

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Marco Túlio de Freitas Reis

**GENOSENSOR ELETROQUÍMICO CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE OURO
PARA DETECÇÃO SENSÍVEL DE SARS-CoV-2**

São Carlos – SP

2022

Marco Túlio de Freitas Reis

**GENOSENSOR ELETROQUÍMICO CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE OURO
PARA DETECÇÃO SENSÍVEL DE SARS-CoV-2**

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos no estado de São Paulo, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biotecnologia.

Orinetadora: Prof. Dr^a Laís Canniatti Brazaca

Coorientadora: Prof. Dr^a Andrea Soares da Costa Fuentes

São Carlos – SP

2022

Marco Túlio de Freitas Reis

**GENOSENSOR ELETROQUÍMICO CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE OURO
PARA DETECÇÃO SENSÍVEL DE SARS-CoV-2**

Monografia apresentada ao curso Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal De São Carlos no estado de São Paulo, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biotecnologia .

Área de concentração: Biotecnologia.

Prof. Dra. Laís Canniatti Brazaca (Orientadora)

Prof. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes (Coorientadora)

São Carlos – SP, ___/___/___ 2022

*A minha família por todo o incentivo, em especial aos meus pais e irmãos,
fonte de toda inspiração.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por toda a trajetória, pelo dom da vida, pelas portas abertas ao decorrer do caminho e pela força para superar os desafios.

Agradeço imensamente à minha mãe, Shirley, por ser meu exemplo de garra, destreza e amor incondicional. Ao meu Pai, Eder Jairo, pelo incentivo e carinho de sempre. Aos meus irmãos, Pedro e Luís, pelo suporte, incentivo e amizade.

A minha orientadora, Profa. Laís Canniatti Brazaca, por todo apoio, gentileza e parceria, tornando possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Emanuel Carrilho, pela confiança e acolhimento em seu laboratório.

Aos colegas do BioMicS e a Nathália e Lucas do GMEME, pelos ensinamentos que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Agradeço também aos funcionários do IQSC, especialmente ao Dr. Marcio de Paula pelo auxílio na microscopia.

A toda minha família, em especial à minha Tia Madrissílva e minha avó Dulce, por fortalecerem a base da minha formação pessoal e profissional.

A todos os amigos, em especial Maria Júlia, Giovanna, Sabrina, Marco, Pedro, Vinícius, Lucas, Ygor, Leandro, Matheus, Carolina e outros que, de diversas formas, contribuíram para esta construção.

Agradeço por fim, à Dani e Leandro, pelo acolhimento e amizade a todo momento.

Destitutus ventis, remos adhibe

“Privado de ventos, pegue os remos”

-Provérbio latino

RESUMO

Desde o surgimento do novo coronavírus (SARS-CoV-2), mais de 495 milhões de pessoas foram afetadas pela doença, levando a cerca de 6,17 milhões de mortes. Em tal contexto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) descreveu como alguns dos principais métodos para conter o avanço do vírus o distanciamento social e o isolamento de indivíduos infectados. Sendo assim, o diagnóstico precoce da COVID-19 é de extrema importância para tratar e isolar rapidamente indivíduos infectados, evitando o avanço da doença e quadros de saúde mais graves. Atualmente, o padrão ouro para o diagnóstico da doença é o qPCR. Apesar de sua alta sensibilidade e baixos limites de detecção, este demanda infraestrutura laboratorial avançada, mão de obra especializada, transporte da amostra e é de alto custo. Dessa maneira, o desenvolvimento de ferramentas para o diagnóstico de COVID-19 de maneira simples, rápida, de baixo custo e *in situ* é de grande interesse. O presente estudo mostra o desenvolvimento de um genossensor eletroquímico descartável e portátil capaz de detectar o cDNA do SARS-CoV-2. Para isso, eletrodos de carbono foram produzidos a partir da técnica de serigrafia, e nanopartículas de ouro foram depositadas em sua superfície para promover o aumento de sensibilidade e facilitar a imobilização de biomoléculas. Sequências de cDNA específicas do SARS-CoV-2 foram imobilizadas na superfície do eletrodo sobre monocamadas automontadas através do uso de ácido mercaptoacético, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida e N-hidroxisuccinimida, e a presença do analito foi avaliada através da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Após a otimização dos parâmetros para montagem do biossensor foi possível construir uma curva de calibração para concentrações de DNA alvo entre $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, mostrando o potencial do dispositivo para detecção da sequência desejada. Próximos passos incluem a realização de otimizações adicionais no protocolo de montagem do biossensor, visando principalmente o aumento na reprodutibilidade e a diminuição no limite de detecção do dispositivo. Espera-se que, no futuro, o biossensor desenvolvido se mostre como uma ferramenta portátil, precisa, rápida e de baixo custo para o diagnóstico do SARS-CoV-2.

Palavras-chave: Biossensor. COVID-19. Eletroquímica. SARS-CoV-2.

ABSTRACT

Since the emergence of the new coronavirus (SARS-CoV-2), more than 495 million people have been affected by this disease, leading to an estimated 6.17 million deaths. In this context, the World Health Organization (WHO) described social distancing and isolation of infected individuals as some of the main methods to contain the spread of the virus. Therefore, early diagnosis of COVID-19 is extremely important to fast treat and isolate infected individuals, preventing the advancement of the disease and more serious health conditions. Currently, the gold standard for diagnosing the disease is qPCR. Despite its high sensitivity and low detection limits, it demands advanced laboratory infrastructure, skilled labor, sample transport and is expensive. In this sense, the development of tools for the diagnosis of COVID-19 in a simple, fast, low-cost and *in situ* way is of great interest. The present study shows the development of a disposable and portable electrochemical genosensor capable of detecting the cDNA of SARS-CoV-2. For this, carbon electrodes were produced using the screen printing technique, and gold nanoparticles were deposited on its surface to increase sensitivity and facilitate the immobilization of biomolecules. cDNA sequences specific of SARS-CoV-2 were immobilized on the electrode surface on self-assembled monolayers using mercaptoacetic acid, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide and N-hydroxysuccinimide, and the presence of the analyte was evaluated by electrochemical impedance spectroscopy (EIS). After optimizing the parameters for biosensor assembly, it was possible to build a calibration curve for target DNA concentrations between $0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $10.0 \mu\text{mol L}^{-1}$, showing the device's potential for detecting the desired sequence. Next steps include performing additional optimizations in the biosensor assembly protocol, mainly aiming at increasing reproducibility and decreasing the detection limit of the device. It is expected that, in the future, the developed biosensor will prove to be a portable, accurate, fast and low-cost tool for the diagnosis of SARS-CoV-2.

Keywords: Biosensor. COVID-19. Electrochemistry. SARS-CoV-2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura geral do SARS-CoV-2	12
Figura 2 - Esquema representativo dos elementos e funcionamento geral de um biossensor.	15
Figura 3 - Conjunto de eletrodos utilizados no trabalho.	19
Figura 4 - Processo de construção dos eletrodos aplicados no trabalho	23
Figura 5 - Voltamograma característico do eletrodo de trabalho (ET) contendo apenas tinta condutora de carbono, após a ativação eletroquímica	30
Figura 6 - Padrão do resultado gráfico obtido da VC no eletrodo de carbono após a deposição das nanopartículas de ouro	31
Figura 7 - Dois ET, um sem AuNPs (ET1) e outro com AuNPs (ET2), foram submetidos a MEV em duas diferentes aproximações.	33
Figura 8 - EDS de dois ET	34
Figura 9 - Esquema ilustrativo das etapas sucessivas de preparo, imobilização do DNA de captura e aplicação do DNA alvo sobre o eletrodo de trabalho.	35
Figura 10 - Rtc de cada uma das etapas partindo desde o eletrodo limpo até o ET com o DNA alvo.	37
Figura 11 - Gráficos A, B e C referentes ao experimento de otimização da concentração de captura	38
Figura 12 - Gráficos A, B e C referentes ao experimento da utilização do espaçador.	40
Figura 13 - : Resultado referente ao experimento de otimização do tempo de incubação do DNA alvo.	41
Figura 14 -Curva de calibração para o DNA alvo.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo das etapas do protocolo otimizado para a preparação do biossensor	26
Tabela 2 - Sequências de ácidos nucleicos utilizados no trabalho dispostos na orientação 5' para 3'.	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO GERAL	20
2.1 Objetivos específicos	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Materiais	21
3.2 Construção dos eletrodos	22
3.3 Modificação dos eletrodos	23
3.3.1 Ativação eletroquímica	23
3.3.2 Eletrodeposição de AuNPs	24
3.3.3 Ativação dos eletrodos modificados	24
3.4 Medidas eletroquímicas	24
3.5 Modificação dos eletrodos com sequências de DNA	25
3.6 Biomoléculas utilizadas	26
3.7 Caracterização morfológica dos eletrodos	26
3.8 Parâmetros analíticos	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Construção de eletrodos	28
4.2 Análise eletroquímica dos eletrodos produzidos	28
4.3 Caracterização morfológica dos eletrodos produzidos	30
4.4 Avaliação da montagem do genossensor	33
4.5. Otimização da detecção do DNA alvo	36
4.6. Curva de calibração	40
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

Em novembro de 2019 o mundo tomou conhecimento de que na cidade de Wuhan, na China, estava ocorrendo um surto de uma doença respiratória, causada por uma nova cepa de coronavírus (SARS-CoV-2). O coronavírus recebeu essa denominação por possuir espículas glicoproteicas proeminentes em sua superfície, semelhante a uma coroa (Figura 1). Trata-se de um vírus envelopado que possui apenas uma fita de RNA e um nucleocapsídeo helicoidal (CRUZ *et al.*, 2020).

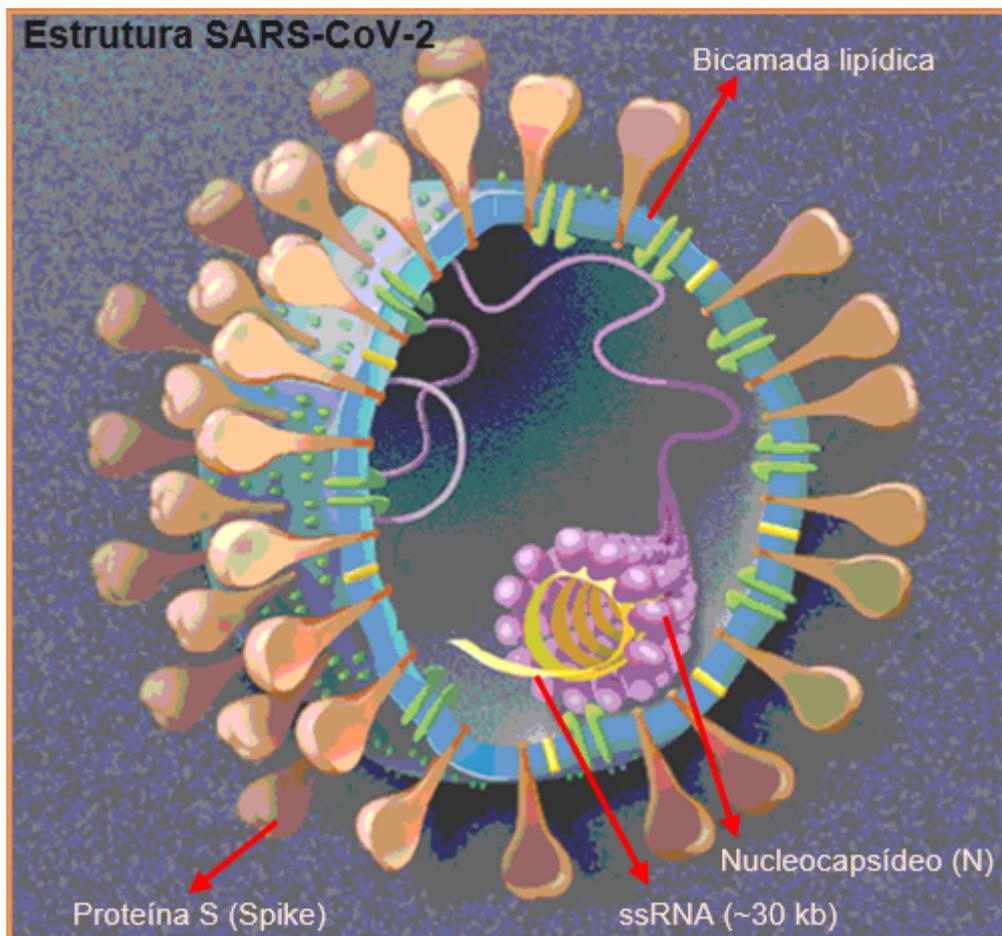


Figura 1: Estrutura geral do SARS-CoV-2. Constituído por uma bicamada lipídica que possui glicoproteína (Proteína S, Spike) de superfície para reconhecimento e invasão na célula hospedeira. Possui no interior o nucleocapsídeo constituído de proteínas N que protegem e reservam o material genético(fita simples de RNA) de aproximadamente 30.000 bases.

Fonte: Adaptado de UZUNIAN, 2020.

Dois meses após identificação do primeiro caso foram confirmadas milhares de outras infecções, evidenciando as elevadas taxas de proliferação e prevalência do vírus. Após 4 meses da identificação do primeiro caso da doença na China o SARS-CoV-2 já havia se disseminado para mais de 100 países, incluindo o Brasil, caracterizando uma pandemia, e acometendo pessoas de diferentes idades. Os

óbitos, foram causados especialmente em pessoas que compõem o grupo de risco tais como gestantes, idosos, pessoas com problemas cardiovasculares, imunossuprimidos, entre outros (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020; OPAS, 2020).

Desde então, o novo coronavírus continua a se disseminar por praticamente todos os países do globo e, recentemente, o Brasil alcançou a triste marca de 650.000 mortos e aproximadamente 29 milhões de casos confirmados. Neste contexto, é notório que o país passa atualmente pelo mais grave problema de saúde pública dos últimos 100 anos (CSSEGISandData/COVID-19, 2022).

