o eletrodo, 3 fita de cobre, 4 cela eletroquímica, 5 tampa da cela eletroquímica.....	21
Figura 4 - Mecanismo de hidrólise do PLA, com potencial, em solução de NaOH. [52].....	21
Figura 5 - (A) Desenho do eletrodo e (B) imagem digital dos eletrodos, da cela eletroquímica e do suporte para o eletrodo de trabalho.....	22
Figura 6 - Etapas de montagem do imunossensor 3D baseado em PLA/grafeno: ativação eletroquímica do eletrodo de PLA/grafeno, ativação do eletrodo com EDC/NHS, imobilização covalente do anticorpo e incubação do antígeno.....	23
Figura 7 - Etapas do design do eletrodo 3D e eletrodos impressos.....	24
Figura 8 - Voltamogramas cíclicos para os eletrodos 3D recém impresso (preto) e para o eletrodo de carbono vítreo (vermelho). Eletrólito suporte: KCl 0,1 mol L ⁻¹ contendo [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ 1,0 mmol L ⁻¹ , velocidade de varredura 10 mV s ⁻¹	25
Figura 9 - Voltamogramas cíclicos para os eletrodos 3D ativados em NaOH 1,0 mol L ⁻¹ durante 200 s sob a aplicação de diferentes potenciais +1,2, +1,4, +1,6, +1,8 e +2,0 V vs. Ag/AgCl, KCl(sat). Eletrólito suporte: KCl 0,1 mol L ⁻¹ contendo [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ 5,0 mmol L ⁻¹ , velocidade de varredura 25 mV.....	26
Figura 10 - Efeito da aplicação dos potenciais +1,2, +1,4, +1,6, +1,8 e +2,0 V vs. Ag/AgCl, KCl _(sat) sobre (A) a separação de picos e (B) a corrente anódica extraídas dos voltamogramas cíclicos obtidos em KCl 0,1 mol L ⁻¹ contendo [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ 5,0 mmol L ⁻¹ , velocidade de varredura 25 mV s ⁻¹ . A ativação eletroquímica do eletrodo 3D foi realizada em NaOH 1,0 mol L ⁻¹ e o tempo de aplicação dos potenciais foi fixado em 200 s (n = 5).....	26

Figura 11 - Voltamogramas cíclicos para os eletrodos 3D ativados em NaOH 1,0 mol L ⁻¹ sob a aplicação de +1,6 vs. Ag/AgCl, KCl(sat) durante 200, 300, 600, 900, 1800 e 3600 s. Eletrólito suporte: KCl 0,1 mol L ⁻¹ contendo [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ 5,0 mmol L ⁻¹ , velocidade de varredura 25 mV s ⁻¹	27
Figura 12 - Efeito do tempo de ativação sobre (A) a separação de picos e (B) a corrente anódica extraídas dos voltamogramas cíclicos obtidos em KCl 0,1 mol L ⁻¹ contendo [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ 5,0 mmol L ⁻¹ , velocidade de varredura 25 mV s ⁻¹ . A ativação eletroquímica do eletrodo 3D foi realizada em NaOH 1,0 mol L ⁻¹ e o potencial foi fixado em +1,6 V (n = 5).....	28
Figura 13 - Esquema de funcionamento do imunossensor 3D e [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ como sonda redox.....	29
Figura 14 - Voltamogramas obtidos para o eletrodo 3D utilizando DPV (parâmetros: intervalo de tempo 50,0 ms, incremento 1,2 mV e amplitude 25,0 mV) e SWV (parâmetros: frequência 23,0 Hz, incremento 1,0 mV e amplitude 20,0 mV) em solução de PBS (0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,5) contendo [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ 5,0 mmol L ⁻¹	31
Figura 15 - (A) Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo 3D de PLA/grafeno ativado em solução tampão fosfato salino 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,5) contendo [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ 5,0 mmol L ⁻¹ , variando a <i>f</i> na faixa de 10,0 até 100,0 Hz. (B) Gráfico <i>I</i> vs. <i>f</i> . Parâmetros <i>a</i> = 50,0 mV e Δ <i>E</i> _s = 5,0 mV.....	32
Figura 16 - (A) Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo 3D de PLA/grafeno ativado em solução tampão fosfato salino 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,5) contendo [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ 5,0 mmol L ⁻¹ , variando a <i>a</i> na faixa de 10,0 até 100,0 mV. (B) Gráfico <i>I</i> vs. <i>a</i> . (C) Gráfico largura de pico a meia altura vs. <i>a</i> . Parâmetros <i>f</i> = 20,0 Hz e Δ <i>E</i> _s = 5,0 mV.....	33
Figura 17 - (A) Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo 3D de PLA/grafeno ativado em solução tampão fosfato salino 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,5) contendo [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ 5,0 mmol L ⁻¹ , variando o Δ <i>E</i> _s na faixa de 1,0 até 10,0 mV. (B) Gráfico <i>I</i> vs. Δ <i>E</i> _s . (C) Gráfico largura de pico a meia altura vs. Δ <i>E</i> _s . Parâmetros <i>f</i> = 20,0 Hz e <i>a</i> = 30,0 mV.....	34

Figura 18 - (A) Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo 3D de PLA/grafeno ativado em solução tampão fosfato salino $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ nos pHs 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0 contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$. (B) Gráfico de corrente vs. pH (n=3).....35

Figura 19 - (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para o imunossensor incubado com soluções padrão nas seguintes concentrações 0,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 ng mL^{-1} de MCLR. (B) Curva de calibração para MCLR (n=3).....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Imunossensores eletroquímicos para a detecção de microcistina-LR...15

LISTA DE ABREVIATURAS

GCE	Eletrodo de carbono vítreo (<i>glassy carbono electrode</i>).
MGNnP	Nanopartícula magnética.
PEI	Polietilenoimina.
nBC	Nanobiochar.
ITO	Eletrodo de óxido de índio dopado com estanho (<i>Indium tin oxide</i>).
S0	Iniciador DNA.
AgNP	Nanopartículas de prata.
AuNR	Nanobastões de ouro.
CNT	Nanotubos de carbono.
Au@PtNP	Nanopartículas core-shell ouro e platina.
xGnP	nanoplaquetas de grafite.
AuNP	Nanopartículas de ouro.
BSA	Albumina de soro bovino.
Br-Py bromide.	Cristal líquido (E)-1-decyl-4-[(4-decyloxyphenyl)diazenyl]pyridinium bromide.
MFD	Modelagem por Fusão e Deposição.
FFF	Fabricação por Filamento Fundido.
OMS	Organização Mundial de Saúde.
MC-LR	microcistina-LR.
LOD	Os valores de limite de detecção.
LOQ	Os valores de limite de quantificação.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	14
2.2	IMPRESSÃO 3D PARA A FABRICAÇÃO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS.....	16
2.2.1	Estratégias para melhorar o desempenho dos eletrodos 3D	17
2.2.2	Imunossensores impressos em 3D	18
3	OBJETIVOS	19
3.1	OBJETIVO GERAL.....	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	20
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	20
4.2	DESIGN E IMPRESSÃO DO ELETRODO 3D.....	20
4.3	ATIVAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS ELETRODOS DE PLA/GRAFENO...21	
4.4	PREPARAÇÃO DO IMUNOSSENSOR.....	22
4.5	PROPRIEDADES ELETROQUÍMICAS.....	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	DESENHO E IMPRESSÃO DOS ELETRODOS.....	24
5.2	ATIVAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS ELETRODOS.....	24
5.3	CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR VOLTAMÉTRICO 3D DE PLA/GRAFENO PARA MICROCISTINA-LR.....	29
5.3.1	Escolha da técnica voltamétrica	29
5.3.2	Otimização dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada	31
5.3.3	Estudo do pH do eletrólito suporte	34
5.3.4	Curva de calibração	35
6	PERSPECTIVAS	38
	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental das águas naturais, ocasionada, principalmente, pelo gerenciamento inadequado de resíduos industriais, agrícolas e urbanos, causa um grande impacto à saúde pública. Como consequência do descarte incorreto dos resíduos nos cursos d'água, ocorre sua eutrofização, favorecendo a proliferação excessiva de cianobactérias [1]. Além de causarem sabor e odor desagradáveis na água [2], as cianobactérias podem produzir algumas toxinas chamadas de microcistinas, apresentando um risco à saúde das comunidades que vivem nas proximidades, pois podem causar câncer hepático ou levar à óbito [3]. Na década de 90, foi reportada, no Brasil, a intoxicação de 100 pacientes renais crônicos, devido à presença de microcistina na água utilizada no processo de hemodiálise [4]. Dentre os 100 pacientes, 52 morreram após a exposição intravenosa à microcistina.

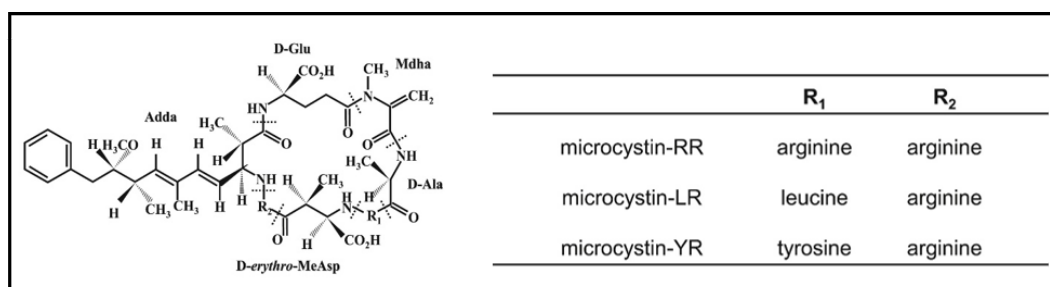
Além disso, tais cianobactérias são caracterizadas por sua propriedade de bioacumulação [5], podendo ser encontradas no fígado e músculo de peixes e, conseqüentemente, intoxicar os que deles se alimentam [6]. A contaminação também ocorre após a ingestão de água contaminada ou através da inalação e contato cutâneo durante atividades recreativas ou domésticas. Portanto, monitorar o abastecimento de água e suas fontes é de grande importância e a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabelece um limite de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de microcistina-LR (MCLR) na água potável [7].

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA

Estruturalmente, a microcistina consiste em um heptapeptídeo cíclico com dois L-aminoácidos variáveis e aproximadamente 248 variantes foram identificadas. As microcistinas podem ser classificadas como de forte (microcistina-LR, microcistina-YR), média (microcistina-WR) ou fraca (microcistina-RR) toxicidade [3], Figura 1.

Figura 1: Estrutura química das microcistinas –RR, –LR e –YR. Figura retirada da referência [3].



Dentre as formas de detecção de microcistinas, a utilização de sensores eletroquímicos oferece vantagens como elevada sensibilidade, simplicidade instrumental, relativo baixo custo e possibilidade de miniaturização. A Tabela 1 apresenta uma revisão dos imunossensores eletroquímicos encontrados na literatura para a detecção de microcistina-LR, as condições, a técnica eletroanalítica empregada e seus limites de detecção.

Tabela 1. Imunossensores eletroquímicos para a detecção de microcistina-LR.

