

Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências da Natureza – CCN  
Campus Lagoa do Sino

**Desenvolvimento de imunossensor eletroquímico  
nanoestruturado descartável para detecção de SARS-  
CoV-2 em amostras ambientais**

**Aluna:** Isabela Ferreira Reis

**Orientador:** Prof. Dr. Fernando Campanhã Vicentini

Buri, SP

2023

Isabela Ferreira Reis

**Desenvolvimento de imunossensor eletroquímico  
nanoestruturado descartável para detecção de SARS-CoV-2  
em amostras ambientais**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à banca examinadora da  
Universidade Federal de São Carlos,  
Centro de Ciências da Natureza,  
Campus Lagoa do Sino, para  
obtenção do título de bacharel em  
Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Fernando  
Campanhã Vicentini

Buri, SP

2023

Reis, Isabela Ferreira

Desenvolvimento de imunossensor eletroquímico nanoestruturado descartável para detecção de SARS-CoV-2 em amostras ambientais / Isabela Ferreira Reis -- 2023. 40f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos, campus Lagoa do Sino, Buri

Orientador (a): Fernando Campanhã Vicentini

Banca Examinadora: Fernando Campanhã Vicentini, Mônica Helena Marcon Teixeira Assumpção, Orlando Fatibello Filho

Bibliografia

1. Imunossensores eletroquímicos. 2. Química analítica.
3. SARS-CoV-2. I. Reis, Isabela Ferreira. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Lissandra Pinhatelli de Britto - CRB/8 7539

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

**Folha de Aprovação**

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Trabalho de Conclusão de Curso da candidata Isabela Ferreira Reis, realizada em 03/03/2023:

Documento assinado digitalmente  
 FERNANDO CAMPANHA VICENTINI  
Data: 03/03/2023 17:56:10-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Prof. Dr. Fernando Campanhã Vicentini** – Orientador(a)  
Centro de Ciências da Natureza – UFSCar – Campus Lagoa do Sino.

Documento assinado digitalmente  
 MONICA HELENA MARCON TEIXEIRA ASSUM  
Data: 03/03/2023 17:48:06-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Profa. Dra. Mônica Helena Marcon Teixeira Assumpção**  
Centro de Ciências da Natureza – UFSCar – Campus Lagoa do Sino.

Documento assinado digitalmente  
 ORLANDO FATIBELLO FILHO  
Data: 03/03/2023 17:27:59-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

**Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho**  
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – UFSCar – Campus São Carlos.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me dado a oportunidade de realizar essa graduação, me orientando e me iluminando nessa caminhada.

Agradeço aos meus pais, Marcos e Dacia por me darem apoio emocional e financeiro para realizar essa graduação longe de casa, me aconselhando mesmo de longe e dando todo o amor que preciso. Agradeço também minha irmã Aline pelos conselhos e por ser meu suporte sempre que precisei.

Agradeço ao meu professor Dr. Fernando Campanhã Vicentini pelos ensinamentos ao longo destes anos, pelo auxílio nos dias de laboratório e por compartilhar seu conhecimento ao longo dessa pesquisa. Gostaria de agradecer também ao Dr. Luís Marcos Cerdeira Ferreira pelos ensinamentos e auxílio durante a pesquisa feita em laboratório. Agradeço também ao meu companheiro de laboratório Luca Marote pelo apoio durante a pesquisa.

Agradeço também pelo apoio da Universidade Federal de São Carlos e ao Centro de Ciências da Natureza, e aos outros docentes do curso de Engenharia Ambiental, pelos ensinamentos ao longo desses 5 anos, que me fizeram ter a certeza de que estou no caminho profissional que queria para mim.

Agradeço aos meus colegas de classe pelo apoio e pela troca de conhecimento que tivemos ao longo de toda graduação.

Agradeço também às minhas amigas de infância por me apoiarem na decisão de estudar longe, mas que sempre estiveram ao meu lado.

Agradeço especialmente aos meus amigos que fiz durante esses 5 anos, por estarem comigo nos momentos bons e ruins, e que fizeram essa experiência ser a melhor possível.

Agradeço a todos os demais que me ajudaram na formação de uma Engenheira Ambiental.

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento.”

**Albert Einstein**

## Resumo

Atualmente, os processos físico-químicos avançados exigem materiais com combinação de propriedades não encontradas em materiais convencionais. Materiais formados pela associação de compostos orgânicos e inorgânicos são uma alternativa para preparação de novos materiais e esses com propriedades superiores às apresentadas pelos constituintes quando eles agem individualmente. Imunossensores eletroquímicos baseados em eletrodos impressos descartáveis (SPEs) que utilizam tereftalato de polietileno (PET), são uma opção de baixo custo, portátil, sensível e versátil para aplicações clínicas fora do ambiente de laboratório. Neste contexto, no presente projeto foi desenvolvido um imunossensor eletroquímico portátil e descartável para a detecção da proteína *Spike* (SP) em amostras ambientais (água de rio) e clínicas (saliva artificial e soro sanguíneo), sendo o sensor baseado em um eletrodo impresso, e modificado com um filme base à de carbon black e nanopartículas de ouro (AuNPs). Os parâmetros experimentais, tais como pH da solução e parâmetros da técnica voltamétrica, foram otimizados para a voltametria de onda quadrada (SWV). Os voltamogramas SW foram registrados após diferentes tempos de incubação, variando entre 10 e 150 min, na presença de  $7,65 \text{ ng mL}^{-1}$  de solução de SP. Nesse cenário, foram avaliadas duas condições de calibração definidas: uma otimizada com incubação de 120 min e outra com incubação de proteína *Spike* de 10 min. Para avaliar o desempenho/eficiência do imunossensor AuNPs-CB/PET-SPE na detecção da proteína Spike do SARS-CoV-2, as amostras positivas sob o regime de incubação de 120 min apresentaram maior perda de corrente e menores valores de desvio padrão considerando as medidas realizadas em triplicata, o que demonstrou ser um resultado relevante para a detecção de SP nas amostras propostas. Sob condições otimizadas, o biossensor apresentou limites de detecção (LODs) de  $101 \text{ fg mL}^{-1}$  e  $46,2 \text{ fg mL}^{-1}$  para períodos de incubação de 10 min e 120 min, respectivamente. É importante salientar que o custo final de um imunossensor proposto (US\$ 0,29), comprova seu custo-benefício em relação a outras técnicas/métodos de detecção.

**Palavras-chave:** SARS-CoV-2, COVID-19, proteína Spike, eletrodos impressos descartáveis, nanopartículas de ouro, carbon black.

## **Abstract**

Currently, advanced physicochemical processes require materials with a combination of properties not found in conventional materials. Materials formed by the association of organic and inorganic compounds are an alternative for the preparation of new materials and these with properties superior to those presented by the constituents when they act individually. Electrochemical immunosensors based on disposable screen-printed electrodes (SPEs) are a cheap, portable, sensitive and versatile option for clinical applications outside the laboratory environment and without the use of external reagents. In this context, in the present project a portable and disposable electrochemical immunosensor was developed for the detection of Spike protein (SP) in environmental (river water) and clinical samples (artificial saliva and blood serum), the sensor was based on a screen-printed electrode modified with carbon black base film and gold nanoparticles (AuNPs). The experimental parameters, such as solution pH and parameters of the voltametric technique, were optimized for square-wave voltammetry (SWV). SW voltammograms were recorded after different incubation times, ranging from 10 to 150 min, in the presence of  $7.65 \text{ ng mL}^{-1}$  of SP solution. In this scenario, two defined calibration conditions were evaluated: one optimized with incubation of 120 min and another with incubation of SP of 10 min. To evaluate the performance/efficiency of the Immunosensor AuNPs-CB/PET-SPE to detecting the Spike protein of SARS-CoV-2, the positive samples under the 120 min incubation regime presented greater current loss and lower standard deviation values considering the measurements performed in triplicate, which demonstrate be a relevant result for the detection of SP in the proposed samples. Under optimized conditions, the biosensor presented detection limits (LODs) of  $101 \text{ fg mL}^{-1}$  and  $46.2 \text{ fg mL}^{-1}$  for incubation times of 10 min and 120 min, respectively. It is important to highlight that the final cost of the proposed immunosensor (US\$ 0.29), proves its cost-benefit over other detection techniques/methods.

**Keywords:** SARS-CoV-2, COVID-19, Spike protein, disposable printed electrodes, gold nanoparticles, carbon black.

## Lista de Ilustrações

<b>Figura 1:</b> Rota de transmissão do vírus SARS-CoV-2 nos edifícios através do sistema de encanamento sanitário ou de águas residuais. Adaptada de Tran et al. 2021 [8].	6
<b>Figura 2:</b> Estrutura do coronavírus. Adaptado de Ferreira, G., et al [12].	7
<b>Figura 3:</b> Elementos e componentes típicos de biossensores [14].	7
<b>Figura 4:</b> Nanopartículas de ouro sintetizadas empregando método com redução de citrato (Método de Turkevich) com algumas adaptações [26].	14
<b>Figura 5:</b> Esquema de confecção do eletrodo impresso descartável.	17
<b>Figura 6:</b> Análise de voltametria cíclica obtida para PET-SPE branco (linha preta), CB/PET-SPE (linha vermelha) e o 10º ciclo voltamétrico de AuNPs-CB/PET-SPE (linha azul) com base na aplicação de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> como eletrólito de suporte, faixa de potencial de -0,2V a 1,5 V e velocidade de varredura de 50 mVs <sup>-1</sup> .	20
<b>Figura 7:</b> Voltamogramas cíclicos obtidos a partir da aplicação de solução de KCl 0,10 mol L <sup>-1</sup> na presença de [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-</sup> 2,0 mmol L <sup>-1</sup> utilizando (A) PET-SPE, (B) CB/PET-SPE, (C) AuNPs/PET-SPE e (D) AuNPs-CB/PET-SPE em diferentes taxas de varredura potencial (10 – 100 mV s <sup>-1</sup> ). <b>E</b> ) I <sub>p</sub> vs. v <sup>1/2</sup> gráfico. <b>F</b> ) Ψ vs 32.79v <sup>-1/2</sup> gráfico (Fator 32,79 representa o valor numérico de [πDnF/(RT)] <sup>-1/2</sup> ).	22
<b>Figura 8:</b> Voltamograma cíclico para SPE em diferentes etapas de modificação sem CTS na presença de ferri/ferro em tampão fosfato pH 7,4 0,1 mol L <sup>-1</sup> com velocidade de varredura 50 mV s <sup>-1</sup> .	24
<b>Figura 9:</b> Voltamograma cíclico para SPE em diferentes etapas de modificação com CTS na presença de ferri/ferro em tampão fosfato pH 7,4 0,1 mol L <sup>-1</sup> com velocidade de varredura 50 mV s <sup>-1</sup> .	25
<b>Figura 10:</b> (A) Respostas SWV obtidas em diferentes períodos de incubação com base na aplicação de 7,65 ng mL <sup>-1</sup> SP na presença de [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>4-/3-</sup> 4,0 mmol L <sup>-1</sup> PBS (pH 7,4) em 0,1 mol L <sup>-1</sup> , no intervalo de tempo de 10 - 120 min. Condições de SWV: f = 5 Hz; a = 10 mV; ΔE = 2 mV. (B) Variação de corrente normalizada, (I <sub>0</sub> -I)/I <sub>0</sub> , vs tempo de incubação.	277
<b>Figura 11:</b> Resposta SWV obtida a partir de um aumento nas concentrações de SP (de 7,65×10 <sup>-15</sup> para 7,65×10 <sup>-6</sup> g mL <sup>-1</sup> ) na presença de PBS (pH 7,4) 0,1 mol L <sup>-1</sup> contendo [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>4-/3-</sup> 4,0 mmol L <sup>-1</sup> após (A) 10 min, e (B) 120 min de incubação; (C) Gráfico de resposta vs. Concentração de SP; (D) Gráfico de calibração linear utilizando o log C <sub>SP</sub> . Condições do SWV: f = 5 Hz; a = 10 mV; ΔE = 2 mV.	299

**Figura 12:** Curva logística de cinco parâmetros para os períodos de incubação de (A) 10 min e (B) 120 min obtidos a partir da aplicação de SP (na faixa de concentração de  $7,65 \times 10^{-15}$  a  $7,65 \times 10^{-6}$  g mL<sup>-1</sup>) em PBS (pH 7,4) 0,1 mol L<sup>-1</sup> na presença de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  4,0 mmol L<sup>-1</sup>..... 30