Atualmente sabe-se que o SARS-CoV-2 atua em múltiplos órgãos do corpo, especialmente pulmão, rins e fígado, e pode causar sintomas diversos na pessoa infectada. As vias respiratórias são as mais afetadas, podendo o indivíduo apresentar desde um resfriado leve (comum em jovens saudáveis), até a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), principalmente se fizer parte do grupo de risco para a doença. A transmissão do vírus se dá pelo ar e pelo contato com secreções contaminadas, sendo que pessoas que não apresentam sintomas, mas que estão infectadas, também são capazes de transmitir o vírus (CRUZ *et al.*, 2020).

Até o momento não há medidas farmacológicas disponíveis e cientificamente comprovadas para o tratamento da doença. Assim, diante do quadro apresentado, a OMS passou a estudar medidas para diminuir sua taxa de transmissão. Estas envolvem restrição da circulação de pessoas, uso de máscaras, higienização das mãos e testagem em massa da população, entre outros. Dentre estas, destaca-se a etapa do diagnóstico, uma vez que, esta é considerada um pilar indispensável para identificar casos positivos precocemente e, assim, tomar medidas sanitárias mais eficazes para conter a pandemia (LIMA *et al.* 2020; MARCEL *et al.*, 2020).

Atualmente, o teste padrão-ouro de diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 é o RT-qPCR (*Reverse transcription real-time polymerase chain reaction*). As amostras para esta análise podem ser obtidas por meio do aspirado nasofaríngeo, swab nasal e oral, bem como pela secreção respiratória do trato inferior, como escarro, lavado traqueal ou lavado broncoalveolar. Nesses, inicialmente ocorre a reação de transcriptase reversa com o segmento de RNA viral, produzindo então um DNA complementar (cDNA) que depois será amplificado, sendo possível acompanhar, em tempo real, o número de cópias à cada ciclo (GONÇALVES, 2021).

Apesar da técnica ser extremamente sensível, apresentando baixos limites de detecção (de 3,3 a 330 cópias de RNA/mL) (IGLÓI *et al.*, 2020), esta requer infraestrutura laboratorial específica, mão de obra especializada e períodos relativamente longos para se obter o resultado. Assim, uma alternativa às técnicas baseadas em PCR são os testes rápidos, como os dispositivos do tipo lateral flow, para a detecção de proteínas específicas ao SARS-CoV-2 (proteína N ou proteína S) ou de anticorpos relacionados à doença. Estes últimos, denominados de testes sorológicos, detectam a presença de anticorpos, IgA, IgM e IgG, proteínas imunológicas específicas expressadas pelo organismo em resposta à infecção pelo vírus. Esse diagnóstico mostra que o paciente esteve infectado a dias ou até mesmo a semanas atrás da realização do teste, não sendo indicado para pessoas infectadas. Diferentemente dos testes para a presença das proteínas virais, que são capazes de demonstrar a presença do vírus no momento da realização do teste. Assim, os testes rápidos apesar de menos sensíveis, se destacam pela simplicidade, rapidez e baixo custo, quando comparados à RT-PCR (ESTEVÃO, 2020; NOGUEIRA, 2020; SILVA, 2020; CNN, 2022).

Embora exista certa diversidade de testes para detecção do vírus, a testagem no Brasil tem sido considerada por especialistas como incipiente. Observa-se o avanço da variante ômicron e conseqüentemente o aumento da demanda de testes associada a uma escassez de exames e a um custo elevado dos mesmos (TURBIANI, 2018). Nesse sentido, tanto a Abrafarma (associação que reúne as 26 maiores redes farmacêuticas do país) quanto a associação de laboratórios alertaram que o atual cenário de baixa disponibilidade dos testes rápidos é preocupante (IDOETA, 2022).

Em tal contexto, biossensores se mostram como uma excelente alternativa para o desenvolvimento de testes para o auxílio do diagnóstico da COVID-19 de maneira simples, rápida, de baixo custo e *in situ*. Entende-se por biossensores dispositivos analíticos capazes de transduzir interações biomoleculares a níveis mensuráveis. (NOGUEIRA *et al.*, 2020). Estes dispositivos são capazes de quantificar de maneira simples, rápida e precisa uma grande quantidade de analitos, dentre os quais, proteínas, DNA, RNA, células inteiras ou parte delas (BRAZACA, 2019).

Os biossensores são constituídos, de maneira geral, de dois elementos integrados entre si. O primeiro é a camada de bioreconhecimento, onde há

imobilizado biomoléculas como enzimas, DNA, anticorpos e outras, que interagem de maneira específica com o analito alvo. Quando isso ocorre, há mudanças biofísicas ou bioquímicas nessa região que são identificadas e transduzidas para gerar uma resposta analítica mensurável. Dessa forma, esse componente responsável pela transdução é definido como o segundo elemento essencial destas tecnologias (Figura 2) (DAI, 2019; MORALES; HALPERN, 2018).

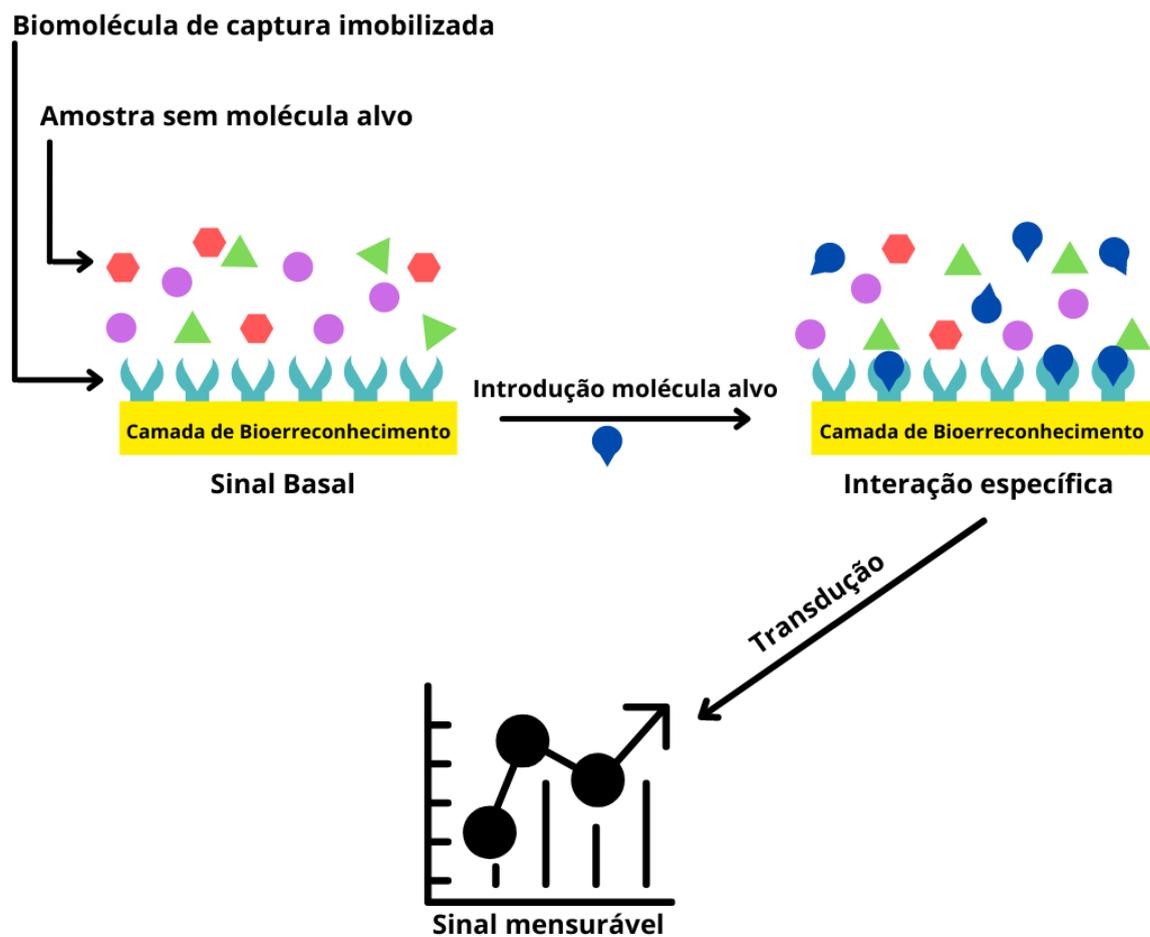


Figura 2 - Esquema representativo dos elementos e funcionamento geral de um biossensor.
Fonte: Elaborado pelo autor.

A transdução do sinal pode ser baseada em uma diversidade de técnicas, incluindo métodos ópticos, elétricos, eletroquímicos, térmicos, piezoelétricos e

magnéticos (ALHADRAMI, 2018; PASHCHENKO *et al.*, 2018). Dentre essas, as técnicas eletroquímicas se destacam pelo seu potencial de portabilidade, baixa necessidade de pré-tratamento de amostra e alta sensibilidade. Esta se baseia na alteração de diversas propriedades elétricas como corrente, impedância, voltagem ou condutividade, por exemplo, para realizar a detecção do analito de interesse. Além disso, as técnicas eletroquímicas podem ser separadas em quatro principais classes quando aplicada à biossensores eletroquímicos: amperometria, potenciometria, condutometria e técnicas impedimétricas. Na amperometria, analisam-se valores da corrente em resposta a reações de oxirredução das espécies eletroquimicamente ativas presentes no eletrodo de trabalho quando este é submetido a um potencial elétrico fixo. A condutimetria, por sua vez, se baseia nas mudanças de condutância na solução de medida, como um todo, fruto da adesão de moléculas\biomoléculas e compostos no eletrodo de trabalho. Neste caso, a concentração dos portadores móveis de carga elétrica se alteram, fazendo com que a condutância medida sofra alterações. A potenciometria, por sua vez, utiliza da diferença de potencial entre dois eletrodos para a avaliação da composição da amostra. O pHmetro é um exemplo de sensor potenciométrico utilizado cotidianamente em laboratório. Por fim, a técnica impedimétrica baseia-se em analisar mutuamente a capacitância e resistência do eletrodo de trabalho (ASAL *et al.*, 2018; UPASHAM *et al.*, 2021; KIMMEL *et al.*, 2012; BRAZACA, 2015; XU; SHOAIE; JAHANPEYMA 2020).

Entre as diversas técnicas eletroquímicas existentes, gostaríamos de detalhar o funcionamento de duas importantes para o desenvolvimento de biossensores: a voltametria cíclica (VC) e a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

A VC é uma técnica eletroquímica que consiste na aplicação de uma varredura de potenciais, em uma janela pré-determinada, de forma cíclica sobre o eletrodo de trabalho na direção catódica e anódica, tendo a corrente resposta monitorada. Com base em tal monitoramento, é possível obter informações importantes sobre reações de oxirredução de componentes presentes na amostra. Caso os compostos a serem analisados não sejam eletroquimicamente ativos é necessário o uso de marcadores ou mediadores eletroquimicamente ativos, fazendo a detecção indireta do analito de interesse. Uma estratégia comum se baseia na análise dos picos de oxidação e redução da solução de hexacianoferrato de potássio II e III, mediador eletroquímico bem estabelecido, para a detecção indireta do

analito. Comumente, quanto maior a concentração de biomoléculas na superfície, sendo estas de caráter isolante, maior a diminuição na corrente dos picos relacionados às reações de oxirredução do mediador (BRAZACA, 2019).

A EIE, por sua vez, é uma técnica impedimétrica conhecida por ser extremamente sensível no monitoramento de interações biomoleculares. Com base em aplicação de sinais de corrente alternada de pequena amplitude (na escala de mV) sobrepostos a um potencial contínuo em elevada diversidade de frequências, é possível investigar as propriedades de um sistema em condições próximas ao seu estado de equilíbrio. Devido aos sinais senoidais possuírem uma grande variedade de frequência a serem explorados (mHz à MHz), isso permite que a técnica seja aplicada a diferentes amostras e situações. Além disso, é possível obter uma vasta quantidade de informações pelo sinal senoidal de resposta, como a resistência à transferência de carga (R_{tc}), impedância e capacitância do sistema. Quando se trata da detecção de biomoléculas, essa técnica se mostra extremamente útil. Isso porque as trocas eletrônicas são dificultadas devido a presença do analito na superfície do eletrodo, alterando a R_{tc} de acordo com a concentração das espécies alvo. Assim, o monitoramento da resposta do sistema elucidada sobre a capacitância e resistência das amostras no eletrodo de trabalho (MAALOUF *et al.*, 2007; BRAZACA, 2015).

É interessante mencionar que potenciostatos portáteis e de baixo custo já são comercialmente disponíveis, permitindo que as técnicas citadas sejam executadas *in situ* mesmo com poucos recursos. Dessa forma, as técnicas de VC e EIE são de extremo interesse para o desenvolvimento de novos biossensores sensíveis e com potencial de portabilidade (BRAZACA, 2019; BERNARDES, 2020; XU; SHOAI; JAHANPEYMA, 2020; FERRARIA *et al.*, 2020).

Como citado anteriormente, biossensores se baseiam em biorreceptores (anticorpos, material genético, enzima, receptores, entre outros) para a detecção seletiva do analito. Entre tais opções, pequenos fragmentos de DNA se destacam por serem mais estáveis e apresentarem menor custo se comparados com anticorpos. Além disso, permitem detecção do analito com ótima especificidade, podendo discriminar até mesmo a diferença entre um único par de base entre diferentes sequências de DNA ou RNA. Ademais, tais dispositivos podem ser reutilizados, tornando o diagnóstico ainda mais prático e barato (TELES; FONSECA, 2008; CARLISLE, 2004).

