

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Utilização de um sensor eletroquímico descartável para o diagnóstico rápido da COVID-19 por meio da detecção da proteína Spike do vírus SARS-CoV-2

Evair Dias Nascimento*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria

***bolsista CAPES**

São Carlos-SP

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Evair Dias Nascimento, realizada em 23/08/2024.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria (UFSCar)

Profa. Dra. Roberta Cerasi Urban (UFSCar)

Profa. Dra. Silvia Helena Pires Serrano (USP)

Prof. Dr. Diego Leoni Franco (UFU)

Prof. Dr. Oldair Donizeti Leite (UTFPR)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Edivaldo e Márcia, ao meu irmão Victor, minha esposa Milena e aos meus amigos, obrigada por me incentivarem a chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pela força e proteção em toda minha vida.

Aos meus pais Edivaldo e Márcia, por serem meus maiores incentivadores desde o início dessa jornada. Se cheguei até aqui hoje e se busco um futuro melhor, é por vocês. Obrigada pelo apoio e carinho, mesmo de longe e com todos os obstáculos que enfrentamos.

Aos demais familiares que me deram todo o incentivo desde o início da jornada acadêmica, mesmo de longe. Em especial, ao meu irmão Victor.

À minha esposa Milena, por ter acompanhado toda minha jornada neste período com dedicação, carinho, atenção e apoio. Em especial, agradeço por me fazer companhia mesmo à distância e não me deixar desistir.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria, por todos os aprendizados recebidos durante o doutorado que tanto contribuíram para minha formação profissional e pessoal. Esse trabalho foi desenvolvido devido à sua paciência e acolhimento ao me orientar, incentivando o pesquisador dentro de mim a sempre fazer o meu melhor.

A todos(as) professores que fizeram parte da minha vida, desde infantil na vila São Bento até a etapa do doutorado, sem vocês chegar aqui não seria possível. A minha querida comunidade Vila do São Bento, sinto-me honrado em ser o primeiro filho que buscou chegar até o nível de doutorado, sempre carregarei e representarei esta comunidade com muito orgulho.

Aos membros da banca, pela disponibilidade em participar e contribuir com este trabalho.

À Dra. Tássia Regina de Oliveira e ao Dr. Wilson Thiago da Fonseca pela ajuda nos experimentos e discussões sempre que solicitados.

Aos colegas do Laboratório de Bioanalítica e Eletroanalítica (LABIE), tanto pelos

momentos de discussão científica quanto por nossos cafezinhos da tarde. Obrigada especialmente pelos momentos em que as coisas não davam certo e, além do suporte (experimental e emocional), era montada uma verdadeira força tarefa para encontrar e solucionar o problema. Espero ter contribuído para a formação de vocês como vocês contribuíram para a minha.

À coordenação e secretaria do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da UFSCar, sempre dispostos a ajudar quando solicitados.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Departamento de Química pela estrutura fornecida para realização deste trabalho.

A todos os órgãos de fomento, em especial a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa concedida. (O presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES – Código de Financiamento 88887.513708/2020-00).

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Ampére
A _{spr}	absorbância de ressonância plasmônica de superfície (do inglês: <i>surface plasmon resonance absorbance</i>)
Ab1	Anticorpo Primário
Ab2	Anticorpo secundário
ACE2	Enzima Conversora da Angiotensina 2 (do inglês: <i>Angiotensin-Converting Enzyme 2</i>)
ag	Attograma
AgNPs	Nanopartículas de Prata
ALP	Enzima de fosfatase alcalina (ALP do inglês: <i>Alkaline phosphatase</i>)
AUC	Área sob a curva ROC (do inglês <i>area under the curve</i>)
AuNS	nanoestrelas de ouro
AuNPs	Nanopartículas de ouro
AgNP	Nanopartículas de prata
AUC-PR	Área sob a curva de precisão
BSA	albumina de soro bovino (do inglês, <i>bovine serum albumin</i>)
CBB	azul brilhante de Coomassie 0,1% (do inglês: <i>Coomassie brilliant blue</i>)
CE	Contra-eletrodo (do inglês <i>Counter electrode</i>)
Ct	<i>cycle threshold</i>
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPV	voltametria de pulso diferencial (do inglês: <i>Differential</i>

	<i>pulse voltammetry</i>)
DTT	Ditiotreitol
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
ECL	Eletroquimioluminescência
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDS	Espectroscopia de raios X por energia dispersiva (do inglês: <i>Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy</i>)
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês: <i>Electrochemical impedance spectroscopy</i>)
FMA	Ácido ferroceno monocarboxílico (do inglês: Ferrocene monocarboxylic acid)
FET	Transistores de efeito de campo (do inglês: <i>Field Effect Transistor</i>)
FMOC-aas	N-(fluorenil-9-metoxicarbonil) aminoácidos
rGO	Óxido de grafeno reduzido
GO	Óxido de grafeno
GCE	Eletrodo de carbono vítreo (do inglês: <i>Glassy carbon electrode</i>)
GE	Eletrodo de ouro (do inglês: <i>Gold electrode</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: <i>High performance liquid chromatography</i>)
HRP	Enzima de peroxidase de rábano (HRP do inglês: <i>Horseradish peroxidase</i>)

HAS	hipertensão arterial sistêmica
IC	Índice de concordância
<i>I</i>	Corrente
I_{pa}	Corrente de pico anódica
I_{pc}	Corrente de pico catódica
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina classe G
IgM	Imunoglobulina classe M
IgA	Imunoglobulina classe A
L	Litro
LD	Limite de detecção
Log	Logaritmo
m	Mili
μ	micro (10^{-6})
MES	Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico
Mol	Unidade de quantidade de matéria
N	Nano
<i>N</i>	Réplicas
NHS	N-hidroxisuccinimida
Neg-H	Negativo Hospitalizado
Neg-NH	Negativo não-hospitalizado
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i>)

PBS-Ca-Mg	Tampão fosfato salino com íons de cálcio e magnésio
PBS-DMSO	Tampão fosfato salino com Dimetilsulfóxido
PBS-TW	Tampão fosfato salino com Tween-20
PDDA	Cloreto de polidialildimetilamônio (do inglês <i>Polydiallyldimethylammonium chloride</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
PMs	Partícula magnética
POC	<i>Point-of-care</i>
Pos-H	Positivo Hospitalizado
PVC	cloreto de polivinila (do inglês <i>Polyvinyl chloride</i>)
QCM	Microbalança de cristal de quartzo (do inglês: <i>quartz crystal microbalance</i>)
r	Coefficiente de correlação
RBD	domínio de ligação ao receptor (do inglês <i>receptor-binding domain</i>)
RE	Eletrodo de referência (do inglês <i>Reference electrode</i>)
RNA	ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
ROC	Característica de Operação do Receptor (do inglês <i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>)
RSD	Desvio-padrão relativo (do inglês <i>relative standard deviation</i>)
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa (do inglês: <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)

SDS	Dodecil sulfato de sódio
SPE	<i>Screen printed electrode</i>
SPCE	Eletrodos de carbono serigrafados (do inglês <i>screen-printed carbono electrode</i>)
SPGE	Eletrodo serigrafado com tinta de ouro (do inglês <i>Screen-printed gold electrode</i>)
SWV	Voltametria de onda quadrada (do inglês: <i>Square wave voltammetry</i>)
TC	Tomografia computadorizada
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão (do inglês: <i>Transmission electronic microscopy</i>)
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
TW	Tween-20
UTI	Unidade de terapia intensiva
V	Volt
WE	Eletrodo de trabalho (do inglês <i>working electrode</i>)
8-WEs	Oito eletrodos de trabalho

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1: Variáveis demográficas e clínicas dos voluntários que participaram do estudo.....	46
TABELA 3.2: Informações clínicas e demográficas dos indivíduos recrutados para o estudo, incluindo indivíduos Neg-NH e Pos-H utilizados para o modelo de construção e avaliação. Os conjuntos retidos 1 e 2 contendo indivíduos Neg-H....	48
TABELA 7.1: Métricas de avaliação do desempenho do modelo em amostras de urina utilizando o método proposto.....	75

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Árvore filogenética de betacoronavírus e suas espécies.	2
FIGURA 1.2: Estrutura do vírus SARS-CoV-2.....	4
FIGURA 1.3: Interação do Peptídeo ACE2 com a Proteína S do SARS-CoV-2.	5
FIGURA 1.4: Representação esquemático do teste RT-PCR. Etapa 1 a extração do RNA viral do vírus; etapa 2 a transcrição do RNA viral e a etapa 3 o processo para diagnóstico a partir do RT-PCR.....	7
FIGURA 1.5: Evolução clínica e laboratorial da COVID-19.....	10
FIGURA 1.6: Representação esquemática para um biossensor.....	11
FIGURA 1.7: Eletrodos serigrafados com diferentes formatos.....	17
FIGURA 1.8: Revestimentos das PMs com diferentes superfícies funcionalizadas para possíveis aplicações diagnósticas.....	18
FIGURA 1.9: Representação esquemática das diferentes estratégias de aplicação das PMs. A) Uso de PMs após modificação da superfície do WE. B) Utilização de PMs no desenvolvimento do método sem a modificação do WE para posterior aplicação na superfície do eletrodo com diferentes sondas.	20
FIGURA 1.10: Possíveis estratégias eletroquímicas para auxiliar no diagnóstico de COVID-19 utilizando PMs funcionalizados com grupo carboxila (-COOH).	23
FIGURA 1.11: Mapa bibliométrico referente a correlação das palavras-chaves utilizadas pelos autores dos trabalhos publicados na base de dados Scopus.	24
FIGURA 3.1: Etapas de construção do dispositivo SPCE que contém 8 células eletroquímicas independentes.	33
FIGURA 3.2: Sequência de 615 aminoácidos para ACE2 humana e destacado em	

vermelho a região de 19 resíduos de aminoácidos que se ligam à glicoproteína S do SARS-CoV-2 (24QAKTFLDKFNHEAEDLFYQ ₄₂).....	34
FIGURA 3.3: Estrutura do peptídeo ACE2 relacionado à sequência genética 24QAKTFLDKFNHEAEDLFYQ ₄₂ C.	35
FIGURA 3.4: Sequência da glicoproteína S contendo o domínio RBD em vermelho e a sequência de ligação ao receptor; ligação ao ACE2 humano em azul.	36
FIGURA 3.5: Ligação cruzada entre proteína S monomérica do SARS-CoV-2 e formaldeído 1%, A) SDS-PAGE visualizado com coloração azul brilhante de Coomassie, linha 1: marcadores de peso molecular (KDa), linha 2: Proteína S monomérica de SARS-CoV-2, linha 3: Proteína S do SARS-CoV-2 polimerizada. B) Imunoblot para Proteína S polimerizada.....	37
FIGURA 3.6: Etapas de modificação do eletrodo de ouro no cristal de quartzo com ACE2 para realizar as medidas de QCM pelo fluxo de uma solução de Proteína S.	38
FIGURA 3.7: A) Célula QCM microfluídica impressa em 3D com volume interno de 150 µL e B) configuração microfluídica usada para análise QCM.....	39
FIGURA 3.8: Sistema para síntese das AuNPs estabilizadas em citrato.....	40
FIGURA 3.9: Imobilização covalente do peptídeo ACE2 nas PMs utilizando EDC/NHS.....	41
FIGURA 3.10: Etapa envolvida no procedimento de conjugação do peptídeo ACE2 com as AuNPs.	42
FIGURA 3.11: Etapas de captura e separação da proteína S do SARS-CoV-2 das amostras via formação do bioconjugado PMs-ACE2/proteínas S/ACE2-AuNPs...	44
FIGURA 3.12: A) Adição do ímã sob o eletrodo de trabalho. B) Etapa de detecção eletroquímica da proteína S do SARS-CoV-2 usando SPCE não modificado. C)	

Representação da oxidação cronoamperométrica de AuNPs e posteriormente a redução do cloro complexo de Au(III) obtido por DPV.....	45
FIGURA 4.1: A) TEM das PMs e B) AuNPs e C) histograma referentes a distribuição média das AuNPs	50
FIGURA 4.2: A) e B) TEM do bioconjugado PMs-ACE2/proteína S/ACE2-AuNPs em diferente magnitudes e C) Análise EDS do bioconjugado PMs-ACE2/proteína S/ACE2-AuNPs.....	51
FIGURA 4.3: Espectros de UV-vis obtidos da solução de ACE2 ($8 \mu\text{g mL}^{-1}$) e das dispersões de AuNPs e do conjugado ACE2-AuNPs.	53
FIGURA 4.4: A) e B) Estudo da frequência de ressonância em função do tempo e da variação de frequência, respectivamente, obtida pela injeção de $52,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ da proteína S do SARS-CoV-2 no cristal de quartzo modificado com peptídeo de controle negativo e no cristal modificado com ACE2; C) e D) Estudo da frequência de ressonância em função do tempo e da variação de frequência, respectivamente, obtida na injeção de amostra de saliva na ausência e presença de $52,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína S do SARS-CoV-2, preparada em tampão PBS.	55
FIGURA 4.5: Voltamogramas cíclicos obtidos, contendo FMA ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em solução aquosa $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ KCl (pH 8,0) usando arranjo SPCE com 8 células independentes com velocidades de varredura variando de 10 a 300 mV s^{-1} . Inserção: corrente de pico anódica vs. $v^{1/2}$	57
FIGURA 4.6: Representação do processo de oxirredução das AuNPs e as curvas DPV obtidas a partir da aplicação do bioconjugado PMs-ACE2/proteína S/ACE2-AuNPs, gerado na presença e ausência de 360 fg mL^{-1} de proteína S do SARS-CoV-2, juntamente com PBS- Ca-Mg; tempo de incubação: 30 minutos. $E_{\text{dep}} = + 1.25 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 120 \text{ s}$, $v = 34 \text{ mV s}^{-1}$, $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$, and $a = 50 \text{ mV}$	59
FIGURA 4.7: Estudo de repetibilidade A) análise intradia e B) análise interdia	

usando para cada medida um arranjo SPCE com uma solução padrão de Proteína S do SARS-CoV-2 a 78 fg mL^{-1} 60

FIGURA 4.8: A) Média dos valores de corrente de pico para diferentes volumes de ACE2-AuNPs na presença de 78 fg mL^{-1} de proteína S do SARS-CoV-2 no bioconjugado PMs-ACE2/Proteína S/ACE2-AuNPs; tempo de incubação: 30 minutos. B) Corrente de pico para diferentes tempos de incubação com base na aplicação de 78 fg mL^{-1} de proteína S do SARS-CoV-2 na dispersão de bioconjugado PMs-ACE2/Proteína S/ACE2-AuNPs contendo $20 \mu\text{L}$ PMs-ACE2 e $30 \mu\text{L}$ de ACE2-AuNPs. 61

FIGURA 4.9: Estudo da seletividade de interação entre a ACE2 e a proteínas S do SARS-CoV-2 em relação a outras proteínas, todas a $0,1 \text{ fg mL}^{-1}$. inserção: Estrutura da proteína S do SARS-CoV-2 e ACE2. O zoom destacado em verde é a região de 19 resíduos de aminoácidos (${}_{24}\text{QAKTFLDKFNHEAEDLFYQ}_{42}\text{C}$) da ACE2 que se ligam à glicoproteína S do SARS-CoV-2. 63

FIGURA 4.10: A, B e C Análise detalhada da interface entre SARS-CoV-2-RBD e ACE2. As interações polares são indicadas por linhas tracejadas vermelhas 64

FIGURA 5.1: A) Curvas DPV obtidas a partir da aplicação do ensaio magnético utilizando soluções padrão contendo proteína S na faixa de concentração de $0,0009 - 360,00 \text{ fg mL}^{-1}$.; B) Valores de corrente de pico catódico obtidos em função da concentração da proteína S. Parâmetros DPV aplicado: $E_{\text{dep}} = + 1,25 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 120 \text{ s}$, $v = 34 \text{ mV s}^{-1}$, $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$ e $a = 50 \text{ mV}$ 66

FIGURA 5.2: A) Valores de corrente de pico obtidos a partir da análise de amostras de saliva de indivíduos saudáveis e infectados por SARS-CoV-2 usando o ensaio magnético e valores Ct para Genes N1 e N2 de amostras de swab obtidas via RT-PCR. B) Curva ROC para detecção da proteína S do SARS-CoV-2 usando o ensaio magnético. C) Diagrama de pontos interativo de respostas de corrente de pico obtidas

para a proteína S do SARS-CoV-2 em amostras de saliva para indivíduos saudáveis e infectados. *teste t, $p < 0,0001$ 68

FIGURA 6.1: A) Curvas DPV obtidas a partir da aplicação do ensaio magnético na solução do branco e em soluções padrão contendo proteína S na faixa de concentração de 0,048 a 483.000 ag mL^{-1} . B) Valores de corrente de pico catódico obtidos em função da concentração da proteína S. Parâmetros DPV aplicados: $E_{\text{dep}} = +1,25 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 120 \text{ s}$, $v = 34 \text{ mV s}^{-1}$, $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$ e $a = 50 \text{ mV}$; 71

FIGURA 6.2: Estudo do efeito da diluição das amostras de urina na aplicação do ensaio proposto para determinação da proteína S indivíduo saudável e diagnosticado com COVID-19. 72

FIGURA 6.3: A) Curva ROC para o modelo não ajustado; B) Curva ROC e C) Curva AUC-PR para o modelo ajustado levando em conta o tempo entre a coleta do swab e a da amostra de urina. 74

RESUMO

UTILIZAÇÃO DE UM SENSOR ELETROQUÍMICO DESCARTÁVEL PARA O DIAGNÓSTICO RÁPIDO DA COVID-19 POR MEIO DA DETECÇÃO DA PROTEÍNA SPIKE DO VÍRUS SARS-COV-2. A eclosão da pandemia da COVID-19, causada pela Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus 2 (SARS-CoV-2), tem impulsionado a busca por testes para o diagnóstico visando o controle e redução da transmissão viral. A técnica de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) é a principal técnica utilizada para o diagnóstico. Contudo, devido às limitações de acessibilidade e custo, é necessário desenvolver novos testes que sejam mais acessíveis e possam colaborar no diagnóstico precoce da doença. Pensando nisso, desenvolvemos um ensaio magnético ultrasensível utilizando esferas magnéticas e nanopartículas de ouro conjugadas com o peptídeo da enzima conversora de angiotensina humana 2 (ACE2) (Gln²⁴-Gln⁴²) para a captura e detecção da proteína Spike do SARS-CoV-2 nas amostras de saliva e urina humana. A técnica aplicada envolveu a utilização de um dispositivo eletroquímico descartável contendo oito eletrodos de carbono serigrafados independentes que permitem a análise simultânea de oito amostras. O ensaio magnético exibiu limites de detecção ultrabaixo para proteína Spike do SARS-CoV-2, 0,35 ag mL⁻¹ nas amostras de saliva e 0,13 ag mL⁻¹ nas amostras de urina. Em termos de eficiência, o ensaio magnético proposto para as amostras de saliva, considerando amostras de saliva de indivíduos saudáveis e infectados por SARS-CoV-2, apresentou área sob a curva (AUC) de 99,6%, sensibilidade de 100,0% e especificidade de 93,7% para a proteína Spike do SARS-CoV-2 e correlação com a técnica de RT-PCR. A abordagem proposta para as amostras de urina, considerando amostras de urina de indivíduos negativos não hospitalizados (Neg-NH), indivíduos negativos hospitalizados (Neg-H) e indivíduos positivo hospitalizados (Pos-H), apresentou significativa semelhança com a técnica de RT-PCR, com área sob a curva (AUC) de 87,0%, área sob a curva de precisão

(AUC-PR) de 73%, sensibilidade de 95,8% e especificidade 73,1%, para a proteína Spike do SARS-CoV-2. Os resultados obtidos demonstram o potencial de aplicação deste ensaio magnético como uma solução simples e de baixo custo para diagnóstico de COVID-19 em *point-of-care* com base na saliva ou urina.