**Figura 13:** Respostas SWV obtidas para o imunossensor AuNPs-CB/PET-SPE aplicado em PBS (pH 7,4) 0,1 mol L<sup>-1</sup> contendo  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  4,0 mmol L<sup>-1</sup> após a incubação das amostras: (A) água do rio, (B) saliva artificial e (C) soro sanguíneo. (D) Comparativo de resposta de variação de corrente normalizada. Os padrões de cor representam solução em branco (linha preta), amostra negativa (azul) e amostra positiva contendo 76,5 pg mL<sup>-1</sup> SP em 10 min de incubação (vermelho) e 120 min de incubação (violeta). Condições do SWV:  $f = 5$  Hz;  $a = 10$  mV;  $\Delta E = 2$  mV..... 31

## Sumário

1. Introdução.....	4
2. Revisão Bibliográfica.....	5
2.1 COVID-19 .....	5
2.2 Biossensores .....	7
2.3 Imunossensores.....	8
2.4 Nanopartículas de Ouro .....	9
2.5 Carbon Black.....	10
2.6 Imunossensores para COVID - 19.....	11
3. Objetivos: .....	12
4. Metodologia.....	12
4.1 Reagentes e soluções.....	12
4.1.1 Preparo de soluções .....	13
4.1.2 Síntese de Nanopartículas de ouro.....	13
4.1.3 Preparação do filme a base de carbon black 0,1% m/v .....	15
4.1.4 Preparação de saliva artificial.....	15
4.2 Equipamentos .....	15
4.3 Eletrodo impresso descartável (SPE-PET).....	166
4.4 Preparação do imunossensor AuNPs-CB/SPE-PET.....	177
4.5 Comportamento eletroquímico do imunossensor AuNPs-CB/PET-SPE.....	17
5. Resultados e Discussão .....	19
5.1 Caracterização eletroquímica do imunossensor AuNPs-CB/PET-SPE .....	19
5.2 Otimização dos parâmetros SWV.....	25
5.3 Tempo de incubação da proteína Spike .....	26
5.4 Curva de calibração .....	27
5.5 Análise do imunossensor AuNPs-CB/PET-SPE na detecção da proteína Spike em amostras reais .....	30

6. Análise comparativa de testes SARS-CoV-2 relatados na literatura baseados na detecção de Proteína Spike.....	32
7. Conclusões .....	35
8. Referências Bibliográficas .....	355

## 1. Introdução

O novo coronavírus, nomeado também de SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV), teve sua primeira aparição na cidade de Wuhan, na China, em meados de dezembro de 2019, e em março de 2020 a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou que o surto rapidamente se tornou uma pandemia, já que o vírus estava se espalhando rapidamente por todo o mundo. Estima-se que o mesmo alcançou aproximadamente 216 países e territórios ao redor do mundo e foi estabelecida como uma emergência de saúde pandêmica global. É comprovado que o novo coronavírus não carrega apenas uma alta taxa de infecção, mas provou também ter consequências terríveis nos pulmões e no sistema respiratório do corpo humano, o que a longo prazo em casos mais graves é capaz de levar o enfermo a morte [1- 4].

No início de 2022 mais de 385 milhões de casos foram identificados e quase 6 milhões de mortes relatadas, porém, desde o final de 2020 várias vacinas altamente eficazes foram desenvolvidas e estão sendo administradas em países ao redor do mundo. O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado com um grande genoma de RNA de fita simples de sentido positivo, onde a glicoproteína de pico (*Spike*) é um de seus componentes sendo responsável pela entrada do vírus nas células hospedeiras. A identidade e distribuição do receptor celular específico reconhecido pela proteína *Spike* são os principais fatores que determinam a suscetibilidade da espécie hospedeira e o tropismo tecidual do vírus [4, 5].

O indivíduo infectado ainda pode liberar o vírus dias após o desaparecimento de todos os sintomas respiratórios, sendo comprovado pela literatura a presença do SARS-CoV-2 em amostra de fezes, aumentando a possibilidade de transmissão fecal-oral. A partir das fezes, existem três rotas principais para o vírus: através da água, das superfícies, ou para locais onde os vetores de insetos estão presentes. Sendo assim, através de diferentes vias, o vírus podem chegar à boca e infectar tanto o trato intestinal quanto o respiratório de um hospedeiro aceitável [6, 7].

Nesse contexto, para que fosse possível a detecção do vírus em amostras clínicas e ambientais, no presente projeto foi desenvolvido um imunossensor descartável, empregando como substrato garrafas PET reaproveitadas, visando reduzir o custo do dispositivo, e por ser um material fácil de manusear. Com o emprego de um sensor impresso descartável, é possível reduzir o volume de amostra necessária para análise, o

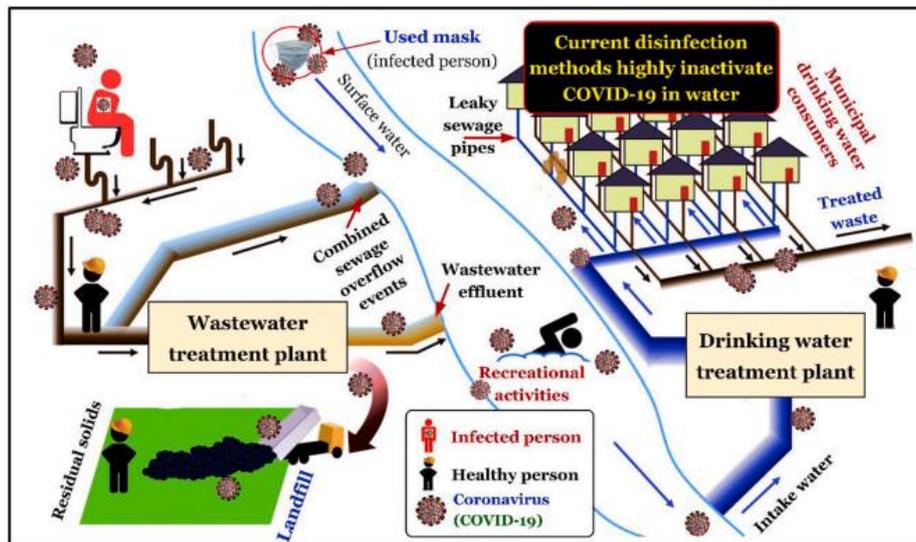
que conseqüentemente, ajuda a diminuir o tamanho geral do sistema de diagnóstico no qual o sensor está integrado. Nesse sentido, a técnica de serigrafia tem sido amplamente utilizada na produção de eletrodos para novas plataformas de sensoriamento e na melhoria de seus desempenhos [8, 9].

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1 COVID-19**

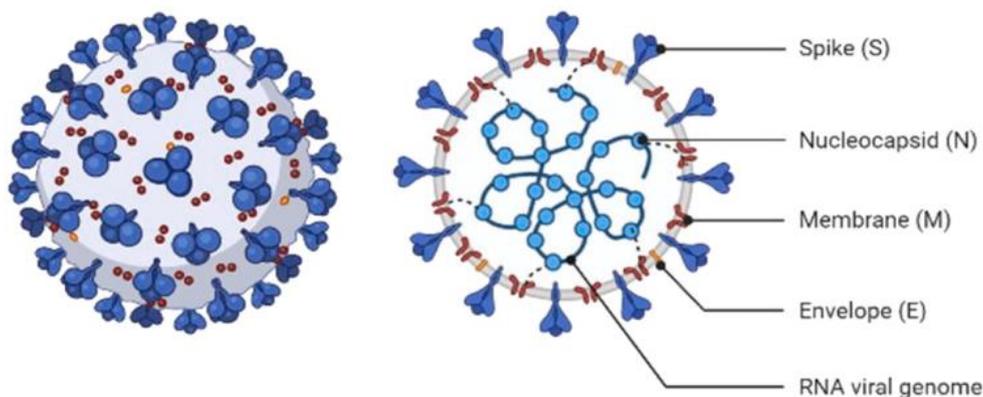
Diante das questões apresentadas, tem-se a principal forma de transmissão através de inalação ou contato com gotículas infectadas tendo como consequência casos assintomáticos ou sintomas leves, como ausência de olfato e paladar, como também casos graves em que apresentam febre alta, tosse e dispneia podendo agravar para o quadro de pneumonia e insuficiência respiratória o que representa uma alta taxa de mortalidade no mundo. Apesar da doença possuir fácil transmissão, a água é uma das formas mais eficazes de conter o novo coronavírus, em contrapartida aumentou-se a demanda de água potável e as necessidades de bilhões de pessoas que vivem em países em desenvolvimento que não têm acesso a água potável, facilitando a propagação do mesmo. Os vírus entéricos transmitidos pela água, principalmente transmitido via fecal-oral, de pessoa para pessoa ou o consumo de água ou alimentos contaminados pode representar um sério risco para a saúde de trabalhadores em instalações de tratamento de águas residuais, bem como para a comunidade circundante, como mostra a Figura 1. Essa via de transmissão, através do sistema de encanamento sanitário (ou de águas residuárias), pode ser provavelmente responsável pela contaminação ambiental e disseminação do COVID-19 (Coronavirus Diales 2019) nas comunidades [2, 3, 8].

**Figura 1:** Rota de transmissão do vírus SARS-CoV-2 nos edifícios através do sistema de encanamento sanitário ou de águas residuárias. Adaptada de Tran et al. 2021 [8].



Coronavírus possui esse nome por conter pontas semelhantes a coroas na superfície externa do vírus, possuem em torno de 65 a 125 nm de diâmetro e por isso sua transmissão é tão fácil. A Figura 2 mostra a estrutura do SARS-CoV-2 que possui a glicoproteína de envelope pequeno (E), membrana de glicoproteína (M), proteína do nucleocapsídeo (N), na qual envolve o RNA viral, e a glicoproteína de pico (Spike) que é responsável pela entrada do vírus nas células hospedeiras, sendo um processo sequencial envolvendo a fixação celular e endocitose. A função da proteína de envelope inclui o desenvolvimento do envelope e a patogênese. A proteína Spike utiliza a angiotensina 2 (ACE2) como receptor e assim o RNA que está no interior do vírus é liberado. As mutações que essa proteína sofre permitem a ligação a esse receptor mais facilmente garantindo assim, a entrada celular para o vírus [2, 11].

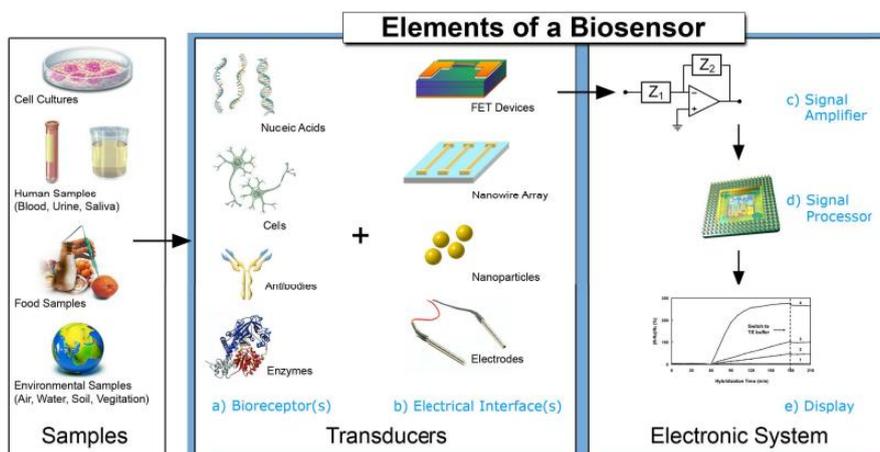
**Figura 2:** Estrutura do coronavírus. Adaptado de Ferreira, G., et al [12].



## 2.2 Biossensores

Os biossensores podem ser empregados para a detecção da proteína *Spike*. Um biossensor é um dispositivo analítico que possui um material biológico imobilizado (enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, tecidos, polissacarídeo, bactéria, entre outros) - no qual é feito o reconhecimento de uma determinada substância (proteína, toxina, peptídeo, vitamina, açúcares, íon metálicos) por meio de uma reação bioquímica específica - com um elemento transdutor usado para a identificação e quantificação de um analito de interesse. Ele também é capaz de fornecer informações analíticas quantitativas e medições não havendo a necessidade de etapas envolvendo reagentes adicionais, facilitando e otimizando análises. O esquema geral dos biossensores pode ser visualizado na Figura 3 [11, 15].