Os eletrodos a serem utilizados nos biossensores, por sua vez, podem ser baseados em vários tipos de materiais, como polímeros condutores, materiais metálicos, fibras óticas e materiais à base de carbono. Entre estes últimos, têm-se as tintas condutoras de carbono que se destacam por possuírem baixo custo, simplicidade na produção e aplicação, além de possibilitarem a implementação de certo dinamismo nos dispositivos finais em vista da variedade de tintas disponíveis. Também permitem a produção dos eletrodos de acordo com a quantidade desejada, não apenas em grandes escalas (KAMARUDIN; MUSTAPHA; KIM, 2021; LI, 2018). Outro fator importante é que as tintas de carbono se destacam entre os materiais utilizados por serem bem estabelecidas eletroquimicamente, possuindo alta condutividade térmica e elétrica, não reagindo quimicamente com outros compostos e possuindo uma estabilidade mecânica robusta (BI, 2019; HAN *et al.*, 2014). A deposição da tinta escolhida deve ser realizada sobre um substrato no qual ocorra aderência desta com facilidade e uniformidade. Esse processo pode ser realizado por diversas técnicas, como flexografia, impressão inkjet, rotogravura e screen-printing (serigrafia) - considerada a mais prática entre as técnicas de impressão em massa (SUGANUMA, 2014; SAIDINA *et al.*, 2019).

Tipicamente, os sistemas de eletrodos aplicados para VC e EIE são baseados em três eletrodos distintos, cada qual com suas especificações funcionais e estruturais (Figura 3). O eletrodo de trabalho (ET), usualmente localizado na parte central do sistema, é o eletrodo monitorado durante a execução das medidas eletroquímicas. Sendo assim, é no ET que ocorre a imobilização das biomoléculas para a construção de um biossensor. O eletrodo de referência (ER), por sua vez, é capaz de manter seu potencial constante em uma grande diversidade de situações, sendo assim utilizado como referência para aplicação de potenciais no ET. É usualmente composto de Ag/AgCl, calomelano saturado, entre outros. Por fim, tem-se o eletrodo auxiliar (EA) ou contra-eletrodo. Este possui o papel de estabelecer a conexão elétrica com o ET através da solução de medida e aceitar a passagem de corrente, minimizando a alteração de potencial no eletrodo de referência, permitindo que este se mantenha constante. É comumente baseado em platina mas pode também ser construído com carbono, cobre ou aço inoxidável (PACHECO *et al.*, 2013).

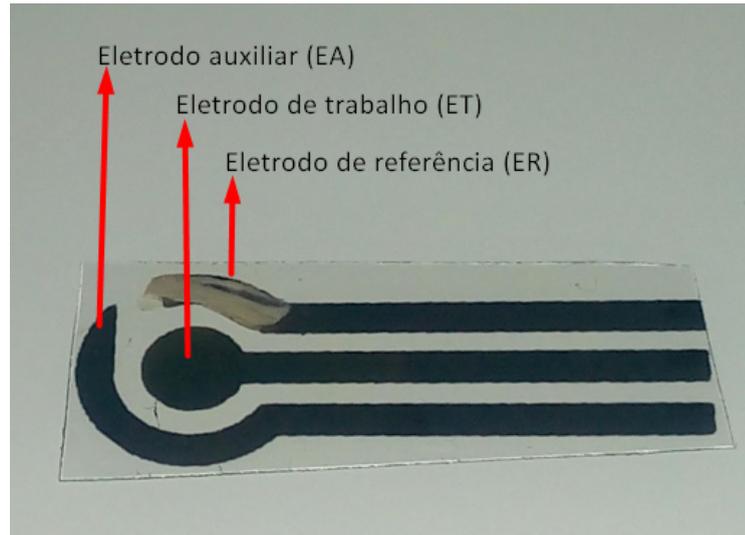


Figura 3 - Conjunto de eletrodos utilizados no trabalho. Cada um dos três eletrodos, EA, ET e ER, estão identificados pelas setas em vermelho. No ER, pode-se observar a presença da tinta de prata sobre a tinta condutora de carbono
Fonte: Elaborado pelo autor.

Por fim, é válido pontuar que o desempenho da condução elétrica pela tinta de carbono pode ser otimizado pela adição de, dentre outros compostos, nanopartículas metálicas como as de ouro na superfície do ET (TERZI *et al.*, 2017). Nesse sentido, as nanopartículas de ouro (AuNPs) são bastante descritas na literatura para tais aplicações, visto que é bem estabelecido seu processo de nucleação, deposição e suas propriedades eletroquímicas. Além de melhorar a condutividade do dispositivo tornando-o mais sensível a trocas de elétrons, a deposição de AuNPs também possui o papel de facilitar a imobilização de biomoléculas sobre sua superfície. Dessa forma, os dispositivos com tais nanopartículas metálicas comumente apresentam maior sensibilidade além de tornar a imobilização de biomoléculas mais simples e rápida, quando comparado a plataformas sem AuNPs (BRAZACA, 2022).

Em vista do supracitado, pode-se dizer que a associação de materiais condutores, nanopartículas metálicas e técnicas eletroquímicas, como VC e EIE, são interessantes para o desenvolvimento de novos sistemas de sensores capazes de identificar a presença do SARS-CoV-2. Por meio da interação do DNA complementar do vírus com o DNA de captura imobilizado na superfície do ET é possível realizar o rápido diagnóstico da doença e assim auxiliar nas ações necessárias ao tratamento adequado do paciente e em seu isolamento.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi desenvolver um genossensor eletroquímico baseado em eletrodos de carbono contendo nanopartículas de ouro para detecção sensível do vírus SARS-CoV-2. Para isso, sequências de captura baseadas no cDNA do vírus foram imobilizadas sobre o eletrodo de trabalho, e as técnicas de EIE e VC foram utilizadas para a detecção do DNA alvo.

2.1 Objetivos específicos

- Construir eletrodos a partir da tinta condutora de carbono através da técnica de serigrafia;
- Realizar deposição reprodutível de nanopartículas de ouro sobre o eletrodo de trabalho;
- Induzir modificações químicas na superfície do eletrodo de trabalho para a imobilização do DNA de captura e identificação do DNA alvo;
- Avaliar a modificação dos eletrodos com base nas técnicas de EIE e VC;
- Otimizar o protocolo de construção do biossensor;
- Criar uma curva de calibração para o DNA alvo;
- Avaliar os parâmetros analíticos do genossensor construído, como reprodutibilidade, limite de detecção e limite de quantificação;
- Avaliar a especificidade do genossensor construído;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Água ultrapura foi obtida do sistema Barnsted Nanopure System (resistividade de $18,2 \text{ M } \Omega \text{ cm}^{-1}$). A fita isolante e a plataforma de polietileno tereftalato ($\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$)_n (PET) personalizada com 77 fios por cm^2 foram adquiridas na Silk Center Digital, em São Carlos, São Paulo, Brasil. A plataforma para serigrafia foi projetada utilizando o software AutoCAD e produzida pela IASA Segmentos Industriais, também localizada na cidade de São Carlos, São Paulo, Brasil. A tela de serigrafia e o rodo de poliuretano que apresenta dureza de 75 shores são propriedades do Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos (GMEME), do Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola, e foram emprestados para a realização deste trabalho. A tinta condutora de carbono (EDAG 423SS E&C) foi adquirida comercialmente da empresa Henkel (Alemanha). Os reagentes tetracloroaurato de hidrogênio ($\text{AuCl}_4\text{H}_7\text{O}_3$), ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido mercaptoacético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{S}$), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3$) (EDC) e N-hidroxisuccinimida ($\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$) (NHS), foram obtidos comercialmente da empresa Sigma-Aldrich (Brasil).

Etanolamina ($\text{CH}_2(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{OH}$) foi obtida comercialmente da empresa Sigma Aldrich (Brasil). Tinta condutora de prata em caneta (CW2200MTP) foi obtida da empresa Chemtronics®. Tampão fosfato salino, do inglês Phosphate-buffered saline (PBS), foi preparado em água ultrapura utilizando, para um litro, 8 g de cloreto de sódio (NaCl), 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 1,15 g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) e 0,2 g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) (pH= 7,4). Todos esses reagentes foram comprados da empresa Sigma Aldrich (Brasil). Os reagentes hexacianoferrato de potássio III ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) e hexacianoferrato de potássio II ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich (Brasil). O DNA de captura foi obtido comercialmente da empresa Sigma-Aldrich (Brasil), enquanto o DNA alvo viral foi obtido da empresa Exxtend (Brasil).

3.2 Construção dos eletrodos

A confecção dos eletrodos foi realizada em parceria com a doutoranda Nathalia Oezau Gomes, do GMEME, no Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo (IQSC/USP).

Primeiramente, a tela de serigrafia com molde específico para o design do eletrodo de interesse foi posicionada sobre a plataforma de PET. A tinta condutora de carbono foi então homogeneizada com auxílio de uma espátula e transferida para a superfície do molde. Após fixar bem a tela e o substrato para que não se deslocassem durante o espalhamento da tinta condutora de carbono, com o auxílio de um rodo que foi mantido inclinado aproximadamente 45° , foi feito o espalhamento da tinta duas vezes consecutivas sobre todos os moldes da tela (GOMES, 2019).

Em seguida, a plataforma de PET foi retirada de baixo da tela com cuidado para não modificar o formato da tinta depositada. A seguir essa plataforma foi transferida para uma estufa onde ficou por 30 minutos à 90°C para a cura térmica de tinta. Após tal período, tinta condutora de prata foi depositada sobre o ER com o auxílio de uma caneta, a qual foi seca a temperatura ambiente por 12 horas (GOMES, 2019). Assim, os eletrodos podem ser recortados individualmente mantendo um espaçamento constante entre eles, não afetando a integridade das tintas aplicadas. Por fim, a área dos eletrodos foi delimitada com o uso de uma fita isolante. Essa etapa é fundamental que seja feita com muita cautela para manter todos os eletrodos com área semelhante. O eletrodo de trabalho produzido possuía aproximadamente 12.56 mm^2 de área geométrica (raio de 2 mm), com trilhas condutoras de aproximadamente 2,7 cm de comprimento e 0,8 cm de largura. A Figura 4 demonstra o processo de produção dos eletrodos.

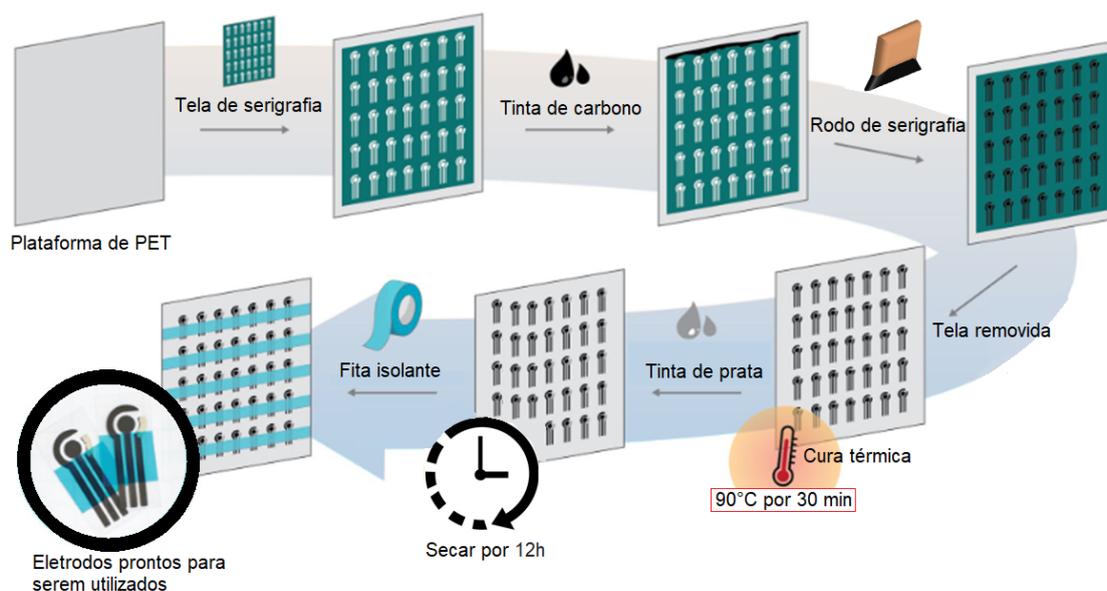


Figura 4 - Processo de construção dos eletrodos aplicados no trabalho

Primeiramente, a tela de serigrafia é disposta sobre a plataforma de PET. Em seguida, a tinta de carbono é adicionada e espalhada sobre os moldes. A tela é então removida e a tinta passa 30 min a 90°C na estufa para cura térmica, seguindo da aplicação da tinta de prata no ER. Após secagem de 12h é realizada a delimitação da área dos ET com fita isolante.

Fonte: Adaptado de BRAZACA, 2022.

3.3 Modificação dos eletrodos

3.3.1 Ativação eletroquímica

Foi utilizada a técnica de VC para a ativação eletroquímica dos eletrodos. Essa etapa é fundamental pois ao decorrer da produção dos eletrodos estes ficam expostos a longos períodos à contaminantes presentes no ambiente que podem interferir nas sensíveis medições eletroquímicas nas quais serão submetidos. Assim, para certificar que a superfície a ser trabalhada contém apenas os compostos das tintas utilizadas, estes eletrodos são submetidos a esta ativação e limpeza eletroquímica, sendo posteriormente armazenados em placa de Petri vedada com papel filme. Para tal, foram aplicados dois ciclos de voltametria cíclica, sob submersão em 100 μL de 0,5 mol L^{-1} de ácido sulfúrico (H_2SO_4) (água ultrapura), com aplicação de potencial entre 2,5 e -2,5 V e velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Entre os ciclos de varredura, a solução ácida utilizada foi trocada. Após tal processo, os eletrodos foram lavados em água ultrapura corrente e secos com gás N_2 (GOMES, 2019).

3.3.2 Eletrodeposição de AuNPs

Em seguida, realizou-se, sobre o ET, a deposição de nanopartículas de ouro. A deposição foi realizada eletroquimicamente em uma solução contendo $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetracloroaurato de hidrogênio ($\text{AuCl}_4\text{H}_7\text{O}_3$). Os eletrodos foram submetidos a aplicação de um potencial constante de $0,18\text{V}$ por 400 segundos sob agitação, promovendo a deposição das nanoestruturas de ouro. Após, os eletrodos foram lavados em água ultrapura corrente e secos com gás N_2 (DIBA; KIM; LEE, 2015; BRAZACA, 2022).