ABSTRACT

USE OF A DISPOSABLE ELECTROCHEMICAL SENSOR FOR RAPID DIAGNOSIS OF COVID-19 THROUGH DETECTION OF THE SPIKE PROTEIN OF THE SARS-COV-2 VIRUS. The outbreak of the COVID-19 pandemic, caused by severe acute respiratory syndrome of Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), has fueled the search for diagnostic tests aimed at controlling and reducing viral transmission. The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique is the main technique used for diagnosis. However, due to accessibility and cost limitations, it is necessary to develop new tests that are more accessible and can help in the early diagnosis of the disease. With this in mind, we developed an ultrasensitive magnetic assay using magnetic beads and gold nanoparticles conjugated with the human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) peptide (Gln²⁴-Gln⁴²) for the capture and detection of the SARS-CoV-2 Spike protein in samples of human saliva and urine. The technique applied involved the use of a disposable electrochemical device containing eight independent screen-printed carbon electrodes (SPCE) that allow the simultaneous analysis of eight samples. The magnetic assay exhibited ultra-low detection limits for SARS-CoV-2 Spike protein, 0.35 ag mL⁻¹ in saliva samples and 0.13 ag mL⁻¹ in urine samples. In terms of efficiency, the magnetic assay proposed for saliva samples, considering saliva samples from healthy individuals and those infected by SARS-CoV-2, presented an area under the curve (AUC) of 99.6%, sensitivity of 100.0% and specificity of 93.7% for the SARS-CoV-2 Spike protein and great similarity with the RT-PCR technique. The proposed approach for urine samples, considering urine samples from non-hospitalized negative individuals (Neg-NH), hospitalized negative individuals (Neg-H) and hospitalized positive individuals (Pos-H), showed significant similarity with the RT-PCR, with area under the curve (AUC) of 87.0%, area under the precision curve (AUC-PR) of 73%, Sensitivity of 95.8% and Specificity 73.1%, for the Spike protein SARS-CoV-

2. The results obtained point to the potential application of this magnetic assay as a simple and low-cost solution for point-of-care diagnosis of COVID-19 based on saliva or urine.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. CORONAVÍRUS (SARS-COV-2).....	2
1.2. ESTRUTURA DO SARS-COV-2	4
1.3. MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO DA COVID-19.....	6
<i>1.3.1. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE COM TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR).....</i>	<i>6</i>
<i>1.3.2. TESTES SOROLÓGICOS.....</i>	<i>8</i>
1.4. BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA DIAGNÓSTICO DA COVID-19	10
<i>1.4.1. BIOSSENSORES VOLTAMÉTRICOS</i>	<i>12</i>
<i>1.4.2. BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS</i>	<i>13</i>
<i>1.4.3. BIOSSENSORES IMPEDIMÉTRICOS</i>	<i>14</i>
1.5. UTILIZAÇÃO DE DISPOSITIVOS ELETROQUÍMICOS DESCARTÁVEIS PARA DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS	15
1.6. PARTÍCULAS MAGNÉTICAS	18
<i>1.6.1. APLICAÇÃO DAS PMS EM MÉTODOS ELETROQUÍMICOS</i>	<i>19</i>
<i>1.6.2. BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS USANDO PMS PARA DIAGNÓSTICO DA COVID-19.....</i>	<i>21</i>
2. OBJETIVOS.....	28

2.1. OBJETIVO GERAL	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	30
3.1. REAGENTES, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	30
3.2. FABRICAÇÃO DO SPCE	32
3.3. DEFINIÇÃO E SÍNTESE DO PEPTÍDEO ACE2	33
3.4. OBTENÇÃO E POLIMERIZAÇÃO DA PROTEÍNA S DO SARS-COV-2 PURIFICADA.....	35
3.5. ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA S DO SARS-COV-2 E O PEPTÍDEO ACE2 POR MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO	37
3.6. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS COM CITRATO	39
3.7. IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DO PEPTÍDEO ACE2 NAS PMS	40
3.8. CONJUGAÇÃO DAS AUNPS COM O PEPTÍDEO ACE2.....	42
3.9. ETAPAS ENVOLVIDAS NA CAPTURA E SEPARAÇÃO DA PROTEÍNA S EM AMOSTRAS DE SALIVA E URINA NO ENSAIO MAGNÉTICO.....	43
3.10. DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DA PROTEÍNA S DO SARS-COV-2 EM AMOSTRAS DE SALIVA E URINA UTILIZANDO AUNPS.....	44
3.11. APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO EM AMOSTRAS DE VOLUNTÁRIOS	45
3.11.1 COORTES 1	46

3.11.2. COORTES 2	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS PMS, AUNPS E DO BIOCONJUGADO	50
4.2. CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DO BIOCONJUGADO ..	52
4.3. ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE O PEPTÍDEO ACE2 E A PROTEÍNA S SARS-COV-2 POR MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO (QCM)	53
4.4. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO ARRANJO SPCE.....	56
4.5. DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DA PROTEÍNA S DO SARS-COV-2	58
4.6. OTIMIZAÇÃO DA QUANTIDADE DE ACE2-AUNPS E TEMPO DE INCUBAÇÃO UTILIZADO NO ENSAIO	60
4.7. INTERAÇÃO DA ACE2 COM A PROTEÍNA S DO SARS-COV-2.....	62
5. APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO EM NAS AMOSTRAS DE SALIVA	66
5.1. DESEMPENHO ANALÍTICO DO MAGNETO-ENSAIO	66
5.2. ANÁLISE DE AMOSTRAS DE SALIVA DAS COORTES DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E INDIVÍDUOS INFECTADOS POR SARS-COV-2 USANDO O ENSAIO MAGNÉTICO PROPOSTO	67
6. APLICAÇÃO NAS AMOSTRAS DE URINA	71
6.1. DESEMPENHO ANALÍTICO DO ENSAIO MAGNÉTICO	71
6.2. AVALIAÇÃO DA DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE URINA	72

6.3. AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DO ENSAIO PROPOSTO PARA A DETECÇÃO DA PROTEÍNAS EM AMOSTRAS DE URINA DE VOLUNTÁRIOS.....	73
8. CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	80

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Coronavírus (SARS-CoV-2)

Em dezembro de 2019, em Wuhan, na China, surgiu uma série de casos de pneumonia de etiologia desconhecida, que inicialmente a Organização Mundial da Saúde (OMS) denominou como um novo coronavírus de 2019 (2019-nCov)¹, sendo este posteriormente definido como Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus 2 (SARS-CoV-2, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*)^{2,3}. De acordo a OMS, este vírus é responsável pela doença conhecida como COVID-19⁴.

Este fato se deu pela análise da sequência genética, revelando que o SARS-CoV-2, pertencente à família dos *Coronaviridae*, apresenta o gênero betacoronavírus, com 79,0% de identidade de nucleotídeos para SARS-CoV de 2002 na China e 51,8% de identidade para MERS-CoV de 2012 que surgiu no Oriente Médio⁵ (Figura 1.1).

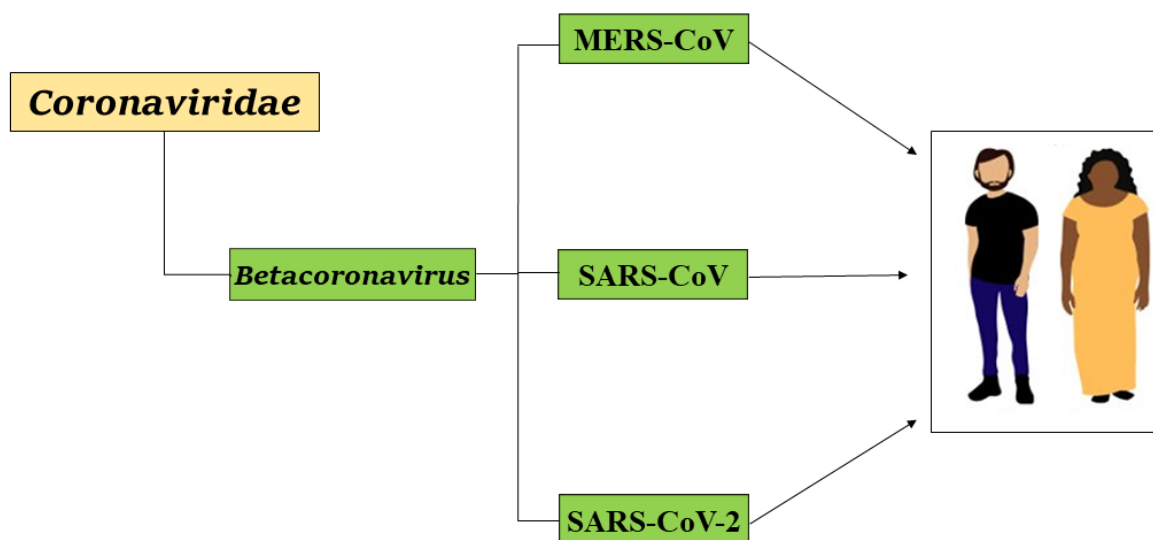


FIGURA 1.1: Árvore filogenética de betacoronavírus e suas espécies.

Fonte: Adaptada de Nguyen, *et al.*⁶.

Além disso, foi relatado que o SARS-CoV-2 apresenta genoma 96% idêntico ao coronavírus de morcego¹, indicando que o SARS-CoV-2 tem uma possível origem neste hospedeiro^{7,8}. Entretanto, a transmissibilidade para humanos deve ter ocorrido por um hospedeiro intermediário, pois raramente os coronavírus que infectam animais podem infectar os humanos diretamente. Por exemplo, o MERS-CoV, em 2012, teve o camelo como intermediário e o SARS-CoV, em 2002, teve o pangolim como intermediário⁷. No entanto, até a elaboração deste texto o hospedeiro intermediário para o SARS-CoV-2 ainda permanece desconhecido, com suspeita que seja o pangolim⁹.

Em relação ao SARS-CoV de 2002 na china, a prevalência dos casos ocorreu na província de Guangdong, com um número de casos superior a 8 mil casos, dentre os quais 774 indivíduos vieram a óbito, apresentando uma taxa de letalidade de aproximadamente 10%^{10,11}. É importante ressaltar que o SARS-CoV, assim como o SARS-CoV-2 (como será discutido no item 1.2), utilizava a Enzima Conversora da Angiotensina 2 (ACE2, do inglês: *Angiotensin-Converting Enzyme 2*) para proporcionar a infecção viral¹². Entretanto, o MERS-CoV originário do oriente médio, apresentou casos confirmados em 27 países, incluindo o continente africano e americano, com um total de 2.494 casos confirmados e 858 óbitos, resultando em uma taxa de letalidade de aproximadamente de 35%^{11,13}.

No entanto, o SARS-CoV-2 apresentou uma disseminação e uma taxa de transmissão superior ao SARS-CoV e o MERS-CoV. De acordo a OMS, a COVID-19, em nível global, até o presente momento, possui mais de 775 milhões de casos confirmados e quase 7 milhões de mortos. No Brasil, de acordo os dados do Ministério da Saúde, até o momento os números são alarmantes, com quase 37,5 milhões de casos confirmados e mais de 702 mil mortes.

Uma das formas de contribuir para diminuição da propagação da COVID-19 é compreender a estrutura do SARS-CoV-2, pois isto pode proporcionar à

comunidade científica novas ferramentas para serem utilizadas no desenvolvimento de intervenções eficazes e inovadoras para prevenir, diagnosticar e tratar a doença causada por este vírus.

1.2. Estrutura do SARS-CoV-2

Estruturalmente, o SARS-CoV-2 é um vírus de ácido ribonucleico viral (RNA, do inglês: *Ribonucleic Acid*) de cadeia simples positivo e envelopado com um genoma de 26-32 kb. Além do RNA viral, a estrutura viral contém proteínas não estruturais e estruturais como a proteína *Spike* (proteína S), glicoproteína de membrana (proteína M), envelope (E) e a proteína de nucleocapsídeo (proteína N), e vários processos virais dependem dessas proteínas, como a entrada nas células hospedeiras para formar novas partículas virais¹⁴⁻¹⁶. A estrutura do SARS-CoV-2 é mostrada na Figura 1.2.

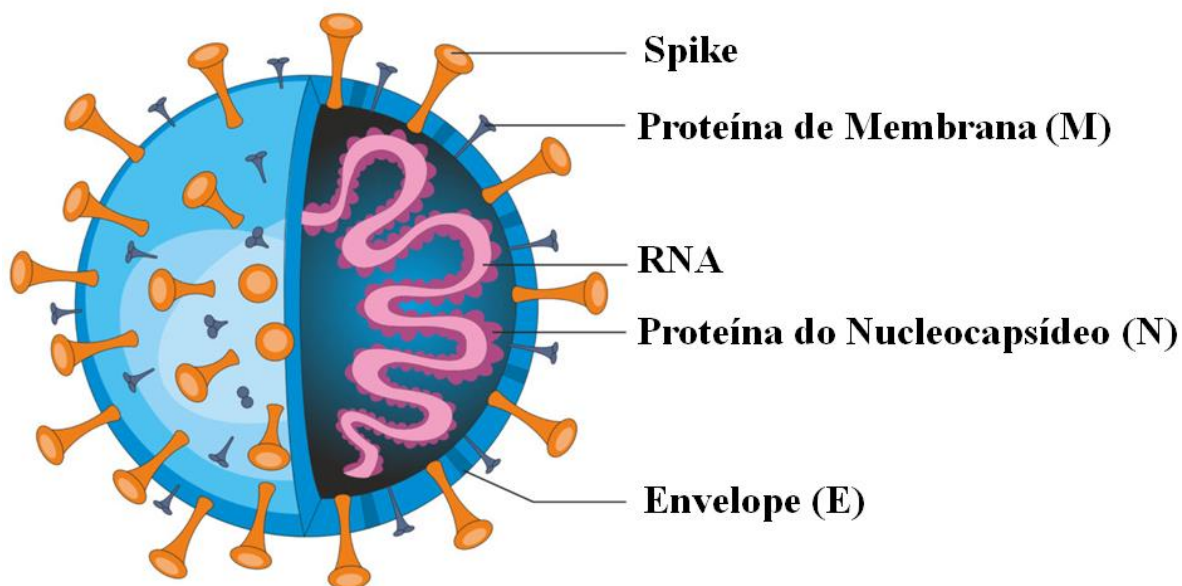


FIGURA 1.2: Estrutura do vírus SARS-CoV-2.

Fonte: Adaptada de Ahmed, *et al.*¹⁷.