Eletrodo	Imunossensor	Técnica Eletroanalítica	Limite de Detecção	Referência
GCE	GCE/MGNnP-P EI-anti-MC-LR	Voltametria de Onda Quadrada	0,053 ng mL ⁻¹	[8]
Papel	nBC/papel/anti- MCLR/MCLR	Amperometria	0,017 ng mL ⁻¹	[9]
GCE oxidado	Streptavidina/GC E oxidado	Impedância Eletroquímica	0,033 ng mL ⁻¹	[10]
ITO	S0-AgNP/AuNR -Ab2/AuNP-CNT -Ab1/ITO	Voltametria de pulso diferencial	2,8 ng mL ⁻¹	[11]
Au	Au@PtNP-Ab2/ MC-LR/Ab-MC-L R/AuNC/MoS ₂ /A u	Voltametria de pulso diferencial	0,3 ng mL ⁻¹	[12]
GCE	AgNP-Nafion-xG nP-anti-MC-LR/ GCE	Voltametria de Onda Quadrada	0,017 ng mL ⁻¹	[13]
GCE	anti-MC-LR/AuN P-BSA/Br-Py/G CE	Voltametria de Onda Quadrada	0,05 ng mL ⁻¹	[14]

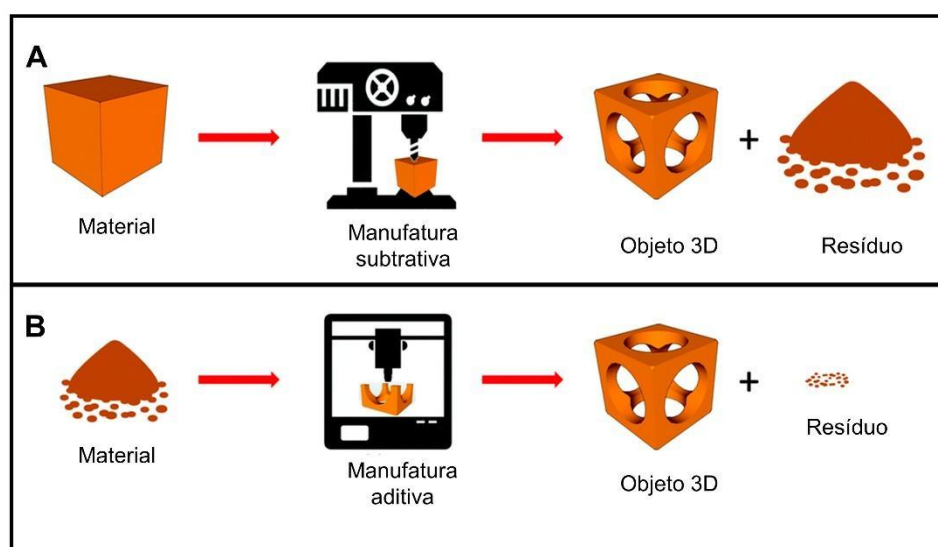
GCE: eletrodo de carbono vítreo (*glassy carbon electrode*), MGNnP: nanopartícula magnética, PEI: polietilenoimina, nBC: nanobiochar, ITO: eletrodo de óxido de índio dopado com estanho (*Indium tin oxide*), S0: iniciador DNA, AgNP: nanopartículas de prata, AuNR: nanobastões de ouro, CNT: nanotubos de carbono, Au@PtNP: nanopartículas core-shell ouro e platina, xGnP: nanoplaquetas de grafite, AuNP: nanopartículas de ouro, BSA: albumina de soro bovino, Br-Py: cristal líquido (E)-1-decyl-4-[(4-decyloxyphenyl)diazeny]pyridinium bromide. Tabela desenvolvida pelos autores.

2.2 IMPRESSÃO 3D PARA A FABRICAÇÃO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS

Como pode ser observado na Tabela 1, os imunossensores eletroquímicos para microcistina-LR são, em sua maioria, fabricados a partir de eletrodos convencionais como o eletrodo de carbono vítreo e os eletrodos 3D ainda não foram explorados.

A tecnologia de impressão 3D ou manufatura aditiva consiste na fabricação de objetos tridimensionais a partir da deposição controlada de camadas sucessivas de material até que uma estrutura final seja criada. Essa tecnologia oferece vantagens sobre os processos de manufatura subtrativa, como a redução de resíduos (Figura 1) e a possibilidade de criação de estruturas complexas. O crescente interesse pela impressão 3D, tanto na indústria quanto nos laboratórios de pesquisa, deve-se à diminuição do custo e tempo de produção, e a fabricação de objetos sob demanda, com formas e tamanhos adequados à aplicação desejada [15,16].

Figura 2. Comparação entre os métodos de (A) manufatura subtrativa e (B) manufatura aditiva. Figura adaptada da referência [15].



Assim, devido às suas vantagens, a tecnologia de impressão 3D tem sido utilizada nas mais diversas áreas como medicina, engenharia civil, engenharia mecânica, ciência de materiais e química. Desde o início da pandemia de Covid-19, a tecnologia de impressão 3D tem mostrado sua importância para a fabricação de equipamentos de proteção individual como protetores faciais [17] e prototipagem de ventiladores pulmonares [18]. Sua relevância é reconhecida na área de

eletroquímica [19], sendo reportada a utilização de impressoras 3D para a fabricação de células eletroquímicas [20] e espectroeletroquímicas [21], baterias [22], eletrolisadores de água [23], sensores 3D [24] e mais recentemente, imunossensores eletroquímicos para Covid-19 [25,26].

Nos últimos 5 anos, a maioria dos eletrodos 3D, impressos pela técnica de Modelagem por Fusão e Deposição (MFD) ou Fabricação por Filamento Fundido (FFF), são fabricados a partir de filamentos comerciais contendo termoplásticos como o ácido polilático (PLA) e cargas como negro de fumo, fibra de carbono e grafeno para torná-los condutores [27–29]. No entanto, devido ao baixo percentual de material eletroativo nos filamentos comerciais, cerca de 8% nos filamentos de PLA/grafeno [30,31], os eletrodos impressos apresentam uma elevada resistência a transferência de carga (R_{ct}) e uma ou mais etapas de ativação são necessárias para a remoção do polímero da superfície para melhorar os desempenhos dos eletrodos.

2.2.1 Estratégias para melhorar o desempenho dos eletrodos 3D

Para contornar o problema do baixo desempenho dos eletrodos 3D, duas estratégias podem ser utilizadas: o aumento da concentração dos materiais eletroativos, sem que a printabilidade seja comprometida [29], ou a remoção do polímero da superfície [32]. Desta forma, métodos de ativação química por solventes [33] e ativação mecânica [34] podem resultar no aumento da cinética de transferência eletrônica pela exposição do material eletroativo na superfície dos eletrodos. Entretanto, os detalhes de impressão e a estrutura fina desses eletrodos podem ser danificados após a remoção do polímero por solvente ou polimento, comprometendo o seu desempenho [35].

Outra estratégia de ativação eletroquímica dos eletrodos 3D que pode ser realizada em tampão fosfato (pH 7,4) [30] ou em NaOH 1,0 mol L⁻¹ [36]. Tais processos consistem na oxidação ou oxidação/redução do eletrodo de PLA/grafeno e pode resultar em uma diminuição da R_{ct} . Além disso, grupos funcionais oxigenados podem ser gerados nas folhas de grafeno após a ativação eletroquímica, aumentando a sensibilidade e seletividade do sensor a moléculas de interesse como a dopamina [30].

2.2.2 Imunossensores impressos em 3D

Os imunossensores eletroquímicos são caracterizados pela sua especificidade e alta sensibilidade. Seu funcionamento baseia-se nas interações de anticorpos, utilizados como elementos de reconhecimento (receptores), e seus antígenos. Assim, a formação do imunocomplexo anticorpo-antígeno resulta na alteração das propriedades eletroquímicas do eletrodo, utilizado como suporte para os anticorpos [37,38]. Dentre as possibilidades de construção dos imunossensores, a abordagem conhecida como *label-free* utiliza uma sonda redox que pode estar presente na solução do eletrólito ou imobilizada no eletrodo. Desta forma, quando um elemento de transdução voltamétrico é utilizado, espera-se que o evento de imunoreconhecimento seja acompanhado pela diminuição da corrente de pico associada ao processo redox da sonda. A supressão da corrente ocorre pelo bloqueio interfacial do eletrodo pelo imunocomplexo e é proporcional à concentração do analito de interesse, o antígeno.

A literatura científica apresenta poucos exemplos de imunossensores impressos em 3D. Os trabalhos reportados exploram a propriedade de biocompatibilidade do PLA e/ou de nanopartículas de ouro para a imobilização de anticorpos. Nesse sentido valida-se a ativação dos grupos carboxílicos do PLA com EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) e NHS (N-hidroxissuccinimida) à imobilização covalente de anticorpos contra o Hantavirus [39]. Outro trabalho, reportado por Munõz e colaboradores utilizou nanopartículas de prata, cisteamina e glutaraldeído para a imobilização da proteína recombinante do SARS-Cov-2 (coronavírus causador da Covid 19) [25]. Ambos trabalhos utilizaram filamentos comerciais e foi necessário o pré-tratamento químico e/ou eletroquímico dos eletrodos para a exposição do material eletroativo.

Neste trabalho, uma estratégia de construção de um imunossensor 3D foi proposta para a detecção de microcistina-LR. As propriedades eletroquímicas do eletrodo de PLA/grafeno foram estudadas antes e após sua ativação eletroquímica. Em seguida, o eletrodo foi imobilizado covalentemente com o anticorpo anti-microcistina-LR *via* EDC/NHS e sua resposta eletroquímica em relação à microcistina-LR foi avaliada na presença da sonda eletroquímica $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ pela técnica de voltametria de onda quadrada.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O projeto teve como objetivo o desenvolvimento de um imunossensor impresso em 3D de PLA/grafeno para a detecção de microcistina-LR.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fabricação, utilizando impressora 3D, dos eletrodos e da cela eletroquímica a partir dos filamentos comerciais de PLA/grafeno e ABS, respectivamente.
- Ativação eletroquímica dos eletrodos 3D em NaOH 1,0 mol L⁻¹.
- Imobilização covalente do anticorpo anti-microcistina-LR *via* ativação dos grupos carboxílicos do eletrodo com EDC/NHS.
- Caracterização eletroquímica do eletrodo por voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada.
- Otimização dos parâmetros da técnica voltamétrica com o intuito de obter a melhor resposta eletroanalítica para a microcistina-LR.
- Construção da curva de calibração para a microcistina-LR por voltametria de onda quadrada, utilizando o processo de redução do hexacianoferrato como pico base.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

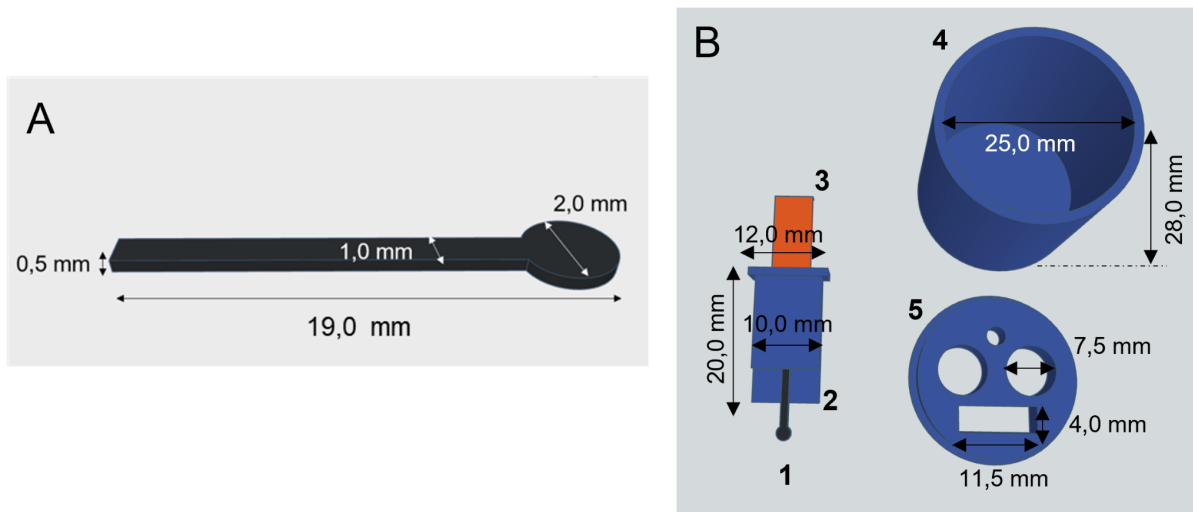
4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

O filamento condutor de PLA/grafeno foi adquirido da BlackMagic3D. O antígeno microcistina-LR da ENZO Life Science. O anticorpo anti-microcistina-LR foi adquirido da Abcam. EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), NHS (N-hidroxisuccinimida), hexacianoferrato(II) e albumina de soro bovino (*bovine serum albumin*, BSA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Para a solução do eletrólito suporte, tampão fosfato salino ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foi preparado pela mistura de monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato de potássio, cloreto de potássio, cloreto de sódio adquiridos da Sigma-Aldrich. Os pHs das soluções tampão foram ajustados com hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ou ácido clorídrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Todas as soluções foram preparadas em água Milli-Q (Millipore, resistividade $18,2 \text{ MW cm}^{-1}$). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e não passaram por etapas extras de purificação.