3.3.3 Ativação dos eletrodos modificados

Antes de iniciar as modificações químicas, os eletrodos passam por um segundo processo de limpeza para retirar potenciais impurezas que tenham aderido à superfície durante a eletrodeposição de AuNPs e/ou durante o seu armazenamento. Assim, os eletrodos foram submergidos em $100 \mu\text{L}$ de solução de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico (H_2SO_4) em água ultrapura, sendo então submetidos a dez ciclos de VC, com potencial variando de $1,5$ à $0,0 \text{ V}$, na velocidade de 100 mV s^{-1} . Entre os ciclos, a solução não é trocada. Após, os eletrodos foram lavados em água ultrapura corrente e secos com gás N_2 , ficando assim prontos para serem utilizados.

3.4 Medidas eletroquímicas

Todas as medidas foram realizadas em um potenciostato PGSTAT128N (Autolab) acoplado a um computador de mesa com software Anova 2.1.5.

Todas as medidas, exceto as de ativação eletroquímica, eletrodeposição de AuNPs e ativação dos eletrodos modificados, foram realizadas em $100 \mu\text{L}$ de uma solução de hexacianoferrato de potássio III ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) e hexacianoferrato de potássio II ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) (4 mmol L^{-1} cada, PBS pH7,4). Essa solução será chamada aqui de solução hexacianoferrato de potássio II e III. As medidas eletroquímicas para a avaliação da montagem do biossensor e para a detecção do DNA alvo se basearam em duas etapas sucessivas, sendo uma realizada em VC e outra em EIE. Para a VC, foram realizados dois ciclos a velocidade de 100 mV s^{-1} ,

com potencial variando entre 1,3V e -0,5V. Para a EIE, por sua vez, o intervalo de frequências utilizado foi de 100 KHz até 0,1 Hz, sendo analisadas 10 frequências por década, com amplitude de 0,01 V_{rms}.

3.5 Modificação dos eletrodos com sequências de DNA

Após a limpeza dos eletrodos realizou-se a imobilização da sequência de captura. Para isso, primeiramente, 20 µL de uma solução de ácido mercaptoacético (MAA) (10 mmol L⁻¹, água ultrapura) foram incubados sobre o eletrodo de trabalho por 2 horas. Após, os eletrodos foram lavados em água ultrapura e secos com gás N₂. Na etapa seguinte, ocorreu a incubação, por 1 hora, do ET em uma solução composta pela mistura de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) (5,0 mmol L⁻¹ e 10,0 mmol L⁻¹ respectivamente, em PBS pH 7,4). Em seguida, os eletrodos foram lavados novamente em PBS e secos com gás N₂. Com os eletrodos secos, estes foram incubados por 4 horas uma solução contendo a sequência de DNA de captura (0,1 µmol L⁻¹) e etanolamina (0,12 mmol L⁻¹) (PBS 1x pH 7,4). Decorrido o tempo de incubação, os eletrodos passaram pela lavagem em PBS e secagem com gás N₂. Por fim foi realizada a incubação com a sequência alvo viral por 1 h (PBS 1x pH 7,4) para a avaliação da amostra.

Tabela 1 - Resumo das etapas do protocolo otimizado para a preparação do biossensor

Nome etapa	Solução	Protocolo submetido / Tempo de incubação
Ativação eletroquímica	0,5 mol L ⁻¹ de ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	Dois ciclos de VC com potenciais entre 2,5 e -2,5 V e velocidade de varredura de 100mV s ⁻¹ . Solução trocada entre os ciclos.
Eletrodeposição de AuNPs	0,5 mol L ⁻¹ de ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) e 5,0 mmol L ⁻¹ de tetracloroaurato de hidrogênio	Potencial constante de 0,18V por 400 segundos sob agitação.
Ativação dos eletrodos modificados	0,5 mol L ⁻¹ de ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	Dez ciclos de VC, com potencial variando de 1,5 à 0,0 V, na velocidade de

		100 mV s ⁻¹ . Solução não é trocada entre os ciclos.
MAA	10 mmol L ⁻¹ de MAA	2h
EDC-NHS	5,0 mmol L ⁻¹ e 10,0 mmol L ⁻¹ respectivamente de (EDC) e (NHS)	1h
DNA de captura + espaçador	1,0 µmol L ⁻¹ e 1,2 mmol L ⁻¹ de DNA de captura e etanolamina, respectivamente	1h
DNA alvo	0,1 µmol L ⁻¹ de DNA alvo	4h

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6 Biomoléculas utilizadas

Utilizou-se duas fitas de DNA que são complementares entre si, cada qual constituídas por 22 nucleotídeos. Uma delas, denominada de sequência de captura, possui um grupamento amina em sua extremidade 5' que é responsável por permitir sua imobilização sobre o ET após os tratamentos por MAA e EDC-NHS. A outra fita, que é um segmento de DNA complementar (DNAc) da fita simples do RNA viral, é nomeada aqui de sequência alvo. Esta quando aplicada sobre o ET, se liga à fita de DNA de captura imobilizada na plataforma. A sequência alvo utilizada é uma parcela da sequência do gene responsável pela produção da proteína N presente no nucleocapsídeo viral (LU, 2020). A Tabela 2 mostra a sequência das duas fitas de DNA. Todas as soluções com tais biomoléculas foram preparadas em tampão PBS 1x de pH 7,4.

Tabela 2 - Sequências de ácidos nucleicos utilizados no trabalho dispostos na orientação 5' para 3'.

Nome	Sequência (5'-3')	Nº nt	Tm em °C
DNA de captura	NH ₂ -TTTTGGTGTATTCAAGGCTCCC	22	65,8
DNA-Alvo	GGGAGCCTTGAATACACCAAAA	22	64

Ambas possuem 22 nucleotídeos (nt). A sequência de captura possui um grupamento amina (-NH₂) na extremidade 5'. A temperatura de melting (Tm), que é definida como a temperatura onde metade das fitas simples presentes estão aneladas com seu par complementar, foi definido aqui pela equação: $2(A+T) + 4(G+C) = Tm^{\circ}C$ para o DNA-alvo. O método utilizado para o cálculo de Tm para o DNA de captura não foi especificado pela empresa Sigma-Aldrich.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.7 Caracterização morfológica dos eletrodos

De maneira complementar, utilizou-se técnicas para a caracterização morfológicas e químicas dos eletrodos desenvolvidos. Utilizou-se microscopia de eletrônica de varredura (MEV) para a observação da superfície do eletrodo, sendo esta realizada na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC/USP) em um equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 15 kV, corrente de 2,82 A e I probe de 200 pA. As amostras foram recobertas com carbono em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) e mantidas em dessecador até o momento de análise.

A composição química dos eletrodos foi analisada por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), realizadas também na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC/USP) em um equipamento EDX LINK ANALYTICAL, (Isis System Series 300), com detector de SiLi Pentafet, janela ultrafina ATW II (Atmosphere Thin Window), de resolução de 133 eV a 5,9 keV e área de 10 mm², acoplado a um Microscópio Eletrônico ZEISS LEO 440 (Cambridge, England). Utilizou-se padrão de Co para calibração, feixe de elétrons de 20 kV, distância focal de 25 mm, dead time de 30%, corrente de 2,82 A e I probe de 2,5 nA.

3.8 Parâmetros analíticos

A sensibilidade do dispositivo foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Sensibilidade} = s/A$$

sendo *s* a inclinação da curva de calibração e *A* a área geométrica do eletrodo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Construção de eletrodos

A técnica de serigrafia se mostrou uma ótima alternativa para a obtenção de eletrodos baseados em carbono de maneira simples, rápida e versátil. A tinta apresentou ótima aderência à plataforma PET utilizada, fazendo com que os eletrodos permanecem intactos através de todas as etapas sucessivas de incubação e lavagens necessárias para a montagem do biossensor. O sistema de eletrodos utilizado pode ser visto Figura 2. Este é composto de três eletrodos: um ao meio (ET) e dois laterais (EA e ET), sendo um destes mais proeminente que outro (EA). Todos os três eletrodos são constituídos de tinta condutora de carbono, porém no ER há uma camada de tinta de prata (Ag/AgCl). Isso se deve pois tal tinta vem sendo utilizada nos ER de sensores eletroquímicos devido sua capacidade de manter a estabilidade do potencial em diferentes condições. Por conta dessa estabilidade, além de não serem tóxicos ao meio ambiente, os eletrodos de referência contendo Ag/AgCl são os mais comumente utilizados (SOPHOCLEOUS; ATKINSON 2017).

4.2 Análise eletroquímica dos eletrodos produzidos

Primeiramente investigou-se as propriedades eletroquímicas dos eletrodos de carbono sem modificação, na presença e na ausência de nanopartículas de ouro. Para isso, os eletrodos foram submetidos à VC em $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico (Figura 5). Na ausência das nanopartículas de ouro observou-se a formação de um voltamograma sem picos de oxidação ou redução. Resultados similares foram observados em outros trabalhos (PRADELA-FILHO *et al.*, 2017; ANDREOTTI *et al.*, 2019; BRAZACA, 2022). Esse resultado se deve pois o único material presente é a própria tinta condutora de carbono e esta não sofre reações redox em tais potenciais, apenas permite a passagem da corrente.

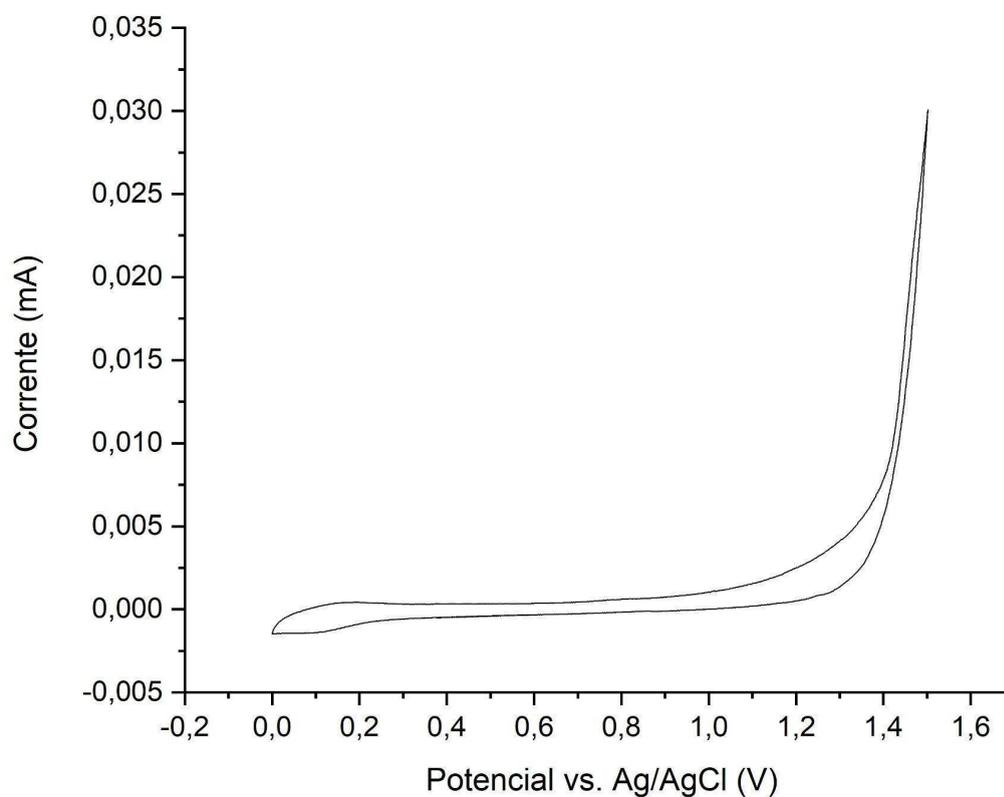


Figura 5 - Voltamograma característico do eletrodo de trabalho (ET) contendo apenas tinta condutora de carbono, após a ativação eletroquímica. Utilizou-se $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico como eletrólito suporte na velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dessa forma, investigou-se o comportamento redox dos eletrodos após a eletrodeposição das nanopartículas de ouro submergindo os eletrodos na mesma solução de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico. Como pode ser observado na Figura 6, dois picos relacionados a reações redox do ouro são evidentes.

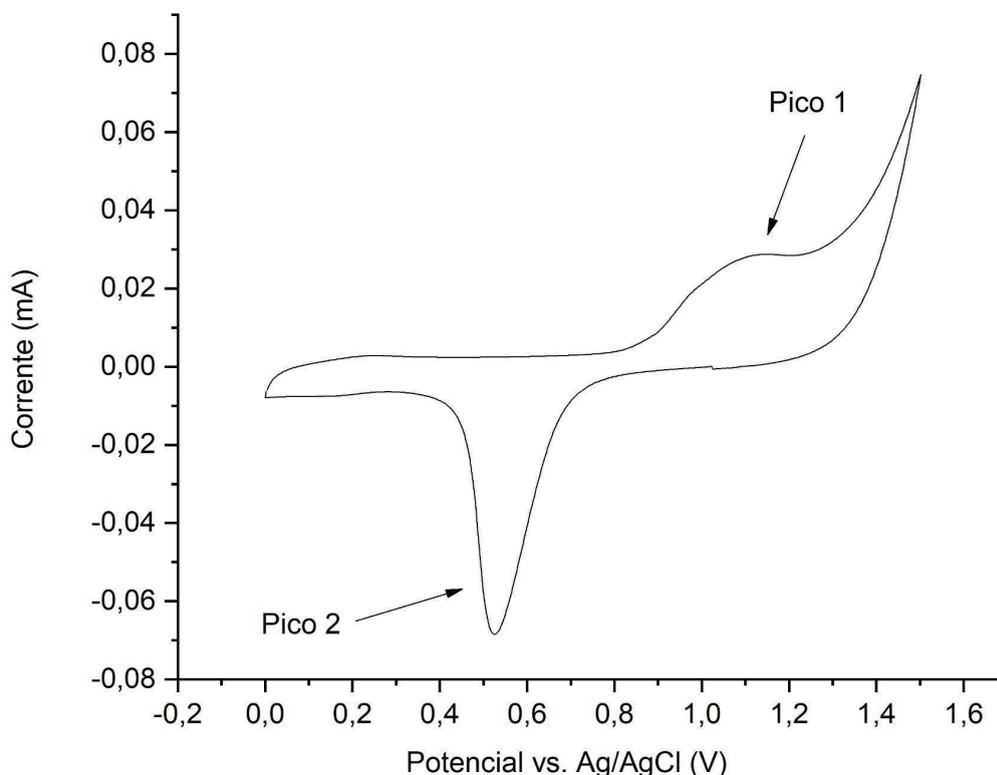


Figura 6 - Padrão do resultado gráfico obtido da VC no eletrodo de carbono após a deposição das nanopartículas de ouro. Utilizou-se $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico como eletrólito suporte na velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com base nesse resultado, é observado a oxidação do ouro no intervalo de varredura do potencial entre 0,9 e 1,3 V, referente ao pico 1. Já o pico 2, entre 0,8 e 0,4 V, refere-se ao pico catódico das nanopartículas de ouro. Esse achado é condizente com resultados encontrados por outros estudos similares na literatura (BRAZACA, 2022; PEREIRA, 2016; HEZARD *et al.*, 2012). Todos os três eletrodos submetidos a esse processo apresentaram voltamogramas semelhantes, mostrando assim que as AuNPs estavam sendo depositadas com sucesso sobre o ET.