**Figura 3:** Elementos e componentes típicos de biossensores [14].



São usados como elemento de transdução de materiais condutores e semicondutores, comumente conhecido como eletrodo, em que a energia química que ocorre entre o patógeno e o material imobilizado no transdutor é convertida em energia elétrica por conta da interação do eletrodo com uma solução eletrolítica. Os sensores baseados em reações enzimáticas em função do oxigênio consumido foram considerados biossensores de primeira geração, e que com sua evolução, os de segunda geração apresentaram independência em relação a quantidade de oxigênio dissolvida por conta da presença de um mediador redox permitindo a oxidação da glicose. Já os biossensores de terceira geração apresentam a transferência direta de elétrons entre o cofator enzimático e o eletrodo, na qual durante a conversão do substrato um par redox no sítio ativo tende a ceder elétrons e a outra aceitar [13, 16].

Os sensores eletroquímicos possuem como vantagem uma rapidez na geração de resposta, simplicidade experimental e relativo baixo custo quando comparados aos métodos mais tradicionais, como o método Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), o que os torna viável para que dispositivos deste porte possam ser otimizados e comercializados para os mais diversos fins. Além disso, devido à simplicidade de instrumentação, os dispositivos eletroanalíticos são facilmente submetidos à miniaturização, permitindo maior portabilidade e possibilidade de análise *in loco*, muitas vezes requerida em análises ambientais [11].

### **2.3 Imunossensores**

Já os imunossensores são um tipo de biossensor que se baseiam na resposta antígeno-anticorpo imobilizados na superfície do transdutor. A presença de anticorpos é capaz de identificar patógenos presentes por conta de uma infecção e por isso é possível usar imunoenaios para detectar alvos específicos. Os analitos podem ser identificados de duas formas: na técnica *label-dependent* possuindo um marcador, o que resulta em uma mudança colorimétrica ou de fluorescência no sinal, e de forma *label-free*, onde o analito se liga a uma molécula causando alterações no microsistema, como flutuações de impedância [13]. Diferentes métodos para utilização dos imunossensores foram desenvolvidos ao longo dos anos para solucionar algumas limitações, como o custo dos ensaios de anticorpo-antígeno e estabilidade em um único dispositivo integrado. O uso de anticorpos marcados com enzimas é uma estratégia muito comum para gerar reações

redox e produzir um sinal amperométrico. O imunossensor voltamétrico, é baseado em técnicas eletroanalíticas em que a detecção de antígenos é realizada através da variação de sinal corrente resultante da sua interação com o anticorpo imobilizado na presença de uma sonda que reage eletroquimicamente com a superfície dos eletrodos de trabalho [17-19].

Um dos maiores problemas enfrentados na utilização de imunossensores é a imobilização do anticorpo específico na superfície do eletrodo mantendo também a bioatividade dos anticorpos para a imunorreação (reação do antígeno com o seu anticorpo). Por isso, ao longo dos anos têm-se empregado uma variedade de nanomateriais no desenvolvimento de imunossensores, tendo como exemplo as nanopartículas de ouro e o carbon black [19].

Imunossensores amperométricos vêm sendo amplamente utilizados na detecção de biomarcadores proteicos vinculados ao câncer e a doença de Alzheimer, por exemplo. Seu mecanismo de funcionamento é baseado na medida de corrente resultante da aplicação de um potencial constante no eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo de referência. Na literatura, Li et al desenvolveu um imunossensor reutilizável baseado em eletrodo de ouro modificado com grafeno dopado com nanopartículas superparamagnéticas e conjugados com anticorpos anti- $\beta$ A42 [20].

Os fatores mais importantes que afetam o desempenho de um imunossensor são a camada de bioreconhecimento e o transdutor, por isso, para que aconteça a imobilização do anticorpo específico, o eletrodo desenvolvido com um filme de carbono foi capaz de detectar a proteína *Spike* utilizando o anticorpo *Spike* IgG anti-SARS-CoV-2. Para compor a estrutura do eletrodo foi usado também uma tinta condutora à base de grafite e esmalte (sendo uma mistura de polímeros e solventes), com grande potencial para o suporte de tinta condutora conferindo flexibilidade, resistência e durabilidade ao filme [19, 21].

## 2.4 Nanopartículas de Ouro

As nanopartículas (NP) são partículas com diâmetro entre 1 e 10 nm, em que suas propriedades são definidas de acordo com seu tamanho. Possuem estruturas eletrônicas que possibilitam sua aplicação nas mais diversas áreas, como na medicina, física, óptica e como no presente estudo, na química. Um dos nanomateriais mais

utilizados para modificação em biossensores são as nanopartículas de ouro (AuNPs), em que suas propriedades determinam a eficiência de carregamento dos anticorpos e a capacidade de resistir à interferência, que têm grande influência no desempenho de detecção de ensaios *in vitro* [22].

As AuNPs estão ganhando notoriedade considerável neste campo devido à sua excepcional compatibilidade com biomoléculas, estabilidade e propriedades de amplificação de sinal. Sua popularidade decorre do fato de formarem sistemas mais biocompatíveis e sua capacidade de ser funcionalizada com uma gama de biomoléculas, as torna mais amplamente utilizadas [23].

Possuem vantagens como fácil preparação, alta área superficial específica e alta condutividade elétrica, como também se mostra compatível com estruturas celulares e biomoléculas. De acordo com a literatura, as nanopartículas bimetálicas têm atividade eletrocatalítica melhor em comparação com nanopartículas monometálicas. Esse método tem a capacidade de aumentar a quantidade de anticorpos imobilizados, como também acelerar o processo de transferência de elétrons para o aumento de sinal [24, 25].

Quando se utiliza nanopartículas, os níveis de energia dos elétrons não são contínuos quando comparados ao metal bulk. Ocorre uma mudança na área de superfície e confinamento de elétrons que tem como consequência a mudança de propriedades dos materiais como, por exemplo, o ponto de fusão, fluorescência, condutividade elétrica, permeabilidade magnética e reatividade química. Para a detecção de proteínas, o uso de nanopartículas tem a capacidade de aumentar a quantidade de anticorpos imobilizados, como também acelerar o processo de transferência de elétrons para o aumento de sinal. Além disso, a ação eletrocatalítica das nanopartículas, pode facilitar as medidas amperométricas de baixo potencial do imunossensor eletroquímico [26].

## **2.5 Carbon Black**

O negro de fumo (do inglês, *carbon black* (CB)) é um nanomaterial condutor que possui baixo custo e em sua maioria provém da combustão de derivados de petróleo, sendo utilizado para o desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos, como os biossensores. Esse material pode ser empregado na forma de uma dispersão coloidal para o desenvolvimento de filmes, além disso, é facilmente modificado por diversos materiais como nanopartículas metálicas ou de óxidos metálicos [27, 28]. Possui ampla variação de

diâmetro (3,0 – 100 nm), em que essas partículas de carbono geralmente são agregadas, que podem se estender por três dimensões, formando aglomerados maiores. Porém, esse arranjo estrutural pode ser alterado quando um dispersante adequado é incorporado ao material, aumentando sua área de superfície [28].

Outra vantagem importante é a rápida transferência de carga e alta sensibilidade analítica podendo facilitar os resultados no desenvolvimento de sensores eletroquímicos, apesar de seu uso ser relativamente recente. O emprego de CB para a detecção de analitos de interesse ambiental tem sido reportado, como exemplo na identificação de contaminantes emergentes como os pesticidas organofosforados e herbicidas [29]. Já na indústria farmacêutica e biológica, Paczosa-Bator e colaboradores desenvolveram uma plataforma de um sensor potenciométrico baseada em CB modificado para detectar íons sódio, potássio, clorato e nitrato [30, 51]. Para o projeto em questão, o CB foi utilizado com o intuito de modificar a superfície do eletrodo impresso de carbono, além de utilizar nanomateriais para ancorar o AB anti-*Spike*, já que possui propriedade condutora e grande área de superfície.

## 2.6 Imunossensores para COVID - 19

Há estudos na literatura que desenvolveram imunossensores para a detecção do vírus que causa a doença da COVID-19, como Zhai, et al, no qual utilizou grafeno dopado com nitrogênio (N-HRGO), sendo a solução de grafeno usada para modificar um eletrodo de carbono vítreo. Como resultados, o N-HRGO possui excelentes propriedades físico-químicas com uma grande área de superfície e boas propriedades catalíticas devido à presença de orifícios e bordas expostas para fornecer canais de transporte de íons/massa abundantes e locais ativos. Para a detecção do vírus, o resultado indica que o imunossensor eletroquímico conforme preparado tem boa seletividade para a detecção da proteína *Spike* COVID-19, mesmo em um sistema de mistura (sistema formado por duas ou mais substâncias puras) [31].

Outro estudo para ser citado, foi desenvolvido por Liv, Lokman, onde usou um eletrodo de carbono vítreo modificado com clusters de ouro (Au) encapados com cisteamina (Cys), glutaraldeído (Glu), a proteína *Spike* do antígeno SARSCoV-2 (gene S) e albumina sérica bovina (BSA), tendo ao todo, gene BSA/S/Glu/Cys/Au/GCE. De forma simples, rápida, com baixo custo e ultrasensível foi determinado

voltametricamente o pico de AB SARS-CoV-2 em amostras reais e sintéticas. A partir dos resultados, o uso dessas modificações trouxe resultados satisfatórios no que diz a respeito da detecção do vírus, além disso, o método desenvolvido é melhor do que a técnica de RT-PCR em termos de tempo de análise e custo [32].

### 3. Objetivos:

O objetivo do presente projeto foi a detecção de SARS-CoV-2 em amostras ambientais (água de rio) e clínicas (saliva artificial e soro sanguíneo) empregando-se um imunossensor eletroquímico descartável, modificado com nanopartículas de ouro, carbon black, e anticorpos anti-*Spike*. Os objetivos específicos foram:

- Confeccionar um eletrodo impresso à base de tinta de carbono em substrato de PET;
- Sintetizar nanopartículas de ouro pelo método de Turkevich para preparação do filme à base de carbon black;
- Preparo e armazenamento de sínteses com proteínas;
- Aplicação de técnicas voltamétricas para analisar informações qualitativas e quantitativas do projeto em questão;
- Aplicar o eletrodo modificado para a detecção do vírus SARS-CoV-2 em amostras ambientais e clínicas;
- Análise de custo e eficiência do eletrodo desenvolvido.

### 4. Metodologia

#### 4.1 Reagentes e soluções

As soluções foram preparadas a partir de reagentes de grau de pureza analítica dissolvidos em água ultrapura. Os reagentes e produtos químicos a seguir empregados nos experimentos foram adquiridos de Sigma-Aldrich: cloreto de ouro, borohidreto de sódio, solução de glutaraldeído (GA) a 25% (v/v), ferrocianeto de potássio, monohidrogenofosfato de potássio, dihidrogenofosfato de potássio, cloreto de potássio, cloreto de magnésio, dihidrogenofosfato de sódio, ácido sulfúrico, ácido clorídrico, cloreto de sódio, amônia, cloreto de cálcio, alanina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, valina, ácido ascórbico, albumina, ureia, 1,4- $\alpha$ -D-

Glucano-glucanohidrolase ( $\alpha$ -amilase da saliva humana) e soro humano masculino do sangue total coagulado AB (filtrado estéril). O dicloridrato de cistamina (Cys) e a albumina sérica bovina (BSA) (99%) foram adquiridos da Nfinitu Tech LLC (EUA). O carbon black (VCX72R) foi gentilmente doado pela Cabot® (EUA). A proteína recombinante Spike Sars-Cov-2 (S1) (SARS-CoV-2) (SP, 76,45 kDa) e o anticorpo anti-proteína Spike de SARS-CoV-2 (anti-SP Ab) foram adquiridos da Sino Biological (China). O pó de grafite foi adquirido de Fischer Chemical (EUA), enquanto a tinta condutora de prata foi obtida da EMS (EUA). O esmalte para cuidados com as unhas (Base Brilho Cuidados, Cora©, São Paulo, Brasil) foi utilizado como veículo à base de polímero para a produção de tinta condutora. Folhas de polietileno tereftalato (PET) foram adquiridas de garrafas de refrigerantes descartadas encontradas no mercado local de Campina do Monte Alegre (São Paulo, Brasil).

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (com resistividade  $\geq 18$  M $\Omega$ -cm) a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore®).

#### **4.1.1 Preparo de soluções**

A solução tampão fosfato com concentração analítica de 0,10 mol L<sup>-1</sup> e pH 7,4 foi preparada com a dissolução de quantidades apropriadas de dihidrogenofosfato de sódio e hidrogenofosfato dissódico em água destilada.

Para o preparo da solução usada nas medidas com o imunossensor, foram pesadas quantidades apropriadas de ferricianeto de potássio, ferrocianeto de potássio e cloreto de potássio, os quais foram dissolvidos em água destilada resultando em soluções de K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] / K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 4 mmol L<sup>-1</sup> em KCl 0,10 mol L<sup>-1</sup>.