4.2 DESIGN E IMPRESSÃO DO ELETRODO 3D

O eletrodo 3D foi desenhado na forma de disco de 2,0 mm de diâmetro e 0,5 mm de espessura. Um cabo de 17,0 mm foi incluído no *design* para facilitar o contato elétrico (Figura 3-A). Posteriormente, o eletrodo de PLA/grafeno foi impresso com densidade de preenchimento de 100 %, altura da camada (resolução) de 50 μm , utilizando uma impressora SETHI S3X à temperatura de extrusão de 190 °C e da mesa de impressão à 55 °C. A cela eletroquímica foi desenhada como apresentada na Figura 3-B e impressa a partir de filamento de ABS à temperatura de extrusão de 235 °C. Um suporte de ABS para o eletrodo foi impresso para facilitar seu encaixe na cela eletroquímica e facilitar o contato elétrico com a garra crocodilo do potenciostato por meio de uma fita de cobre.

Figura 3. Forma e dimensões **(A)** do eletrodo 3D e **(B)** 1 eletrodo, 2 suporte para o eletrodo, 3 fita de cobre, 4 cela eletroquímica, 5 tampa da cela eletroquímica.



4.3 ATIVAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS ELETRODOS DE PLA/GRAFENO

O eletrodo 3D de PLA/grafeno foi ativado eletroquimicamente com base nos métodos previamente reportados por Richter *et al.* e Koterwa e colaboradores [40,41]. Foi realizada a oxidação do eletrodo 3D pela aplicação de diferentes potenciais entre +1,0 V a +2,0 V vs. Ag/AgCl, KCl (saturado) em diferentes tempos de oxidação (200-3600 s) e em solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹. O eletrodo 3D foi utilizado como eletrodo de trabalho, uma placa de platina como eletrodo auxiliar e o eletrodo de Ag/AgCl, KCl (saturado) como referência, como mostrado na Figura 4.

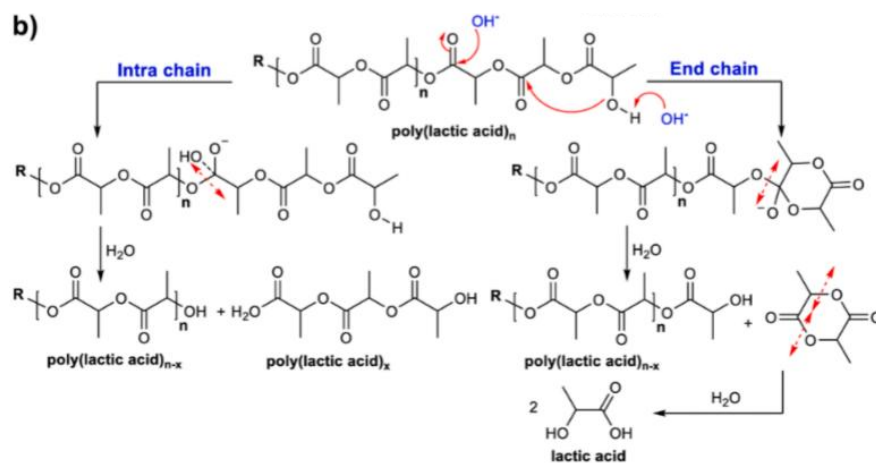
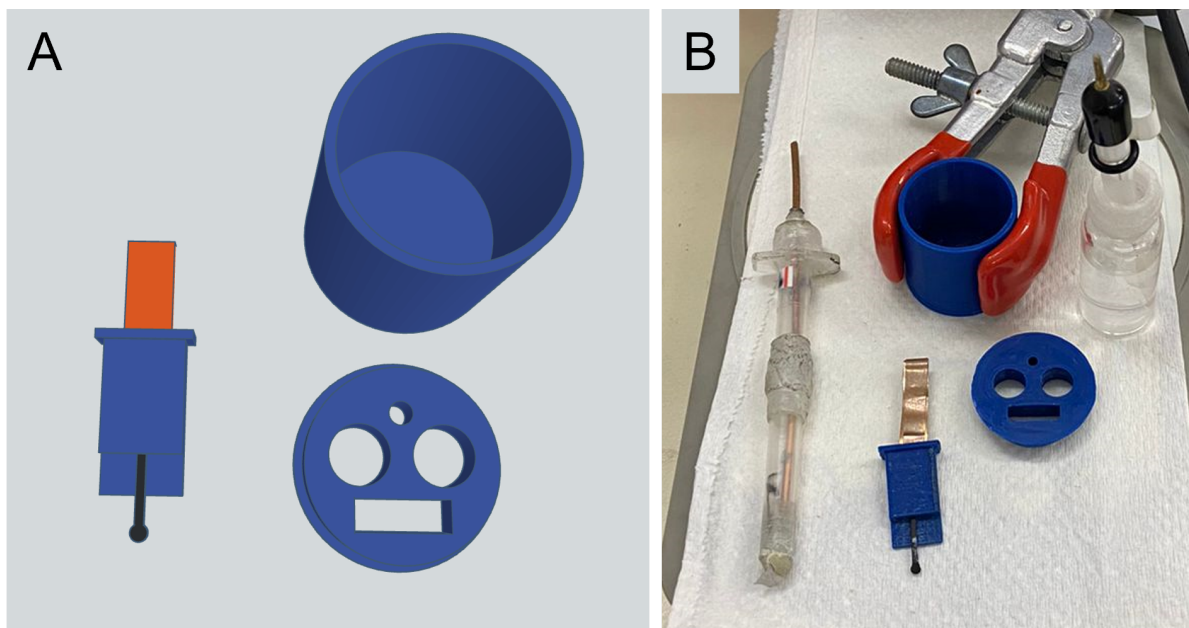


Fig. 4. The mechanism PLA hydrolysis in an a) acidic, b) alkaline environment.

Figura 4. Mecanismo de hidrólise do PLA, com potencial, em solução de NaOH. [52]

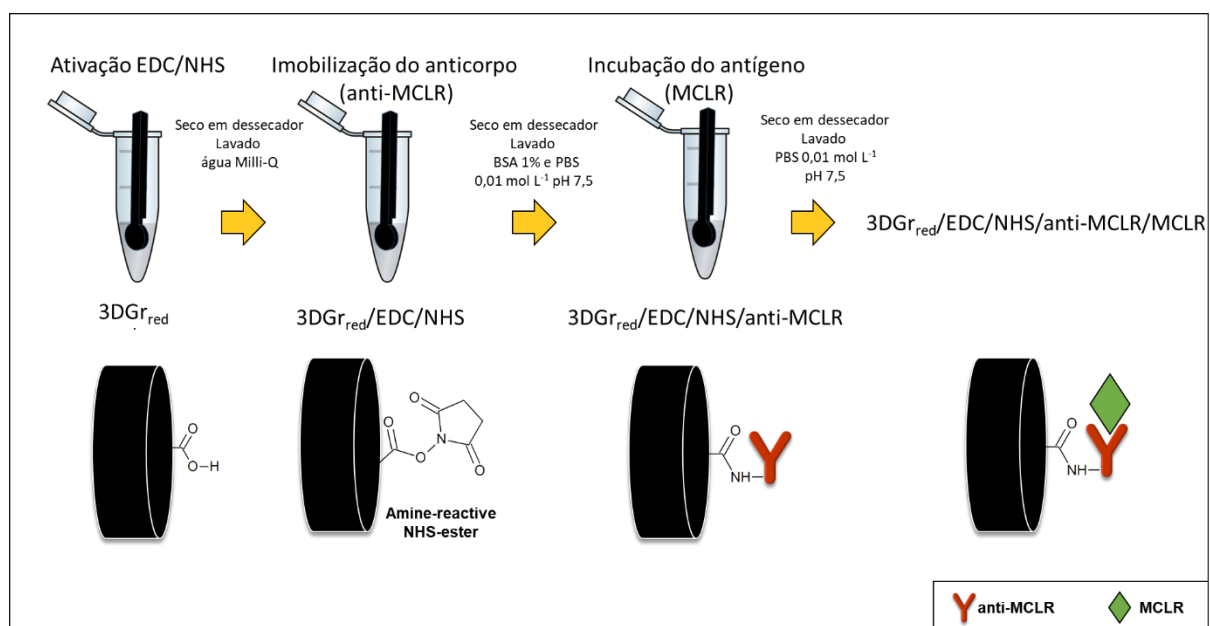
Figura 5. (A) Desenho do eletrodo e (B) imagem digital dos eletrodos, da cela eletroquímica e do suporte para o eletrodo de trabalho.



4.4 PREPARAÇÃO DO IMUNOSSENSOR

O imunossensor foi construído como apresentado na Figura 6. Após a etapa eletroquímica descrita no item 3.3, a ativação do eletrodo foi realizada em um microtubo *Eppendorf* contendo 20,0 μL de uma solução 1:1 (volume) de EDC ($5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e NHS ($2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) por 30 minutos. Posteriormente, o eletrodo foi seco em dessecador por 5 minutos e lavado com água Milli-Q para remoção dos reagentes EDC e NHS em excesso. Em seguida, o eletrodo 3D ativado foi imerso por 30 minutos em 20,0 μL de uma suspensão contendo o anticorpo anti-microcistina-LR (20,0 μL 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em tampão fosfato salino, PBS 0,01 mol L^{-1} , pH 7,5) e seco por 5 minutos em dessecador. Após a lavagem com BSA 1% em PBS 0,1 mol L^{-1} , pH 7,5, o eletrodo foi seco em dessecador e armazenado a 4°C. Para avaliar a resposta em relação ao antígeno, o imunossensor foi incubado com diferentes concentrações de microcistina-LR (5, 10, 15 e 20 ng mL^{-1}) em PBS 0,01 mol L^{-1} , pH 7,5. O tempo de incubação do antígeno foi de 30 minutos. Após a incubação o eletrodo foi seco em dessecador por 5 minutos e lavado com PBS 0,1 mol L^{-1} , pH 7,5 para a remoção de excesso do antígeno.

Figura 6. Etapas de montagem do imunossensor 3D baseado em PLA/grafeno: ativação eletroquímica do eletrodo de PLA/grafeno, ativação do eletrodo com EDC/NHS, imobilização covalente do anticorpo e incubação do antígeno.



4.5 PROPRIEDADES ELETROQUÍMICAS

As propriedades eletroquímicas do eletrodo antes e após a ativação eletroquímica foram estudadas por voltametria cíclica. As medidas eletroquímicas foram conduzidas em um potenciostato Autolab PGSTAT128N (Eco Chemie, Holanda), controlado pelo software NOVA 2.1. O eletrodo 3D foi utilizado como eletrodo de trabalho, uma placa de platina como eletrodo auxiliar e o eletrodo de Ag/AgCl, KCl (saturado) como referência.

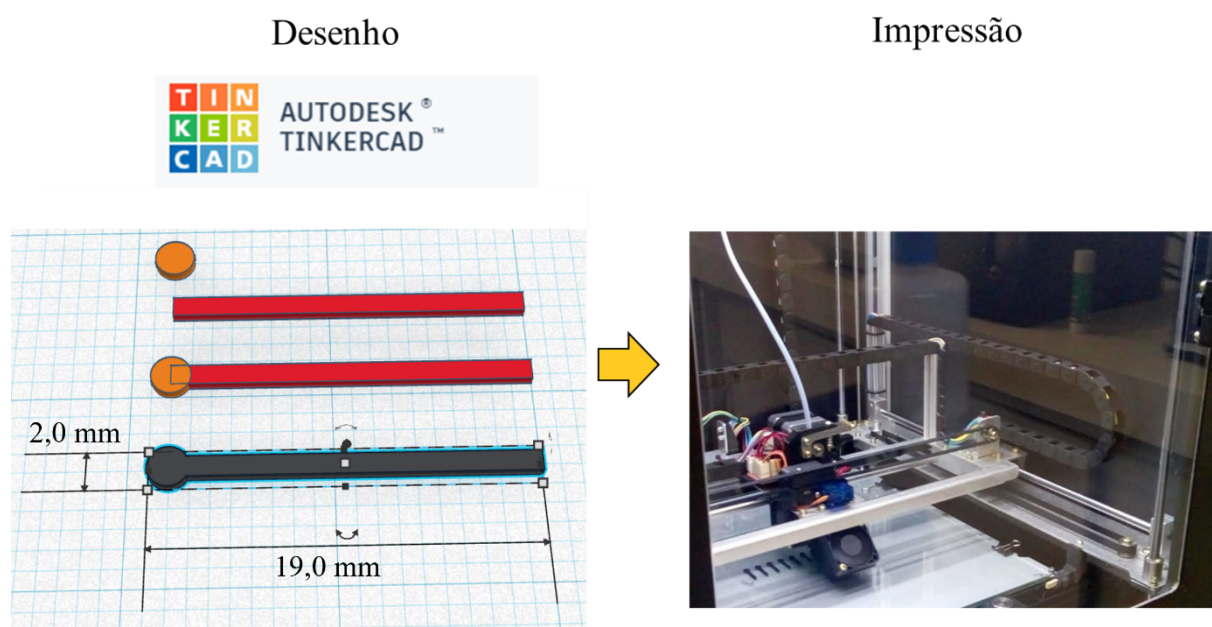
As medidas de voltametria cíclica foram realizadas em eletrólito suporte KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo K₄[Fe(CN)₆] 5,0 mmol L⁻¹ na velocidade de varredura de 25 mV s⁻¹.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENHO E IMPRESSÃO DOS ELETRODOS

Os eletrodos foram desenhados na plataforma online e gratuita Tinkercad® [42] a partir de formas pré-definidas, como pode ser visto na Figura 7. Uma imagem digital do eletrodo impresso também é apresentada. O tempo de impressão para a fabricação de 12 eletrodos foi de 3 minutos e 9 segundos e o custo estimado, considerando apenas o valor do filamento de PLA/grafeno, foi de R\$ 0,12.