Dentre as proteínas estruturais, a proteína S é uma proteína

transmembrana encontrada na superfície externa do SARS-CoV-2, como representada na Figura 1.2, e é a principal responsável pela entrada do vírus nas células hospedeiras¹⁸. Isso ocorre através da interação da proteína S com a ACE2 que é um grande receptor expresso nas células do trato respiratório inferior, como representado na Figura 1.3. Dessa forma, o vírus se espalha para diferentes tipos de células e suprime as respostas dos anticorpos que combatem o vírus^{14,16,19-21}

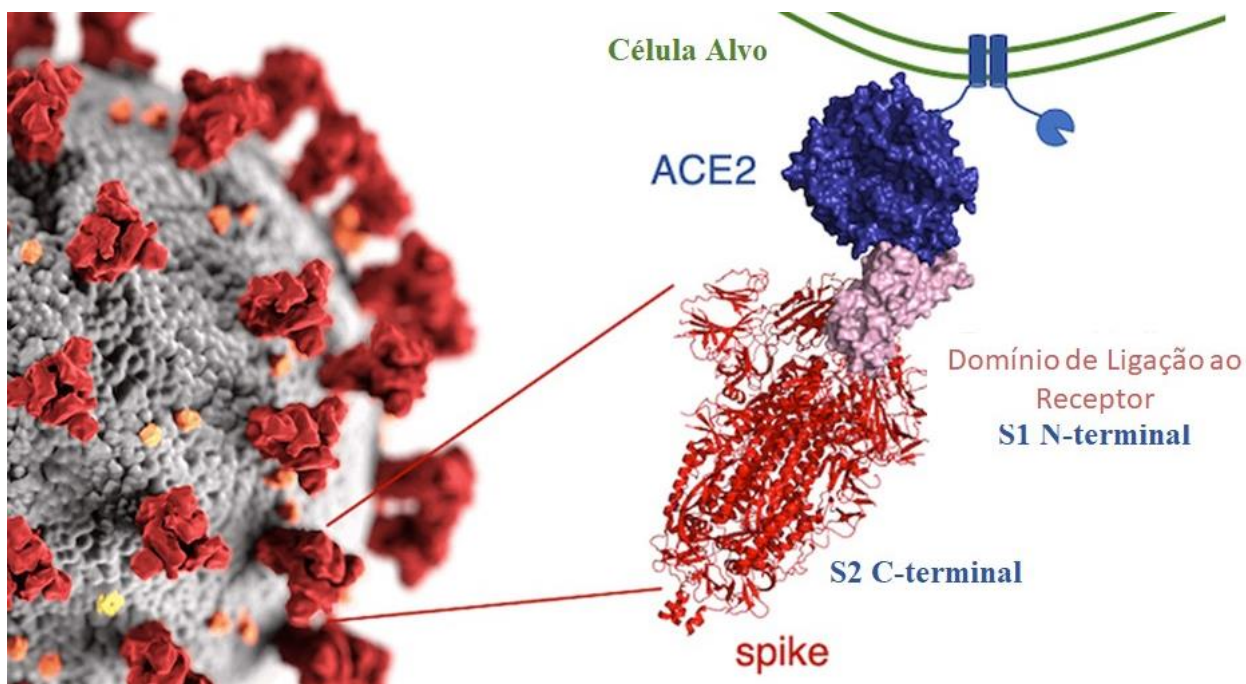


FIGURA 1.3: Interação do Peptídeo ACE2 com a Proteína S do SARS-CoV-2.

Fonte: Adaptada de Starr, *et al.*²².

Portanto, o rápido diagnóstico da COVID-19 é essencial para conter a propagação do vírus. A detecção imediata e o isolamento dos indivíduos afetados podem efetivamente quebrar a cadeia de transmissão. Assim, o diagnóstico precoce de novos casos de COVID-19 por meio de testagem em larga escala, tanto de indivíduos sintomáticos quanto assintomáticos, é crucial para interromper a disseminação do vírus por meio de estratégias de isolamento social e quarentena²³.

1.3. Métodos para diagnóstico da COVID-19

1.3.1. Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR)

A OMS recomenda que a confirmação da infecção por SARS-CoV-2 pode ser realizada pela detecção de sequências únicas de RNA por meio de testes de amplificação usando a Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa (RT-PCR do inglês: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) para confirmar a infecção por SARS-CoV-2²⁴⁻²⁶.

No entanto, embora eficaz, o RT-PCR, por ser um teste molecular, enfrenta desafios ao ser utilizado para testes em larga escala, rápidos e econômicos. Estes desafios decorrem da acessibilidade limitada da técnica, que normalmente só está disponível em grandes centros de pesquisa e laboratórios. Além disso, são necessários profissionais qualificados para operar o equipamento, bem como uma quantidade significativa de insumos, como tampões para extração de RNA, enzimas para transcrição reversa e reação em cadeia, *primers* e misturas de bases nitrogenadas. Além disso, o processo envolve etapas de extração, transcrição, desnaturação, anelamento e alongamento, resultando em um custo mais elevado e tempo de análise estendido, de aproximadamente 5-6 horas, conforme representado na Figura 1.4. Além disso, o teste é de uso limitado quando se trata de análises quantitativas na maioria dos casos^{24,25,27,28}.

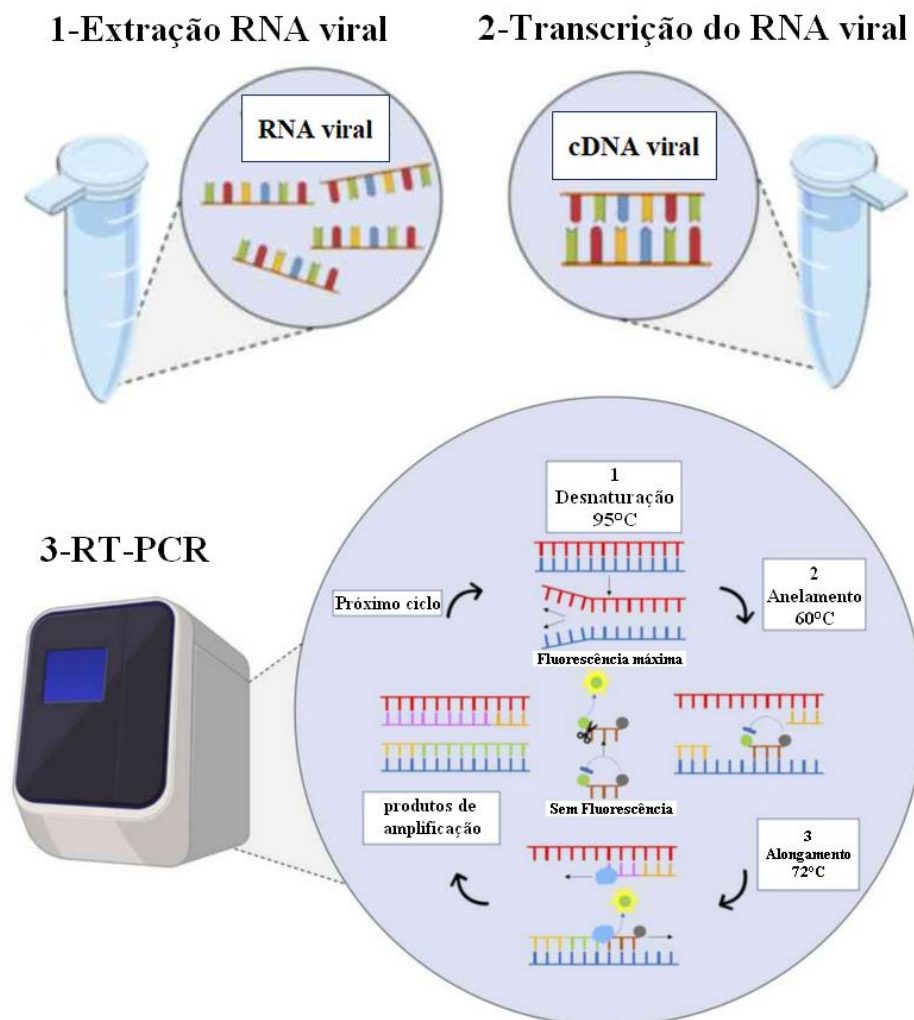


FIGURA 1.4: Representação esquemática do teste RT-PCR. Etapa 1 a extração do RNA viral do vírus; etapa 2 a transcrição do RNA viral e a etapa 3 o processo para diagnóstico a partir do RT-PCR.

Fonte: Adaptada de Falzone, *et al.*²⁹.

Na grande maioria dos casos, as amostras utilizadas para realizar o diagnóstico da doença envolve a coleta de *swab* oro ou nasofaringe, não permitindo a coleta pelo próprio paciente. Assim, é necessário pessoal especializado para a coleta, que fica sujeitos a contaminação. Em alguns poucos casos, são utilizadas amostras de coleta menos invasiva, como saliva e urina^{30,31}.

1.3.2. Testes sorológicos

Vários testes alternativos estão disponíveis para identificar o SARS-CoV-2 em pacientes, incluindo testes imunocromatográficos^{32,33} e imunoenaios enzimáticos (ELISA)^{34,35}. Embora esses testes ofereçam certas vantagens sobre o RT-PCR, por serem mais rápidos e menos dispendiosos, têm uma desvantagem importante: a dificuldade em detectar o vírus nas suas fases iniciais quando utilizados para detecção de anticorpos³⁶. Além disso, quando a carga viral é baixa, estes testes podem produzir resultados falsos negativos e falsos positivos, diminuindo a precisão. Como resultado, a confirmação de um diagnóstico potencial positivo requer o uso do RT-PCR³⁷.

Por exemplo, de acordo com a avaliação clínica de Shen *et al.*³⁸, um ensaio rápido de imunocromatografia com ouro coloidal para imunoglobulina classe M (IgM) e imunoglobulina classe G (IgG) em relação ao SARS-CoV-2 apresentou uma resposta clínica com sensibilidade de 71,1% em indivíduos positivos para PCR e uma especificidade de 96,2% em PCR-indivíduos negativos. O estudo revelou ainda que indivíduos com sintomas há mais de 14 dias tiveram uma taxa de sensibilidade significativamente maior, de 95,2%, indicando maior produção de anticorpos nesse período. Enquanto isso, o estudo de Demey *et al.*³⁹ comparou quatro testes imunocromatográficos que detectaram anticorpos IgM e IgG já disponíveis no mercado e constatou que todos os testes tiveram uma taxa de sensibilidade de 54,55% a 81,22% no décimo dia para IgM e IgG. Porém, no 15º dia, todos os testes apresentaram 100% de sensibilidade para IgG, enquanto dois testes ainda apresentavam baixas taxas de sensibilidade para IgM até 24 dias, tornando-os inadequados para o diagnóstico precoce da doença.

O teste ELISA também é capaz de identificar anticorpos anti-SARS-CoV-2. Beivis *et al.*⁴⁰ avaliaram esta técnica para detectar anticorpos imunoglobulina

classe A (IgA) e IgG em amostras de soro e plasma usando o domínio S1 recombinante da proteína S do vírus como antígeno. O estudo mostrou que o imunoenensaio ELISA apresenta boa sensibilidade para IgA e excelente sensibilidade para detecção de IgG. Os resultados indicaram que as amostras colhidas pelo menos quatro dias após um teste RT-PCR positivo mostraram 90,5% de concordância (IC 95%: 77,9–96,2) para IgA e 100% de concordância (IC 95%: 91,6–100) para IgG, o que prova que o método é confiável para detectar anticorpos.

Em vista disso, faz-se necessário investir em sistemas e em ensaios que possam auxiliar na determinação dos casos positivos mais rapidamente e nos estágios iniciais. De acordo Mavrikou *et al*⁴¹, o tempo ideal de diagnóstico da COVID-19, para conter a propagação do vírus, estaria entre os dias 1 a 3 de infecção, proporcionando assim um diagnóstico precoce do paciente e viabilizando a eficácia do monitoramento e do controle da doença. Como descrito por Xavier *at al.*⁴², que demonstra que os níveis de intensidade de sinal imunológico apresenta alta intensidade a partir do 5º dia de infecção, ou seja, no início dos sintomas, desenvolver métodos que possam realizar o diagnóstico da doença nos primeiros dias de infecção com uma sensibilidade melhor ou similar que o RT-PCR seria o ideal para diminuir a propagação e disseminação da doença, como representado na Figura 1.5.

Portanto a utilização de ensaios simples, rápidos, de baixo custo, com boa sensibilidade e seletividade poderia auxiliar no combate à pandemia devido ao novo coronavírus, bem como pode vir a ser útil em estudos futuros. Neste sentido, o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos surge como uma estratégia alternativa para a detecção de alvos que possam ser utilizados para o diagnóstico da COVID-19^{41,43}.

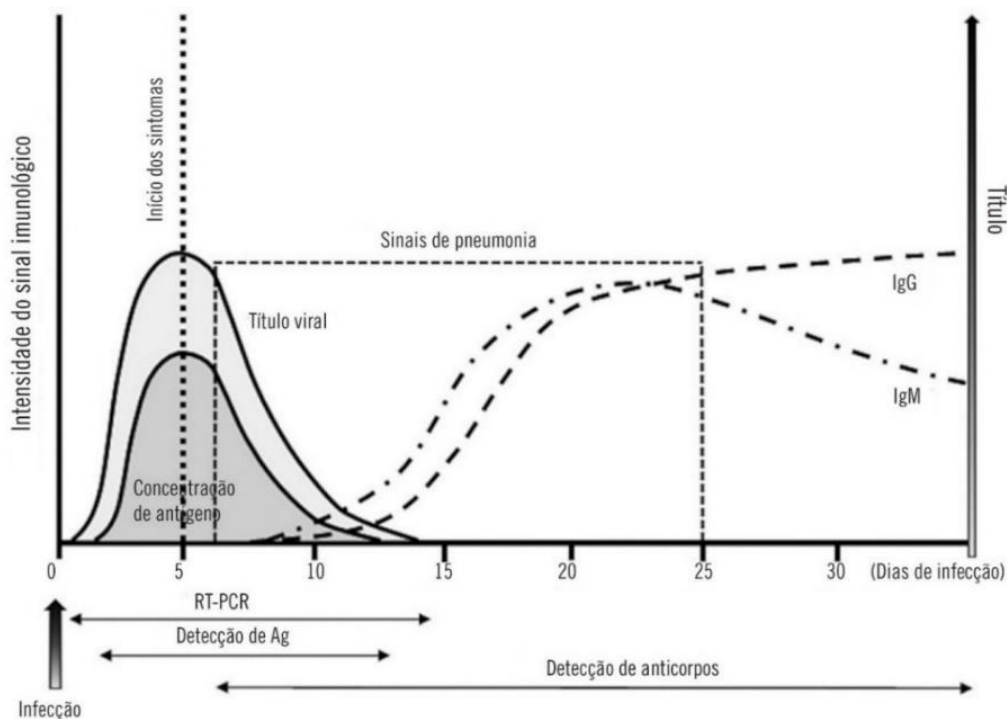


FIGURA 1.5: Evolução clínica e laboratorial da COVID-19.

Fonte: Xavier, *et al.*⁴².

1.4. Biossensores eletroquímicos para diagnóstico da COVID-19

Nos últimos anos, houve avanços significativos na aplicação de métodos eletroquímicos, principalmente para auxiliar o diagnóstico de doenças, impulsionando assim tecnologias mais robustas. Biossensores eletroquímicos estão ganhando popularidade devido à sua simplicidade, resposta rápida, flexibilidade, instrumentação miniaturizada, excelente sensibilidade e baixo custo⁴⁴. Como resultado, estão se tornando ferramentas alternativas para análise quantitativa ou semiquantitativa de vírus respiratórios⁴⁵. Vários tipos de biossensores eletroquímicos foram desenvolvidos e aplicados para a detecção de SARS-CoV-2 para diagnóstico da COVID-19, incluindo dispositivos baseados em transistores de efeito de campo (FET do inglês: *Field Effect Transistor*)⁴⁶⁻⁴⁸, métodos fotoeletroquímico⁴⁹⁻⁵¹, via eletroquimioluminescência (ECL)⁵²⁻⁵⁶ e também com uso de biossensores

potenciométricos⁴¹. No entanto, na maioria dos biossensores eletroquímicos relatados na literatura empregam principalmente técnicas voltamétricas e/ou impedimétricas.

Essencialmente, um biossensor é um dispositivo que emprega elementos biológicos para interagir com o analito e então converte as respostas bioquímicas em sinais mensuráveis⁵⁷ (Figura 1.6). Essa tecnologia é classificada com base no tipo de biorreceptor utilizado e na técnica empregada. Por exemplo, biossensores podem ser chamados de imunossensores quando são utilizadas interações antígeno/anticorpo, aptassensores quando aptâmeros são usados como biorreceptores e genossensores quando sequências de RNA ou DNA são usadas para detecção de alvos. Além disso, os sinais eletroquímicos podem ser medidos de várias maneiras, incluindo as técnicas de amperometria, voltametria⁵⁸, potenciometria, condutometria e via técnicas de impedância⁵⁹. Combinando essas técnicas com biomarcadores, é possível detectar proteínas^{60,61}, DNA e RNA^{62,63}, anticorpos^{64,65} ou outras biomoléculas⁶⁶ e mesmo moléculas simples.

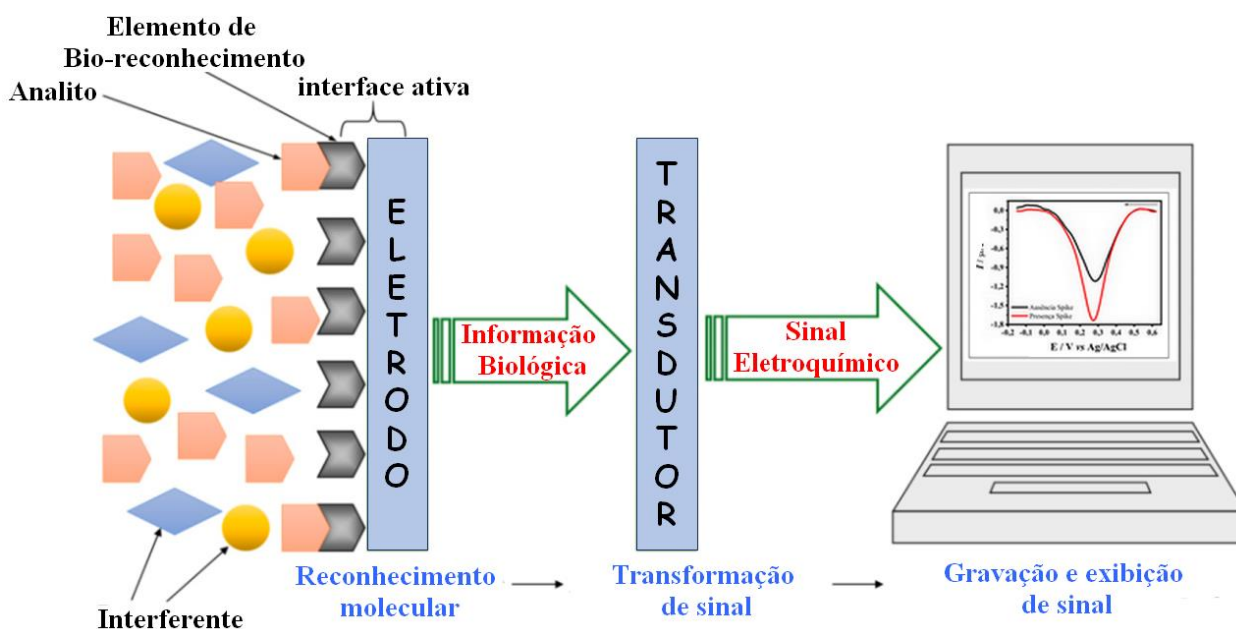


FIGURA 1.6: Representação esquemática para um biossensor.