#### **4.1.2 Síntese de Nanopartículas de ouro**

Para a síntese das nanopartículas de ouro, foi utilizado o método de redução de citrato (Método de Turkevich) com adaptações. Toda a vidraria e o agitador magnético foram cuidadosamente higienizados com água régia e depois enxaguados com água ultrapura e secos. Esta etapa foi necessária para evitar a agregação de partículas de ouro residuais e nucleação indesejada durante os procedimentos de síntese. Todos os lotes de nanopartículas de ouro foram armazenados em local escuro com frasco envolto em papel

alumínio para minimizar a oxidação e dentro de um refrigerador para diminuir a influência do calor.

Inicialmente, uma quantidade de 758,4 mg de  $\text{AuCl}_3$  foi dissolvida em 50 mL de  $\text{HCl}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , o que deu origem a  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  de solução de  $\text{HAuCl}_4$ . Posteriormente, uma quantidade de 590  $\mu\text{L}$  desta solução foi adicionada à 90 mL de água sob agitação vigorosa contínua à temperatura ambiente, dando à solução uma cor amarelo-pálido. Após 1 min de agitação, 1,0 mL de citrato de sódio  $38,8 \text{ mmol L}^{-1}$  foi adicionado à mistura que foi mantida sob agitação novamente por mais um minuto. Finalmente, uma solução composta por 1,0 mL de borohidreto de sódio a 0,075 % e citrato de sódio de  $38,8 \text{ mmol L}^{-1}$  foi adicionada à mistura para evitar agregação, e isso instantaneamente alterou a cor de dispersão para vermelho rubi. A mistura foi então mantida sob agitação por 10 min (Figura 4). O pH da solução coloidal resultante foi ajustado para 6,0 usando  $\text{KOH}$   $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  para evitar a desestabilização de partículas devido à protonação de citrato. Por fim, o Erlenmeyer foi armazenado em um recipiente próprio em refrigerador ( $4^\circ\text{C}$ ) [50, 26].

**Figura 4:** Nanopartículas de ouro sintetizadas empregando método com redução de citrato (Método de Turkevich) com algumas adaptações [26].



#### 4.1.3 Preparação do filme a base de carbon black 0,1% m/v

Em um microtubo pesou-se 0,5 mg de carbon black em seguida adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de AuNPs. A mistura foi levada durante 20 minutos no ultrassom, resultando em uma dispersão de CB AuNP-1,0  $\text{mg mL}^{-1}$  [33].

#### 4.1.4 Preparação de saliva artificial

A saliva artificial foi preparada com base no estudo de Bjorklund e colaboradores, sendo composta por 34 reagentes listados abaixo, que foram pesados para atingir a concentração desejada afim de produzir 250 mL de saliva artificial. Foi acrescentado todos os reagentes em um balão volumétrico no qual foi completado com água destilada [34]. Os seguintes reagentes utilizados para a saliva artificial foram: Fosfato monopotássico (2,6  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Magnésio (0,2  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Fosfato monossódico (2,6  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Amônia (4,4  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Cloreto de cálcio (1,4  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Alanina (0,0371  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Ácido aspártico (0,012  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Cloreto de sódio (10  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Cisteína (0,05  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Ácido glutâmico (0,0265  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Cloreto de potássio (15,6  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Glicina (0,1185  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Histidina (0,0064  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Isoleucina (0,0221  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Leucina (0,0221  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Lisina (0,0185  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Metionina (0,0002  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Fenilalanina (0,0176  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Prolina (0,0017  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Serina (0,02  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Taurina (0,075  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Treonina (0,0243  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Triptofano (0,01  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Tirosina (0,0116  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Valina (0,0154  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Ácido ascórbico (0,005  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Tiamina (0,00002  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Riboflavina (0,00013  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Biotina (0,0000033  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Ácido fólico (0,00000023  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Albumina (0,0004  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Inositol (0,01  $\text{mmol L}^{-1}$ ); Mucina (5  $\text{g L}^{-1}$ ) e Uréia (2,9  $\text{mmol L}^{-1}$ ).

## 4.2 Equipamentos

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 101 (Metrohm Autolab, NL) conectado à um computador com sistema operacional Windows 10<sup>®</sup>. O tratamento dos dados foi realizado em software Nova 2.1.4 e OriginPro<sup>®</sup>.

As medidas de pH das soluções foram feitas em pHmetro Jenway 3510, com eletrodo de vidro combinado Ag/AgCl/KCl 3,0  $\text{mol L}^{-1}$ .

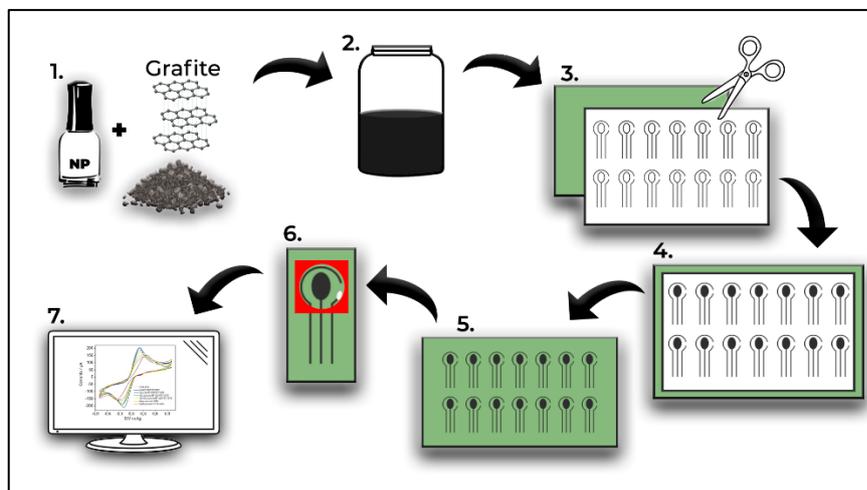
Para o preparo das soluções, utilizou-se uma balança analítica digital Bel Engineering modelo M214Ai.

### **4.3 Eletrodo impresso descartável (SPE-PET)**

Na Figura 5 é apresentado o processo que envolve a fabricação do SPE-PET. Para a confecção dos eletrodos descartáveis foram usadas garrafas PET reutilizadas. A folha PET foi lavada com detergente neutro e após a secagem, a folha foi lixada (com lixa 150) em uma única direção para facilitar a deposição da tinta nas ranhuras do PET, e então ela foi limpa com álcool 70% para remover quaisquer resíduos. Imprimiu-se em folhas de papel adesivo o formato do eletrodo e colou-se na folha de PET de 25×35 mm.

A tinta condutora de carbono foi preparada conforme procedimento previamente relatado na literatura [11]. Resumidamente, 18,9 g de pó de grafite foi adicionada a 27g de esmalte (Etapa 1 e 2), o que resultou em uma suspensão final com aproximadamente 41% (m/m) de teor de carbono. Esta suspensão foi submetida a 3 ciclos de centrifugação a 3500 rpm durante 3 min em uma centrífuga assimétrica dupla SpeedMixer™ Dac 150.1 FVZ-K (FlackTec Inc). Em seguida, com o auxílio de uma espátula, recobriu-se com tinta condutora à base de grafite e esmalte seguindo a mesma direção dos sulcos causados pelo lixamento (Etapas 3 e 4). Por fim, esperou-se a secagem completa da tinta para remover o adesivo e recortar os eletrodos individualmente (Etapas 5 e 6). Com o auxílio de um pincel, o eletrodo de referência foi pintado com tinta de prata e empregou-se esmalte de unha para isolar o contato do eletrodo de trabalho (área geométrica = 0,196 cm<sup>2</sup>). Por fim, aplicou-se o espaçador e delimitador de gota (volume de célula = 100 µL) (Etapa 6).

**Figura 5:** Esquema de confecção do eletrodo impresso descartável. Fonte: Autor próprio, 2022.



#### 4.4 Preparação do imunossensor AuNPs-CB/SPE-PET

Para as análises, o SPE-PET foi modificado com 20  $\mu\text{L}$  de solução à base de carbon black e logo em seguida foi levado ao dessecador por aproximadamente 30 minutos. Após o período de secagem, lavou-se o eletrodo com água destilada e foi feita a varredura em 100  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,4 para ativação do eletrodo. Na segunda etapa, foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de cistamina (Cys) 10 mmol  $\text{L}^{-1}$ , levado ao dessecador por 1 hora. Na terceira etapa foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de glutaraldeído (GA) a 2,5% (m/v), levando 1 hora para secar, e na quarta etapa, adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  de anticorpo (Anti-SP Ab) 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em tampão fosfato salino (PBS) 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,4 e aguardou-se 2 horas em refrigeração. Finalmente, 25  $\mu\text{L}$  de solução de BSA 1% (m/v) foi usada para bloquear sítios de ligação não específicos na superfície do eletrodo por 30 minutos. Ao final de cada um dos procedimentos supracitados, o eletrodo foi lavado com PBS 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH 7,4).

#### 4.5 Comportamento eletroquímico do imunossensor AuNPs-CB/PET-SPE

As caracterizações eletroquímicas do PET-SPE, CB/PET-SPE e AuNPs-CB/PET-SPE foram realizadas utilizando voltametria cíclica em duas condições diferentes: i) em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ ; ii) em KCl 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  na presença de 2,0 mmol  $\text{L}^{-1}$   $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/\beta-}$  utilizado como sonda eletroquímica para estimar as respectivas áreas

ativas dos eletrodos e os valores da constante heterogênea de transferência de elétrons,  $k^0$ .

A análise da voltametria cíclica foi realizada utilizando-se  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/\beta-}$  4,0 mmol L<sup>-1</sup> e PBS (pH 7,4) 0,1 mol L<sup>-1</sup> para avaliar o efeito de modificações adicionais nos eletrodos em termos da fixação molecular de anti-*Spike* Ab. Para as demandas analíticas, o imunossensor AuNPs-CB/PET-SPE foi avaliado por voltametria de onda quadradas (Square wave voltammetry - SWV) utilizando  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/\beta-}$  4,0 mmol L<sup>-1</sup> e PBS (pH 7,4) 0,1 mol L<sup>-1</sup> antes e depois a etapa de incubação na presença da substância para análise. A variação de corrente SWV normalizada,  $(I_0-I)/I_0$ , foi utilizada para minimizar quaisquer variações na área do eletrodo potencialmente causadas pelo processo de fabricação manual do SPE.

O limite de detecção (LOD) do imunossensor AuNPs-CB/PET-SPE foi estimado por meio de regressão logística de cinco parâmetros (5PL) e Equações 1-3 em toda a faixa de concentração. Esta abordagem é útil para ensaios biológicos e situações em que a intensidade do sinal mostra uma dependência logarítmica da concentração do analito [35, 36].

$$L_C = \mu_{blank} + t_{(95\%, n-1)} \times \sigma_{blank} \quad (1)$$

Aqui,  $L_C$  é o limite do branco – este é um valor crítico relacionado às intensidades de sinal em branco que tem 5% de probabilidade de resultar em um falso positivo;  $\mu_{blank}$  é a média das intensidades de sinais para  $n = 9$  repetições do branco;  $\sigma_{blank}$  é o desvio padrão (do inglês, *Standard Deviation* - SD) das replicatas do branco; e  $t_{(95\%, n-1)}$  é o valor de t-Student para  $n-1$  graus de liberdade com 95% de confiança.

$$L_D = L_C + t_{(95\%, m(n-1))} \times \sigma_{test} \quad (2)$$

Na Equação 2,  $L_D$  representa o limite de detecção do sinal – ou seja, o menor valor do sinal com 5% de probabilidade de resultado falso negativo;  $\sigma_{test}$  é o desvio padrão agrupado de  $(I_0-I)/I_0$  valores para  $n=3$  repetições para cada ponto de  $m=10$  concentrações

da curva, que pode ser calculado usando a Equação 3; e  $t_{(95\%, m(n-1))}$  é o valor de t-Student para  $m(n-1)$  graus de liberdade com 95% de confiança.