Figura 7. Etapas do design do eletrodo 3D e eletrodos impressos.



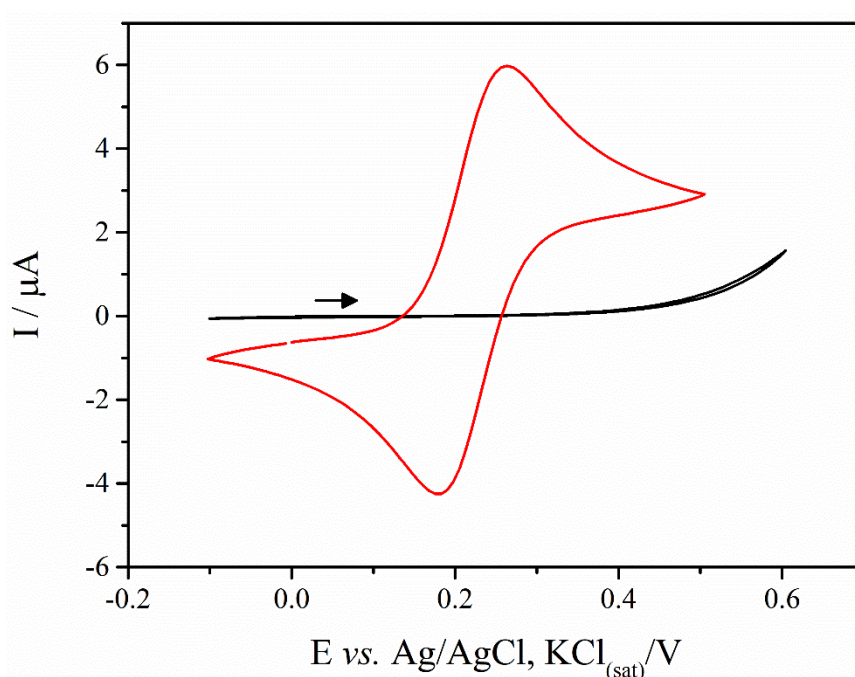
5.2 ATIVAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS ELETRODOS

Antes da fabricação do imunossensor, é preciso conhecer e otimizar as propriedades eletroquímicas do eletrodo impresso 3D. Assim, as medidas de voltametria cíclica na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ foram realizadas. A sonda redox de esfera interna $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ possui processos de oxirredução bem definidos e é sensível à superfície química dos eletrodos, ou seja, a relação entre a concentração do aditivo (material eletroativo) e o polímero, e a presença de grupos funcionais na

superfície dos eletrodos podem afetar diretamente a cinética de transferência de elétrons.

Uma comparação entre o comportamento eletroquímico da sonda redox sobre o eletrodo 3D e um eletrodo de carbono vítreo é apresentada na Figura 8. O processo de transferência eletrônica foi completamente bloqueado no eletrodo 3DGr, provavelmente devido à camada do polímero PLA na superfície do eletrodo.

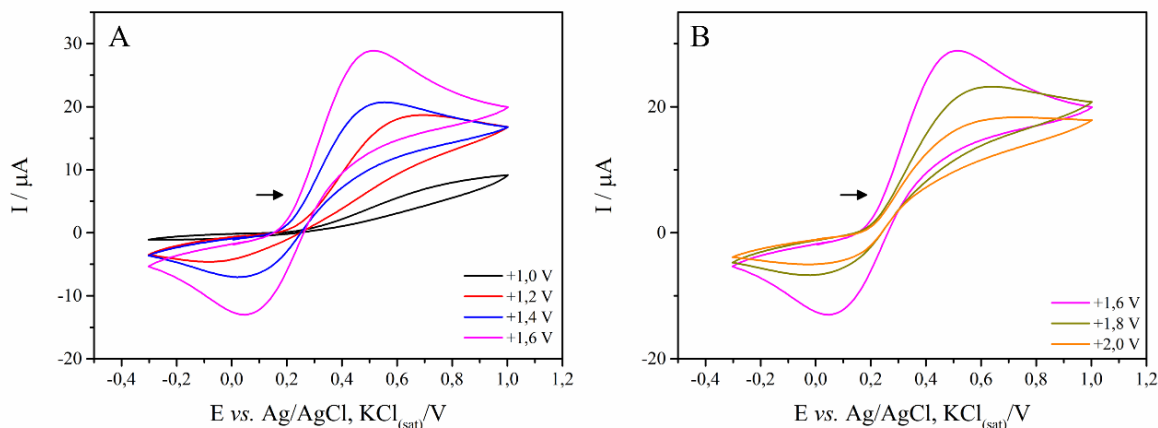
Figura 8. Voltamogramas cíclicos para os eletrodos 3D recém impresso (preto) e para o eletrodo de carbono vítreo (vermelho). Eletrólito suporte: KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo [Fe(CN)₆]⁴⁻ 1,0 mmol L⁻¹, velocidade de varredura 10 mV s⁻¹.



Trabalhos previamente reportados na literatura têm demonstrado a necessidade de ativação dos eletrodos antes de sua utilização para a exposição do material eletroativo na superfície. Uma das formas de ativação é o pré-tratamento eletroquímico em hidróxido de sódio que remove seletivamente o PLA via saponificação [32,40,41], aumentando a porosidade do eletrodo 3D, permitindo que o [Fe(CN)₆]⁴⁻ alcance o material eletroativo e possa ser oxidado.

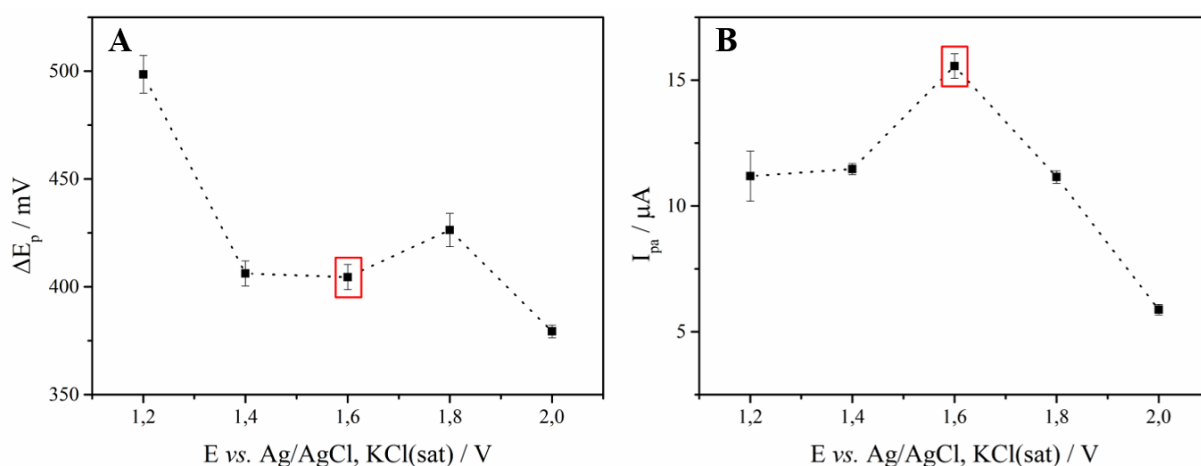
Desta maneira, foi realizada a oxidação do eletrodo em NaOH 1,0 mol L⁻¹ pela aplicação de diferentes potenciais entre +1,0 V a +2,0 V vs. Ag/AgCl (KCl saturado) por 200 s e a resposta do eletrodo ativado é apresentada na Figura 9.

Figura 9. Voltamogramas cíclicos para os eletrodos 3D ativados em NaOH 1,0 mol L⁻¹ durante 200 s sob a aplicação de diferentes potenciais +1,2, +1,4, +1,6, +1,8 e +2,0 V vs. Ag/AgCl, KCl(sat). Eletrólito suporte: KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo [Fe(CN)₆]⁴⁻ 5,0 mmol L⁻¹, velocidade de varredura 25 mV s⁻¹.



Embora a aplicação dos potenciais de +1,6 V não tenha resultado na menor separação de picos (Figura 9-A), a corrente de pico anódica foi maior (Figura 9-B), o que pode refletir na maior sensibilidade do eletrodo ativado nesse potencial.

Figura 10. Efeito da aplicação dos potenciais +1,2, +1,4, +1,6, +1,8 e +2,0 V vs. Ag/AgCl, KCl(sat) sobre (A) a separação de picos e (B) a corrente anódica extraídas dos voltamogramas cíclicos obtidos em KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo [Fe(CN)₆]⁴⁻ 5,0 mmol L⁻¹, velocidade de varredura 25 mV s⁻¹. A ativação eletroquímica do eletrodo 3D foi realizada em NaOH 1,0 mol L⁻¹ e o tempo de aplicação dos potenciais foi fixado em 200 s (n = 5).



Uma vez otimizado o potencial de ativação do eletrodo (+1,6 V vs. Ag/AgCl, KCl(sat)), variou-se o tempo de ativação entre 200 e 3600 segundos. O melhor

desempenho foi obtido para o eletrodo ativado por 1800 s, como pode ser visto nas Figuras 11 e 12.

Figura 11. Voltamogramas cíclicos para os eletrodos 3D ativados em NaOH 1,0 mol L⁻¹ sob a aplicação de +1,6 vs. Ag/AgCl, KCl(sat) durante 200, 300, 600, 900, 1800 e 3600 s. Eletrólito suporte: KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo [Fe(CN)₆]⁴⁻ 5,0 mmol L⁻¹, velocidade de varredura 25 mV s⁻¹.