Fonte: Adaptada de Apogee⁶⁷.

Além disso, os biossensores eletroquímicos podem ser classificados de acordo com o transdutor como voltamétricos, amperométricos ou impedimétricos⁶⁸. Nas seções a seguir, serão discutidos os vários tipos de biossensores, incluindo biossensores voltamétricos, amperométricos e impedimétricos, aplicados como métodos alternativos para o diagnóstico da COVID-19.

1.4.1. Biossensores voltamétricos

Numerosos biossensores voltamétricos foram criados para a identificação do SARS-CoV-2. Alguns desses estudos utilizaram técnicas eletroquímicas, como voltametria de pulso diferencial (DPV do inglês: *Differential pulse voltammetry*) e voltametria de onda quadrada (SWV do inglês: *Square wave voltammetry*) para detectar um alvo específico do SARS-CoV-2. As técnicas de DPV foram usadas para desenvolver imunossensores que faziam uso de os biorreceptores imobilizados diretamente na superfície do eletrodo de trabalho (WE do inglês: *working electrode*)^{69,70} ou que modificavam o WE com materiais funcionalizados para posterior ancoragem dos biorreceptores⁷¹⁻⁷⁴. Materiais como nanopartículas de ouro (AuNPs)⁷⁵, nanoestrelas de ouro (AuNS)^{76,77}, ouro eletrodepositado⁷⁴ e óxido de grafeno reduzido (rGO)^{76,77} ou óxido de grafeno (GO) foram aplicados para modificação do eletrodo devido à sua grande área superficial e biocompatibilidade com materiais biológicos^{78,79}. Um estudo de Hashemi *et al.*⁷⁷ utilizaram um eletrodo de carbono vítreo (GCE do inglês: *Glassy carbon electrode*) modificado com rGO e AuNS para imobilizar anticorpos para capturar a subunidade S1 da proteína S do SARS-CoV-2 no plasma sanguíneo. Os autores utilizaram as técnicas de Voltametria Cíclica e DPV e alcançaram um limite de detecção (LD) de $0,18 \times 10^{-19} \% \text{V/V}$ (% V/V é a relação anticorpos monoclonais V/V contra a glicoproteína S1 do SARS-CoV-2) e o sensor foi testado com amostras reais e demonstrou sensibilidade de 100% e

especificidade de 85%, valores ideais para diagnóstico.

Muitos estudos exploraram aptâmeros^{80,81} ou *hairpin*⁸² como sondas de captura em aptassensores para detectar SARS-CoV-2 e imobilizar anticorpos ou proteínas virais. Sari *et al.*⁸¹ alcançaram um LD de 2,63 ng mL⁻¹ modificando a superfície de um *screen printed electrode* (SPE) com AuNPs e utilizando a técnica de DPV. Por outro lado, Xue *et al.*⁸² utilizaram múltiplas *hairpin* para ligação do alvo e um *hairpin* imobilizado no eletrodo de ouro (GE), utilizando também a DPV obtiveram um LD inferior de 9,79 fg·mL⁻¹. Alguns genossensores usaram sequências de cadeia curta complementares às sequências genômicas da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) do SARS-CoV-2 como sondas de captura^{73,83} ou primers⁸⁴. Embora os LDs sejam baixos, o que indica um bom desempenho dos métodos, nenhum desses estudos avaliou genossensores em amostras de pacientes com COVID-19.

1.4.2. Biossensores amperométricos

Outra forma de explorar os biossensores eletroquímicos frente ao SARS-CoV-2 foi a utilização de técnicas de cronoamperometria/amperometria. Nesse caso, o uso de marcadores enzimáticos, como a enzima de fosfatase alcalina (ALP do inglês: *Alkaline phosphatase*) ou peroxidase de rábano (HRP do inglês: *Horseradish peroxidase*) são frequentemente usadas em imunossensores para gerar um sinal analítico através de substratos adicionados ao sistema. Por exemplo, Peng *et al.*⁸⁵ e Samper *et al.*⁸⁶ desenvolveram imunossensores para detectar anticorpos IgG contra a proteína S e a proteína N, respectivamente. No estudo de Peng *et al.*⁸⁵, um anticorpo secundário (Ab2) marcado com ALP foi utilizado, alcançando um LD de 1,64 ng mL⁻¹ em apenas 13 minutos de incubação utilizando o substrato eletroquímico p-aminofenil fosfato. Por outro lado, Samper *et al.*⁸⁶ empregaram um

Ab2 marcado com HRP, obtendo um LD de 33,7 ng mL⁻¹ em tampão PBS e 5,8 ng mL⁻¹ em plasma usando substrato 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB). No entanto, as amostras clínicas não foram avaliadas.

Além disso, Erdem *et al.*⁸⁷ desenvolveram um imunossensor amperométrico para detectar a proteína S usando um Ab2 marcado com HRP. Apesar de atingir um LD de 0,13 ng mL⁻¹, foi necessário um tempo de incubação de 2 horas e 30 minutos para todos os reagentes. Além disso, o sensor não foi avaliado em amostras clínicas, apresentando desvantagens significativas em comparação com outros biossensores mais rápidos, mais sensíveis e já utilizados em amostras reais.

1.4.3. Biossensores Impedimétricos

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS do inglês: *Electrochemical impedance spectroscopy*) pode ser usada para desenvolver biossensores para COVID-19. O uso do EIS é especialmente interessante em sensores *label-free*, que tendem a ser mais simples na construção e mais baratos, como a pesquisa realizada por Mehmandoust *et al.*⁸⁸, que desenvolveram biossensores que imobilizam o domínio peptidase da ACE2. Utilizaram um tempo de 30 minutos para interação e captura do alvo, obtendo assim um LD de 100,0 fg mL⁻¹ para a proteína S do SARS-CoV-2. Este LD é digno de nota quando comparado a Soto *et al.*⁸⁹, que utilizaram peptídeos sintéticos para detecção da proteína S com tempo de incubação de 15 minutos e alcançaram LD de 18,2 ng mL⁻¹ em soluções comerciais de proteína S e 0,01 cópias mL⁻¹ contendo partículas lisadas de SARS-CoV-2 para estudos com partículas virais. Esses biossensores foram testados em amostras reais de indivíduos saudáveis e pacientes positivos para COVID-19, comprovando que são uma alternativa eficaz para o diagnóstico da doença.

Vários tipos de biossensores impedimétricos foram desenvolvidos para

detectar antígenos virais, incluindo imunossensores, que são capazes de detectar antígenos como a proteína S⁹⁰⁻⁹³, proteína N^{94,95}, subunidade S1^{90,91} ou domínio de ligação ao receptor (RBD, do inglês *receptor-binding domain*)⁹². Alguns desses imunossensores foram relatados na literatura sem a necessidade da etapa de modificação do WE com nanomateriais. Nestes casos, os anticorpos contra a proteína S ou N foram imobilizados na superfície do eletrodo para se ligarem aos antígenos virais. Todos os estudos utilizaram um tempo de incubação de 30 minutos ou menos. Um dos imunossensores impedimétricos mais sensíveis foi desenvolvido por Ehsan *et al.*⁹², que alcançou um LD de 0,25 fg mL⁻¹ para a proteína S e foi testado em amostras reais de *swab* nasofaríngeos de pacientes com COVID-19. Para a proteína N, Ayala-Charca *et al.*⁹⁴ desenvolveram um imunossensor com LD de 116 fg mL⁻¹, usando polímero condutor e nanofolhas de rGO na modificação do eletrodo. Este sensor também foi testado em amostras de *swab* nasofaríngeo.

Como alternativa para melhorar estes ensaios, o uso de sensores eletroquímicos descartáveis pode ser interessante para auxiliar no diagnóstico da COVID-19, visto que estes dispositivos apresentam muitas possibilidades de aplicação, inclusive vêm sendo utilizados para o diagnóstico de outras doenças, incluindo infecciosas⁹⁶⁻⁹⁸.

1.5. Utilização de dispositivos eletroquímicos descartáveis para diagnóstico de doenças

A utilização de dispositivos eletroquímicos descartáveis para o diagnóstico de doenças representa um grande avanço na saúde pública e na medicina. Esses dispositivos são valiosos por fornecerem resultados rápidos e precisos, com baixo custo, facilidade de operação e ampla janela de uso, além disso, os eletrodos descartáveis podem realizar uma medida por eletrodo, sem necessidade de

renovação, com baixo custo e facilidade na montagem do sistema devido à possível miniaturização. No contexto da COVID-19, a utilização destes dispositivos foi impulsionada, visto que, ao se considerar aplicações em diagnóstico clínico, os eletrodos descartáveis costumam ser amplamente utilizados. Eles não necessitam de métodos de tratamento de superfície, reduzem o tempo e o custo da produção biológica, aumentando assim a frequência do diagnóstico. Além disso, os dispositivos descartáveis podem ser modificados para fornecer testes do tipo *point-of-care* (POC), o que implica em detecção rápida no local de atendimento.

Para fabricação destes dispositivos pode-se utilizar diferentes técnicas, entre elas a técnica de serigrafia. Essa técnica consiste na aplicação de tinta condutora, normalmente a base de carbono, em um substrato que geralmente é material a base de polímero, cerâmica, tecido ou papel. É importante ressaltar que este substrato apresenta uma máscara, que normalmente é de vinil, com o formato dos eletrodos a serem utilizados. Após a aplicação da tinta de carbono, é aplicada uma tinta de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) para obtenção do eletrodo de referência (Como será discutida no item 3.2). Depois de concluída todas as etapas de fabricação, utilizando tinta de carbono, tem-se o dispositivo *screen-printed carbon electrodes* (SPCE). Portanto, essa tecnologia só necessita de tinta, um material como substrato, um molde com o formato do eletrodo, um pincel para aplicar a tinta e uma estufa para à cura. Devido ao baixo custo e facilidade de produção em massa, esses dispositivos estão sendo produzidos em laboratório e aplicados em diferentes matrizes, como em amostras biológicas para o diagnóstico de doenças. A Figura 1.7 apresenta alguns exemplos de dispositivos fabricados no nosso grupo de pesquisa a partir da serigrafia, apresentando diversos formatos, como: dispositivo simples, dispositivos em formato de arranjo de 8 células eletroquímicas independentes e dispositivos utilizados em sistema em fluxo.

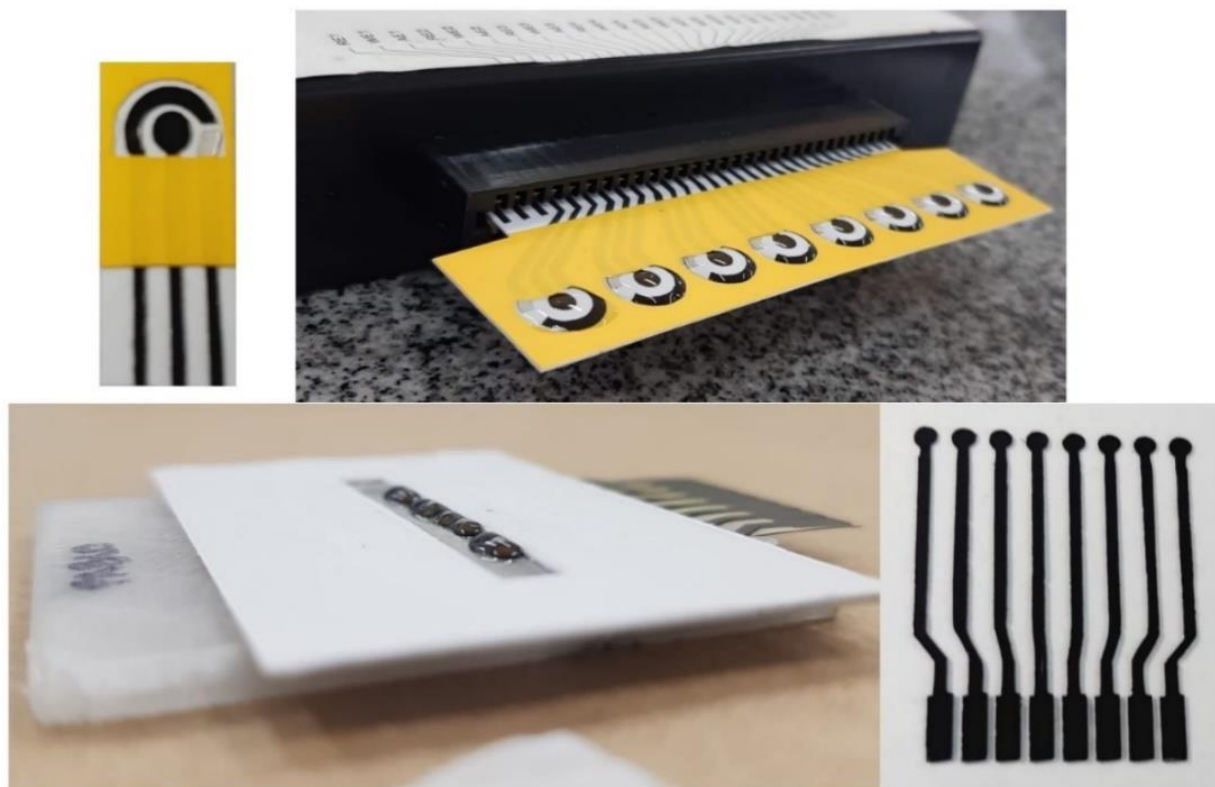


FIGURA 1.7: Eletrodos serigrafados com diferentes formatos.

Fonte: O Autor

O grupo de pesquisa no qual este trabalho foi desenvolvido vem realizando um grande esforço para desenvolver dispositivos eletroquímicos descartáveis usando a técnica de serigrafia para diversas aplicações, e mais recentemente focado na aplicação para diagnóstico de doenças, como a de Alzheimer^{99,100}, câncer de próstata e de cabeça e pescoço¹⁰¹⁻¹⁰³ e para doenças infecciosas, como para Influenza A e COVID-19¹⁰⁴.

Como visto, os sensores eletroquímicos descartáveis são particularmente valiosos devido à sua simplicidade, baixo custo, acessibilidade e alta sensibilidade e seletividade clínica^{105,106}. No entanto, estes dispositivos podem ainda ser melhorados, e uma possibilidade para este melhoramento é a utilização de partículas magnéticas (PMs), visto que seu uso pode elevar a seletividade e sensibilidade da detecção. Essa abordagem já vem sendo documentada na literatura para melhorar a precisão do

diagnóstico. As PMs oferecem uma série de benefícios, incluindo a pré-concentração do analito, facilitando a separação do analito dos agentes interferentes em amostras biológicas, auxiliando nas etapas de lavagem^{107,108} e amplificando o sinal analítico^{109,110}.

1.6. Partículas Magnéticas

As PMs são partícula comumente compostas de óxidos de ferro, como magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), que podem ser facilmente sintetizadas em nanopartículas ou podem ser encontradas comercialmente em tamanhos maiores. Além disso, elas podem ser modificadas com uma variedade de grupos funcionais, como grupos tiol, hidroxila, aminas e carboxila¹¹¹, conforme demonstrado na Figura 1.8. Esta adaptabilidade os torna uma escolha ideal com base nas necessidades específicas de análise.

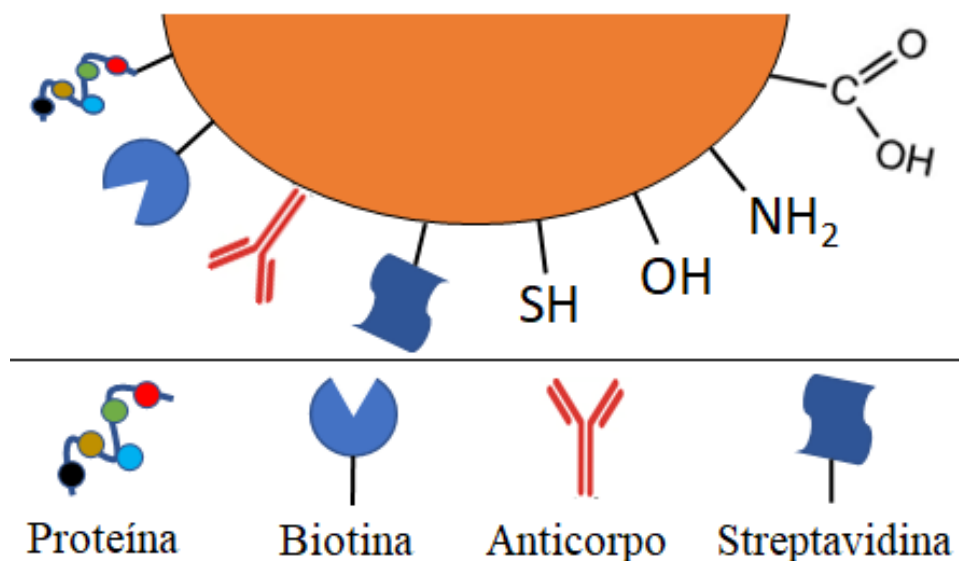


FIGURA 1.8: Revestimentos das PMs com diferentes superfícies funcionalizadas para possíveis aplicações diagnósticas.

Fonte: adaptada de Sultan¹¹².