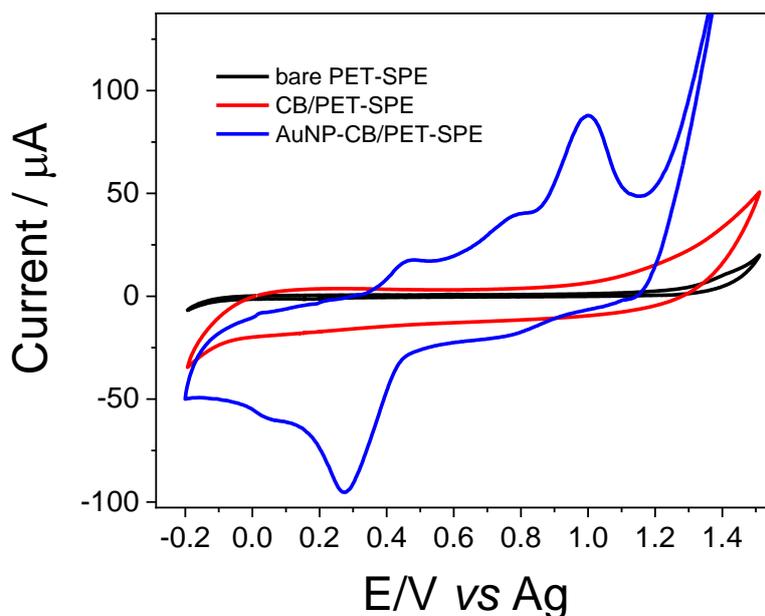
$$\sigma_{test} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m \sigma_i^2}{m}} \quad (3)$$

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Caracterização eletroquímica do imunossensor *AuNPs-CB/PET-SPE*

A Figura 6 apresenta uma análise comparativa dos voltamogramas cíclicos obtidos para os PET-SPE, CB/PET-SPE e AuNPs-CB/PET-SPE aplicados em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ . A adição da dispersão AuNPs-CB na superfície do eletrodo resultou em uma resposta voltamétrica típica para o ouro policristalino, que é caracterizada por três correntes de pico anódicas em torno de 0,456 V, 0,780 V e 1,000 V e atribuídas a voltametrias específicas de diferentes planos cristalinos de ouro, sendo este um reflexo da oxidação de AuNPs em espécies de óxido. Um pico catódico bem definido observado a 0,270 V, enquanto outros picos menos intensos são observados a 0,750 V e 0,050 V, que estão relacionados à subsequente redução das espécies de óxido voltando ao ouro metálico [37-39].

**Figura 6:** Análise de voltametria cíclica obtida para PET-SPE branco (linha preta), CB/PET-SPE (linha vermelha) e o 10º ciclo voltamétrico de AuNPs-CB/PET-SPE (linha azul) com base na aplicação de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  como eletrólito de suporte, faixa de potencial de  $-0,2\text{V}$  a  $1,5 \text{ V}$  e velocidade de varredura de  $50 \text{ mVs}^{-1}$ .



As áreas eletroativas do PET-SPE, CB/PET-SPE, AuNPs/PET-SPE e AuNPs-CB/PET-SPE foram estimadas por voltametria cíclica utilizando  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$   $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em solução de  $\text{KCl}$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (Figura 7), com base na Equação de Randles-Sevcik (Equação 4).

$$I_p = \pm(2.69 \times 10)n^3 A D^{\frac{1}{2}} C v^{\frac{1}{2}} \quad (4)$$

sendo  $I_p$  é a corrente de pico (A),  $n$  é o número de elétrons transferidos durante o processo redox,  $A$  é a área eletroativa ( $\text{cm}^2$ ),  $D$  é o coeficiente de difusão do  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  nos respectivos meios ( $7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ),  $C$  é a concentração de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  ( $\text{mol cm}^{-3}$ ), e  $v$  é a velocidade de varredura de potencial ( $\text{V s}^{-1}$ ).

As áreas eletroativas obtidas para o PET-SPE, CB/PET-SPE, AuNPs /PET-SPE e AuNPs-CB/PET-SPE foram  $0,102 \text{ cm}^2$ ,  $0,130 \text{ cm}^2$ ,  $0,152 \text{ cm}^2$  e  $0,207 \text{ cm}^2$ , respectivamente; estes resultados mostram que a modificação dos eletrodos com

nanomateriais alterou significativamente a morfologia dos mesmos, aumentando sua rugosidade superficial. As mudanças correspondentes na cinética de transferência de carga foram avaliadas usando a constante aparente de transferência heterogênea de elétrons,  $k^0$ ; foi estimada com base no método de Nicholson para sistemas quase reversíveis [40].

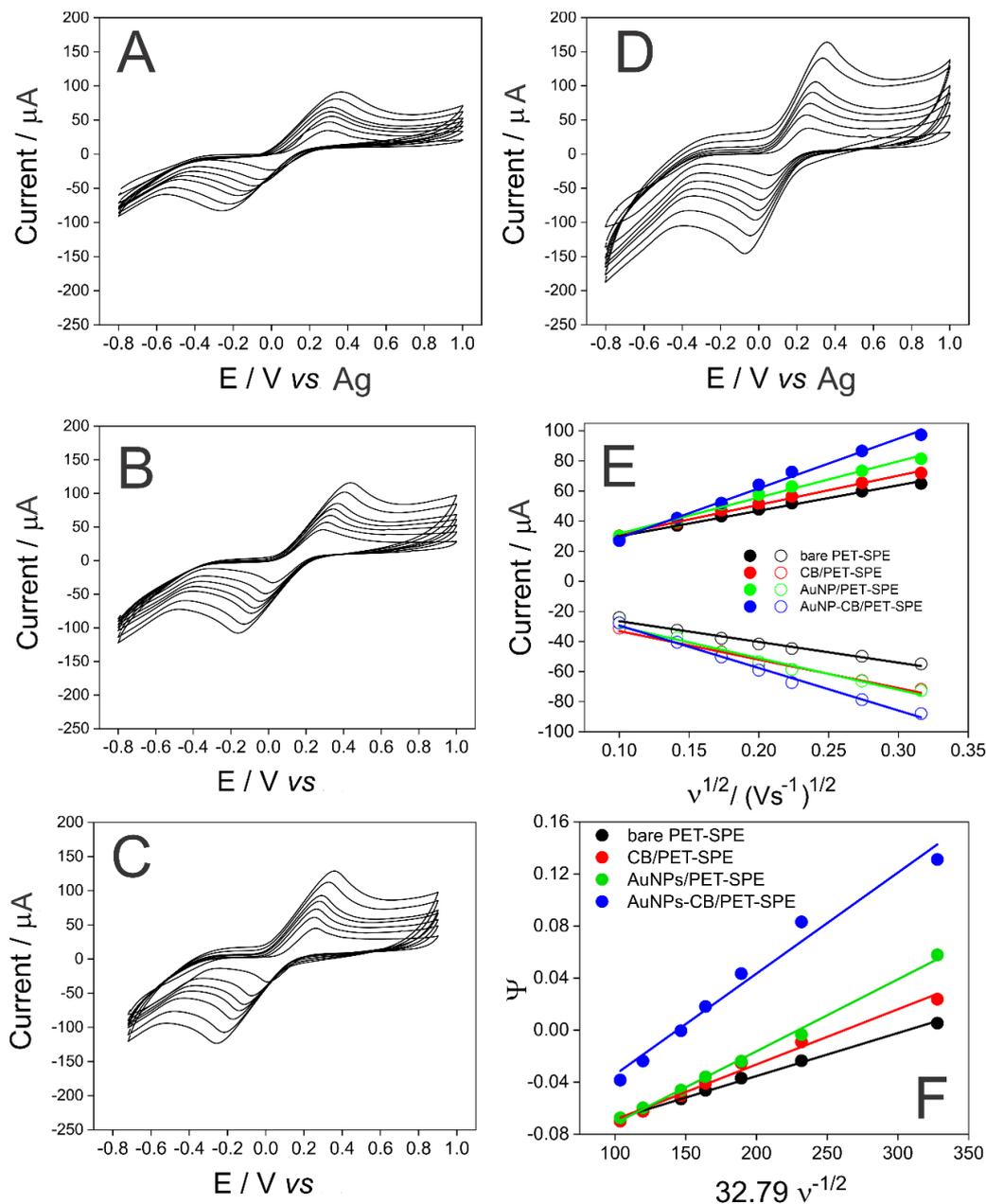
$$\Psi = k^0 [\pi D n v F (RT)]^{\frac{1}{2}} \quad (5)$$

Em que  $\pi = 3,1415$ ,  $F$  é a constante de Faraday ( $96.485 \text{ C mol}^{-1}$ ),  $R$  é a constante universal do gás ideal ( $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura termodinâmica ( $298 \text{ K}$ ) e  $\psi$  é um parâmetro cinético obtido da Equação 6 abaixo de proposto por Lavagnini *et. al* [41]:

$$\Psi = (-0.6288 + 0.0021 n \Delta E_p)(1 - 0.017 n \Delta E_p) \quad (6)$$

onde  $\Delta E_p$  é a separação pico-a-pico baseada nos voltamogramas cíclicos na Figura 7. Os valores de  $k^0$  foram obtidos pelos coeficientes angulares das curvas resultantes:  $3,31 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$  para PET-SPE;  $4,2 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$  para CB/PET-SPE e  $7,8 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$  para AuNPs-CB/PET-SPE; os resultados obtidos a partir das equações abaixo apontam para um aumento na reversibilidade à medida que os nanomateriais são incorporados na superfície do PET-SPE.

**Figura 7:** Voltamogramas cíclicos obtidos para solução de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$   $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em presença de  $\text{KCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$  utilizando (A) PET-SPE, (B) CB/PET-SPE, (C) AuNPs/PET-SPE e (D) AuNPs-CB/PET-SPE em diferentes velocidades de varredura potencial ( $10 - 100 \text{ mV s}^{-1}$ ). (E)  $I_p$  vs.  $v^{1/2}$ . (F)  $\Psi$  vs  $32.79v^{-1/2}$  (Fator 32,79 representa o valor numérico de  $[\pi D n F/(R T)]^{-1/2}$ ).



PET-SPE:	$\Psi = (-0,096 \pm 0,002) + (3,31 \pm 0,09) \times 10^{-4} v^{-1/2}$	(r = 0,998)
	$I_{pa} = (1,3 \pm 0,2) \times 10^{-5} + (1,69 \pm 0,07) \times 10^{-4} v^{1/2}$	(r = 0,995)
	$I_{pc} = (-1,3 \pm 0,2) \times 10^{-5} + (-1,38 \pm 0,09) \times 10^{-4} v^{1/2}$	(r = 0,990)
CB/PET-SPE:	$\Psi = (-0,106 \pm 0,004) + (4,20 \pm 0,20) \times 10^{-4} v^{-1/2}$	(r = 0,994)
	$I_{pa} = (1,2 \pm 0,1) \times 10^{-5} + (1,94 \pm 0,5) \times 10^{-4} v^{1/2}$	(r = 0,993)
	$I_{pc} = (-1,4 \pm 0,2) \times 10^{-5} + (-1,90 \pm 0,1) \times 10^{-4} v^{1/2}$	(r = 0,989)
AuNP/PET-SPE:	$\Psi = (-0,127 \pm 0,003) + (5,53 \pm 0,02) \times 10^{-4} v^{-1/2}$	(r = 0,998)
	$I_{pa} = (7,5 \pm 0,2) \times 10^{-5} + (2,4 \pm 0,1) \times 10^{-4} v^{1/2}$	(r = 0,993)
	$I_{pc} = (-1,0 \pm 0,3) \times 10^{-5} + (-2,1 \pm 0,1) \times 10^{-4} v^{1/2}$	(r = 0,994)
AuNPs-CB/PET-SPE:	$\Psi = (-0,112 \pm 0,010) + (7,80 \pm 0,50) \times 10^{-4} v^{-1/2}$	(r = 0,988)
	$I_{pa} = (-0,4 \pm 0,3) \times 10^{-5} + (3,3 \pm 0,1) \times 10^{-4} v^{1/2}$	(r = 0,996)
	$I_{pc} = (-0,1 \pm 0,2) \times 10^{-5} + (-2,8 \pm 0,2) \times 10^{-4} v^{1/2}$	(r = 0,996)

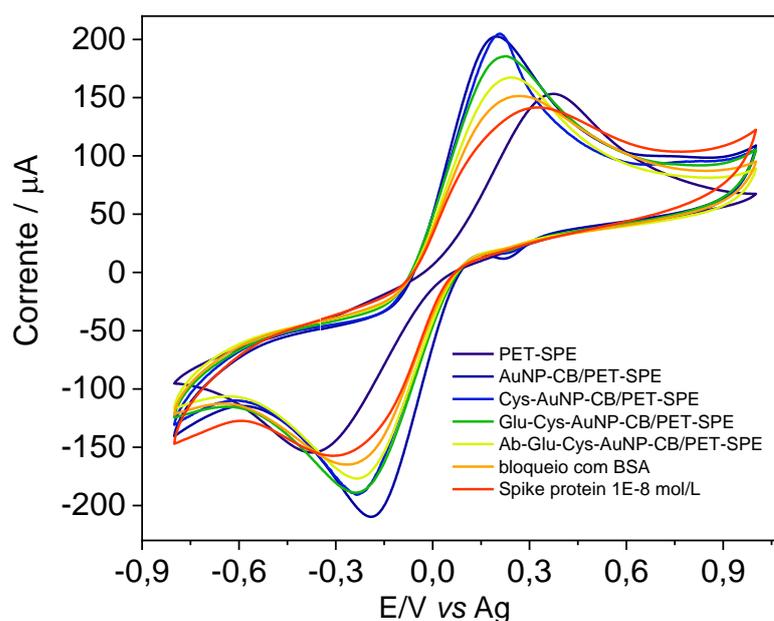
Na Figura 8 são apresentados os voltamogramas cíclicos registrados após cada uma das etapas empregadas para modificar a superfície do PET-SPE, a fim de produzir uma resposta de imunodeteção eficiente ao SARS-CoV-2 SP.