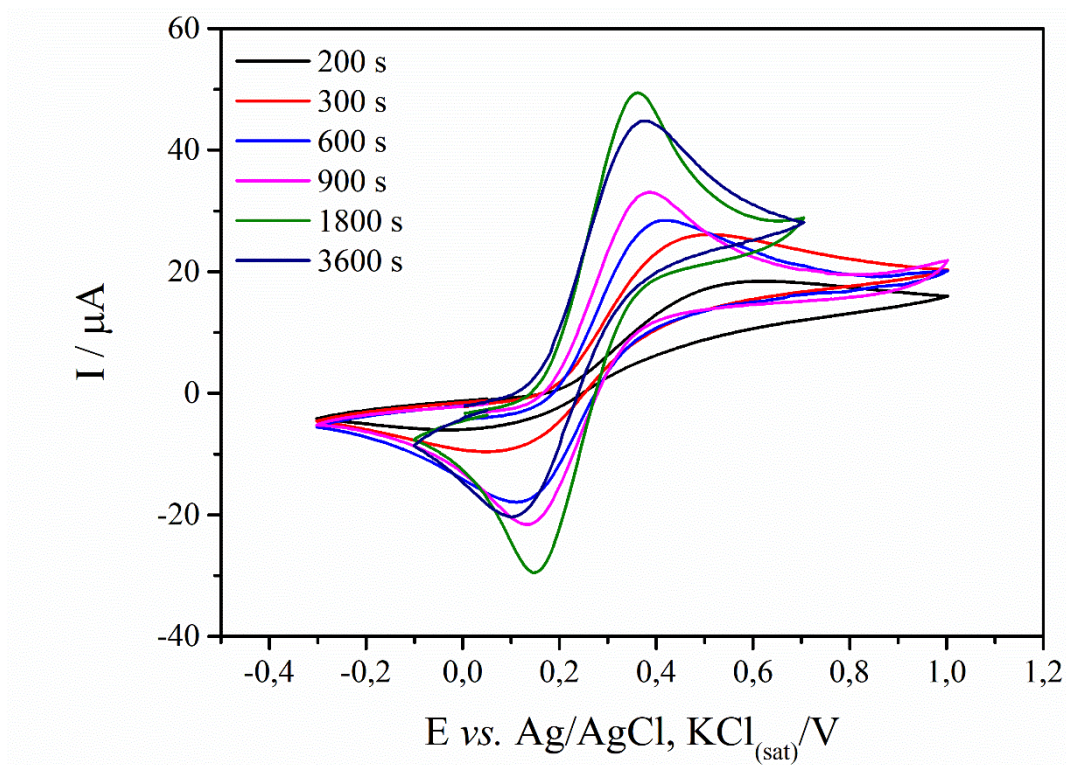
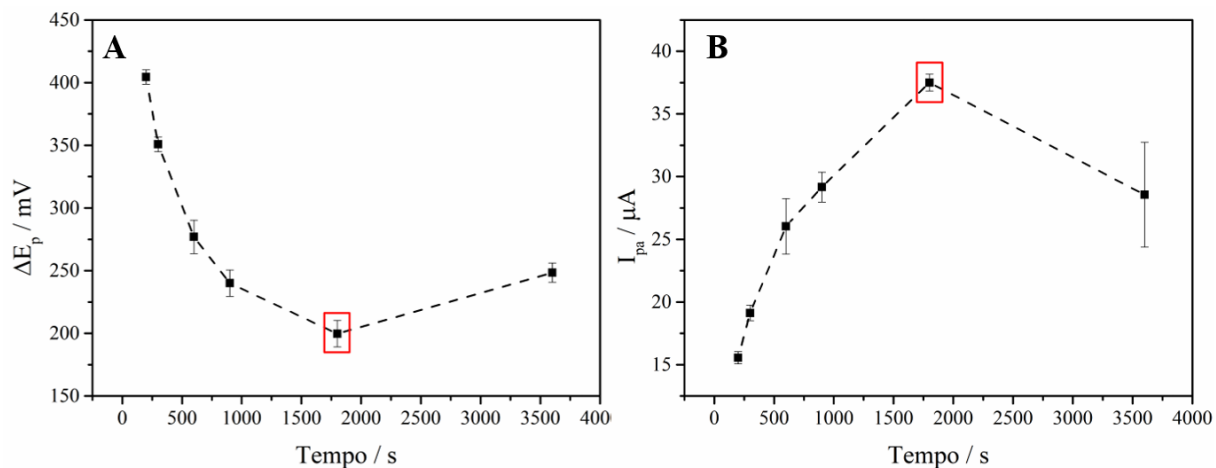
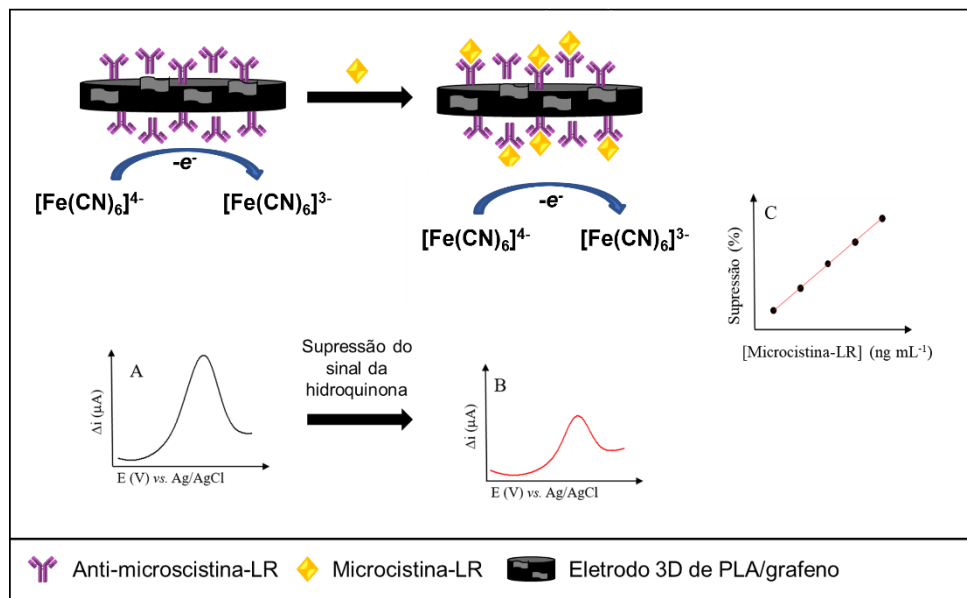


Figura 12. Efeito do tempo de ativação sobre **(A)** a separação de picos e **(B)** a corrente anódica extraídas dos voltamogramas cíclicos obtidos em KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo [Fe(CN)₆]⁴⁻ 5,0 mmol L⁻¹, velocidade de varredura 25 mV s⁻¹. A ativação eletroquímica do eletrodo 3D foi realizada em NaOH 1,0 mol L⁻¹ e o potencial foi fixado em +1,6 V (n = 5).



Com as condições de ativação do eletrodo otimizadas, aplicação de +1,6 V vs. Ag/AgCl (KCl saturado) por 1800 s em NaOH 1,0 mol L⁻¹, um imunossensor voltamétrico foi construído e seu princípio de funcionamento é representado na Figura 13. O pico relacionado ao processo de oxidação do [Fe(CN)₆]⁴⁻, presente em solução, será medido antes do imunoensaio e considerado como pico base. Após a incubação do antígeno, espera-se a supressão da corrente de pico, que será proporcional à concentração do antígeno.

Figura 13. Esquema de funcionamento do imunossensor 3D e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ como sonda redox.



5.3 CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR VOLTAMÉTRICO 3D DE PLA/GRAFENO PARA MICROCISTINA-LR

5.3.1 Escolha da técnica voltamétrica

Um grupo de métodos analíticos qualitativos e quantitativos baseados nas propriedades elétricas de uma solução contendo um analito, é abrangido na área da Eletroanalítica. Dentre as técnicas eletroanalíticas, a voltametria se destaca, a qual as informações a respeito do analito são obtidas através da medida de corrente em função de um potencial aplicado sob condições de polarização do eletrodo. O processo fundamental é a transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo e as moléculas em solução adjacente à superfície eletródica, gerando uma corrente que é proporcional à concentração de moléculas e íons [43].

Tradicionalmente, em pesquisas, uma célula eletroquímica contém três eletrodos diferentes (de referência, de trabalho e contra-eletrodo), que são colocados na mesma solução eletrolítica. Durante os experimentos, o fluxo de carga, metrificado através da corrente, ocorre principalmente entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo, enquanto o potencial do eletrodo de trabalho é medido em relação ao eletrodo de referência. A voltametria é empregada por químicos

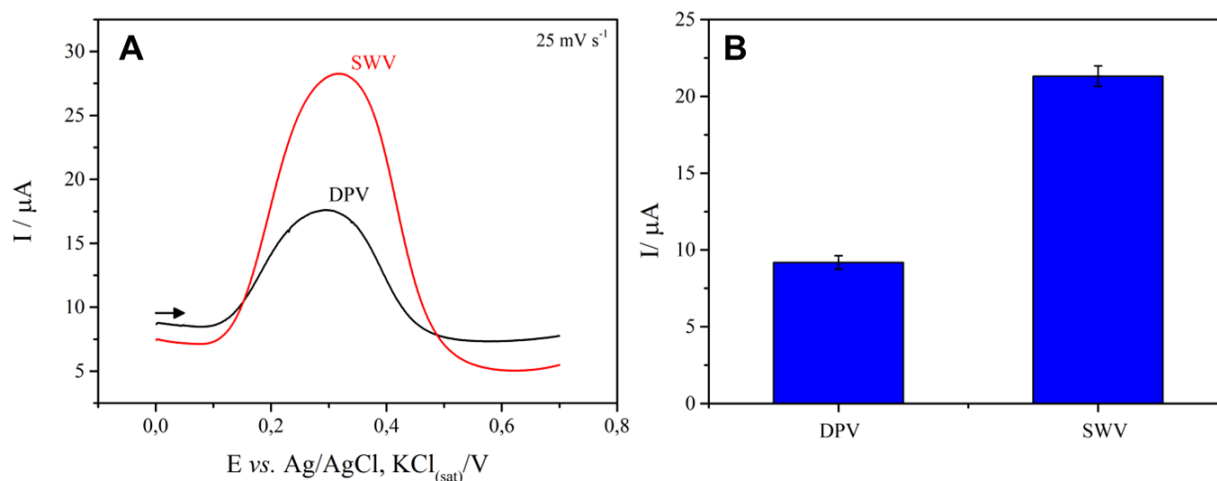
analíticos, inorgânicos, físico-químicos e bioquímicos para estudos fundamentais de processos de oxidação e redução em vários meios, como processos de adsorção às superfícies e mecanismos de transferência de elétrons nas superfícies de eletrodos. Encontra-se em alta utilização, atualmente, para fins analíticos [44].

Os métodos voltamétricos mais conhecidos são o linear, cíclico, pulso diferencial e onda quadrada. Na voltametria linear (LSV, do inglês, linear sweep voltammetry) o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho varia linearmente com o tempo, no entanto, não é uma técnica muito sensível, validando que a corrente total medida possui contribuição de "ruído", corrente capacitiva, o que prejudica a aplicação desta técnica para aplicações quantitativas.

A voltametria cíclica (CV, do inglês, cyclic voltammetry) é frequentemente o primeiro experimento realizado em um estudo. Apresenta uma grande aderência, justamente por conta da capacidade de observar rapidamente o comportamento redox em uma ampla faixa de potenciais. Já as técnicas pulsadas, como a voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês, differential pulse voltammetry) e de onda quadrada (SWV, do inglês, square wave voltammetry) aumentam a sensibilidade e diminuem os limites de detecção de espécies eletroativas.

Desta forma, as técnicas de DPV e SWV foram selecionadas para a otimização da melhor resposta de corrente do eletrodo 3D em relação ao $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. A Figura 14 mostra os voltamogramas obtidos na velocidade de varredura de 25 mV s^{-1} para o eletrodo 3D, utilizando DPV com os parâmetros: intervalo de tempo 50 ms, incremento 5 mV e amplitude 25 mV e SWV com os parâmetros: frequência 50 Hz, amplitude 50 mV e incremento de potencial 5 mV. Como pode ser observado, a sensibilidade obtida para a SWV foi maior, sendo que a corrente obtida foi cerca de 2,5 vezes maior que a apresentada na DPV. Assim, a SWV foi escolhida como a técnica eletroanalítica a ser utilizada no desenvolvimento deste trabalho.

Figura 14. Voltamogramas obtidos para o eletrodo 3D utilizando DPV (parâmetros: intervalo de tempo 50,0 ms, incremento 1,2 mV e amplitude 25,0 mV) e SWV (parâmetros: frequência 23,0 Hz, incremento 1,0 mV e amplitude 20,0 mV) em solução de PBS (0,1 mol L⁻¹, pH 7,5) contendo [Fe(CN)₆]⁴⁻ 5,0 mmol L⁻¹.



A voltametria de onda quadrada, uma técnica diferencial de grande amplitude na qual uma forma de onda é composta por ondas quadradas simétricas, apresenta grandes vantagens da SWV em relação às outras técnicas voltamétricas, por conter em sua teoria os modelos matemáticos utilizados nos critérios de diagnóstico de tipos de processos redox, que são desenvolvidos considerando também as reações redox totalmente irreversíveis [45].