As PMs tornaram-se cada vez mais proeminentes em uma variedade de campos de pesquisa. Uma de suas aplicações mais valiosas é a possibilidade de atuarem como suporte para imobilização de componentes biológicos, como ácidos nucléicos e proteínas. Suas propriedades únicas, incluindo biocompatibilidade, facilidade de funcionalização, grande área de superfície e controle mediado por campo magnético sobre sua localização e transporte, tornam-nas uma ferramenta eficaz para aplicações em biossensores em comparação com métodos tradicionais, como ligação a superfícies bidimensionais, como eletrodos ou placas de microtitulação^{113,114}. Como resultado, as PMs têm sido utilizadas no desenvolvimento de imunossensores, que oferecem maior sensibilidade, tempo de análise reduzido e efeitos de matriz minimizados^{115,116}. A grande superfície disponível para imunocaptura permite a imobilização de numerosas biomoléculas, garantindo assim, em última análise, baixos valores de LD do ensaio¹¹⁷.

1.6.1. Aplicação das PMs em métodos eletroquímicos

Os métodos de diagnóstico, empregando sensores eletroquímicos, muitas vezes enfrentam dificuldades devido à presença de espécies interferentes em amostras complexas, como, sangue total, soro, urina e saliva. Essas potenciais interferentes, que podem ser espécies redox e vários outros compostos, podem interagir com reagentes de procedimento de análise e apresentar respostas similares às dos analitos¹¹⁸. As PMs oferecem uma solução para esse problema, sua grande área superficial reduz o tempo de reação e o volume necessário de reagentes e amostras¹¹⁹. As PMs podem concentrar o analito alvo em sua superfície, permitindo a captura e separação do analito da matriz da amostra com uso de ímãs externos¹²⁰. As PMs podem ainda permitir a amplificação da resposta analítica permitindo alcançar LDs muito baixos.

Existem duas formas principais de usar PMs no desenvolvimento de ensaios: formação de estruturas sanduiches sobre a superfície do WE, realizando assim a modificação deste eletrodo (Figura 1.9A), ou no desenvolvimento de estruturas sanduiches sobre a superfície das PMs, que posteriormente são adicionadas sobre a superfície do WE, ao qual apresenta um ímã localizado sob WE (Figura 1.9B).

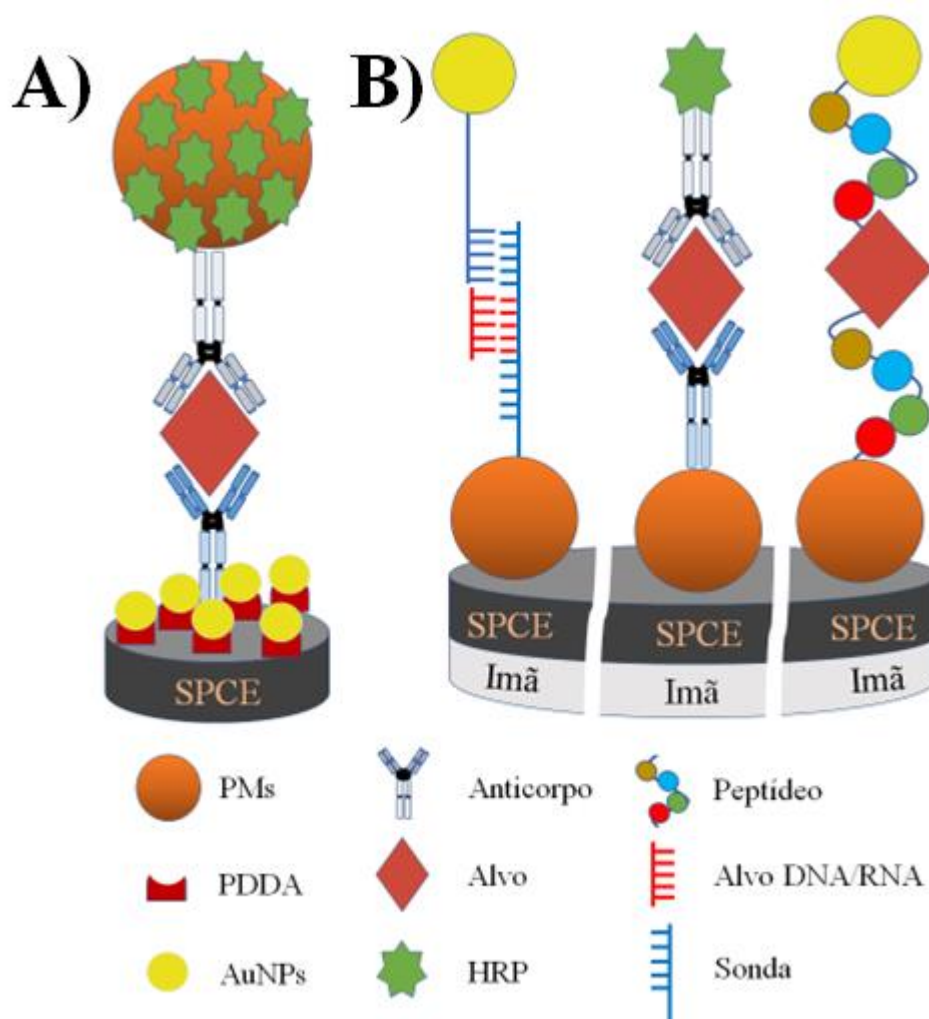


FIGURA 1.9: Representação esquemática das diferentes estratégias de aplicação das PMs. A) Uso de PMs após modificação da superfície do WE. B) Utilização de PMs no desenvolvimento do método sem a modificação do WE para posterior aplicação na superfície do eletrodo com diferentes sondas.

Fonte: O Autor.

As PMs contendo marcadores redox imobilizados são um meio eficaz de capturar, separar e pré-concentrar substâncias-alvo para aumentar a sensibilidade e atingir baixo LD. Este método é frequentemente utilizado em imunoenaios, conforme representado na Figura 1.9A, onde um eletrodo modificado é empregado para ancorar anticorpos específicos que interagem com antígenos, normalmente usando cloreto de polidialildimetilamônio (PDDA, do inglês, poly(diallyldimethylammonium) chloride) e AuNPs. Por exemplo, De Oliveria *et al.*¹⁰⁰ e Proença *et al.*¹²¹ detectaram com sucesso a presença das proteínas ADAM10 (biomarcador da doença de Alzheimer) e cyfra-21-1 (biomarcador do câncer de próstata), respectivamente, modificando a superfície do SPCE. Ambos os estudos demonstraram detecção altamente sensível de marcadores de doença, com LD muito baixo (da ordem de fg mL⁻¹) e excelente especificidade.

Uma abordagem para empregar as PMs no diagnóstico de doenças específicas é por meio da implementação de um ensaio que proporciona a formação da estrutura sanduiche na estrutura das PMs. Este ensaio específico envolve os processos de captura e detecção que ocorrem fora da superfície do WE, para posterior adição no WE para realizar as medidas, conforme ilustrado na Figura 1.9B. Esta metodologia pode ser aplicada a vários alvos potenciais, incluindo DNA e RNA^{122,123}, antígenos^{52,79,99,124,125} e anticorpos¹²⁶.

1.6.2. Biossensores eletroquímicos usando PMs para diagnóstico da COVID-19

Assim como discutido nos itens anteriores, o SARS-CoV-2 é um vírus que apresenta uma rápida propagação. Portanto, torna-se crucial quebrar a cadeia de transmissão o mais rapidamente possível para diminuir a transmissão viral. A chave para conseguir isso é o diagnóstico precoce com alta sensibilidade e especificidade.

Muitos vírus partilham estruturas e sintomas semelhantes, por exemplo, devido às suas semelhanças, a COVID-19 pode ser facilmente confundida com MERS ou gripe, tornando de extrema importância os diagnósticos precisos¹²⁷ o que é crucial para indicar o tipo de tratamento e a necessidade ou não de um maior controle para evitar a propagação da doença na população.

Para atender a esta necessidade premente, foram desenvolvidos biossensores para detectar o SARS-CoV-2, o vírus responsável pela COVID-19¹²⁸⁻¹³². Embora muitos testes de diagnóstico já estejam disponíveis, a atualização constante destes sistemas para identificar novas variantes de vírus e manter os custos baixos são essenciais para a acessibilidade global. Os métodos eletroquímicos são promissores por sua portabilidade, alta frequência analítica e baixo custo. Embora atualmente não existam testes eletroquímicos comerciais para a COVID-19, estudos inovadores estão explorando o uso de PMs para melhorar a precisão e a seletividade da detecção de biomarcadores SARS-CoV-2. Pois, ao modificar as PMs com diferentes biorreceptores, de acordo com o alvo do SARS-CoV-2, um diagnóstico preciso pode ser alcançado. Veja a Figura 1.10 para uma visualização dessas abordagens.

De acordo com a literatura, a estratégia para a etapa de captura utilizando as PMs, vai depender do alvo a ser detectado, como para as sequências de RNA do SARS-CoV-2 que podem ser capturadas usando cadeias de RNA ou genes específicos, ancoradas às PMs¹³³⁻¹³⁵, enquanto as proteínas virais do SARS-CoV-2 podem ser capturadas com anticorpos¹³⁶ ou peptídeos¹³⁷⁻¹⁴¹. Anticorpos primários (Ab1) podem até ser anexados a PMs para capturar proteínas específicas, enquanto proteínas específicas¹⁴² ou peptídeos podem ser anexados a PMs para captura de anticorpos¹⁴³. Portanto, para a etapa de captura deve-se utilizar biomoléculas que sejam compatíveis com o alvo.

O tipo de marcador utilizado também pode afetar o sinal analítico medido

pelo biossensor, com opções que variam de HRP^{137,138,140,142} ou ALP¹⁴¹ ou nanopartículas como AuNPs ou AgNPs¹⁴⁵ conjugadas a peptídeos, *primers* e Ab2. Além disso, Li e Lillehoj¹⁴⁰ demonstraram que o sinal analítico pode amplificado imobilizando marcadores e biorreceptores em PMs. Por último, as PMs podem ser utilizadas para auxiliar na detecção de vários alvos em amostras biológicas, incluindo amostras de urina, soro humano, plasma sanguíneo, sangue bruto, saliva ou *swab*, conforme ilustrado na Figura 1.10.

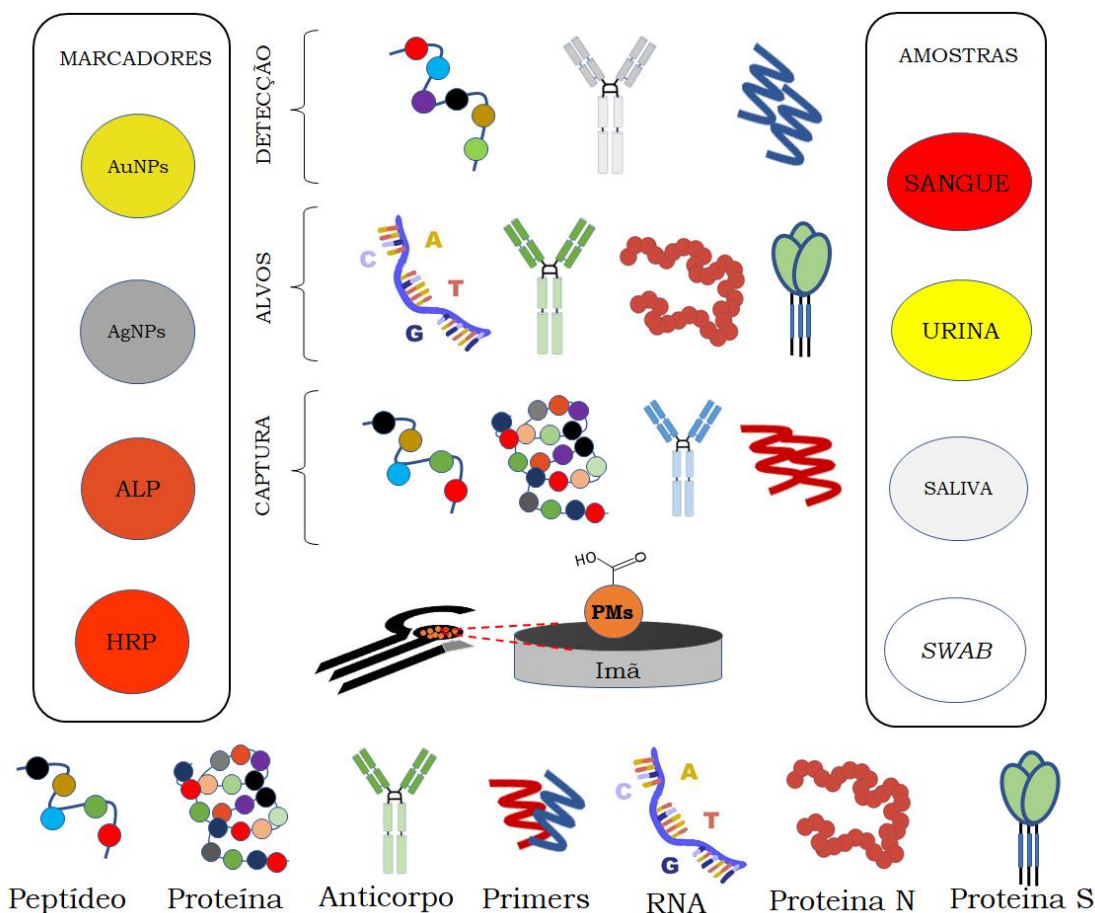


FIGURA 1.10: Possíveis estratégias eletroquímicas para auxiliar no diagnóstico de COVID-19 utilizando PMs funcionalizados com grupo carboxila (-COOH).

Fonte: O Autor.

Realizando uma análise exploratória nas bases de dados *Web of Science* e *Scopus* encontrou-se artigos que relacionaram as palavras-chaves: COVID-19,

eletroquímica e PMs. Uma forma de representar estes resultados obtidos é por meio do mapa bibliométrico utilizando as principais palavras-chave (Figura 1.11). Na figura observa-se que os termos *coronavirus*, *magnetic beads*, *SARS-CoV-2* e *COVID-19* se destacaram. O mapa também ilustrou o tipo particular de biossensor desenvolvido (imunossensores) e os biomarcadores primários utilizados (proteína S e anticorpos).

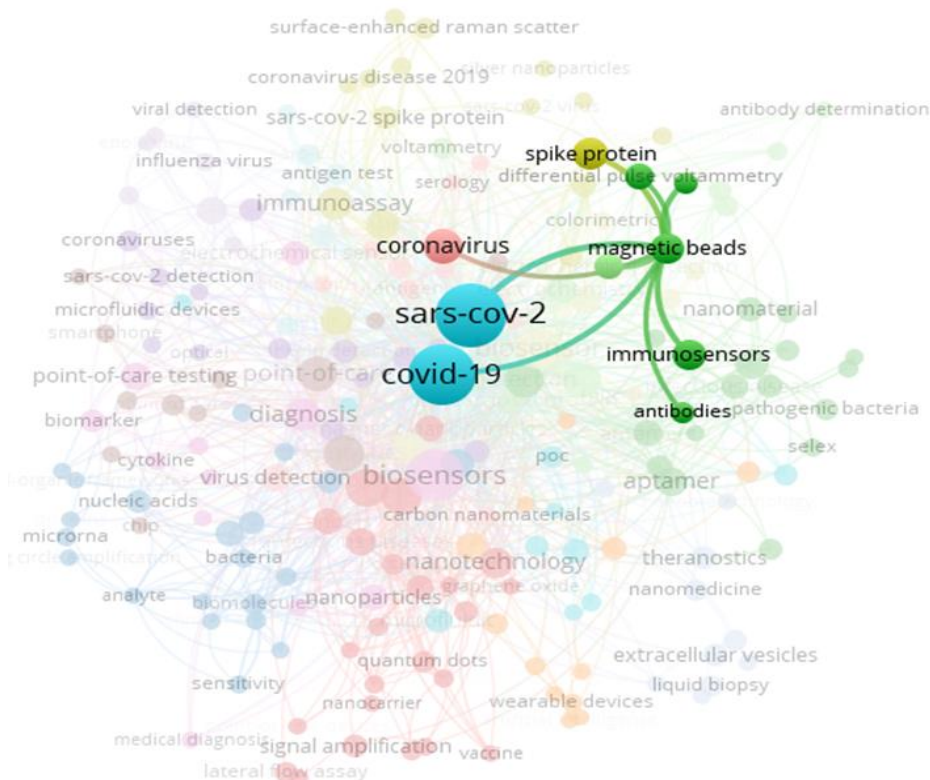


FIGURA 1.11: Mapa bibliométrico referente a correlação das palavras-chave utilizadas pelos autores dos trabalhos publicados na base de dados Scopus.

Fonte: O autor.

O uso de vários marcadores eletroquímicos abre possibilidades interessantes para inovação em biossensores. A combinação desses marcadores com técnicas apropriadas de eletroanálise pode melhorar significativamente a aquisição de dados. Portanto, selecionar o marcador adequado e o método de medição do sinal eletroquímico é crucial na criação de um biossensor sensível e seletivo¹³⁷. Por

exemplo, no trabalho de Lambert et al.¹⁴⁴ que usaram as PMs conjugadas com anticorpos para captura do alvo (proteína N) e utilizaram um anticorpo secundário conjugado com AuNPs na etapa de detecção, além disso, para aplicação foi utilizada amostras de *swab* nasofaríngeas, e obtiveram um LD de 2,64 ng mL⁻¹.

Em vez disso, Torrente-Rod et al.¹⁴⁵ e Vásquez et al.¹³⁷ optaram por utilizar a enzima HRP, que possui resposta rápida. Embora exija um mediador redox para melhorar o sinal analítico, permite a detecção imediata sem etapas de condicionamento, ao contrário dos AuNPs, Torrente-Rod, et al. realizaram a modificação das PMs com proteína S e N para determinação de IgG, IgM e IgA e obtiveram baixos valores de LD para os 3 anticorpos. Porém Vásquez, et al. ancorou anticorpo nas PMs para determinar a presença da proteína S, e obtiveram LD de 22,5 ng mL⁻¹. Em contrapartida, Fabiani et al.¹⁴¹ utilizaram a enzima ALP, conjugada com um anticorpo secundário, para a mesma estratégia de captura de Vásquez et al.¹³⁷. Apesar do ciclo catalítico da ALP ser mais lento que o da HRP, ela mantém um sinal analítico constante por longos períodos, o que se torna uma vantagem notável para melhorar a sensibilidade¹⁴⁶. Os autores também utilizaram o mesmo método para detectar a proteína N, obtendo menor LD (8 ng mL⁻¹) do que com a proteína S no estudo de Vásquez. Isto sugere o uso potencial das PMs para auxiliar nas estratégias de diagnóstico de COVID-19¹⁴¹.