4.3 Caracterização morfológica dos eletrodos produzidos

A fim de avaliar a morfologia padrão e composição química dos eletrodos produzidos, estes foram submetidos respectivamente à MEV e EDS. Dessa forma, tais caracterizações podem ser utilizadas para a avaliação da uniformidade da

deposição tinta de carbono e das nanopartículas de ouro, a avaliação do tamanho das nanoestruturas, além de indicar a presença de possíveis contaminantes. Observa-se na Figura 7 a MEV de dois ETs, em dois fatores de amplificação diferentes para cada, onde no primeiro (A e B da Figura 7) não há presença das AuNPs, visto que esse eletrodo não foi submetido a deposição das nanoestruturas. Neste caso, pode-se observar a disposição da tinta condutora de carbono em preto\cinza na figura, mostrando estar bem distribuída pelo eletrodo. Já no segundo eletrodo (C e D da Figura 7), observa-se a presença das nanopartículas de ouro, identificadas como os pontos claros na figura, sendo estas dispostas de maneira regular sobre a tinta condutora de carbono. Essas nanopartículas estão bem distribuídas por toda a região, mostrando que a eletrodeposição de AuNPs foi efetiva, ocorrendo a distribuição homogênea de AuNPs pela superfície do eletrodo. Além disso, com base no processamento das imagens presentes na Figura 6 no programa ImageJ, foi possível calcular o tamanho médio das nanopartículas metálicas e as variações presentes nas mesmas. Analisando 15 nanopartículas, obteve-se um tamanho médio de 325 ± 62 nm. Ou seja, além de bem distribuídas, as nanopartículas de ouro apresentam boa uniformidade de tamanho entre si.

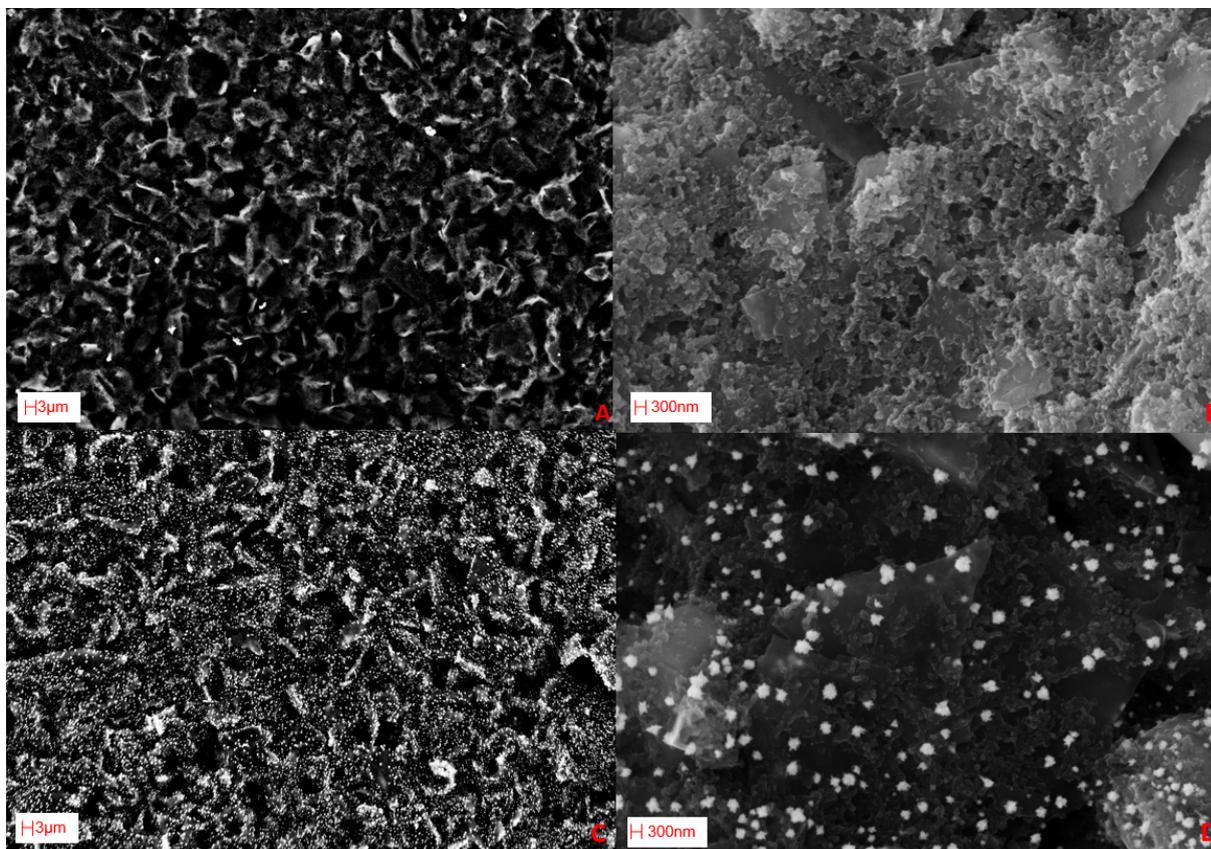


Figura 7 - Dois ET, um sem AuNPs (ET1) e outro com AuNPs (ET2), foram submetidos a MEV em duas diferentes aproximações.

(A) ET1 sem deposição de AuNPs, aproximação de 2.500x. (B) ET1 sem deposição de AuNPs, aproximação de 25.000x. (C) ET2 com deposição de AuNPs, aproximação de 2.500x. (D) ET2 com deposição de AuNPs, aproximação de 25.000x. Escala de 3µm para (A) e (C), e escala de 300nm para (B) e (D).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim, pode-se utilizar tal resultado como contra-prova da efetividade da serigrafia e da deposição de ouro, mostrando que ambos os procedimentos foram realizados com sucesso. Assim, tem-se que o voltamograma padrão para o primeiro eletrodo (Figura 7 A e B) e para o segundo (Figura 7 C e D), são respectivamente os dispostos na Figuras 5 e 6. Dessa forma, foi possível avançar para as subsequentes análises sobre o sensor em desenvolvimento.

Os resultados de EDS, por sua vez, mostram, como esperado, a presença majoritária de carbono (C) nos dois eletrodos, além da presença de ouro (Au) no eletrodo que passou pelo processo de deposição das nanopartículas (Figura 8).

Inesperadamente, porém, foi observado a presença expressiva de cloro (Cl) em ambos os eletrodos. Inclusive, a concentração deste foi maior do que a de Au no eletrodo que passou pela deposição dessas nanopartículas. A origem de tal composto é incerta, sendo que várias hipóteses foram levantadas e analisadas: 1) Primeiramente, é importante mencionar que o único reagente que contém Cl e que é utilizado na produção dos eletrodos, na etapa da deposição de nanopartículas, é o tetracloroaurato de hidrogênio. Porém, esta não pode ser a fonte de contaminação visto que a presença do Cl é observada também nos eletrodos que não sofreram a deposição das nanoestruturas. Ou seja, o Cl está presente tanto no eletrodo que passou pela deposição que utilizou tal reagente, quanto no eletrodo que não utilizou. Dessa forma, essa hipótese não é válida. 2) A segunda hipótese levantada foi investigar a presença de Cl na tinta condutora de carbono. Observado a descrição do produto pelo fabricante, nada é relatado sobre a presença de tal elemento. Além disso, foi realizada uma busca na literatura com finalidade de encontrar trabalhos que utilizaram a mesma tinta condutora e que também vieram a relatar a presença de tal elemento, mas nada foi encontrado. Inclusive, eletrodos produzidos em condições muito semelhantes foram recentemente relatados no artigo de Brazaca *et al.* (Brazaca, 2022), onde não foi observada a presença de Cl. 3) A última hipótese levantada consiste na contaminação do ET pela tinta de prata (Ag/AgCl) utilizada sobre o ER, que contém o elemento. Essa hipótese está sendo sustentada e será investigada à diante em experimentos futuros. Por fim, é importante afirmar que é incerto se a presença do elemento causa interferências na determinação das moléculas alvo, fato esse que deve também ser investigado em maior profundidade em experimentos futuros.

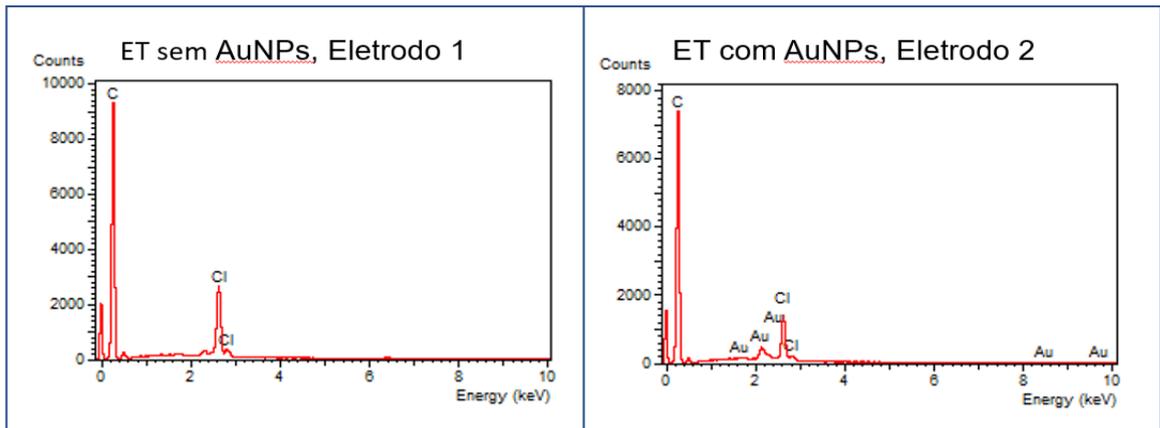


Figura 8 - EDS de dois ET

O eletrodo 1 não foi submetido à etapa de eletrodeposição de AuNPs e, dessa forma, não é observado a presença de ouro. Já no eletrodo 2, que passou por tal processo, há a presença do metal. Além disso, como esperado, é observado o maior sinal referente à presença de Carbono(C), em ambos os eletrodos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Avaliação da montagem do genossensor

Em seguida, investigou-se a imobilização do DNA de captura sobre as AuNPs para a quantificação do DNA alvo. Um resumo da estratégia de imobilização e dos grupamentos químicos envolvidos em cada etapa será descrito a seguir (Figura 9).

Após a limpeza dos eletrodos, estes foram incubados em MAA, sendo que esse ácido orgânico possui um grupo tiol e outro grupo carboxílico. Em tal etapa, o grupamento tiol interage de maneira covalente com o ouro, formando uma monocamada automontada e deixando o grupamento ácido carboxílico disponível para interações subsequentes. Em seguida, a mistura dos agentes reticulantes EDC-NHS é adicionada sobre o eletrodo, interagindo com o ácido carboxílico do MAA e produzindo um composto estável e reativo a aminas. Por fim, o espaçador (etanolamina) e a fita de DNA de captura modificada com um grupamento amina em sua extremidade são incubados sobre o eletrodo, interagindo com o intermediário criado pelo EDC-NHS e se ligando covalentemente ao ácido carboxílico original da extremidade do MAA. Com isso, o DNA alvo pode se hibridizar com a sequência captura, permitindo sua detecção pelo genossensor.