5.3.2 Otimização dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada

Como discutido anteriormente, a técnica de voltametria de onda quadrada (SWV) foi selecionada para avaliar o desempenho do imunossensor. Assim, foi realizada, em triplicata, a otimização dos parâmetros experimentais frequência (f), amplitude de pulso (a) e incremento de potencial (ΔE_s). A frequência foi variada de 10,0 a até 100,0 Hz (Figura 15-A), fixando-se a e ΔE_s em 50,0 mV e 5,0 mV, respectivamente. Como pode ser visto na Figura 15-B, a maior corrente foi obtida em 20,0 Hz. Fixando-se f e ΔE_s em 20,0 Hz e 5,0 mV, respectivamente, variou-se a na faixa de 10,0 até 100,0 mV (Figura 16-A). Embora as maiores correntes sejam obtidas com o aumento da amplitude de pulso (Figura 16-B), o voltamograma apresenta perfil menos alargado em 30,0 mV (Figura 16-C). Para a otimização do ΔE_s , foram utilizados os valores otimizados de f e a iguais a 20,0 Hz e 30,0 mV, respectivamente. Variando-se o incremento de potencial de 1,0 a 10,0 mV (Figura

17-A), observa-se que a corrente não é alterada (Figura 17-B), mas o voltamograma torna-se mais alargado com o aumento deste parâmetro (Figura 17-C). Assim, para a maior resposta de corrente e melhor perfil voltamétrico, os valores otimizados f , a e ΔE_s foram 20,0 Hz, 30,0 mV e 1,0 mV, respectivamente.

Figura 15. (A) Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo 3D de PLA/grafeno ativado em solução tampão fosfato salino 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,5) contendo [Fe(CN)₆]⁴⁻ 5,0 mmol L⁻¹, variando a f na faixa de 10,0 até 100,0 Hz. **(B)** Gráfico I vs. f . Parâmetros $a = 50,0$ mV e $\Delta E_s = 5,0$ mV.

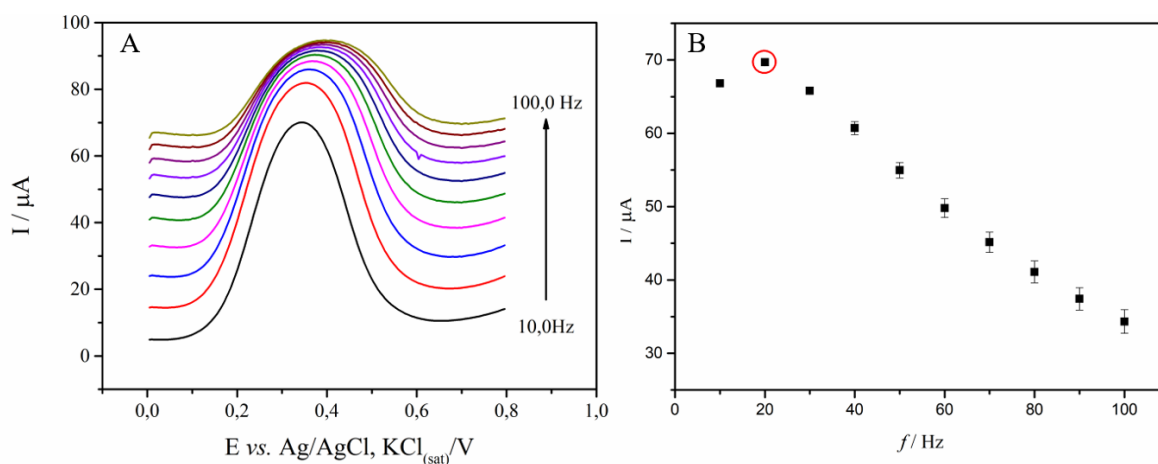


Figura 16. (A) Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo 3D de PLA/grafeno ativado em solução tampão fosfato salino $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, variando a a na faixa de 10,0 até 100,0 mV. **(B)** Gráfico I vs. a . **(C)** Gráfico largura de pico a meia altura vs. a . Parâmetros $f = 20,0 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 5,0 \text{ mV}$.

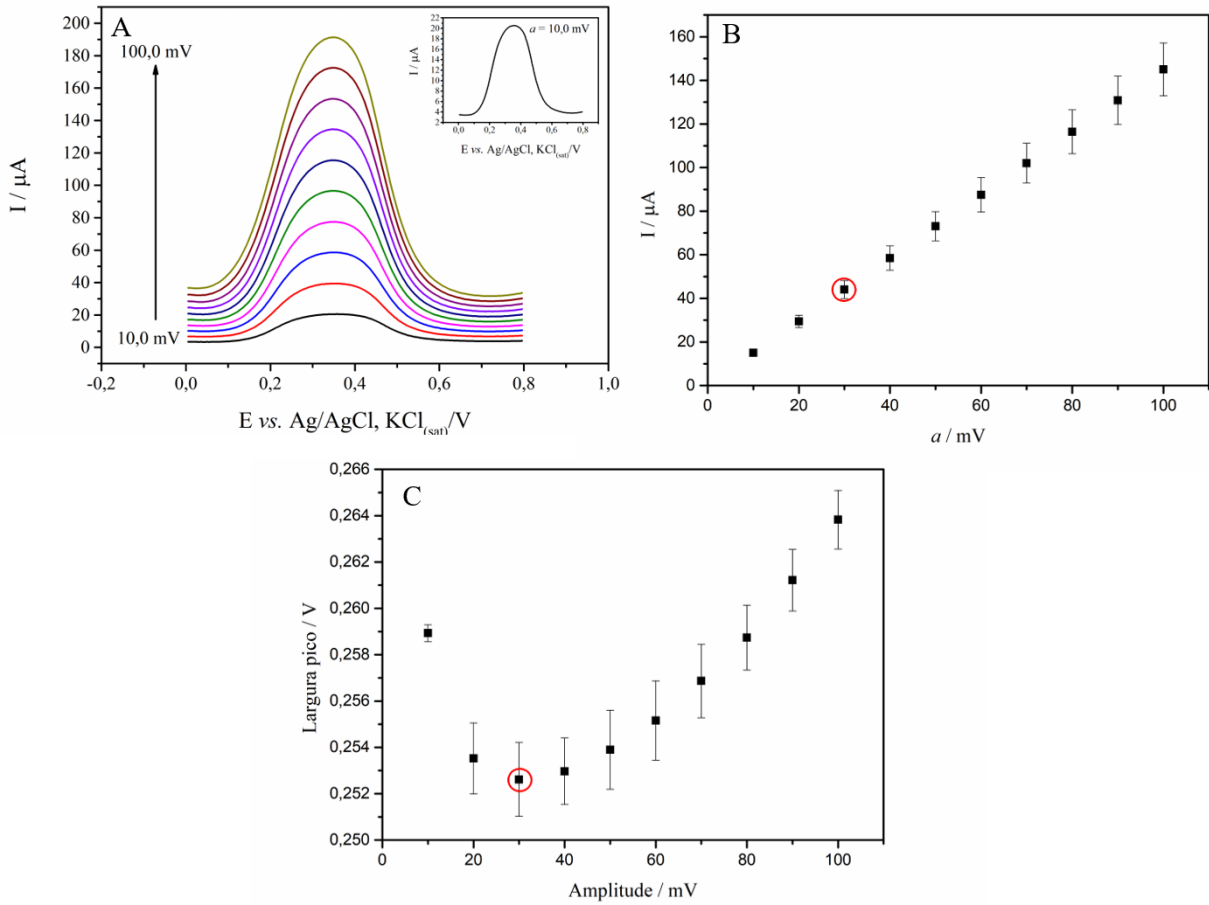
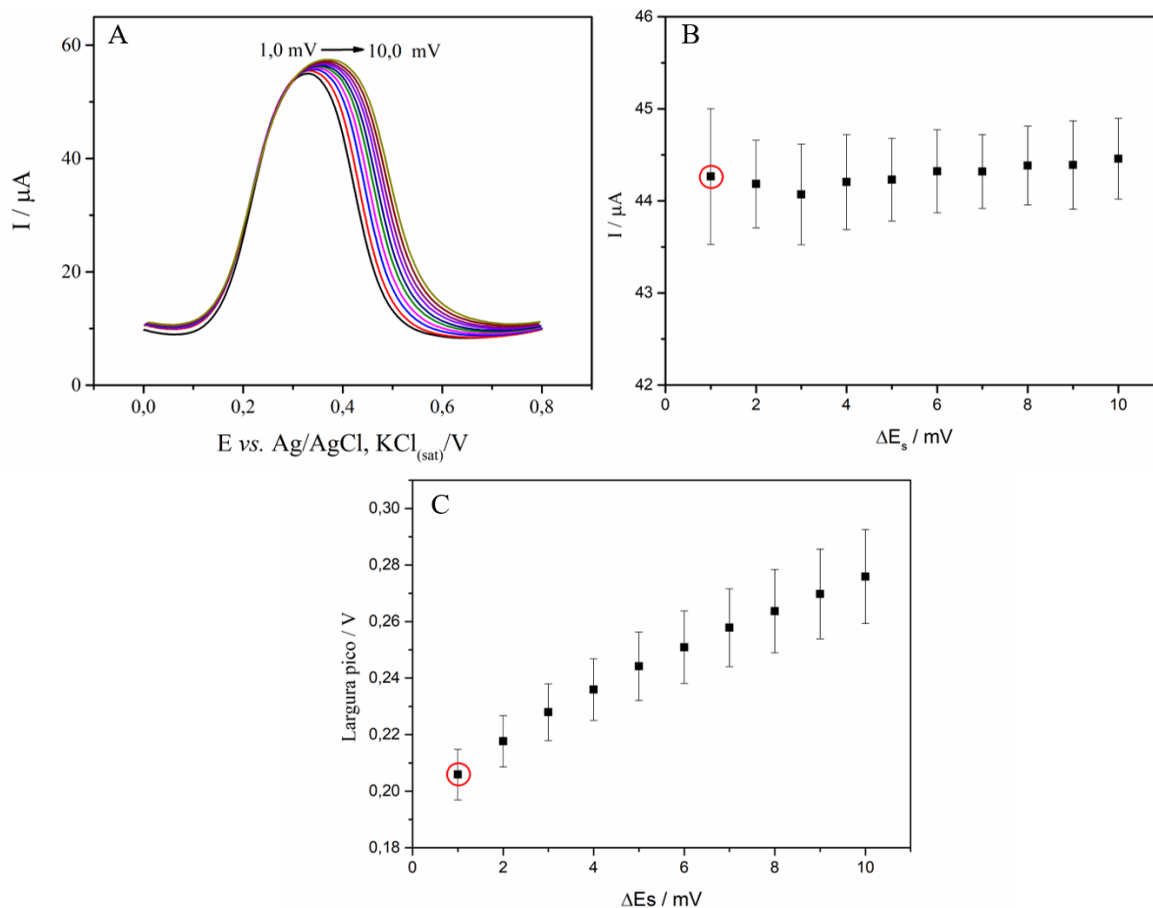


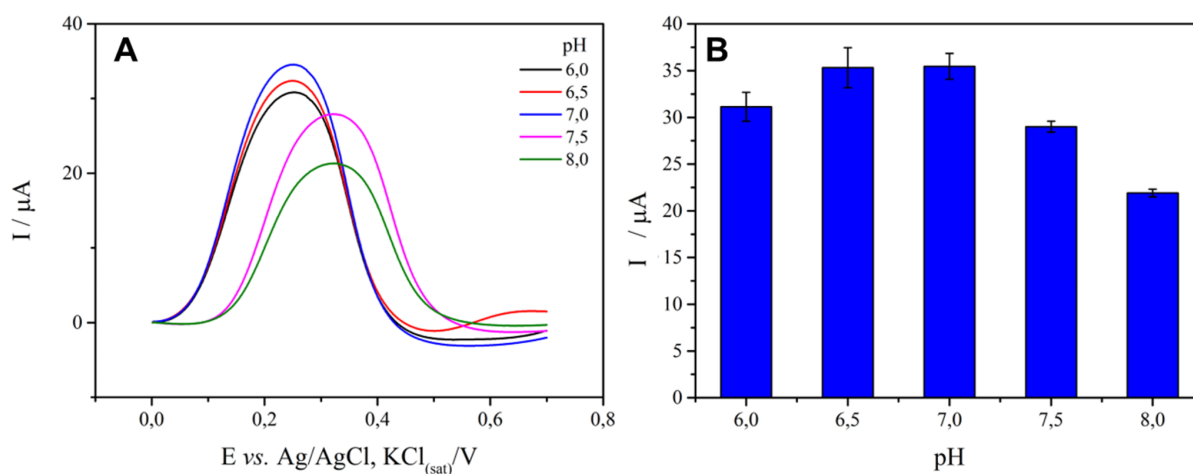
Figura 17. (A) Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo 3D de PLA/grafeno ativado em solução tampão fosfato salino $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, variando o ΔE_s na faixa de 1,0 até 10,0 mV. **(B)** Gráfico I vs. ΔE_s . **(C)** Gráfico largura de pico a meia altura vs. ΔE_s . Parâmetros $f = 20,0 \text{ Hz}$ e $a = 30,0 \text{ mV}$.