É importante notar que, embora os métodos mencionados acima utilizem PMs para realizar a formação de estruturas sanduiches, essas PMs também podem ser utilizados para alterar a superfície de um eletrodo. Em um estudo conduzido por Li e Lillehoj¹⁴⁰, eles usaram PMs conjugadas com HRP para detectar a proteína N em um eletrodo serigrafado com tinta de ouro (SPGE, do inglês *Screen-printed gold electrode*) que havia sido modificado com um Ab2. As medições resultantes foram feitas em célula microfluídica, usando cronoamperometria, e o LD alcançado foi de 10 pg mL⁻¹ para amostras de soro diluídas 5 vezes¹⁴⁰.

Por outro lado, pesquisadores como Malla et al.¹³⁸ e Tok et al.¹⁴⁷ desenvolveram métodos portáteis e simples que envolvem a imobilização de óxido de grafeno reduzido e anti-SARS-CoV-2 nas PMs para capturar o RNA e proteína S, respectivamente^{138,147}. A resposta eletroquímica indicou excelente captura e detecção do alvo em ambos os métodos, com capacidade de detectar os alvos em amostras de no soro e saliva^{138,147}.

Além disso, Dos Santos, et al.¹⁰⁴ desenvolveram um ensaio que captura o RNA viral do SARS-CoV-2 e da influenza A em amostras de saliva, utilizando um dispositivo eletroquímico simples para detecção. O método foi considerado eficaz na detecção do RNA do SARS-CoV-2, juntamente com o vírus influenza A, e o LD para o SARS-CoV-2 foi de 5,0 fmol L⁻¹.

Como visto, o diagnóstico da COVID-19 realizada por meio da técnica RT-PCR, apesar de ser a principal método para o diagnóstico da doença, apresenta algumas limitações que dificultam a análise rápida e aplicação em locais de difícil acesso, visto que diagnósticos rápidos e em massa são cruciais para o controle da doença. Portanto, neste trabalho é proposto um ensaio magnético simples e rápido para o diagnóstico da COVID-19 baseado em dispositivos eletroquímicos descartáveis e de baixo custo, sendo que estes dispositivos apresentam a possibilidade da portabilidade com possível aplicação em POC. A determinação será realizada pela detecção indireta da proteína S do vírus SARS-CoV-2, pois posteriormente será adicionado o marcador químico de AuNPs modificadas com peptídeos ACE2. Assim, o desenvolvimento de dispositivos para a detecção do marcador ACE2/AuNPs bioconjugada a proteína S pode ser uma estratégia de grande importância para o diagnóstico da COVID-19 de forma rápida, simples e de baixo custo. É fundamental o desenvolvimento de métodos que possam gerar informações úteis no controle e combate ao SARS-CoV-2, diminuindo assim a transmissibilidade da doença COVID-19.

Capítulo 2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho objetiva desenvolver um método simples e de baixo custo para detecção da proteína S do SARS-CoV-2 em amostras de saliva e de urina, com uso de PMs, AuNPs, peptídeo ACE2 e dispositivos eletroquímicos descartáveis de SPCE, utilizando a técnica de DPV e que possa auxiliar no diagnóstico precoce da COVID-19.

2.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver e construir eletrodos descartáveis por meio da técnica de serigrafia utilizando materiais descartáveis de baixo custo;
- Sintetizar AuNPs estabilizadas com grupos citrato e realizar a etapa de conjugação com o peptídeo ACE2;
- Preparar e caracterizar o bioconjugado PM-ACE2/Proteína S/ACE2-AuNPs, formados depois das etapas de captura e detecção da Proteína S;
- Definir e avaliar as condições experimentais para captura da proteína S utilizando peptídeo ACE2 conjugado nas partículas magnéticas e AuNPs;
- Otimizar os procedimentos adotados nas etapas do ensaio magnético;
- Aplicar o ensaio magnético na determinação da proteína S em amostras de saliva e urina obtidas de indivíduos saudáveis e indivíduos infectados por SARS-CoV-2;
- Comparar os resultados obtidos da quantificação da proteína S com aqueles obtidos via método de RT-PCR e avaliar a correlação dos dados clínicos dos pacientes hospitalizados.

Capítulo 3

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes, Materiais e Equipamentos

Fosfato de sódio dibásico, dihidrogenofosfato de potássio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, dimetilsulfóxido e Tween 20 foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O reagente de dodecil sulfato de sódio (SDS) foi adquirido da Medicago USA Inc. N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), dimetilsulfóxido (DMSO), ácido ferroceno monocarboxílico, peróxido de hidrogênio 30% (H₂O₂), citrato trissódico, ácido 4-morfolineetanossulfônico (MES), albumina de soro bovino (BSA, do inglês, *bovine serum albumin*) cloreto de ouro (III) tri-hidratado 99,9% (HAuCl₄·3H₂O), cloridrato de 2-aminoetil maleimida, etanolamina, cartuchos de extração em fase sólida C18 sep-pack, ácido trifluoroacético, triisopropilsilano, ditiotreitól (DTT) e éter etilbutílico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e todos estes compostos foram utilizados sem purificação adicional. PMs funcionalizadas com grupos carboxílicos (~1,0 µm de diâmetro médio, com concentração de partículas de 10 mg mL⁻¹) foram obtidas da Invitrogen (Dynabeads™ MyOne™ Carboxylic Acid, ThermoFisher Scientific, Prod. No. 65012). Tinta de carbono (C2160602D2) e tinta Ag/AgCl (C2130429D3) foram adquiridas da Gwent Electronic Materials Ltd., Reino Unido. Os N-(fluorenil-9-metoxicarbonil) aminoácidos (FMOC-aas) foram adquiridos da Advanced Chemteck. 0,7 mmol g-resina 1RINK-amida foi adquirida da Advanced Chemteck CAT SA5130. A anticorpo anti-spike (ab272854) foi obtida da Chimeric, EUA. Vinil adesivo e cloreto de polivinila de 0,5 mm de espessura (PVC, do inglês *Polyvinyl chloride*) foram adquiridos no mercado local.

Tampão fosfato salino (PBS), em pH 7,4, foi preparado utilizando Na₂HPO₄ 10,0 mmol L⁻¹, KH₂PO₄ 1,8 mmol L⁻¹, NaCl 136,9 mmol L⁻¹ e KCl 2,7

mmol L⁻¹. A solução PBS-Ca-Mg foi preparada adicionando CaCl₂ 1,0 mmol L⁻¹ e de MgCl₂ 0,5 mmol L⁻¹ em solução de PBS. PBS-TW foi preparado adicionando 0,05% (v/v) de Tween 20 em PBS e PBS-DMSO foi preparado diluindo uma solução de DMSO grau cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC do inglês: High performance liquid chromatography) a 8% (v/v) em PBS. A solução alvejante de azul brilhante de Coomassie 0,1% (CBB, do inglês: *Coomassie brilliant blue*) empregada nos experimentos consistiu em 10% de ácido acético, 50% de etanol e 40% de água em um agitador. Solução tampão Tris-Glicina/SDS: 25 mmol L⁻¹ Tris base, 190 mmol L⁻¹ glicina e 0,1% SDS. Tampão Laemmli 2X/tampão de carga: 4% SDS, 10% 2-mercaptoetanol, 20% glicerol, 0,004% azul de bromofenol e 0,125 mol L⁻¹ Tris-HCl. Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando água ultrapura (condutividade não menor do que 18 MΩ cm) obtida de um sistema Milli-Q Millipore (Bedford, EUA).

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM, do inglês: *Transmission electronic microscopy*) com análise de raios X por energia dispersiva (EDS, do inglês: *Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*) foram obtidas a com FEI Tecnai G2 (Oregon, EUA). Um medidor de pH SATRA modelo PHS3BW foi utilizado para realizar medições de pH das soluções. As medidas voltamétricas foram realizadas em um multipotenciostato portátil μ stat 8000 da DropSens (Espanha). O corte do vinil adesivo foi realizado utilizando uma impressora de corte artesanal Silhouette Cameo (Silhouette America, Inc.). A interação da proteína S do SARS-CoV-2 com a ACE2 foi estudada usando a técnica de microbalança de cristal de quartzo (QCM, do inglês: *quartz crystal microbalance*) por meio da aplicação de uma microbalança de cristal de quartzo QCM200 (Suécia) com cristais O100RX3 Ti/Au. Uma bomba de seringa foi utilizada para a injeção de 120 μ L das amostras na QCM (NEW ERA PUMP SYSTEMS - EUA). A separação dos ACE2-AuNPs do sobrenadante foi realizada utilizando uma mini centrífuga (Modelo: Mini-6K,

ALLSHENG). Os espectros UV-vis foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu modelo 2550. A homogeneização das PMs foi realizada em banho ultrassônico (modelo: USC - 1400, UNIQUE) com agitador de tubo vórtice (modelo: AV-2 82328, GEHAKA). A preparação final do conjunto SPCE foi realizada com auxílio de uma Prensa Térmica (Modelo: PTM 38, F1 SUPPLIES - Brasil). A impressora 3D (modelo: Ender-3 Pro; CREALITY 3D®) foi empregada, utilizando diferentes filamentos, para o desenvolvimento dos componentes que foram úteis para a condução das análises, como o agitador rotativo, o suporte do sensor magnético e a célula microfluídica utilizada nas medições de QCM.

3.2. Fabricação do SPCE

Os SPCEs foram construídos com base no método previamente relatado na literatura^{148,149}. O layout dos eletrodos foi previamente desenhado no *software* Silhouette Studio v. 2.7.4 com o formato de oito WE (8-WEs) com diâmetro de 3 mm cada, oito contra-eletrodos (CE) e oito eletrodos de pseudo-referência (RE, do inglês: *Reference Electrode*). Posteriormente, o vinil foi transferido para o PVC para ser serigrafado com tinta carbono. Logo em seguida, a tinta foi curada em estufa a 50°C por 60 minutos. Em seguida, com auxílio de um pincel, foi aplicada tinta prata na região do RE, seguido da cura à 50°C por 30 minutos. Após a cura das tintas carbono e prata, o vinil foi removido do PVC. Assim, o delimitador recortado em vinil foi adicionado para delimitar as células eletroquímicas, ao qual também foram cortadas na impressora de corte e seladas em prensa térmica a 120°C por 200 segundos utilizando um tempo de resfriamento de aproximadamente 30 minutos (Figura 3.1).

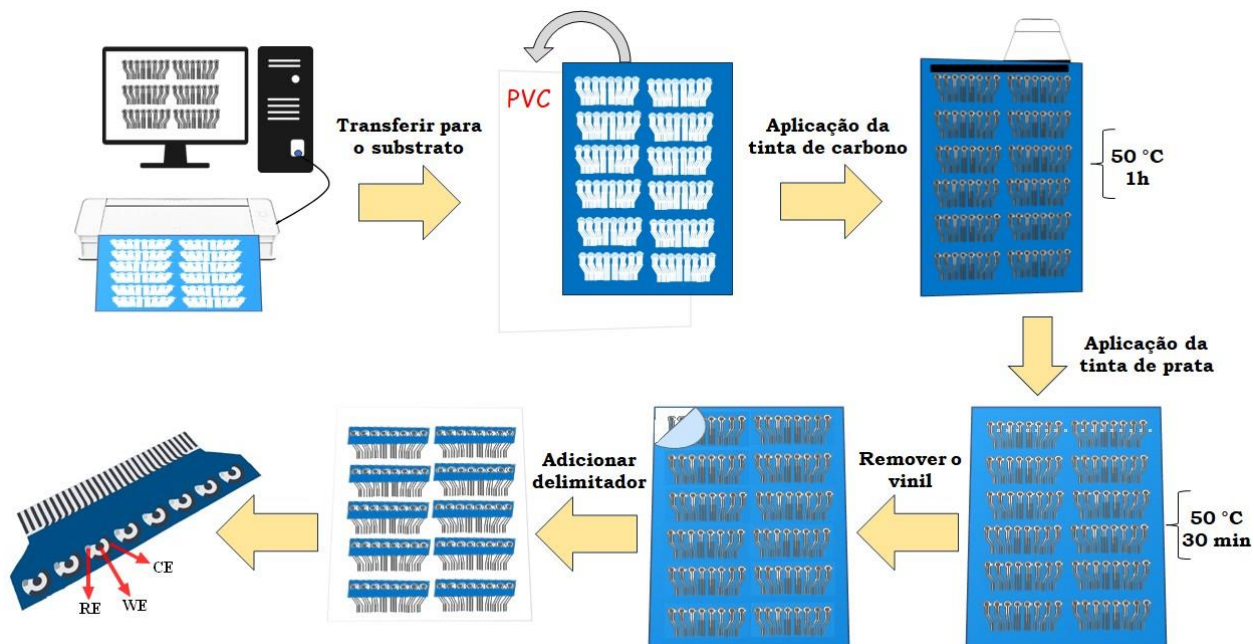


FIGURA 3.1: Etapas de construção do dispositivo SPCE que contém 8 células eletroquímicas independentes.

Fonte: O Autor

Após esse procedimento, foram posicionados ímãs atrás dos 8-WEs, os quais foram fixados utilizando uma fita dupla face (Figura 3.12A). Esses ímãs foram posicionados para reter na superfície dos eletrodos o bioconjugado formado (PMs-ACE2/Proteína S/ACE2-AuNPs, como será discutido posteriormente) e sendo posteriormente realizadas as análises eletroquímicas.

Após a fabricação deste dispositivo realizou-se a caracterização eletroquímica dos SPCEs, para o qual utilizou-se uma solução de 1 mmol L^{-1} de ácido ferroceno monocarboxílico (FMA, do inglês: *Ferrocene monocarboxylic acid*) em solução aquosa de $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0).

3.3. Definição e síntese do peptídeo ACE2

Com base na estrutura tridimensional da região de interação entre o

domínio de ligação ao receptor de espícula RBD do SARS-CoV-2 e a ACE2 humana (PDB:6M17¹⁵⁰), selecionou-se a região correspondente da proteína ACE2, que correspondia a uma hélice alfa entre os aminoácidos GLN²⁴-GLN⁴², em vermelho na Figura 3.2.

```

MSSSSWLLLLSLVAVTAAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNMNAGDKWSAFLKEQSTLA
1|-----10|-----20|-----30|-----40|-----50|-----60|-----70|-----80|
QMYPLQEIQNLTVKLQLQALQQNGSSVLSSEDKSKRLNTILNTMSTIYSTGKVCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNE
90|-----100|-----110|-----120|-----130|-----140|-----150|-----160|
RLWAWESWRSEVGKQLRPLLYEEYVVLKNEMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGQLIEDVEHTFEEIKPLYEHL
170|-----180|-----190|-----200|-----210|-----220|-----230|-----240|
HAYVRAKLMNAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFGQKPNIDVTDAMVDQAWDAQRIFKEAEKFFVSVGL
250|-----260|-----270|-----280|-----290|-----300|-----310|-----320|
PNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGDFRILMCTKVMTDDFLTAHHEMGGHIQYDMAYAAQPFLLRNGANEGF
330|-----340|-----350|-----360|-----370|-----380|-----390|-----400|
HEAVGEIMSLSAATPKHLKSIIGLLSPDFQEDNETEINFLKQALTIVGTLPFITYMLEKWRWVMVKGEIPKQWMMKQWEM
410|-----420|-----430|-----440|-----450|-----460|-----470|-----480|
KREIVGVVEVPVPHDETYCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRTLYQFQFQEALCQAAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLRL
490|-----500|-----510|-----520|-----530|-----540|-----550|-----560|
GKSEPWTALENVVGAKNMNVRPLLNYFEPLFTWLKDQNKNSFVGWSTDWSPYAD
570|-----580|-----590|-----600|-----610|-----615

```

FIGURA 3.2: Sequência de 615 aminoácidos para ACE2 humana e destacado em vermelho a região de 19 resíduos de aminoácidos que se ligam à glicoproteína S do SARS-CoV-2 (₂₄QAKTFLDKFNHEAEDLFYQ₄₂).

Fonte: Banco de dados *Protein Data base* (PDB: 1R42¹⁵¹)

Um resíduo de cisteína foi adicionado ao peptídeo C-terminal para direcionar o processo de acoplamento com as PMs e AuNPs. Os resíduos de aminoácidos completos (₂₄QAKTFLDKFNHEAEDLFYQ₄₂C) (Figura 3.3) foram obtidos em parceria com o Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto, e foram sintetizados usando síntese de peptídeos de fase sólida Fmoc padrão em uma escala de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com resina 0,7 mmol g^{-1} RINK-amida. Todos os fluorenilmetoxicarbonil-aminoácidos (Fmoc-aa) foram utilizados com excesso de 2,5. As reações de acoplamento Fmoc-aa

foram realizadas sob aplicação de micro-ondas utilizando 6 ciclos de 2 minutos. No final das reações de acoplamento, os peptídeos foram clivados da resina durante 2 horas numa solução contendo solução de ácido trifluoroacético a 88%, água a 4%, triisopropilsilano a 4% e anisol a 2% + 30 mg de DTT. Os peptídeos clivados foram precipitados com éter etil butílico e depois purificados usando cartuchos de extração em fase sólida C₁₈ sep-pak utilizando como solvente a mistura água:acetonitrila.