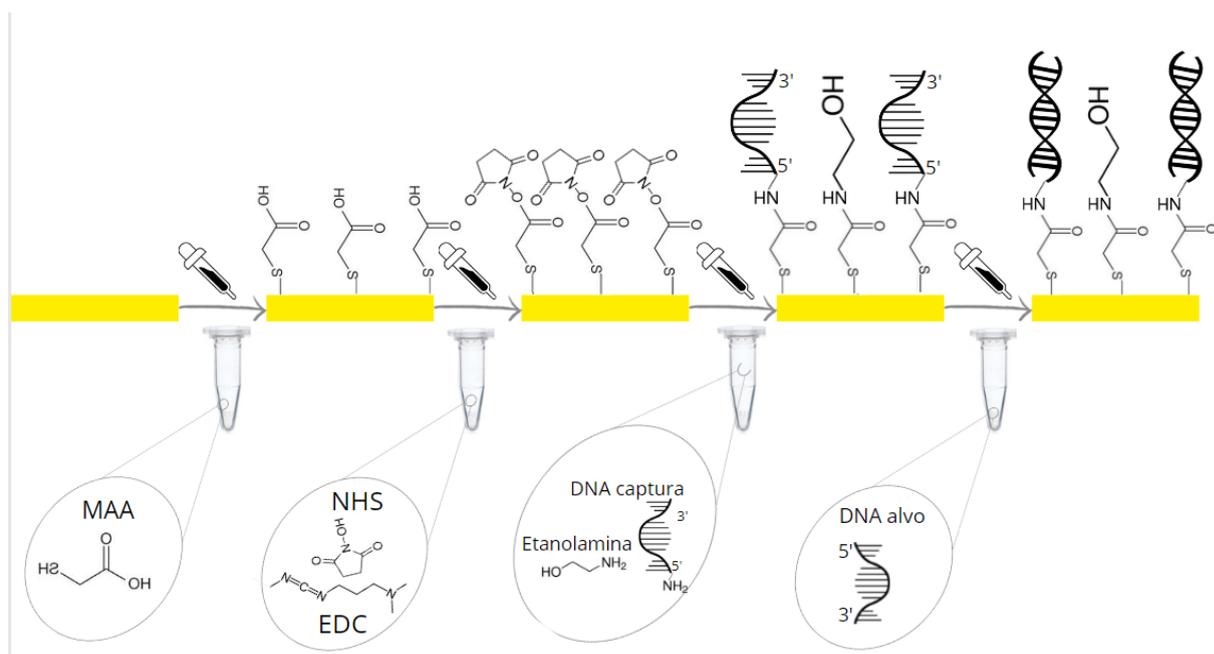


Figura 9 - Esquema ilustrativo das etapas sucessivas de preparo, imobilização do DNA de captura e aplicação do DNA alvo sobre o eletrodo de trabalho. A imobilização do DNA de captura estava sendo realizada sem utilizar o espaçador etanolamina, porém ao decorrer dos experimentos foi proposto utiliza-la à alcançar melhores resultados, nesse sentido, ela foi colocada de maneira representativa aqui no esquema, uma vez que não foi empregada desde o início das análises.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para avaliar se a montagem do dispositivo estava de fato ocorrendo como esperado, medidas de VC em solução hexacianoferrato de potássio II e III foram realizadas após cada uma das etapas de modificação do eletrodo. Partindo do eletrodo limpo, espera-se que ao decorrer das sucessivas modificações na superfície, os picos característicos da solução utilizada nas medidas fossem apresentar correntes menores e/ou voltagens maiores, visto que mais moléculas estariam aderidas à superfície do ET, bloqueando as reações na superfície do eletrodo. Os resultados, porém, não se mostraram reproduzíveis entre diferentes eletrodos, não seguindo o comportamento padrão esperado de queda da corrente com o aumento das camadas do biossensor ao decorrer das modificações químicas com MAA e EDC-NHS, nem nas etapas com as biomoléculas. Dessa forma, passou-se então para análise da EIE sobre cada uma das etapas de modificação do eletrodo. Essa escolha foi devido à maior sensibilidade de tal técnica em comparação à VC.

Primeiramente, observou-se que a R_{tc} do eletrodo limpo sofreu um aumento de 3,55× após a adição do MAA. Tal resultado indica a deposição das moléculas do

ácido sobre o eletrodo de trabalho limpo, que resulta diretamente numa maior dificuldade de transferência de carga, como esperado. Em seguida, após a incubação com EDC-NHS, houve uma pequena redução no valor médio de R_{tc} . Foi observado no trabalho de Brazaca *et al.* (Brazaca, 2022) um comportamento similar, uma vez que o protocolo utilizado pela autora também é semelhante ao empregado aqui. Até este ponto da modificação dos eletrodos os resultados se mostraram reprodutivos ($n=3$), com um desvio da R_{tc} de 18,26%. Em seguida, ao incubar os eletrodos com de DNA de captura, observa-se uma enorme variação dos valores de R_{tc} (92,04%), mostrando que tal protocolo de imobilização deve ser otimizado para se encontrar valores mais consistentes. Além disso, quando se observa a etapa seguinte de aplicação do DNA alvo por 1h à $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, observa-se uma redução dessa R_{tc} em comparação à etapa anterior de imobilização do DNA de captura. Esse comportamento não era esperado visto que a R_{tc} deve aumentar entre tais etapas pois a presença da dupla fita de DNA (captura e alvo anelados) gera uma maior R_{tc} quando comparado apenas à fita de DNA de captura. Sendo assim, observa-se um padrão de resposta reprodutível nas etapas que envolvem o MAA e EDC-NHS, porém as etapas com as biomoléculas não geram um bom resultado, demonstrando assim que otimizações sobre tais etapas devem ser exploradas. Os resultados e observações pontuadas neste parágrafo podem ser observadas na Figura 10.

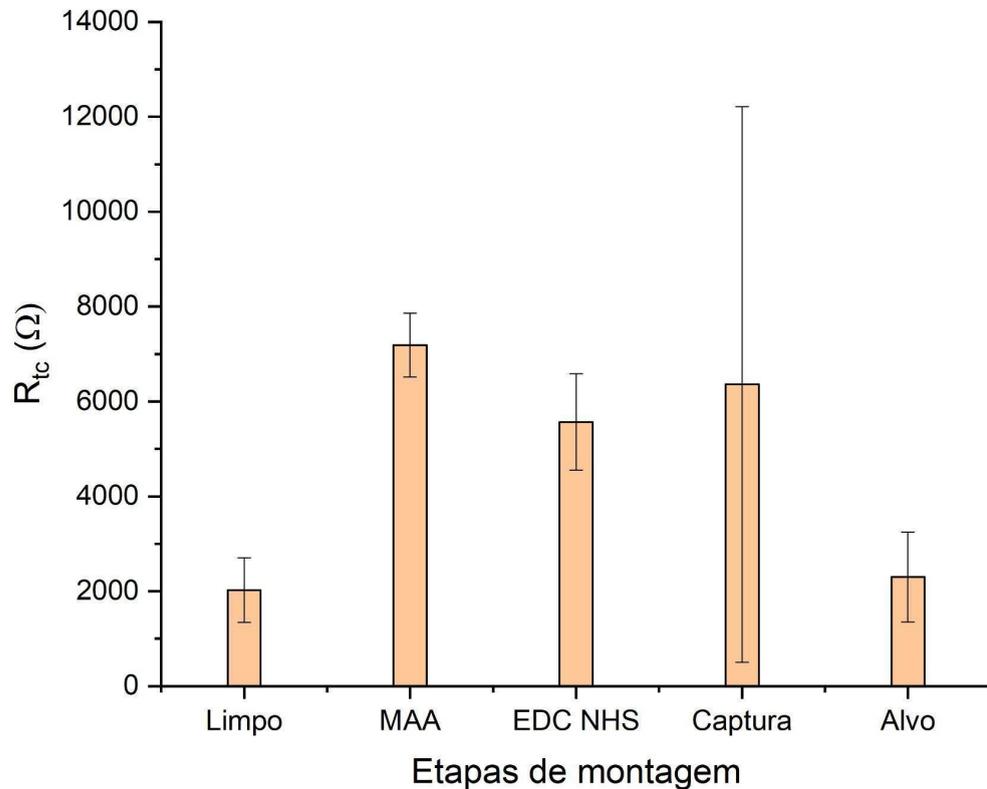


Figura 10 - R_{tc} de cada uma das etapas partindo desde o eletrodo limpo até o ET com o DNA alvo. O experimento foi realizado em triplicata (n=3), plotando assim à média dos valores obtidos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com o objetivo de explorar as etapas de imobilização do DNA de captura e aplicação do DNA alvo, foi proposto explorar otimizações para se encontrar melhores resultados, uma vez que as modificações anteriores foram alcançadas com sucesso pois apresentam resultado reprodutivo, esperado e também observado em outros trabalhos.

4.5. Otimização da detecção do DNA alvo

Inicialmente, realizou-se a otimização da concentração do DNA de captura. Neste caso, o objetivo é encontrar a menor concentração possível para tal molécula que seja capaz de gerar uma detecção sensível do DNA alvo. Para isso, genossensores foram montados com concentrações do DNA de captura variadas

(0,5, 1,0, 3,0, 7,5 e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e estes foram avaliados para a detecção de uma concentração de DNA alvo fixa (1 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (Figura 11). Observa-se o aumento de R_{tc} de 0,5 a 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ da sequência de captura quando avaliamos o sinal obtido após a imobilização desta (Figura 11A). Isso provavelmente indica a imobilização de uma maior quantidade de material sobre o eletrodo, como esperado. Valores mais elevados de concentração (7,5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) registraram uma diminuição expressiva no valor de R_{tc} indicando que, possivelmente, as altas concentrações de sequência de captura estejam dificultando sua imobilização eficiente. Em seguida, avaliou-se a variação do R_{tc} após a interação com a sequência alvo (Figura 11B e C). Era esperado que o valor de R_{tc} aumentasse após a hibridização visto que uma maior quantidade de biomoléculas estaria aderida à superfície, dificultando a transferência de elétrons entre o eletrodo e a solução hexacianoferrato de potássio II e III. Tal comportamento, porém, não foi observado, sugerindo que a hibridização entre as sequências não estava ocorrendo de forma eficiente em nenhuma das condições testadas.

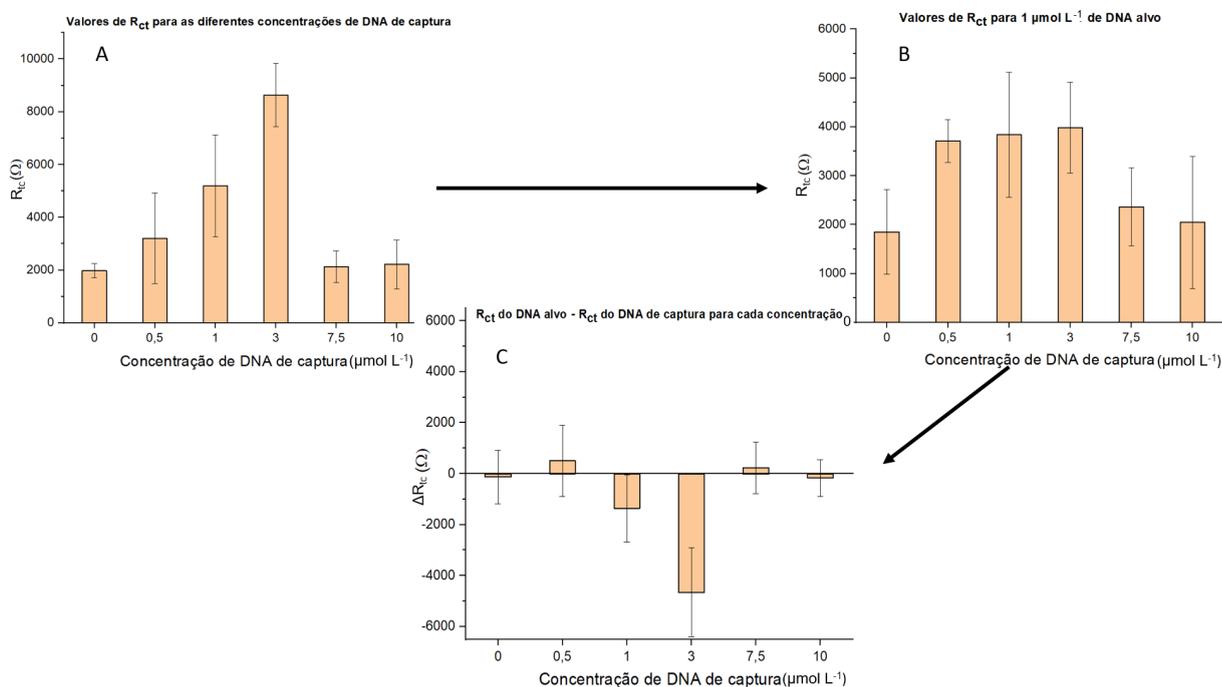


Figura 11 - Gráficos referentes ao experimento de otimização da concentração de captura
 Gráfico A: Valores de R_{tc} para diferentes concentrações de DNA de captura. Gráfico B: Valores de R_{tc} para 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DNA alvo para cada concentração de DNA de captura. Gráfico C: ΔR_{tc} do valor do DNA alvo nas diferentes concentrações de captura, ou seja, subtração dos R_{tc} de cada concentração do gráfico B menos o do A. O experimento foi realizado em triplicata ($n=3$) para cada concentração de DNA de captura.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Afim de proporcionar melhores condições para hibridização das sequências foi proposto, a seguir, incubar a molécula espaçadora etanolamina juntamente com o DNA de captura. Duas combinações foram estudadas aqui: 1) 0,3 mmol L⁻¹ de espaçador com 0,5 µmol L⁻¹ de DNA de captura, e 2) 1,2 mmol L⁻¹ de espaçador com 1,0 µmol L⁻¹ de DNA de captura. Além disso, uma amostra controle (DNA de captura na concentração de 1,0 µmol L⁻¹) foi avaliada. Espera-se que a molécula de etanolamina, por possuir um grupamento amino na sua extremidade, irá ser imobilizada por mecanismo semelhante ao DNA de captura, espaçando e organizando as biomoléculas e permitindo uma imobilização mais eficiente (Figura 9).

Foi possível observar que a presença do espaçador diminuiu um pouco a R_{tc} da etapa da sequência de captura, como pode ser observado comparando as amostras que utilizaram espaçador com o grupo controle (Figura 12A). Isso provavelmente ocorreu porque o espaçador é uma molécula pequena, promovendo um menor bloqueio da superfície do eletrodo se comparado à sequência de captura. Após a incubação do DNA alvo todas as amostras apresentaram um aumento no R_{tc} , com uma menor dispersão dos dados sendo apresentada por amostras que utilizaram o espaçador em relação ao grupo controle (Figura 12B e C). Sendo assim, acreditamos que a utilização do espaçador etanolamina junto à imobilização do DNA de captura melhorou os resultados de construção dos eletrodos e assim esse será empregado em medidas subsequentes. Entre as duas amostras que contém o espaçador, observa-se que a constituída de 1,2 mmol L⁻¹ dessa molécula com 1,0 µmol L⁻¹ de DNA de captura se destacou uma vez que apresentou maior reprodutibilidade. Dessa forma, nos próximos experimentos, essa será a configuração da amostra do DNA de captura.