5.3.3 Estudo do pH do eletrólito suporte

Após otimizar a construção da plataforma do imunossensor, o efeito do pH (6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0) da solução de tampão fosfato salino ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), usada como eletrólito de suporte foi investigado. Esta faixa de pH foi escolhida, porque o anticorpo tem uma estrutura de proteína, então, em soluções de pH maiores que 10 ou menores que 6 pode ocorrer a sua desnaturação.

Figura 18. (A) Voltamogramas de onda quadrada para o eletrodo 3D de PLA/grafeno ativado em solução tampão fosfato salino 0,1 mol L⁻¹ nos pHs 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0 contendo [Fe(CN)₆]⁴⁻ 5,0 mmol L⁻¹. **(B)** Gráfico de corrente vs. pH (n=3).



Como pode ser observado na Figura 18, a corrente de pico diminui em pH maior que 7,0. Tem sido reportada a dependência do pH na cinética de transferência de elétron do par redox [Fe(CN)₆]^{4-/3-} em eletrodos de carbono, o processo torna-se mais lento à medida que o pH aumenta. Tal efeito tem sido atribuído a repulsão eletrostática entre a sonda redox, carregada negativamente, e a superfície do eletrodo, que possui funcionalidades de ácido carboxílico, que se tornam desprotonadas (carregadas negativamente) em soluções mais alcalinas [50]. Não houve diferença nas correntes obtidas nos pHs 6,5 e 7,0. Entretanto, como a perspectiva do trabalho é a aplicação do imunossensor na determinação de microcistina na Lagoa da Conceição na cidade de Florianópolis-SC, o pH 7,0 foi escolhido para conduzir os experimentos seguintes, por ser mais próximo ao pH da água da lagoa. De acordo com dados fornecidos pelo relatório da Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN), os valores de pH da lagoa oscilaram pouco entre fevereiro e setembro de 2021, estando próximo à neutralidade e levemente alcalino (entre 7,13 e 8,50) [51].

5.3.4 Curva de calibração

Com as condições experimentais otimizadas, a curva de calibração foi construída a partir da incubação do imunossensor com diferentes concentrações de microcistina-LR 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 e 20,0 ng mL⁻¹. Foram observados, nos

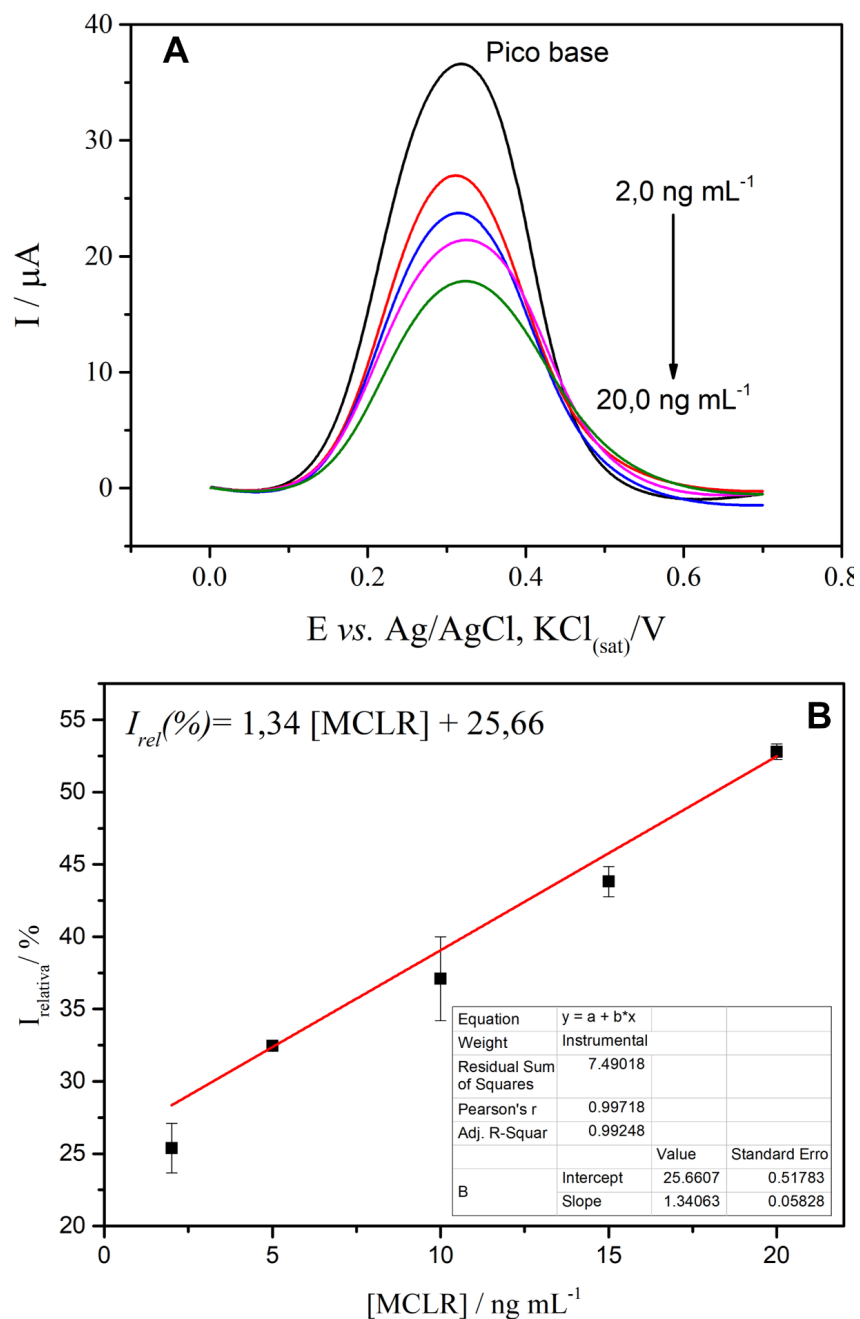
voltamogramas (Figura 16-A) picos definidos em +0,32 V vs. Ag/AgCl, KCl_{sat} correspondentes a oxidação do [Fe(CN)₆]⁴⁻, cujas intensidades de corrente diminuíram proporcionalmente com o aumento da concentração do antígeno. A partir dos valores de porcentagem de corrente suprimida, para cada concentração, foi construída a curva de calibração (Figura 19-B). O pico base foi medido na ausência de microcistina-LR e a porcentagem de corrente suprimida foi calculada de acordo com a Equação abaixo:

$$I_{rel} (\%) = \frac{(I_{pico\ base} - I_{suprimida}) \times 100}{I_{pico\ base}}$$

Onde: $I_{rel} (\%)$, $I_{pico\ base}$ e $I_{suprimida}$ são a porcentagem de corrente suprimida, a corrente resultante referente ao pico base e a corrente resultante referente a supressão na presença da microcistina-LR.

Os valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram calculados pelas expressões: $LOD=3,3\ SD/a$ e $LOQ = 10\ SD/a$, onde “SD” corresponde ao desvio padrão do coeficiente linear e “a” se refere ao coeficiente angular da reta. Os valores de LOD e LOQ obtidos para a microcistina-LR foram 1,28 e 3,88 ng mL⁻¹, respectivamente.

Figura 19. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) contendo [Fe(CN)₆]⁴⁻ 5,0 mmol L⁻¹ para o imunossensor incubado com soluções padrão nas seguintes concentrações 0,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 ng mL⁻¹ de MCLR. **(B)** Curva de calibração para MCLR (n=3).



6 PERSPECTIVAS

Os eletrodos impressos em 3D podem ser fabricados rapidamente (12 eletrodos fabricados em cerca de 3 minutos), apresentando um custo de R\$ 0,12 (considerando apenas o custo do filamento de PLA/grafeno). A ativação eletroquímica melhorou a cinética de transferência de elétrons do eletrodo (diminuição da separação de picos), sendo uma etapa fundamental para a fabricação de imunossensores eletroquímicos. As melhores condições para a ativação do eletrodo foram a aplicação de +1,6 V vs. Ag/AgCl, KCl (saturado) por 1800 s.

Após ativado, um imunossensor 3D voltamétrico para a detecção de microcistina-LR foi construído através da imobilização covalente do anticorpo anti-microcistina-LR via EDC/NHS. Para a maior resposta de corrente e melhor perfil voltamétrico, os valores otimizados dos parâmetros da técnica eletroanalítica de voltametria de onda quadrada foram f , a e ΔE_s foram 20,0 Hz, 30,0 mV e 1,0 mV, respectivamente. Com a realização da otimização dos parâmetros da técnica eletroanalítica de voltametria de onda quadrada, uma curva de calibração foi construída. Os limites de detecção e de quantificação foram de 1,28 e 3,88 ng mL⁻¹, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- [1] E.P. Preece, F.J. Hardy, B.C. Moore, M. Bryan, A review of microcystin detections in Estuarine and Marine waters: Environmental implications and human health risk, *Harmful Algae*. 61 (2017) 31–45. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.006>.
- [2] L. Shang, M. Feng, X. Xu, F. Liu, F. Ke, W. Li, Co-Occurrence of Microcystins and Taste-and-Odor Compounds in Drinking Water Source and Their Removal in a Full-Scale Drinking Water Treatment Plant, *Toxins*. 10 (2018) 26. <https://doi.org/10.3390/toxins10010026>.
- [3] A. de C. Leal, M. do C.P. Soares, Hepatotoxicidade da cianotoxina microcistina, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 37 (2004) 84–89. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822004000700013>.
- [4] E.M. Jochimsen, W.W. Carmichael, J. An, D.M. Cardo, S.T. Cookson, C.E.M. Holmes, M.B. Antunes, D.A. de Melo Filho, T.M. Lyra, V.S.T. Barreto, S.M.F.O. Azevedo, W.R. Jarvis, Liver Failure and Death after Exposure to Microcystins at a Hemodialysis Center in Brazil, *N Engl J Med*. 338 (1998) 873–878. <https://doi.org/10.1056/NEJM199803263381304>.
- [5] A. da S. Ferrão-Filho, B. Kozlowsky-Suzuki, Cyanotoxins: Bioaccumulation and Effects on Aquatic Animals, *Marine Drugs*. 9 (2011) 2729–2772. <https://doi.org/10.3390/md9122729>.
- [6] R.M. Soares, V.F. Magalhães, S.M.F.O. Azevedo, Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions, *Aquatic Toxicology*. 70 (2004) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.06.013>.
- [7] WHO (World Health Organization) Guidelines for Drinking-water Quality, Addendum, vol. 2 (2nd ed.), World Health Organization, Geneva, Switzerland (1998), (n.d.) 95–110.
- [8] R. Almeida de Oliveira, N. Zanato, I. Cruz Vieira, Label-free Immunosensor for the Determination of Microcystin-LR in Water, *Electroanalysis*. 32 (2020) 2166–2173. <https://doi.org/10.1002/elan.202060041>.
- [9] L. Yao, L. He, Y. Yang, Y. Zhang, Z. Liu, L. Liang, Y. Piao, Nanobiochar paper based electrochemical immunosensor for fast and ultrasensitive detection of microcystin-LR, *Science of The Total Environment*. 750 (2021) 141692. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141692>.
- [10] M. Boffadossi, A. Di Tocco, G. Lassabe, M. Pirez-Schirmer, S.N. Robledo, H. Fernández, M.A. Zon, G. González-Sapienza, F.J. Arévalo, Development of an impedimetric immunosensor to determine microcystin-LR. New approaches in the use of the electrochemical impedance spectroscopy was used in determining to determine kinetic parameters of immunoreactions, *Electrochimica Acta*. 353 (2020) 136621. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136621>.
- [11] Z. He, Y. Cai, Z. Yang, P. Li, H. Lei, W. Liu, Y. Liu, A dual-signal readout enzyme-free immunosensor based on hybridization chain reaction-assisted formation of copper nanoparticles for the detection of microcystin-LR, *Biosensors and Bioelectronics*. 126 (2019) 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.033>.