O primeiro procedimento de modificação, que envolveu a incorporação da dispersão AuNPs-CB na superfície do PET-SPE, causou um aumento significativo na resposta da sonda redox e uma notável melhora na reversibilidade, como discutido anteriormente, com uma diminuição substancial do valor de  $\Delta E$  de 0,745 V no PET-SPE (voltamograma preto) a 0,365 V em AuNPs-CB/SPE (linha azul claro). Este sistema quase reversível aprimorado tem as características necessárias consideradas adequadas para a aplicação no biossensoriamento. O voltamograma azul escuro indica a resposta relacionada à ligação de Cys à superfície de AuNPs que acontece através dos grupos dissulfeto. Neste ponto, a ligeira melhora observada na corrente anódica é atribuída às

interações eletrostáticas favoráveis entre os grupos  $\text{NH}_3^+$  de Cys e a sonda redox de carregada negativamente.

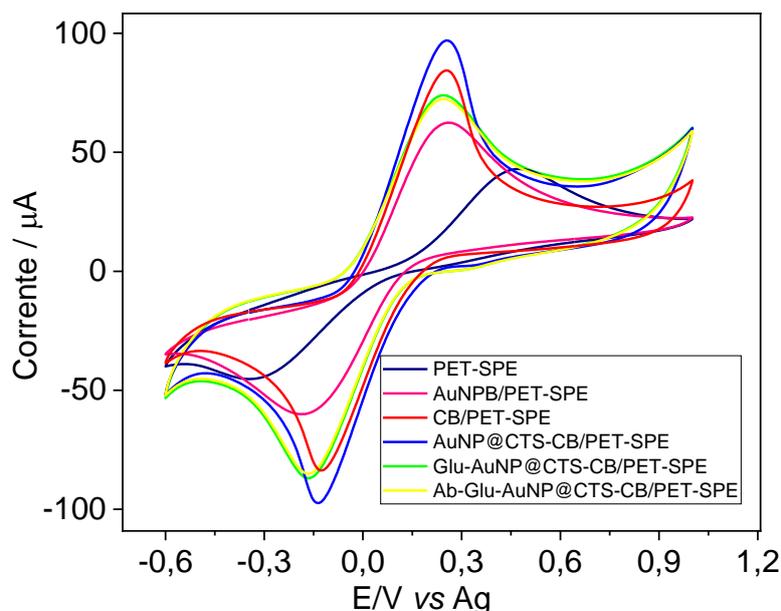
As sucessivas diminuições observadas na resposta, apontam para um declínio na cinética de transferência de carga que está associada à ligação molecular dos materiais modificadores: GA via reação de condensação com Cys (linha verde); Ligação anti-SP a sítios livres de GA (linha amarela); e bloqueio da BSA de locais de ligação não específicos (linha laranja).

**Figura 8:** Voltamogramas cíclicos obtidos após cada uma das etapas realizadas para modificar o PET-SPE em solução de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$   $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em presença de PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,4) na faixa de potencial de  $-0,8$  a  $1,0 \text{ V}$ , e velocidade de varredura de  $50 \text{ mVs}^{-1}$ .



Além do preparo do imunossensor citado anteriormente, foi adotada outra estratégia de modificação, fazendo a dispersão de CB em quitosana (CTS) com teor 0,1% (m/v), tendo o objetivo de ligar o anticorpo a este material através da ligação com glutaraldeído (Figura 9).

**Figura 9:** Voltamogramas cíclicos obtidos após cada uma das etapas realizadas para modificar o PET-SPE com CTS, em solução de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$   $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em presença de PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,4) na faixa de potencial de  $-0,8$  a  $1,0 \text{ V}$ , e velocidade de varredura de  $50 \text{ mVs}^{-1}$ .



Como pode ser observado com a diminuição da amplitude de sinal, houve uma resposta semelhante ao imunossensor sem emprego da CTS em relação ao aumento na resposta da sonda redox e melhora na reversibilidade, porém quando em presença de glutaraldeído (voltamograma verde) não houve a imobilização do anticorpo (voltamograma amarelo), e assim, o PET-SPE com CTS apresentou sinal analítico praticamente igual (antes e após a presença do anticorpo), não havendo diferença significativa no valor de corrente.

## 5.2 Otimização dos parâmetros SWV

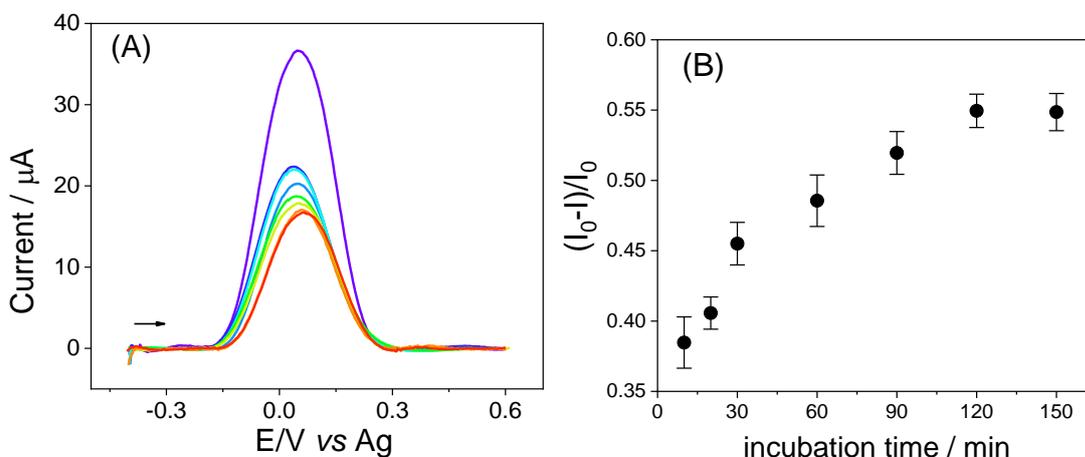
A resposta analítica do imunossensor AuNPs-CB/PET-SPE foi avaliada por SWV; a aplicação desta técnica voltamétrica permite a detecção de pequenas perturbações no sistema redox relacionadas às interações superficiais. Os experimentos de SWV foram realizados na presença de uma mistura contendo  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$   $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$   $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,4) na faixa potencial de  $-0,4$  a  $0,6 \text{ V}$ . Os

parâmetros da técnica foram otimizados entre as seguintes faixas: frequência ( $f$ ) de 1 a 50 Hz; amplitude de pulso ( $a$ ) de 10 a 110 mV; e incremento potencial ( $\Delta E$ ) = 1 a 5 mV. Foram definidos os seguintes valores otimizados: frequência ( $f$ ) = 5 Hz; amplitude de pulso ( $a$ ) = 100 mV; e incremento potencial ( $\Delta E$ ) = 2 mV.

### **5.3 Tempo de incubação da proteína *Spike***

O tempo de incubação da SP foi avaliado e os voltamogramas de SW foram registrados após diferentes períodos de incubação, variando entre 10 e 150 min, na presença do analito alvo. Os voltamogramas obtidos com a resposta de corrente normalizada em função do tempo são mostrados na Figura 10. Os resultados obtidos apontam para um decréscimo no pico de corrente à medida que o período de incubação aumenta na presença de  $7,65 \text{ ng mL}^{-1}$  de solução de SP; esse comportamento é atribuído à afinidade de interação entre o SP e o anti-SP Ab imobilizado em AuNPs-CB/PET-SPE, que causou um bloqueio mais efetivo da superfície quando longos períodos de carga foram empregados.

**Figura 10:** (A) Respostas SWV obtidas em diferentes períodos de incubação (linha vermelha: 10 min; linha laranja: 20 min; linha amarela: 30 min; linha verde: 60 min; linha azul pastel: 90 min; linha azul escuro: 120 min; linha azul claro: 150 min e linha roxa: branco.) de  $7,65 \text{ ng mL}^{-1}$  SP em presença de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$   $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$  PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,4) no intervalo de tempo de 10 - 150 min. Condições de SWV:  $f = 5 \text{ Hz}$ ;  $a = 10 \text{ mV}$ ;  $\Delta E = 2 \text{ mV}$ . (B) Variação de corrente normalizada,  $(I_0 - I)/I_0$ , vs tempo de incubação.



Para o período de incubação de 120 min e maiores, o sensor exibiu maior perda de corrente com valor médio de aproximadamente 55%; este é considerado o intervalo ideal no qual a condição de sensibilidade mais alta pode ser alcançada. O resultado obtido para este período de incubação mostra que não é adequado para o teste de diagnóstico rápido. Surpreendentemente, uma curva de calibração registrada usando incubação de 10 minutos mostrou supressão/perda de corrente média de 38%. Com base nesses resultados, foram avaliadas duas condições de calibração definidas: i) uma condição otimizada usando incubação de 120 min de soluções de SP, a fim de obter uma resposta mais sensível e precisa para análises quantitativas; e ii) uma calibração baseada em 10 min SP incubação direcionada à obtenção de resposta qualitativa aplicada como teste diagnóstico rápido para SARS-CoV-2.

#### 5.4 Curva de calibração

As Figuras 11A e 11B apresentam os voltamogramas de onda quadrada obtidos a partir do aumento das concentrações de SP de  $7,65 \times 10^{-15}$  para  $7,65 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$  por 10

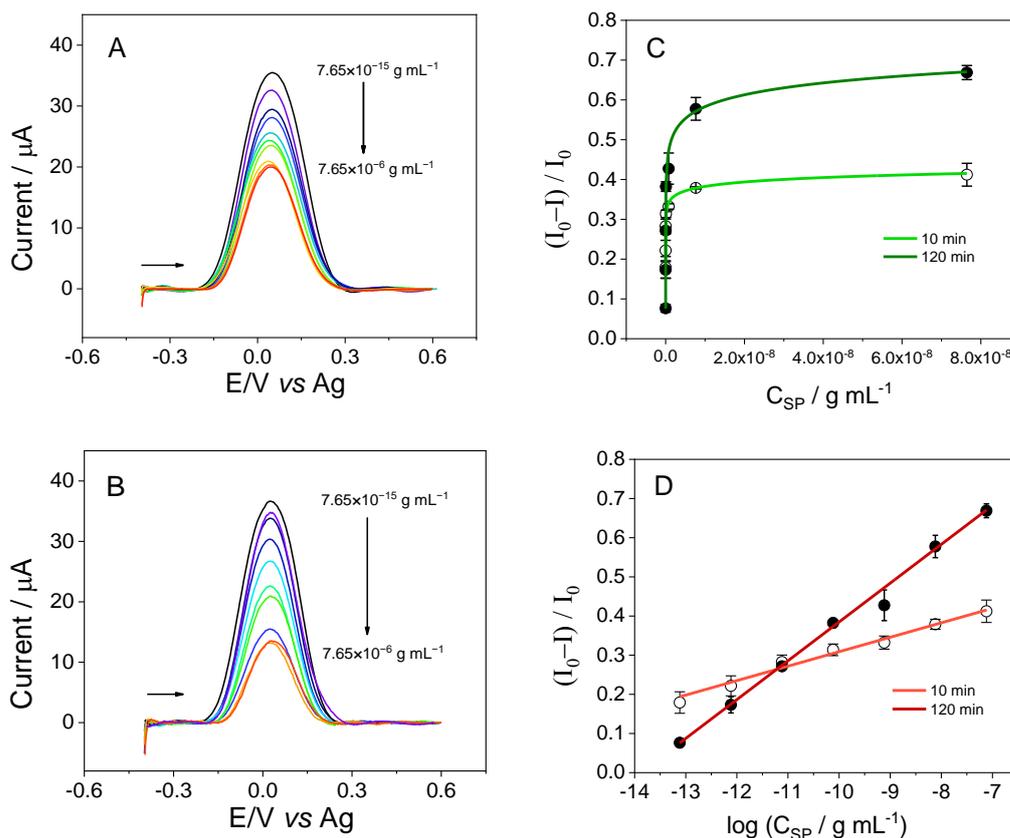
min e 120 min, respectivamente. Para ambas as condições, os gráficos de calibração apresentaram relações lineares (Equações 7 e 8) entre  $I_p$  e logaritmo da concentração de SP entre  $7,65 \times 10^{-14}$  a  $7,65 \times 10^{-8}$  g mL<sup>-1</sup> (Figura 11D).