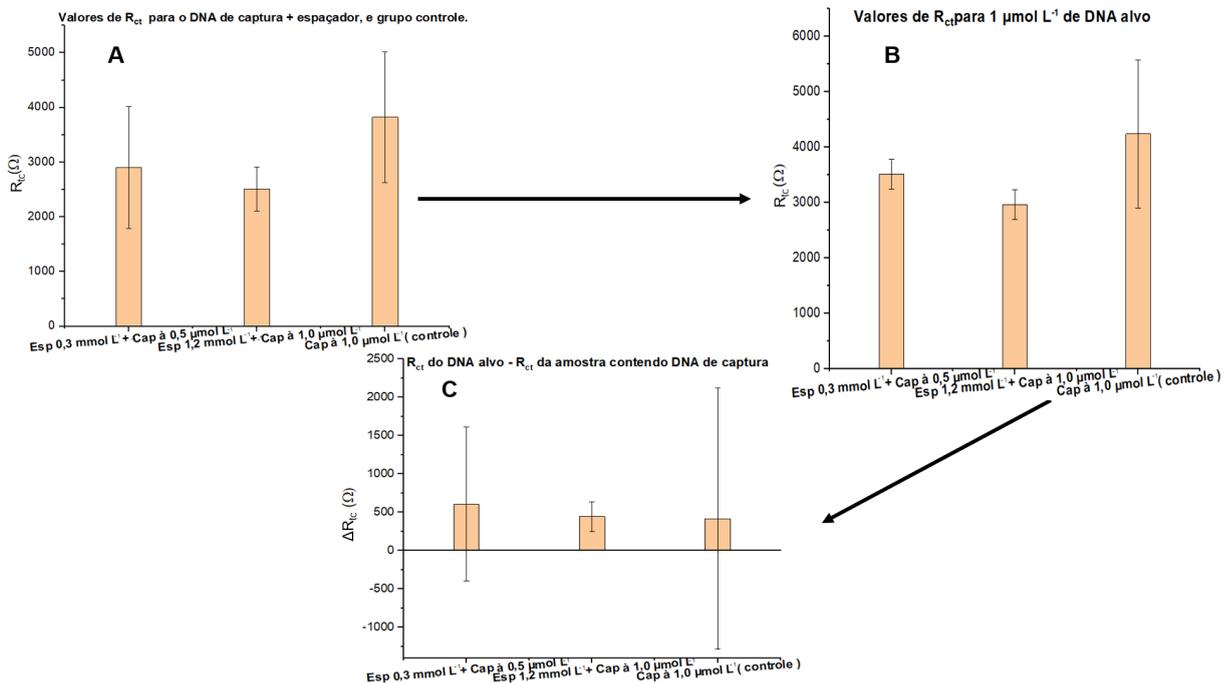


Figura 12 - Gráficos referentes ao experimento da utilização do espaçador.

O experimento consistiu em explorar a incubação do DNA de captura junto com o espaçador (Esp) etanolamina, ambos em diferentes concentrações. Além disso, uma amostra controle sem espaçador foi avaliada. No gráfico A: Está disposto os valores de R_{tc} após a incubação de tais amostras. Gráfico B: Valores de R_{tc} após a incubação de 1 µmol L⁻¹ de DNA alvo para cada amostra de DNA de captura utilizado. Gráfico C: Subtração do valor de R_{tc} do DNA alvo sobre as diferentes amostras de captura, pelo R_{tc} das amostras de DNA de captura, ou seja, subtração dos R_{tc} de cada concentração do gráfico B menos o do A. Cada condição analisada foi feita em triplicata (n=3), plotando assim as médias encontradas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Levando em consideração que o tempo para o anelamento das duas fitas (captura e alvo), é uma variável importante, esta foi investigada a seguir. Assim, foi proposto investigar se em tempos mais longos de incubação do DNA alvo há resultados melhores quanto à uma maior R_{tc} e menor dispersão dos valores obtidos. Assim, foram investigado tempos de incubação de 1h, 2h, 4h e 20h. Esse experimento foi realizado em paralelo com o experimento anterior no qual utilizou-se à associação do espaçador, dessa forma aqui a otimização encontrada anteriormente não foi empregada, utilizando então apenas o DNA de captura à 1,0 µmol L⁻¹.

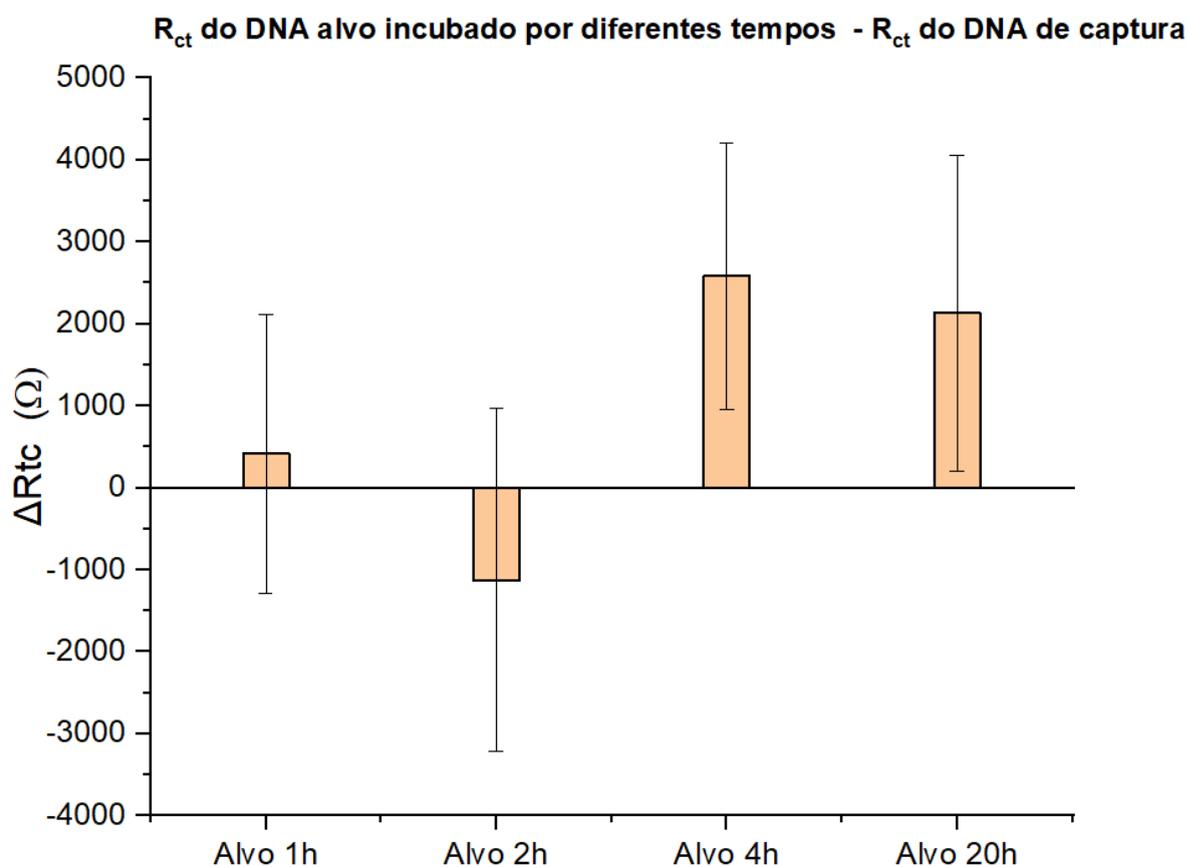


Figura 13 - : Resultado referente ao experimento de otimização do tempo de incubação do DNA alvo. O gráfico mostra a diferença do valor de R_{tc} obtida da incubação do DNA de captura à $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ sem espaçador por 1h, e do valor de R_{tc} obtido para cada tempo diferente de incubação de DNA alvo. Todas as condições foram analisadas em triplicata ($n=3$), plotando assim a média encontrada. Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se na Figura 13 que os tempos de incubação de 4h e 20h mostraram crescimento significativo do valor de R_{tc} entre as etapas de imobilização da sequência de captura e aplicação do DNA alvo. Dessa forma, o tempo de incubação de 4h foi empregado no protocolo de otimização por ser o período mais curto testado que apresentou um aumento expressivo na R_{tc} , sendo este semelhante ao período mais longo de 20h.

4.6. Curva de calibração

Por fim, foi realizada a curva de calibração (Figura 14), levando em consideração todas as otimizações realizadas até o momento. Para isso, os biossensores foram incubados em diferentes concentrações do DNA alvo (de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$) e o ΔR_{tc} foi analisado. É possível observar uma tendência linear ($\Delta R_{tc} = 860,18$

[Alvo] + 637,81; $R^2 = 0,963$) crescente para o R_{tc} com o aumento de concentração do DNA alvo. Tal comportamento é esperado pois quanto maior a concentração do alvo na amostra analisada, o anelamento deste com o DNA de captura imobilizado no ET será em maior escala e assim mais difícil será a transferência de elétrons entre a solução de hexacianoferrato de potássio II e III com a superfície do eletrodo.

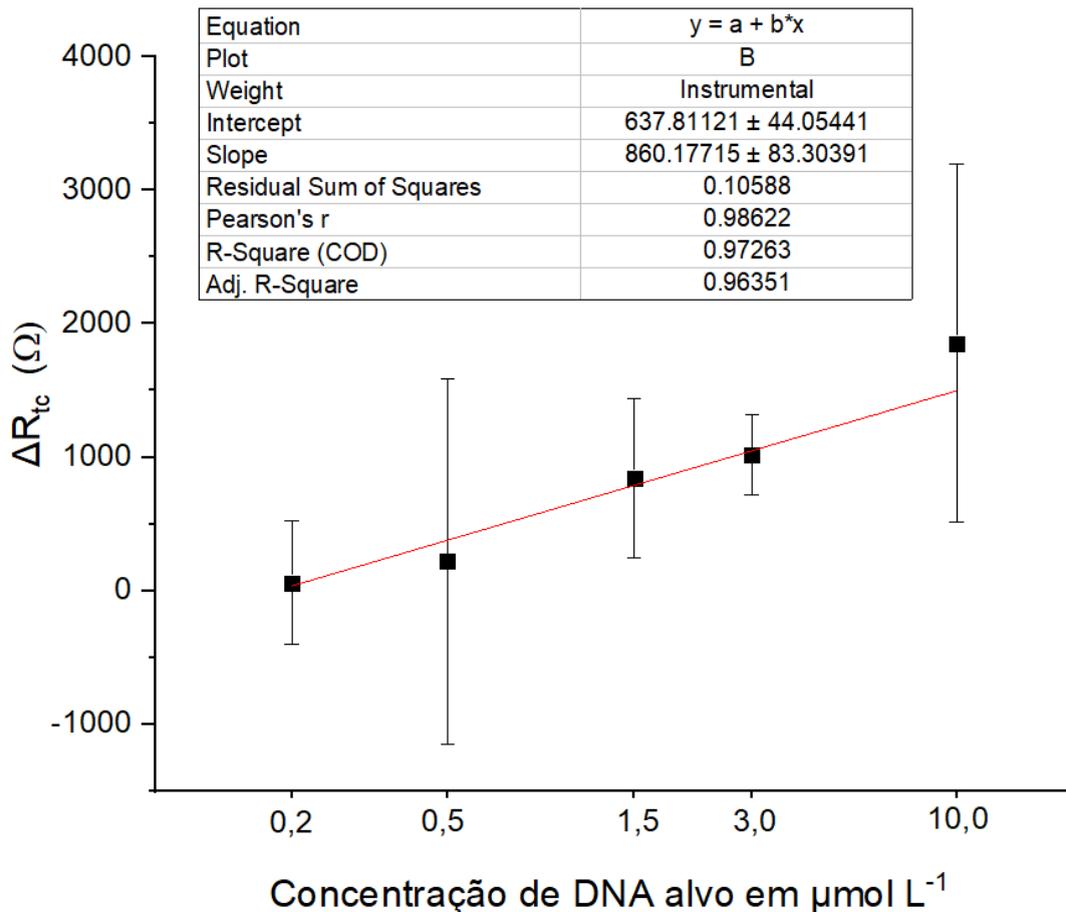


Figura 14: Curva de calibração e sua equação, para o DNA alvo .

O eixo X representa as concentrações de tais moléculas e o eixo Y o ΔR_{tc} entre a etapa de incubação do DNA de captura e do valor da etapa com o DNA alvo à diferentes concentrações. As concentrações do DNA alvo estão em $\mu\text{mol L}^{-1}$. A regressão linear está mostrada em vermelho. Todas as concentrações foram analisadas em triplicata ($n=3$), exceto a amostra de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, na qual foi realizada em duplicata ($n=2$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

A sensibilidade do dispositivo foi calculada como $68,47 \Omega / \text{mm}^2 \log [\text{DNA alvo}]$ ($\mu\text{mol/L}$). É importante notar que a grande variação nos resultados, em especial para as concentrações de $0,5$ e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, mostrando que mais otimizações devem ser experimentadas e adicionadas ao protocolo para melhorar a curva de calibração.

Não foi possível calcular o limite de detecção do dispositivo devido a baixa quantidade de replicatas (n=2) para a amostra controle.

Sendo assim, como próximos passos no projeto, pretende-se, primeiramente, explorar novas otimizações como, por exemplo, alterações no protocolo de deposição do ouro, variações de temperatura para a hibridização das sequências de DNA, variação no tempo de imobilização da sequência de captura, e a variação de concentrações entre o espaçador e a sequência de captura. Em seguida, uma nova curva de calibração será construída e parâmetros analíticos importantes, como especificidade, reprodutibilidade, limite de detecção, limite de quantificação e sensibilidade serão avaliados.

Em resumo, com base nos resultados aqui presentes e discutidos, observa-se que a otimização do protocolo de montagem do biossensor melhorou consideravelmente sua performance analítica, mas que esta ainda não é ideal para o diagnóstico preciso de COVID-19. Esperamos que, a partir de novas otimizações, ensaios e adaptações, o dispositivo apresente maior reprodutibilidade nos resultados, maior sensibilidade e menores limites de detecção, podendo, assim, ser utilizado como ferramenta para o auxílio do diagnóstico de COVID-19.