- [12] P. Pang, X. Teng, M. Chen, Y. Zhang, H. Wang, C. Yang, W. Yang, C.J. Barrow, Ultrasensitive enzyme-free electrochemical immunosensor for microcystin-LR using molybdenum disulfide/gold nanoclusters nanocomposites as platform and Au@Pt core-shell nanoparticles as signal enhancer, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 266 (2018) 400–407. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.154>.
- [13] N. Zanato, L. Talamini, T.R. Silva, I.C. Vieira, Microcystin-LR label-free immunosensor based on exfoliated graphite nanoplatelets and silver nanoparticles, *Talanta*. 175 (2017) 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.021>.
- [14] L. Talamini, N. Zanato, E. Zapp, D. Brondani, I.C. Vieira, Direct Electrochemical Nano-immunosensor for Microcystin-LR in Seawater, *Electroanalysis*. 30 (2018) 819–827. <https://doi.org/10.1002/elan.201700815>.
- [15] A. Ambrosi, M. Pumera, 3D-printing technologies for electrochemical applications, *Chem. Soc. Rev.* 45 (2016) 2740–2755. <https://doi.org/10.1039/C5CS00714C>.
- [16] T.D. Ngo, A. Kashani, G. Imbalzano, K.T.Q. Nguyen, D. Hui, Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges, *Composites Part B: Engineering*. 143 (2018) 172–196. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2018.02.012>.
- [17] UFSC e IFSC Araranguá produzem máscaras para equipes de saúde do município, (n.d.). <https://noticias.ufsc.br/2020/03/ufsc-e-ifsc-ararangua-produzem-mascaras-para-equipes-de-saude-do-municipio/>.
- [18] UNIFAP integra projeto de produção de ventiladores pulmonares em 3D, (n.d.). <http://www.unifap.br/covid-19-unifap-integra-projeto-de-producao-de-ventiladores-pulmonares-3d/>.
- [19] A. Ambrosi, M. Pumera, 3D-printing technologies for electrochemical applications, *Chem. Soc. Rev.* 45 (2016) 2740–2755. <https://doi.org/10.1039/C5CS00714C>.
- [20] R.M. Cardoso, D.M.H. Mendonça, W.P. Silva, M.N.T. Silva, E. Nossol, R.A.B. da Silva, E.M. Richter, R.A.A. Muñoz, 3D printing for electroanalysis: From multiuse electrochemical cells to sensors, *Analytica Chimica Acta*. (2018). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.06.021>.
- [21] M.F. dos Santos, V. Katic, P.L. dos Santos, B.M. Pires, A.L.B. Formiga, J.A. Bonacin, 3D-Printed Low-Cost Spectroelectrochemical Cell for In Situ Raman Measurements, *Anal. Chem.* (2019) acs.analchem.9b01518. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01518>.
- [22] M.P. Down, E. Martínez-Periñán, C.W. Foster, E. Lorenzo, G.C. Smith, C.E. Banks, Next-Generation Additive Manufacturing of Complete Standalone Sodium-Ion Energy Storage Architectures, *Advanced Energy Materials*. (2019) 1803019. <https://doi.org/10.1002/aenm.201803019>.
- [23] J.P. Hughes, P.L. dos Santos, M.P. Down, C.W. Foster, J.A. Bonacin, E.M. Keefe, S.J. Rowley-Neale, C.E. Banks, Single step additive manufacturing (3D printing) of electrocatalytic anodes and cathodes for efficient water splitting, *Sustainable Energy Fuels*. 4 (2020) 302–311. <https://doi.org/10.1039/C9SE00679F>.
- [24] R.M. Cardoso, D.M.H. Mendonça, W.P. Silva, M.N.T. Silva, E. Nossol, R.A.B. da Silva, E.M. Richter, R.A.A. Muñoz, 3D printing for electroanalysis: From multiuse electrochemical cells to sensors, *Analytica Chimica Acta*. 1033 (2018) 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.06.021>.

- [25] J. Muñoz, M. Pumera, 3D-Printed COVID-19 immunosensors with electronic readout, *Chemical Engineering Journal*. 425 (2021) 131433. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.131433>.
- [26] J.S. Stefano, L.R. Guterres e Silva, R.G. Rocha, L.C. Brazaca, E.M. Richter, R.A. Abarza Muñoz, B.C. Janegitz, New conductive filament ready-to-use for 3D-printing electrochemical (bio)sensors: Towards the detection of SARS-CoV-2, *Analytica Chimica Acta*. 1191 (2022) 339372. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339372>.
- [27] D.P. Rocha, A.L. Squissato, S.M. da Silva, E.M. Richter, R.A.A. Munoz, Improved electrochemical detection of metals in biological samples using 3D-printed electrode: Chemical/electrochemical treatment exposes carbon-black conductive sites, *Electrochimica Acta*. 335 (2020) 135688. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.135688>.
- [28] X. Wei, D. Li, W. Jiang, Z. Gu, X. Wang, Z. Zhang, Z. Sun, 3D Printable Graphene Composite, *Sci Rep*. 5 (2015) 11181. <https://doi.org/10.1038/srep11181>.
- [29] C.W. Foster, H.M. Elbardisy, M.P. Down, E.M. Keefe, G.C. Smith, C.E. Banks, Additively manufactured graphitic electrochemical sensing platforms, *Chemical Engineering Journal*. 381 (2020) 122343. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122343>.
- [30] P.L. dos Santos, V. Katic, H.C. Loureiro, M.F. dos Santos, D.P. dos Santos, A.L.B. Formiga, J.A. Bonacin, Enhanced performance of 3D printed graphene electrodes after electrochemical pre-treatment: Role of exposed graphene sheets, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 281 (2019) 837–848. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.11.013>.
- [31] C.W. Foster, M.P. Down, Y. Zhang, X. Ji, S.J. Rowley-Neale, G.C. Smith, P.J. Kelly, C.E. Banks, 3D Printed Graphene Based Energy Storage Devices, *Scientific Reports*. 7 (2017). <https://doi.org/10.1038/srep42233>.
- [32] C. Kalinke, N.V. Neumsteir, G. de O. Aparecido, T.V. de B. Ferraz, P.L. dos Santos, B.C. Janegitz, J.A. Bonacin, Comparison of activation processes for 3D printed PLA-graphene electrodes: electrochemical properties and application for sensing of dopamine, *Analyst*. 145 (2020) 1207–1218. <https://doi.org/10.1039/C9AN01926J>.
- [33] R. Gusmão, M.P. Browne, Z. Sofer, M. Pumera, The capacitance and electron transfer of 3D-printed graphene electrodes are dramatically influenced by the type of solvent used for pre-treatment, *Electrochemistry Communications*. 102 (2019) 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2019.04.004>.
- [34] R.M. Cardoso, S.V.F. Castro, M.N.T. Silva, A.P. Lima, M.H.P. Santana, E. Nossol, R.A.B. Silva, E.M. Richter, T.R.L.C. Paixão, R.A.A. Muñoz, 3D-printed flexible device combining sampling and detection of explosives, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 292 (2019) 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.04.126>.
- [35] F. Novotný, V. Urbanová, J. Plutnar, M. Pumera, Preserving Fine Structure Details and Dramatically Enhancing Electron Transfer Rates in Graphene 3D-Printed Electrodes via Thermal Annealing: Toward Nitroaromatic Explosives Sensing, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 11 (2019) 35371–35375. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b06683>.
- [36] A. Koterwa, I. Kaczmarzyk, S. Mania, M. Cieslik, R. Tylingo, T. Ossowski, R. Bogdanowicz, P. Niedziałkowski, J. Ryl, The role of electrolysis and enzymatic hydrolysis treatment in the enhancement of the electrochemical properties of

- 3D-printed carbon black/poly(lactic acid) structures, *Applied Surface Science*. 574 (2022) 151587. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.151587>.
- [37] S. Sharma, H. Byrne, R.J. O’Kennedy, Antibodies and antibody-derived analytical biosensors, *Essays in Biochemistry*. 60 (2016) 9–18. <https://doi.org/10.1042/EBC20150002>.
- [38] F. Ricci, G. Adornetto, G. Palleschi, A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors, *Electrochimica Acta*. 84 (2012) 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.06.033>.
- [39] G. Martins, J.L. Gogola, L.H. Budni, B.C. Janegitz, L.H. Marcolino-Junior, M.F. Bergamini, 3D-printed electrode as a new platform for electrochemical immunosensors for virus detection, *Analytica Chimica Acta*. 1147 (2021) 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.12.014>.
- [40] E.M. Richter, D.P. Rocha, R.M. Cardoso, E.M. Keefe, C.W. Foster, R.A.A. Munoz, C.E. Banks, Complete Additively Manufactured (3D-Printed) Electrochemical Sensing Platform, *Anal. Chem*. 91 (2019) 12844–12851. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02573>.
- [41] A. Koterwa, I. Kaczmarzyk, S. Mania, M. Cieslik, R. Tylingo, T. Ossowski, R. Bogdanowicz, P. Niedziałkowski, J. Ryl, The role of electrolysis and enzymatic hydrolysis treatment in the enhancement of the electrochemical properties of 3D-printed carbon black/poly(lactic acid) structures, *Applied Surface Science*. 574 (2022) 151587. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.151587>.
- [42] Tinkercad | Create 3D digital designs with online CAD, (2018)., (n.d.). <https://www.tinkercad.com>.
- [43] HOLLER, F. James; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R. *Princípios de análise instrumental*. Bookman, 2009.
- [44] SKOOG, Douglas A. *Fundamentos de química analítica*. Vol. 2. Reverté, 2020.
- [45] DE SOUZA, D. et al. Square wave voltammetry. Second part: Applications. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 790-797, 2004.
- [46] POURNARA, Anastasia D. et al. Chemically modified electrodes with MOFs for the determination of inorganic and organic analytes via voltammetric techniques: a critical review. *Inorganic Chemistry Frontiers*, v. 6, n. 12, p. 3440-3455, 2019.
- [47] H. Zhao, J. Tian, X. Quan, *Colloids Surf. B* 2013, 103, 38–44.
- [48] Z. Lin, H. Huang, Y. Xu, X. Gao, B. Qiu, X. Chen, G. Chen, *Talanta* 2013, 103, 371–374.
- [49] H. L. Du, X. W. Fu, Y. P. Wen, Z. J. Qiu, L. M. Xiong, N. Z. Hong, Y. H. Yang, *Chin. J. Anal. Chem.* 2014, 42, 660–665.
- [50] M.M. Lounasvuori, M. Rosillo-Lopez, C.G. Salzmann, D.J. Caruana, K.B. Holt, Electrochemical characterisation of graphene nanoflakes with functionalised edges, *Faraday Discuss.* 172 (2014) 293–310. <https://doi.org/10.1039/C4FD00034J>
- [51] Relatório de Monitoramento da Lagoa da Conceição. http://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/pdf/23_12_2021_11.14.55.e97b8931e7821fbf9f3e834ccb3672be.pdf
- [52] A. Koterwa, I. Kaczmarzyk, S. Mania, M. Cieslik, R. Tylingo, T. Ossowski, R. Bogdanowicz, P. Niedziałkowski, J. Ryl, The role of electrolysis and enzymatic hydrolysis treatment in the enhancement of the electrochemical properties of 3D-printed carbon black/poly(lactic acid) structures, *Applied Surface Science*. 574 (2022) 151587. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.151587>.

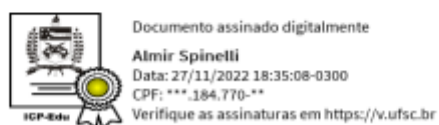
Tiago Dellatorre Toigo

Imunossensor eletroquímico *label-free* baseado em ácido polilático/grafeno e impresso 3D para a detecção de microcistina-LR

Trabalho de Conclusão de Curso II (QMC 5512) apresentado ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

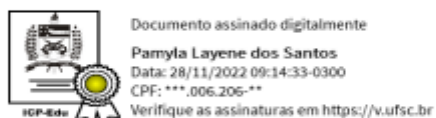


Aluno: Tiago Dellatorre Toigo



Prof. Dr. Almir Spinelli

Orientador



Profa. Dra. Pamyly L. dos Santos

Coorientadora

Florianópolis

2022