$$(I_0-I)/I_{0[10 \text{ min}]} = (0,456 \pm 0,007) + (0,037 \pm 0,006) \times \log C_{SP} \quad r = 0,989 \quad (7)$$

$$(I_0-I)/I_{0[120 \text{ min}]} = (0,781 \pm 0,009) + (0,099 \pm 0,002) \times \log C_{SP} \quad r = 0,999 \quad (8)$$

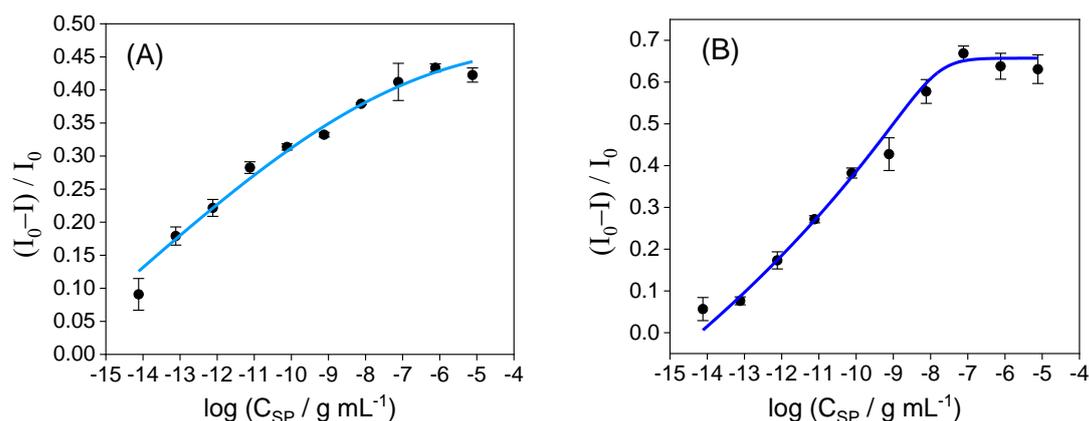
Como pode ser observado, a sensibilidade obtida a partir da aplicação de 120 min de incubação é de 2,7 vezes maior em comparação com a obtida para o tempo de incubação de 10 min; isso pode afetar significativamente a precisão da detectabilidade do sensor.

**Figura 11:** Resposta SWV obtida a partir de um aumento nas concentrações de SP (de  $7,65 \times 10^{-15}$  para  $7,65 \times 10^{-6}$  g mL<sup>-1</sup>) na presença de PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,4) contendo  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/\text{3-}}$  4,0 mmol L<sup>-1</sup> após (A) 10 min, e (B) 120 min de incubação; (C) Resposta de corrente vs. Concentração de SP; (D) Curva de calibração linear utilizando o log C<sub>SP</sub>. Condições do SWV:  $f = 5$  Hz;  $a = 10$  mV;  $\Delta E = 2$  mV.



O limite de detecção (LOD) do AuNPs-CB/PET-SPE foi estimado com base nas curvas ajustadas de regressão logística de cinco parâmetros (5PL) apresentadas na Figura 12. Os valores de LOD obtidos nos períodos de incubação de 10 min e 120 min foram  $101 \text{ fg mL}^{-1}$  e  $46,2 \text{ fg mL}^{-1}$ , respectivamente. O limite de quantificação (LOQ =  $3,33 \times \text{LOD}$ ) foi estimado apenas para o tempo de incubação de 120 min; o valor de LOQ obtido foi de  $154 \text{ fg mL}^{-1}$ .

**Figura 12:** Curva logística de cinco parâmetros para os períodos de incubação de (A) 10 min e (B) 120 min obtidos a partir da aplicação de SP (na faixa de concentração de  $7,65 \times 10^{-15}$  a  $7,65 \times 10^{-6}$  g mL<sup>-1</sup>) em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,4) na presença de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$  4,0 mmol L<sup>-1</sup>.

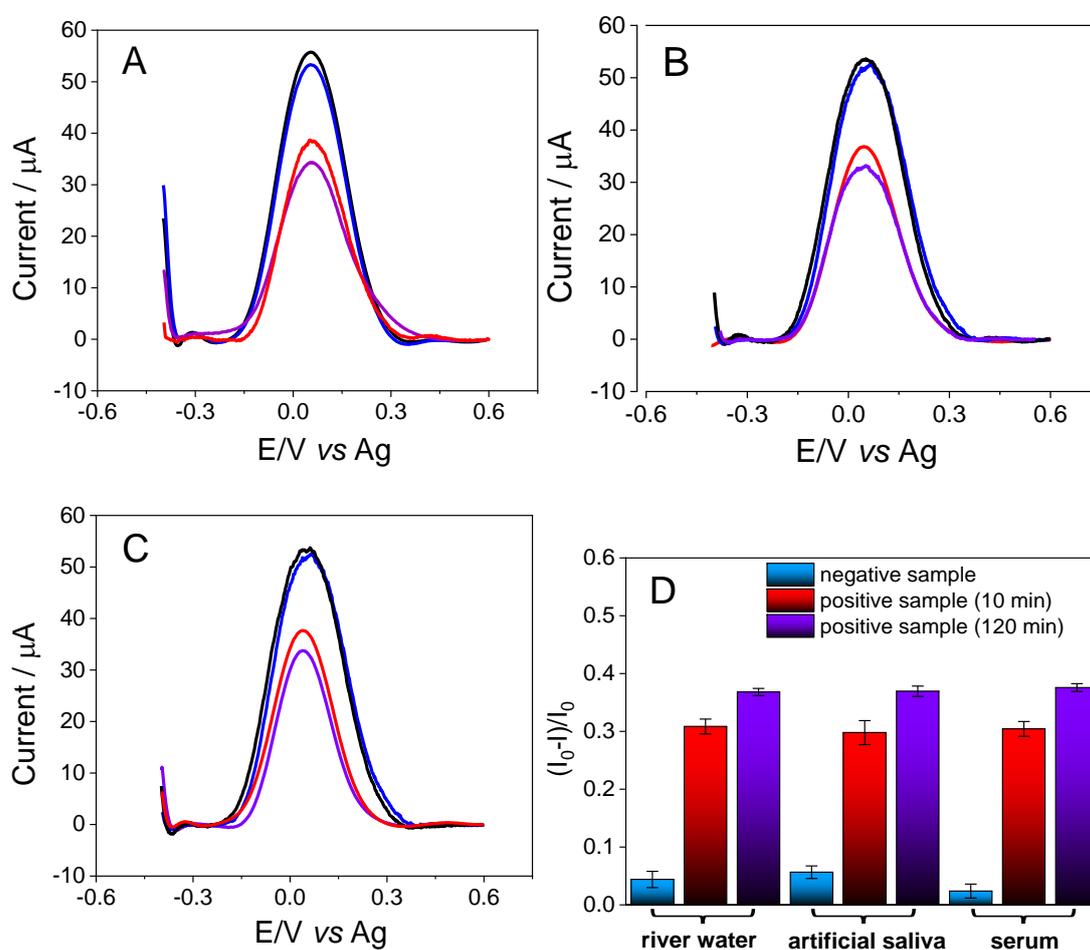


### 5.5 Análise do imunossensor AuNPs-CB/PET-SPE na detecção da proteína Spike em amostras reais

Uma análise foi realizada para avaliar o desempenho/eficiência do imunossensor AuNPs-CB/PET-SPE na detecção da SP do SARS-CoV-2 em três amostras diferentes: i) água do rio (amostra ambiental obtidas do rio Paranapanema em Campina do Monte Alegre, São Paulo, Brasil); ii) saliva artificial e iii) soro sanguíneo (amostras clínicas). Todas as amostras foram fortificadas com  $76,5 \text{ pg mL}^{-1}$  da proteína-alvo e submetidas a períodos de incubação de 10 min e 120 min; as amostras foram analisadas com base na respectiva calibração com vistas à obtenção de modos operacionais qualitativos e quantitativos do sensor.

A Figura 13 apresenta os voltamogramas SW obtidos para as amostras testadas. Os resultados obtidos para as amostras negativas (na ausência de antígeno) nos períodos de incubação de 10 min e 120 min não mostraram diferenças significativas. As magnitudes  $(I_0 - I) / I_0$  e as barras de erro mostradas na Figura 13D baseiam-se nos valores médios e no desvio padrão dos dados agrupados, respectivamente.

**Figura 13:** Respostas SWV obtidas para o imunossensor AuNPs-CB/PET-SPE desenvolvido em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,4) contendo [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-/3-</sup> 4,0 mmol L<sup>-1</sup> após a incubação das amostras: (A) água do rio, (B) saliva artificial e (C) soro sanguíneo. (D) Resposta de variação de corrente normalizada. Os padrões de cor representam solução do branco (linha preta), amostra negativa (azul) e amostra positiva contendo SP 76,5 pg mL<sup>-1</sup> em 10 min de incubação (vermelho) e 120 min de incubação (violeta). Condições do SWV:  $f = 5$  Hz;  $a = 10$  mV;  $\Delta E = 2$  mV.



As amostras negativas apresentaram baixa diminuição da corrente, que foi inferior a 6,7% da perda por sinal do branco; o valor registrado foi menor do que o valor necessário para a obtenção dos valores de LOD nas duas condições de calibração. Esse resultado apontou para a baixa interferência das matrizes das amostras. Como esperado, em comparação com as amostras positivas sob o regime de incubação de 10 min, as

amostras positivas sob o regime de incubação de 120 min apresentaram maior perda de corrente e menores valores de desvio padrão considerando as medidas realizadas em triplicata - isso pode ser atribuído ao estado de equilíbrio de afinidade observado em períodos mais longos de incubação. Os resultados obtidos para as amostras positivas estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Análise comparativa dos resultados obtidos para as amostras positivas avaliadas sob os dois regimes de incubação com base na aplicação do imunossensor AuNPs-CB/PET-SPE.

<b>Amostra</b>	<b>Água do rio</b>	<b>Saliva artificial</b>	<b>Soro sanguíneo</b>
SP adicionada concentração / pg mL <sup>-1</sup>	76,5	76,5	76,5
10 min de incubação (ensaio qualitativo)	+	+	+
120 min de incubação (ensaio quantitativo) / pg mL <sup>-1</sup>	(68 ± 9)	(71 ± 13)	(81 ± 14)

## 6. Análise comparativa de testes SARS-CoV-2 relatados na literatura baseados na detecção de Proteína Spike

Embora muitos trabalhos relatados na literatura tenham frequentemente apontado que os dispositivos de detecção são de baixo custo, poucos desses trabalhos apresentaram realmente o custo específico por unidade de teste. Para fins de comparação, a Tabela 2 apresenta um esboço dos dados coletados em diferentes dispositivos analíticos de baixo custo relatados na literatura que têm sido utilizados para testes de SARS-CoV-2 baseados na detecção de proteína *Spike*. Como pode ser observado, o imunossensor desenvolvido (no presente estudo) destaca-se entre os testes com menor custo por unidade, curto tempo de resposta e LOD satisfatório na faixa fg mL<sup>-1</sup>, quando se comparado a outros trabalhos relatados na literatura, em que há casos de tempo de

resposta ou custo menor, mas que não mostram um resultado satisfatório para os três parâmetros.

**Tabela 2:** Análise comparativa dos testes de baixo custo do SARS-CoV-2 relatados na literatura com base na detecção da proteína *Spike*.