Com base nas concentrações de cDNA presentes na atual curva de calibração, caso o dispositivo atinja uma boa reprodutibilidade, este poderia detectar a presença do material genético viral à partir do produto de uma PCR convencional para o mesmo, uma vez que as concentrações aqui exploradas somente seriam alcançadas após tal técnica. Atualmente os fragmentos de DNA amplificados em testes baseados em PCR são avaliados principalmente a partir do uso da eletroforese em gel. A técnica separa os fragmentos de DNA presentes na amostra por tamanho, indicando se houve ou não a amplificação do material genético desejado. Apesar de ser uma técnica simples e bem estabelecida, esta não é capaz de fornecer informações adicionais precisas sobre o fragmento amplificado – como concentração ou a sequência de nucleotídeos. Para a identificação precisa da sequência, neste caso, é necessário que seja realizado o sequenciamento. Nesse sentido, devido ao elevado tempo que tal método necessita, além do custo elevado, estes não são muito utilizados para diagnóstico de amostras clínicas (SHEN,2020). Com base nisso, o presente dispositivo se mostra uma boa alternativa nesse processo,

realizando a detecção específica do fragmento de cDNA de SARS-CoV-2 de maneira simples, rápida e sensível a partir do produto da PCR convencional.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Foi possível construir com sucesso eletrodos à base de tinta condutora de carbono através da técnica de serigrafia. Também foi alcançado com sucesso e de forma homogênea a deposição das nanopartículas de ouro sobre o ET, estando estas bem distribuídas e apresentando tamanhos similares. Empregando a técnica de EIE, foi possível acompanhar a R_{tc} nas etapas de preparo químico do ET para imobilização do DNA de captura. Além disso, ainda com base nessa técnica, foi possível investigar diferentes condições experimentais e chegar a um protocolo que permitiu a hibridização das sequências estudadas. Com isso, foi possível acompanhar a captura do DNA alvo em concentrações desde $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$, construindo assim uma curva de calibração para a mesma. No entanto, o dispositivo construído mostrou baixa sensibilidade, $68,47 \Omega / \log [\text{DNA alvo}] (\mu\text{mol/L})$, e baixa reprodutibilidade, sendo assim necessário buscar otimizações adicionais no intuito de melhorar o desempenho analítico do dispositivo. Além disso, em etapas seguintes, será calculado o limite de detecção e de quantificação para o dispositivo, sendo necessário realizar maior número de replicatas para a amostra controle. Também pretende-se estudar a especificidade do dispositivo em frente a outras amostras de DNA alvo. Além disso, será investigado a presença do elemento Cl no ET, se este advém da tinta de prata no ER, ou da própria tinta de carbono já que não é especificado pelo fabricante. . Por fim, pretende-se empregar o uso de tais eletrodos em um dispositivo médico portátil de eletrodos descartáveis, no qual será utilizado para ajudar na detecção de pacientes contaminados com o SARS-CoV-2 a partir de amostras de PCR convencional.

REFERÊNCIAS

ALHADRAMI, H. A. Biosensors: Classifications, medical applications, and future prospective. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 65, n. 3, p. 497–508, 2018.

ANDREOTTI, I. A. A.; ORZARI, L. O.; CAMARGO, J. R. *et al.* Disposable and flexible electrochemical sensor made by recyclable material and low cost conductive ink. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 840, p. 109–116, 2019.

ASAL, M.; ÖZEN, Ö.; ŞAHINLER, M., *et al.* Recent developments in enzyme, DNA and immuno-based biosensors. **Sensors (Switzerland)**, v.18, n.6, 2018.

BERNARDES, J. Biossensores que detectam câncer também poderão diagnosticar coronavírus. **USP**, São Paulo, 2020b.

BI, S.; DONG, W.; LAN, B. *et al.* Flexible carbonic pen ink/carbon fiber paper composites for multifunctional switch-type sensors. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v, 124, n.1, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Especializada à Saúde. Departamento de Atenção Hospitalar, Domiciliar e de Urgência. **Protocolo de manejo clínico da Covid-19 na Atenção Especializada [recurso eletrônico]** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção Especializada à Saúde, Departamento de Atenção Hospitalar, Domiciliar e de Urgência. – 1. ed. rev. – Brasília: Ministério da Saúde, 2020. 48 p.

BRAZACA, L. C. **Desenvolvimento de biossensores para o auxílio no diagnóstico de mal Alzheimer, para quantificação rápida de melatonina e para determinação simples do traço genético de anemia falciforme.** 2019. 187 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

BRAZACA, L. C. **Desenvolvimento de um sistema para o diagnóstico precoce do diabetes mellitus tipo 2**, 2015.

BRAZACA, L. C.; IMAMURA, A. H.; GOMES, N. O., *et al.* Electrochemical immunosensors using electrodeposited gold nanostructures for detecting the S proteins from SARS-CoV and SARS-CoV-2. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2022.

CARLISLE, J. A. Chemical immobilization of electro-active enzymes on conducting nanocrystalline-diamond thin films is laying the basis for diamond-based electrochemical biosensors and bio-interfaces. **Nature**, v. 3, p. 668–669, 2004.

CNN. Autotestes de Covid-19 aprovados: como funcionam, onde encontrar, quanto custam. Disponível em: <https://www.cnnbrasil.com.br/saude/autotestes-de-covid-19-aprovados-como-funcionam-onde-encontrar-quanto-custam/>. Acesso em: 02 março 2022.

CRUZ, A. A. *et al.* **Considerações sintomáticas e medicamentosas a respeito do novo coronavírus: uma revisão da literatura sobre farmacologia, efeitos adversos, fisiopatogenia e formas de tratamento do covid-19.** Espaço ecológico no ar. Amazonas, 2020.

CSSEGISandData/COVID-19. Disponível em: <https://github.com/CSSEGISandData/COVID-19>. Acesso em: 02 março 2022.

DAI, X.; VO, R.; HSU, H. H. *et al.* Modularized Field-Effect Transistor Biosensors. **Nano Letters**, v. 19, n. 9, p. 6658–6664, 2019.

DIBA, F. S.; KIM, S.; LEE, H. J. Amperometric bioaffinity sensing platform for avian influenza virus proteins with aptamer modified gold nanoparticles on carbon chips. **Biosensors and Bioelectronics**, v.72, p.355–361, 2015.

ESTEVIÃO, A. Artigo de Opinião: COVID-19. **Acta Radiológica Portuguesa**. Portugal, v. 32, n. 1, p. 5-6, 2020.

FERRARIA, G. A.; CARRINGTON, P.; Rowley-Neale, S. J. *et al.* Recent advances in portable heavy metal electrochemical sensing platforms. **Environmental Science: Water Research and Technology**, v. 6, n. 10, p. 2676–2690, 2020.

GOMES, N. O. **Desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos baseados em papel paramonitoramento não invasivo de lactato em suor.** Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. São Carlos. 2019.

HAN, J. W.; KIM, B.; LI, J. *et al.* Carbon nanotube ink for writing on cellulose paper. **Materials Research Bulletin**, v.50, p.249–253, 2014.

HEZARD, T.; FAJERWERG, K.; EVRARD, D., *et al.* Gold nanoparticles electrodeposited on glassy carbon using cyclic voltammetry: Application to Hg(II) trace analysis. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 664, p. 46–52, 2012.

IDOETA, P. A. Teste de covid: por que está tão difícil conseguir testagem no Brasil? **BBCNews**. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/brasil-60062914>. Acesso em: 02 março 2022.

IGLÓI, Z.; LEVEN, M.. ABDEL-KAREM, Z. *et al.* Comparison of commercial realtime reverse transcription PCR assays for the detection of SARS-CoV-2. **Journal of Clinical Virology**, v. 129, 2020.

KAMARUDIN, S. F.; MUSTAPHA, M.; KIM, J. K. Green Strategies to Printed Sensors for Healthcare Applications. **Polymer Reviews**, v. 61, n. 1, p. 116–156, 2021.

KIMMEL, D. W.; LEBLANC, G.; MESCHIEVITZ, M. E. *et al.* Electrochemical sensors and biosensors. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 685–707, 2012.

LI, D.; LAI, W. Y.; ZHANG, Y. Z., *et al.* Printable Transparent Conductive Films for Flexible Electronics. **Advanced Materials**, v.30, n.10, 2018.

LIMA, F. L. O.; GOMES, L. N. L.; SANTOS, C. S. C. dos .; OLIVEIRA, G. A. L. de .
Diagnosis of COVID-19: importance of laboratory tests and imaging exams. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 9, n. 9, p. e259997162, 2020.

LU, X.; WANG, L.; SAKTHIVEL, S. K., *et al.* US CDC real-time reverse transcription PCR panel for detection of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2. ***Emerging Infectious Diseases***, v.26, n.8, p.1654–1665, 2020.

MAALOUF, R.; FOURNIER-WIRTH, C.; COSTE, J. *et al.* Label-free detection of bacteria by electrochemical impedance spectroscopy: Comparison to surface plasmon resonance. *Analytical Chemistry*, v. 79, n. 13, p. 4879–4886, 2007.

MARCEL S, *et al.* COVID-19 epidemic in Switzerland: on the importance of testing, contact tracing and isolation. ***Swiss Med Wkly***. 1-3, 2020.

MORALES, M. A.; HALPERN, J. M. Guide to Selecting a Biorecognition Element for Biosensors. ***Bioconjugate Chemistry***, v.29, n. 10, p.3231–3239, 2018.

NOGUEIRA, J. M. DA R.; SILVA, L. O. P. Diagnóstico laboratorial da COVID-19 no Brasil. ***RBAC.***, v. 25, n.2, p.117-21, 2020.

NOGUEIRA, L.; SANTOS, M.; BATISTA, A. *et al.* O envolvimento da Ciência Brasileira no diagnóstico da COVID-19. ***Centro Metodista IPA***, v.22, n.43, 2020.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Folha informativa sobre COVID-19. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/covid19>. Acesso em: 02 março 2022.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; DE ALMEIDA, V. G. K., *et al.* Voltammetry: A brief review about concepts. ***Revista Virtual de Química***, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PASHCHENKO, O.; SHELBY, T.; BANERJEE, T. *et al.* A Comparison of Optical, Electrochemical, Magnetic, and Colorimetric Point-of-Care Biosensors for Infectious Disease Diagnosis. ***ACS Infectious Diseases***, v. 4, n. 8, p. 1162–1178, 2018.

PEREIRA, P. A. R. **Preparação e caracterização de superfícies bifuncionais nanoestruturadas de Pt/Au obtidas via template para aplicação em sensores e biosensores**. Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) Universidade Federal de São Carlos, SP. 2016.

PRADELA-FILHO, L. A.; ARAÚJO, D. A. G.; TAKEUCHI, R. M *et al.* Nail polish and carbon powder: An attractive mixture to prepare paper-based electrodes. ***Electrochimica Acta***, v. 258, p.786–792, 2017.

RIEGER, P, H. ***Electrochemistry***. 2 ed. New York: Chapman & Hall. 1994

SAIDINA, D. S.; EAWWIBOONTHANAKIT, N.; MARIATTI, M. *et al.* Recent Development of Graphene-Based Ink and Other Conductive Material-Based Inks for Flexible Electronics. ***Journal of Electronic Materials***, v.48, n.6, p.3428-3450, 2019.

SOPHOCLEOUS, M.; ATKINSON, J. K. A review of screen-printed silver/silver chloride (Ag/AgCl) reference electrodes potentially suitable for environmental potentiometric sensors. **Sensors and Actuators, A: Physical**, v. 267, p. 106–120, 2017.

SUGANUMA, K. **Introduction**. p. 1–22, 2014.

TELES, F. R. R.; FONSECA, L. P. Trends in DNA biosensors. **Talanta**, v. 77, n. 2, p. 606–623, 2008.

TERZI, F.; ZANFROGNINI, B.; RUGGERI, S., *et al.* Amperometric paper sensor based on Cu nanoparticles for the determination of carbohydrates. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 245, p. 352–358, 2017.

TURBIANI, R. Quais os tipos de exames para covid-19 e por que os testes rápidos geram controvérsia. **Viva Bem uol.** Disponível em: <https://www.uol.com.br/vivabem/noticias/bbc/2020/06/15/quais-os-tipos-de-exames-para-covid-19-e-por-que-os-testes-rapidos.htm?cmpid=copiaecola>. Acesso em: 02 março 2022.

UPASHAM, S.; BANGA, I. K.; JAGANNATH, B., *et al.* Electrochemical impedimetric biosensors, featuring the use of Room Temperature Ionic Liquids (RTILs): Special focus on non-faradaic sensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 177, 2021.

XU, L.; SHOAIE, N.; JAHANPEYMA, F., *et al.* **Optical, electrochemical and electrical (nano)biosensors for detection of exosomes**: A comprehensive overview. *Biosensors and Bioelectronics*. Vol. 161. Elsevier Ltd, 2020.

ZIEGLER, M. F. **Pesquisadores desenvolvem testes rápidos para detecção de COVID-19. FAPESP**, São Paulo, 2020. Disponível em: . Acesso em: 6 mai. 2020.

GONÇALVES, C. C. A.; BARROSO, S. P. C.; HERLINGER, A. L.; GALLIEZ, R. DE M.; DE ALMEIDA, T. B.; BOULLOSA, L. T.; NASCIMENTO, E. R. D. S.; DE ALMEIDA, J. M.; DA COSTA, R. M. D. S. C.; DA PAIXÃO, T. M.; COUCEIRO, J. N. D. S. S.; FRAUCHES, T. S.; DE SOUZA, W. R.; COSTA, A. R.; FAFPE, D. S.; LEITÃO, I. DE C.; DA SILVA, B. O.; DE LIRA, G. S. A.; DE ALMEIDA, I. L. C.; TANURI, A. **COVID-19 diagnosis by RT-qPCR in alternative specimens. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**. Vol. 116. 2021.

SHEN, M.; ZHOU, Y., YE, J., ABDULLAH AL-MASKRI, A. A., KANG, Y., ZENG, S., & CAI, S. **Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus**. In *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Xi'an Jiaotong University. Vol. 10, Issue 2, pp. 97–101. 2020

UZUNIAN, A. Coronavirus SARS-CoV-2 and Covid-19. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*. Vol. 56, 2020.