Detecção	Biorreconhecimento	amostra	tempo necessário	LOD	Custo/unidade USD	Ref.
SWV <sup>1</sup>	antígeno-anticorpo	saliva/soro	10 min	101 fg mL <sup>-1</sup>	0,29	este trabalho
SWV <sup>1</sup>	antígeno-ACE2 <sup>2</sup>	soro/líquido nasofaríngeo/saliva	6,5 min	229 fg mL <sup>-1</sup>	1,50	[42]
EIS <sup>3</sup>	antígeno-anticorpo	solução de proteína spike em PBS	~10 min	1,065 fg mL <sup>-1</sup>	5,00	[43]
EIS <sup>3</sup>	antígeno-anticorpo	soro	~90 min	0,5 µg mL <sup>-1</sup>	10,11 <sup>4</sup>	[44]
EIS <sup>3</sup>	antígeno-ACE2 <sup>2</sup>	soro/líquido nasofaríngeo/saliva	4 min	2,18 fg mL <sup>-1</sup>	4,67	[45]
EIS <sup>3</sup>	antígeno-aptâmero	nesofaringel fluido	15 min	não informado	0,31 <sup>5</sup>	[46]
amperométrico <sup>6</sup>	aptâmero conjugado antígeno-invertase	saliva	60 min	5,27 pmol L <sup>-1</sup> (0,4 ng mL <sup>-1</sup> )	3,20	[47]
Colorimétrico	antígeno-ACE2 <sup>2</sup>	soro/líquido nasofaríngeo	5 min	0,154 pg mL <sup>-1</sup>	0,15	[48]
Quimioluminescente fluxo lateral	antígeno-anticorpo	solução de proteína Spike em PBS	16 min	0,1 ng mL <sup>-1</sup>	0,90	[49]

1: Voltametria de onda quadrada; 2: ACE2: Enzima conversora de angiotensina-2; 3: EIS: Espectroscopia de impedância eletroquímica; 4: convertidos de euros (€); 5: convertido de libra esterlina (£); 6: Resposta de corrente indireta com base na medição de glicose (em mg/dL) do glicosímetro Accu-Chek GuideMe

## 7. Conclusões

O presente projeto reportou com sucesso o desenvolvimento de um novo imunossensor construído com materiais de baixo custo para a detecção da proteína Spike do SARS-CoV-2 em amostras clínicas e ambientais.

O dispositivo eletroquímico foi construído usando SPE à base de tinta de carbono em substrato PET, que foi modificado com dispersão CB decorada com AuNPs. O imunossensor foi aplicado para diagnósticos point-of-care rápidos da proteína spike SARS-CoV-2 e/ou análises ambientais sensíveis usando protocolos de calibração baseados em dois períodos de incubação diferentes (10 min e 120 min).

A aplicação do imunossensor proposto sob o regime de incubação de 120 min resultou em maior sensibilidade (~2,7 vezes) em comparação com o regime de incubação de 10 min. Os valores de LOD obtidos com a aplicação bem-sucedida do sensor para diagnóstico rápido de SARS-CoV-2 em diferentes amostras nos regimes de incubação de 10 min e 120 min foram  $101 \text{ fg mL}^{-1}$  e  $46,2 \text{ fg mL}^{-1}$ , respectivamente. Os resultados obtidos neste estudo mostram que o biossensor proposto pode ser efetivamente empregado como uma ferramenta adequada para testes em massa de SARS-CoV-2 em países de baixa renda e pode ser facilmente adaptado para diferentes aplicações (custo de produção = 0,29 USD por unidade).

## 8. Referências Bibliográficas

1. Hattam, V., Visualizing the Virus. Design and Culture, 2021. 13(1): p. 9-17. 2.
2. Higham, A., et al., COVID-19 and COPD: a narrative review of the basic science and clinical outcomes. Eur Respir Rev, 2020. 29(158)
3. Giron-Navarro, R., I. Linares-Hernandez, and L.A. Castillo-Suarez, The impact of coronavirus SARS-CoV-2 (COVID-19) in water: potential risks. Environ Sci Pollut Res Int, 2021. 28(38): p. 52651-52674.
4. Lu, W., et al., Review: A systematic review of virus-like particles of coronavirus: Assembly, generation, chimerism and their application in basic research and in the clinic. Int J Biol Macromol, 2022. 200: p. 487-497.

5. Alexandridi, M., et al., The Coronavirus pandemic - 2022: Viruses, variants & vaccines. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2022. 63: p. 1-9.
6. Heller, L., C.R. Mota, and D.B. Greco, COVID-19 faecal-oral transmission: Are we asking the right questions? *Sci Total Environ*, 2020. 729: p. 138919. 4.
7. Paul, D., P. Kolar, and S.G. Hall, A review of the impact of environmental factors on the fate and transport of coronaviruses in aqueous environments. *npj Clean Water*, 2021. 4(1).
8. Tran, H.N., et al., SARS-CoV-2 coronavirus in water and wastewater: A critical review about presence and concern. *Environ Res*, 2021. 193: p. 110265.
9. Camargo, J.R., et al., Waterproof paper as a new substrate to construct a disposable sensor for the electrochemical determination of paracetamol and melatonin. *Talanta*, 2020. 208: p. 120458.
10. Shereen, M.A., et al., COVID-19 infection: Emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res*, 2020. 24: p. 91-98.
11. de Araujo Andreotti, I.A., et al., Disposable and flexible electrochemical sensor made by recyclable material and low cost conductive ink. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2019. 840: p. 109-116.
12. Ferreira, Gonzalo et al. SARS-CoV-2, Zika viruses and mycoplasma: Structure, pathogenesis and some treatment options in these emerging viral and bacterial infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2021, v. 1867, n. 12, p. 166264.
13. D'Orazio P. Biosensors in clinical chemistry - 2011 update. *Clin Chim Acta*. 2011
14. Grieshaber, Dorothee, et al., Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors* 8.3. 2008, p. 1400-1458.
15. Hegde, Madhu et al. Gold nanoparticle based biosensors for rapid pathogen detection: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 2022, p. 100756.

16. Pakapongpan, Saithip, and Rungtiva P. Poo-arporn. "Self-Assembly of Glucose Oxidase on Reduced Graphene Oxide-Magnetic Nanoparticles Nanocomposite-Based Direct Electrochemistry for Reagentless Glucose Biosensor." *Materials Science and Engineering: C*, vol. 76, 2017, p. 398-405.
17. Zheng, Y., et al., Advanced sensitivity amplification strategies for voltammetric immunosensors of tumor marker: State of the art. *Biosens Bioelectron*, 2021. 178: p. 113021.
18. Guerrero, J.M., et al., Advances for the Development of In Vitro Immunosensors for Multiple Sclerosis Diagnosis. *BioChip Journal*, 2021.
19. Melo, A.M.A., et al., Performance of an amperometric immunosensor assembled on carboxymethylated cashew gum for Salmonella detection. *Microchemical Journal*, 2021. 167.
20. Aydin, E.B., M. Aydin, and M.K. Sezginturk, Electrochemical immunosensor based on chitosan/conductive carbon black composite modified disposable ITO electrode: An analytical platform for p53 detection. *Biosens Bioelectron*, 2018. 121: p. 80-89.
21. Yasri, S. and V. Wiwanitkit, Sustainable materials and COVID-19 detection biosensor: A brief review. *Sens Int*, 2022. 3: p. 100171.
22. Zhang, J., L. Mou, and X. Jiang, Surface chemistry of gold nanoparticles for health-related applications. *Chem Sci*, 2020. 11(4): p. 923-936.
23. Daniel, et al., Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical reviews*, 2004, v. 104, n. 1, p. 293-346.
24. Liu, X., et al., A label-free electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles for direct detection of atrazine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014. 191: p. 408-414. 13.
25. Hernández-Saravia, L.P., et al., A Cu-NPG/SPE sensor for non-enzymatic and non-invasive electrochemical glucose detection. *Microchemical Journal*, 2021, 160 .

26. Daruich De Souza, C., B. Ribeiro Nogueira, and M.E.C.M. Rostelato, Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction. *Journal of Alloys and Compounds*, 2019. 798: p. 714-740.
27. Silva, T.A., et al., Electrochemical Biosensors Based on Nanostructured Carbon Black: A Review. *Journal of Nanomaterials*, 2017. 2017: p. 1-14.
28. Ferreira, Luís MC, et al., Using nanostructured carbon black-based electrochemical (bio) sensors for pharmaceutical and biomedical analyses: a comprehensive review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2022, 115032.
29. Vaz, Fabrício Cristiano, et al., A novel carbon nanosphere-based sensor used for herbicide detection. *Environmental Technology & Innovation* 22, 2021, 101529.
30. Vicentini, F.C., et al., Nanostructured carbon black for simultaneous sensing in biological fluids. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016. 227: p. 610-618.
31. Zhai, Qingfeng, et al., Label-free electrochemical immunosensor for highly sensitive COVID-19 spike protein detection. *Sensors and Actuators Reports* 4, 2022: 100124.
32. Liv, Lokman., Electrochemical immunosensor platform based on gold-clusters, cysteamine and glutaraldehyde modified electrode for diagnosing COVID-19. *Microchemical Journal* 168, 2021: 106445.
33. Orzari, L.O., et al., A novel disposable self-adhesive inked paper device for electrochemical sensing of dopamine and serotonin neurotransmitters and biosensing of glucose. *Biosens Bioelectron*, 2019. 138: p. 111310.
34. Bjorklund, M., A.C. Ouwehand, and S.D. Forssten, Improved artificial saliva for studying the cariogenic effect of carbohydrates. *Curr Microbiol*, 2011. 63(1): p. 46-9.
35. P.G. Gottschalk, J.R. Dunn, The five-parameter logistic: A characterization and comparison with the four-parameter logistic, *Analytical Biochemistry* 343(1), 2005, p: 54-65.

36. C.A. Holstein, M. Griffin, J. Hong, P.D. Sampson, Statistical method for determining and comparing limits of detection of bioassays, *Anal Chem* 87(19), 2015, p: 9795-801.
37. C. Jeyabharathi, P. Ahrens, U. Hasse, F. Scholz, Identification of low-index crystal planes of polycrystalline gold on the basis of electrochemical oxide layer formation, *Journal of Solid State Electrochemistry* 20(11), 2016, p: 3025-3031.
38. A. Sukeri, M. Bertotti, Nanoporous Gold Surface: An Efficient Platform for Hydrogen Evolution Reaction at Very Low Overpotential, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2017.
39. A.P. O'Mullane, from single crystal surfaces to single atoms: investigating active sites in electrocatalysis, *Nanoscale* 6(8), 2014, p: 4012-26.
40. B. Jin, Jim-Rong, Z.-X. Zhang, Theory and application of cyclic voltammetry for measurement of fast electrode kinetics at microdisk electrode, *Chinese Journal of Chemistry* 14(4), 1996, p: 338-347.
41. I. Lavagnini, R. Antiochia, F. Magno, An Extended Method for the Practical Evaluation of the Standard Rate Constant from Cyclic Voltammetric Data, *Electroanalysis* 16(6), 2004, p: 505-506.
42. L.F. de Lima, A.L. Ferreira, M.D.T. Torres, W.R. de Araujo, C. de la Fuente-Nunez, Minute-scale detection of SARS-CoV-2 using a low-cost biosensor composed of pencil graphite electrodes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 118(30), 2021.
43. S.A. Perdomo, et al., SARS: A Low-Cost Portable Electrochemical System for Ultra-Sensitive, Near Real-Time, Diagnostics of SARS-CoV-2 Infections, *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement* 70, 2021, p: 1-10.
44. J. Munoz, M. Pumera, 3D-Printed COVID-19 immunosensors with electronic readout, *Chem Eng J* 425, 2021, 131433.
45. M.D.T. Torres, W.R. de Araujo, L.F. de Lima, A.L. Ferreira, C. de la Fuente-Nunez, Low-cost biosensor for rapid detection of SARS-CoV-2 at the point of care, *Matter* 4(7), 2021, p: 2403-2416.

46. P. Lasserre, et al., SARS-CoV-2 Aptasensors Based on Electrochemical Impedance Spectroscopy and Low-Cost Gold Electrode Substrates, *Anal Chem*, 2022.
47. N.K. Singh, et al., Hitting the diagnostic sweet spot: Point-of-care SARS-CoV-2 salivary antigen testing with an off-the-shelf glucometer, *Biosens Bioelectron* 180, 2021, 113111.
48. A.L. Ferreira, L.F. de Lima, M.T. Torres, W.R. de Araujo, C. de la Fuente-Nunez, Low-Cost Optodiagnostic for Minute-Time Scale Detection of SARS-CoV-2, *ACS Nano*, 2021.
49. D. Liu, et al., Nanozyme chemiluminescence paper test for rapid and sensitive detection of SARS-CoV-2 antigen, *Biosens Bioelectron* 173, 2020, 112817.
50. K.R. Brown, D.G. Walter, M.J. Natan, Seeding of Colloidal Au Nanoparticle Solutions. 2. Improved Control of Particle Size and Shape, *Chemistry of Materials* 12, 2000, p: 306-313.
51. B. Paczosa-Bator, Effects of type of nanosized carbon black on the performance of an all-solid-state potentiometric electrode for nitrate, *Microchim. Acta* 181, 2014, p: 1093–1099.