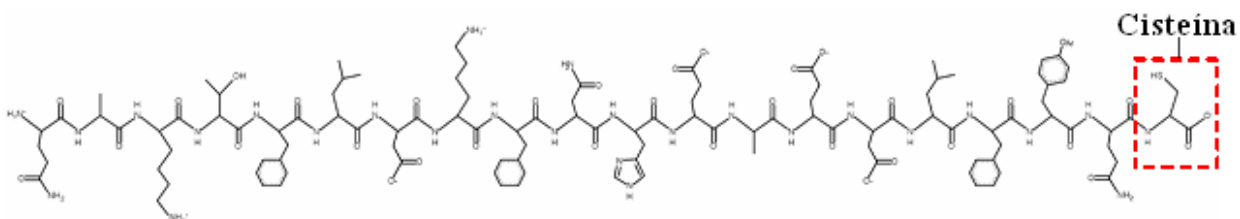


FIGURA 3.3: Estrutura do peptídeo ACE2 relacionado à sequência genética
₂₄QAKTFLDKFNHEAEDLFYQ₄₂C.

3.4. Obtenção e polimerização da proteína S do SARS-CoV-2 purificada

A proteína S trimérica recombinante do SARS-CoV-2 com os 1273 aminoácidos (Figura 3.4) foi produzida em células HEK293 no laboratório de engenharia de cultura celular da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), conforme descrito por Alvim *et al.* (2020)¹⁵². Uma concentração final de formaldeído de 1% foi adicionada à proteína S purificada diluída em tampão PBS.

```

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSNGTNGTKRFD
1|      10|      20|      30|      40|      50|      60|      70|      80|

NPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNATNVVIVKVEFQFCNDPFLGVVYHKNNKSWMESEFRVY
      90|      100|      110|      120|      130|      140|      150|      160|

SSANNCTFEYVVSQPFLMDLEGKQGKFNKLRFEVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQT
      170|      180|      190|      200|      210|      220|      230|      240|

LLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRV
      250|      260|      270|      280|      290|      300|      310|      320|

QPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNYYADSF
      330|      340|      350|      360|      370|      380|      390|      400|

VIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNGYNYLYRFRKSNLKPFFERDISTEIIYQAGSTPC
      410|      420|      430|      440|      450|      460|      470|      480|

NGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFGLTGTGVLTESNKKFL
      490|      500|      510|      520|      530|      540|      550|      560|

PFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGS
      570|      580|      590|      600|      610|      620|      630|      640|

NVFQTRAGCLIGAHEVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARVASQSIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTI
      650|      660|      670|      680|      690|      700|      710|      720|

SVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGF
      730|      740|      750|      760|      770|      780|      790|      800|

NFSQILPDPSPKSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIYAQYTSALLAG
      810|      820|      830|      840|      850|      860|      870|      880|

TITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDLSSTASALGKLQDVVNQNAQALN
      890|      900|      910|      920|      930|      940|      950|      960|

TLVKQLSSNFGAISSVLDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRV
      970|      980|      990|      1000|      1010|      1020|      1030|      1040|

DFCGKGYHLMSPQSAFHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNT
      1050|      1060|      1070|      1080|      1090|      1100|      1110|      1120|

FVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFNKHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDL
      1130|      1140|      1150|      1160|      1170|      1180|      1190|      1200|

QELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVKGVKLVHT
      1210|      1220|      1230|      1240|      1250|      1260|      1270|      1273

```

FIGURA 3.4: Sequência da glicoproteína S contendo o domínio RBD em vermelho e a sequência de ligação ao receptor; ligação ao ACE2 humano em azul.

Fonte: adaptada de Wall, *et al.*¹⁸.

Após manter o material inativo por 60 minutos em temperatura ambiente, o formaldeído foi extinto pela adição de 2,5 mmol L⁻¹ de glicina por 15 minutos em temperatura ambiente. Para a validação da polimerização da proteína S, as amostras

foram submetidas à análise de SDS-PAGE a 8% e coradas com CBB ou anticorpo anti-S (Figura 3.5).

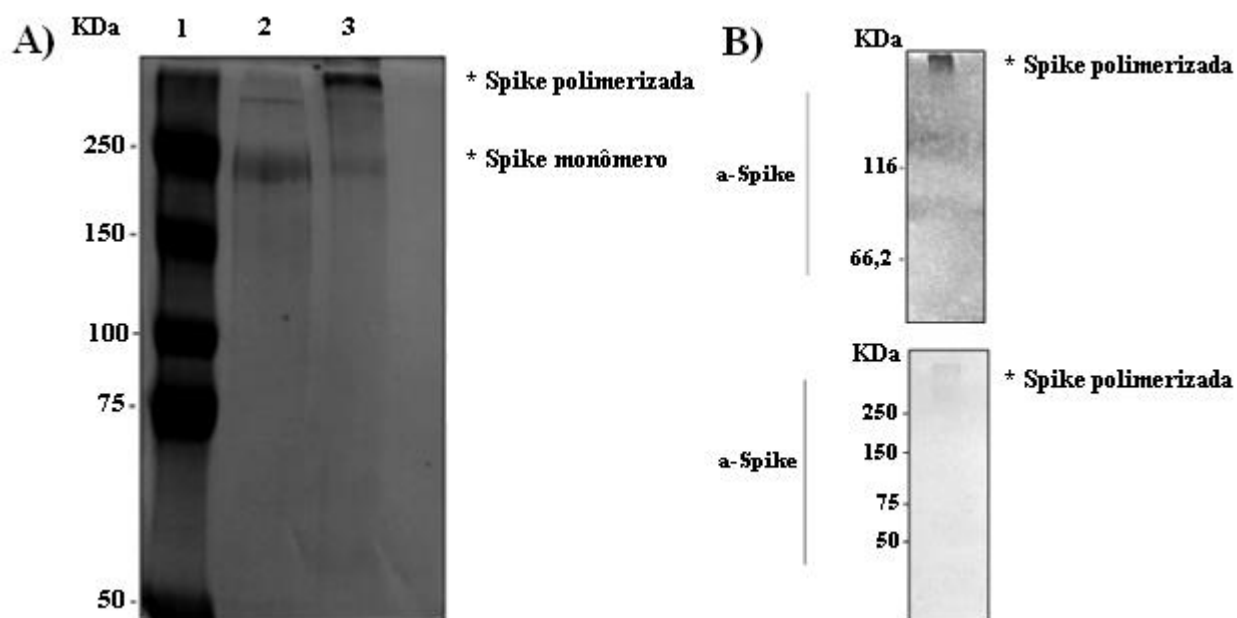


FIGURA 3.5: Ligação cruzada entre proteína S monomérica do SARS-CoV-2 e formaldeído 1%, A) SDS-PAGE visualizado com coloração azul brilhante de Coomassie, linha 1: marcadores de peso molecular (KDa), linha 2: Proteína S monomérica de SARS-CoV-2, linha 3: Proteína S do SARS-CoV-2 polimerizada.

B) Imunobiot para Proteína S polimerizada

Fonte: O autor

3.5. Estudo da interação entre a proteína S do SARS-CoV-2 e o peptídeo ACE2 por microbalança de cristal de quartzo

A interação da proteína S do SARS-Cov-2 e a ACE2 foi avaliada com base na mudança de massa em tempo real utilizando a técnica QCM¹⁵³. Para a realização desta análise foi utilizado um cristal de quartzo com eletrodos de ouro, e a frequência de ressonância foi monitorada em tempo real. Para realizar a análise, o cristal de quartzo foi primeiramente lavado com solução piranha (H₂SO₄/H₂O₂ 1:1

v/v) por 30 segundos; o material foi então enxaguado com água ultrapura e seco à temperatura ambiente. Posteriormente, 75,0 μL de solução do peptídeo ACE2 (0,6 mg mL^{-1}) preparada em PBS-DMSO foi adicionada à superfície do cristal e o material foi mantido em câmara úmida por 60 minutos (Figura 3.6). Isso foi feito para permitir que o cristal sofresse modificação com o peptídeo ACE2 por meio da interação do tiol presente no peptídeo ACE2 com a superfície do ouro¹⁵⁴.

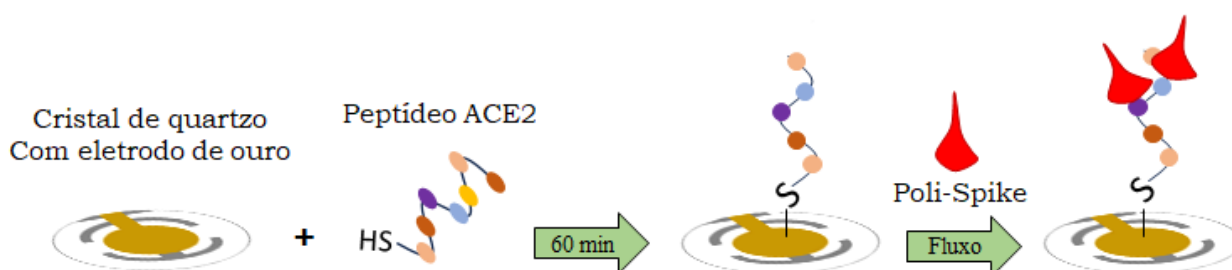


FIGURA 3.6: Etapas de modificação do eletrodo de ouro no cristal de quartzo com ACE2 para realizar as medidas de QCM pelo fluxo de uma solução de Proteína S.

Fonte: O Autor

Posteriormente, o cristal foi lavado com solução de PBS e montado em uma célula microfluídica que foi construída em uma impressora 3D, que apresentava um volume interno de 150 μL (Figura 3.7A). PBS foi bombeado para a célula QCM usando uma bomba peristáltica à uma vazão de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ (Figura 3.7B), até que o cristal de quartzo modificado exibisse uma frequência de ressonância constante.

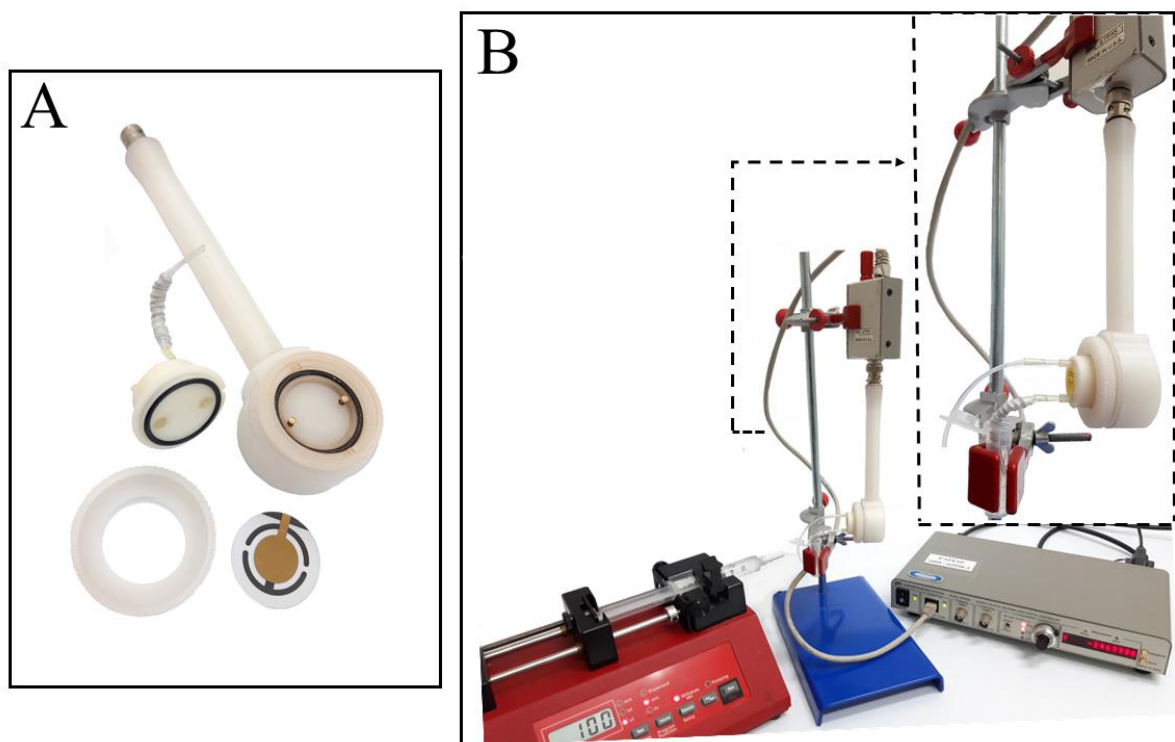


FIGURA 3.7: A) Célula QCM microfluídica impressa em 3D com volume interno de 150 μL e B) configuração microfluídica usada para análise QCM.

Fonte: O autor

3.6. Síntese de nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato

A síntese de nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato foi realizada com base no método Turkevich¹⁵⁵. Para realizar a síntese, 100 mL de solução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,01% m/v) foi preparada em água ultrapura foi aquecida sob agitação até próximo a 100°C . Em seguida, 5,0 mL de solução de citrato de sódio $40,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foram adicionados através de uma bureta à solução e a mistura foi mantida sob agitação por 5 minutos ocasionando a mudança de cor da solução, do amarelo para vermelho escuro (Figura 3.8). Após a mudança de cor, desligou-se a fonte de aquecimento e a dispersão foi mantida sob agitação até atingir a temperatura ambiente. As AuNPs sintetizadas foram armazenadas a 4°C e protegidas da luz.

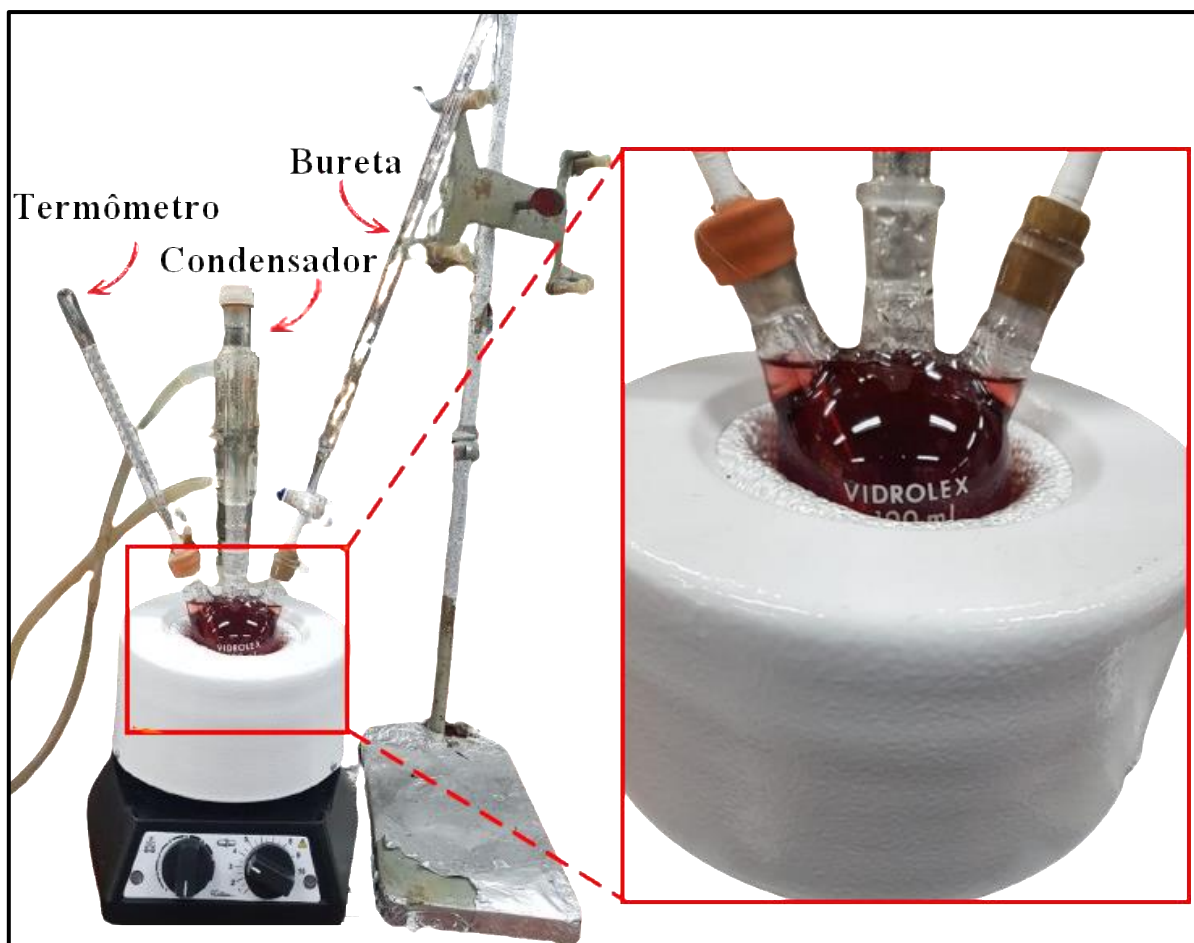


FIGURA 3.8: Sistema para síntese das AuNPs estabilizadas em citrato.

Fonte: O autor

3.7. Imobilização covalente do peptídeo ACE2 nas PMs

As PMs foram colocadas em banho ultrassônico por 10 minutos e uma alíquota de 98 μL dessa dispersão foi transferida para um microtubo. Adicionou-se então 1 mL de tampão MES (25 mmol L^{-1} , pH 6,0) e a mistura foi mantida sob agitação por 30 segundos. Em seguida, realizou-se a separação magnética utilizando um suporte magnético e o sobrenadante foi removido e descartado. Posteriormente, adicionou-se 1,0 mL de EDC/NHS ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,03 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente) à dispersão, e a mistura foi mantida sob agitação suave por 30 minutos em temperatura

ambiente, seguida de agitação e separação magnética. Após isso, adicionou-se 1,0 mL de solução tampão MES (25 mmol L⁻¹, pH 6,0) à mistura, que foi agitada em vórtice por 30 segundos e então submetida à separação magnética. Este procedimento foi repetido três vezes.

Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de solução de cloridrato de 2-aminoetil maleimida 5,0 mg mL⁻¹ à mistura para reagir com os grupos carboxílicos das PMs (Figura 3.9, Etapa 1). A dispersão foi mantida sob agitação suave por 22 horas à temperatura ambiente. As PMs foram então lavadas com PBS-Tween 20 (PBS-TW) e posteriormente foi utilizada uma solução de etanolamina (1,0 mol L⁻¹) preparada em PBS para bloquear os grupos carboxílicos que permaneceram ativados na dispersão. A dispersão foi mantida sob agitação suave por 30 minutos, e as PMs foram separadas magneticamente e lavadas com PBS-TW. Posteriormente, adicionou-se uma solução de 10 µg mL⁻¹ de ACE2 diluída em PBS-DMSO à dispersão e a mistura foi mantida sob agitação suave por 1 hora em temperatura ambiente (Figura 3.9, Etapa 2). Finalmente, as partículas foram separadas magneticamente e lavadas três vezes com PBS-TW. O bioconjugado obtido foi suspenso em 1,0 mL de PBS-TW.

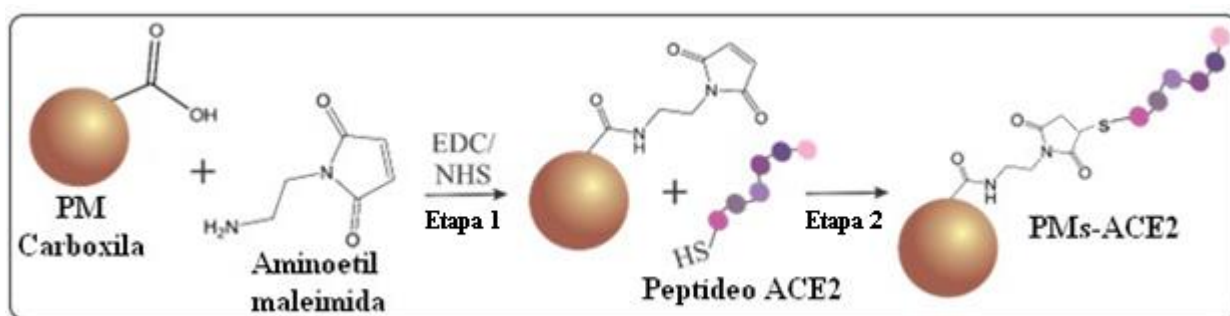


FIGURA 3.9: Imobilização covalente do peptídeo ACE2 nas PMs utilizando EDC/NHS.

Fonte: O autor

3.8. Conjugação das AuNPs com o peptídeo ACE2

As AuNPs sintetizadas foram conjugadas com o peptídeo ACE2 (ACE2-AuNPs) conforme representação na Figura 3.10.

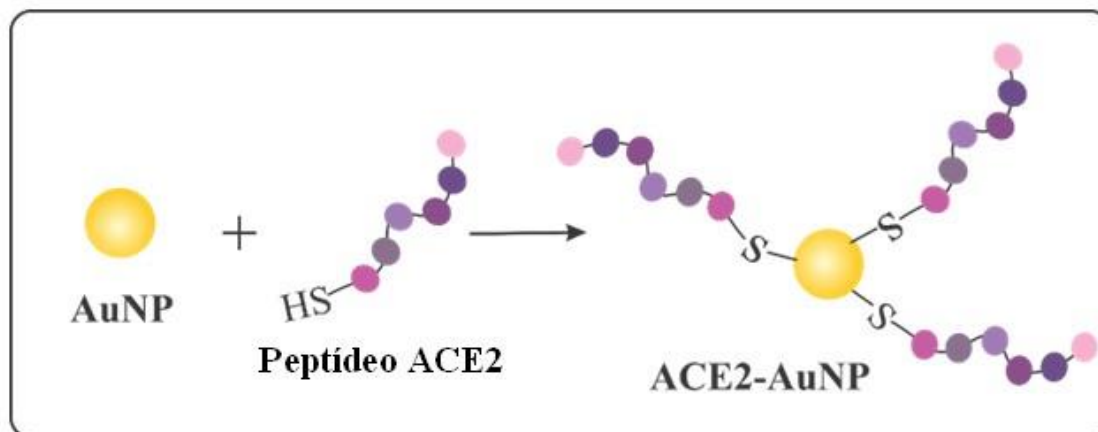


FIGURA 3.10: Etapa envolvida no procedimento de conjugação do peptídeo ACE2 com as AuNPs.

Fonte: O autor

Para realizar o procedimento de conjugação, 900 μL da dispersão de AuNPs $2,2 \text{ nmol L}^{-1}$ foi transferida para um microtubo e centrifugada a 6.200 rpm por 30 minutos a 24°C . Em seguida, o sobrenadante foi removido e uma quantidade de 900 μL de solução de peptídeo ACE2 de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em PBS-DMSO foi adicionada à dispersão, que foi mantida sob agitação lenta por 15 horas. Posteriormente, a dispersão foi centrifugada durante 30 minutos a 6.200 rpm e o sobrenadante foi removido da dispersão. O material conjugado obtido foi suspenso em 900 μL de PBS-DMSO.

3.9. Etapas envolvidas na captura e separação da proteína S em amostras de saliva e urina no ensaio magnético

A detecção da proteína S do SARS-CoV-2 nas amostras de saliva e urina foram realizadas por meio de etapas de captura e detecção do alvo com uso das PMs e AuNPs decoradas com peptídeo ACE2. A Figura 3.11 apresenta as etapas que envolvem a captura magnética da proteína S do SARS-CoV-2 em amostras de saliva e urina. Etapas estas que foram realizadas separadamente, inicialmente o ensaio magnético proposto neste estudo foi aplicada nos estudos de otimização do método, utilizando a solução padrão da proteína S, posteriormente foi realizado a aplicação para cada amostra, primeiro nas amostras de saliva e depois nas amostras de urina.

Inicialmente, as amostras de saliva foram diluídas 1.000 vezes e as amostras de urina foram diluídas 10.000 vezes em PBS-Ca-Mg pH 7,4. Em seguida, 450 μ L das amostras diluídas foram transferidas, cada uma em um microtubo, que continha 20 μ L de PMs-ACE2. Posteriormente, adicionou-se 30 μ L de ACE2-AuNPs, conforme mostrado na Figura 3.11 (Etapa 1). A mistura contendo a amostra foi incubada sob agitação lenta por 1 hora a 24°C, levando a formação do bioconjugado PMs-ACE2/Proteína S/ACE2-AuNPs (Figura 3.11 - Etapa 2). Após o tempo de incubação, o bioconjugado PMs-ACE2/Proteína S/ACE2-AuNPs foi separado da amostra, com auxílio da estante magnética e o sobrenadante constituído da amostra foi descartado (Figura 3.11, Etapa 3). O bioconjugado PMs-ACE2/Proteína S/ACE2-AuNPs foi então lavado com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-TW), o procedimento de lavagem foi repetido três vezes. Por fim, o bioconjugado foi redisperso em 400 μ L de PBS pH 7,4 para posteriormente ser aplicado no SPCE, para a detecção eletroquímica da proteína S do SARS-CoV-2.

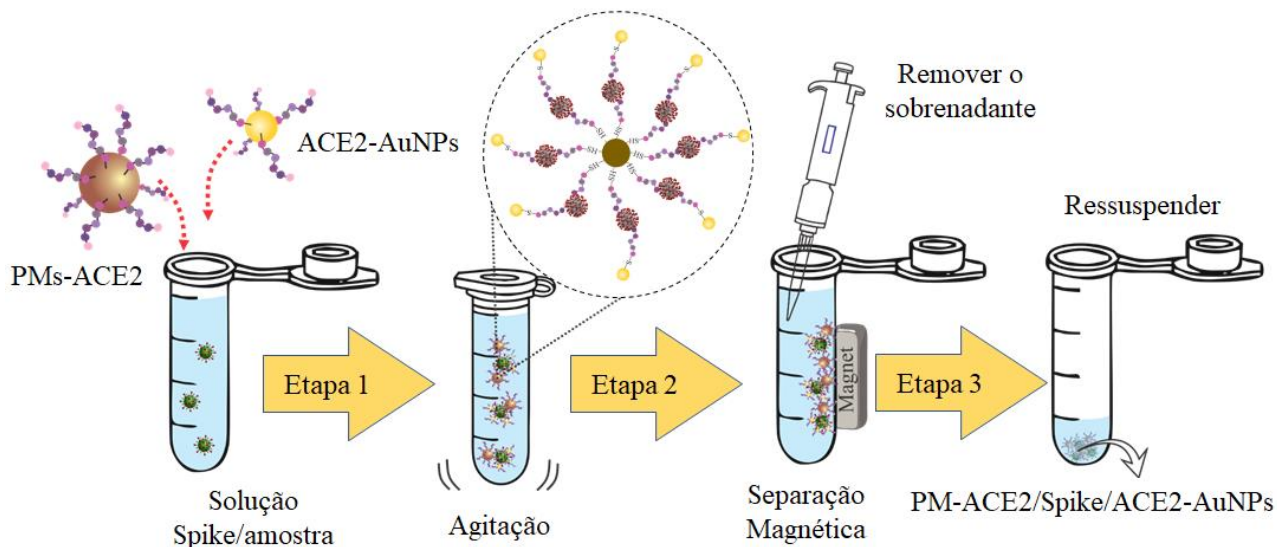


FIGURA 3.11: Etapas de captura e separação da proteína S do SARS-CoV-2 das amostras via formação do bioconjugado PMs-ACE2/proteínas S/ACE2-AuNPs.

Fonte: O autor

3.10. Detecção eletroquímica da proteína S do SARS-CoV-2 em amostras de saliva e urina utilizando AuNPs

A detecção eletroquímica da proteína S do SARS-CoV-2 nas amostras de saliva e urina, através das AuNPs, foram realizadas utilizando um arranjo SPCE com 8 células independentes (Figura 3.12A). A detecção foi realizada sem a modificação dos eletrodos de trabalho.

O arranjo de SPCE foi conectado ao multipotenciostato portátil e a detecção eletroquímica da proteína S foi realizada adicionando uma alíquota de 25 μL de dispersão do bioconjugado PMs-ACE2/Proteína S/ACE2-AuNPs em cada um dos 8-WEs do arranjo (Figura 3.12B). Posteriormente, um volume de 25 μL de HCl 0,2 mol L^{-1} foi adicionado a cada célula, com a função de agir como eletrólito de suporte. A detecção eletroquímica da proteína S foi realizada por DPV (Figura 3.12C), com base nos parâmetros avaliados anteriormente por Afonso, *et al.*¹⁵⁶.

Utilizando as seguintes condições: potencial de deposição ($E_{\text{dep}} = +1,25 \text{ V}$, tempo de deposição ($t_{\text{dep}} = 120 \text{ s}$, velocidade de varredura ($v = 34 \text{ mV s}^{-1}$, *step potential* ($\Delta E_s = 10 \text{ mV}$ e amplitude de pulso ($a = 50 \text{ mV}$).

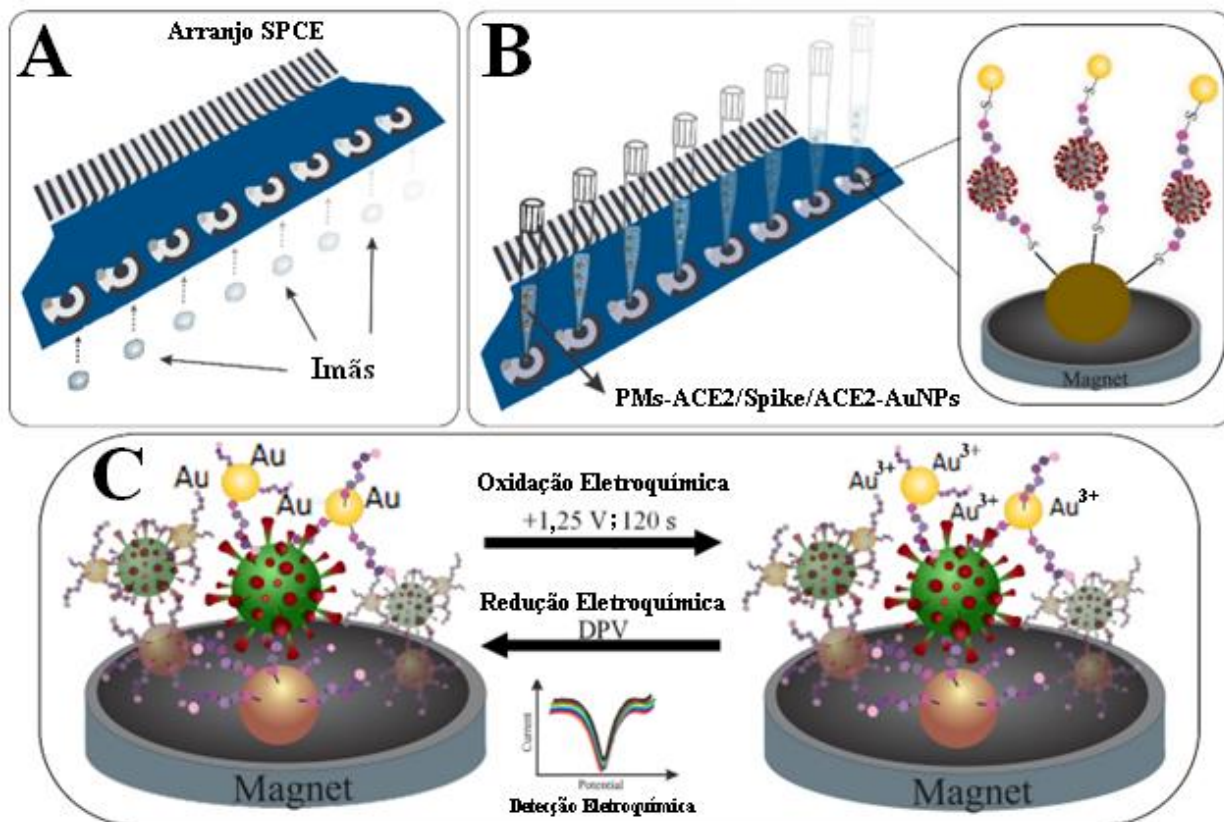


FIGURA 3.12: A) Adição do ímã sob o eletrodo de trabalho. B) Etapa de detecção eletroquímica da proteína S do SARS-CoV-2 usando SPCE não modificado. C) Representação da oxidação cronoamperométrica de AuNPs e posteriormente a redução do cloro complexo de Au(III) obtido por DPV.

Fonte: O autor

3.11. Aplicação do método desenvolvido em amostras de voluntários

Os níveis de proteína S estudados foram detectados em amostras de saliva e urina de indivíduos saudáveis e indivíduos infectados, divididos em duas coortes de indivíduos (Tabela 3.1 e 3.2). Todos os procedimentos éticos envolvendo a

participação dos voluntários da pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSCar (Número: 66076017.3.0000.5504).

3.11.1 Coortes 1

As amostras de saliva foram coletadas no Hospital Universitário da UFSCar. Os testes RT-PCR realizados confirmaram que os indivíduos estavam infectados pelo SARS-CoV-2 (tabela 3.1). Antes da realização dos testes, as amostras de saliva dos voluntários foram mantidas à 80°C por 15 minutos para inativar o vírus.

TABELA 3.1: Variáveis demográficas e clínicas dos voluntários que participaram do estudo.

Variável	Indivíduo saudável	Indivíduos com COVID-19
Casos (n/%)	16/50	16/50
Idade, média (intervalo)	29 (23-53)	44 (22-72)
Sexo, feminino (n/%)	5/31	9/53

3.11.2. Coortes 2

As amostras de urina de 152 voluntários foram auto coletadas em três centros médicos da cidade de Bragança Paulista (SP, Brasil); Hospitais Santa Casa e Bragantino; e na Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia (UNIFAG). As coletas das amostras foram possíveis devido a aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Francisco (CAAE: 31573020.9.0000.5514). Importante ressaltar que não houve orientação aos voluntários sobre jejum antes da coleta das amostras.

Para este estudo, foram utilizadas 74 amostras de indivíduos com resultado positivo para SARS-CoV-2 e que estavam hospitalizados (Pos-H), 23 indivíduos sintomáticos com resultado negativo em RT-PCR para SARS-CoV-2

(Neg-H) e 55 amostras de voluntários saudáveis (Neg-NH), com mais de 18 anos de idade, não grávidas, que não tiveram infecção anterior por COVID-19 ou contato com pessoas infectadas. Todos os internados eram maiores de 18 anos, não gestantes, sem ventilação mecânica ou cateter de demora e sem risco iminente de morte. Para um manuseio seguro antes do teste, as amostras foram inativadas em estufa a 65°C por 30 minutos¹⁵⁷.

Todos os voluntários tiveram seus diagnósticos para COVID-19 confirmados por RT-PCR, que foram utilizados para fins de recrutamento para o estudo ou como parte de seu atendimento clínico, utilizando serviços de análise certificados no Brasil. O teste RT-PCR foi realizada utilizando um kit TaqPath COVID-19 RT-PCR IVD (Thermo Fisher), e os resultados foram interpretados utilizando o software interpretativo COVID-19, de acordo com as instruções do fabricante, com valor limite de ciclo (Ct) < 37. Indivíduos com resultados inconclusivos de RT-PCR foram excluídos deste estudo. A Tabela 3.2 fornece informações demográficas e clínicas destes voluntários.

TABELA 3.2: Informações clínicas e demográficas dos indivíduos recrutados para o estudo, incluindo indivíduos Neg-NH e Pos-H utilizados para o modelo de construção e avaliação. Os conjuntos retidos 1 e 2 contendo indivíduos Neg-H.

	Classificador (Treino + Validação conjunto)		Conjunto retido 1	Conjunto retido 2	
	Neg-NH n (%)	Pos-H n (%)	Neg-H n (%)	Pos-H n (%)	Neg-H n (%)
Total=152	55	56	16	18	7
Idade – média (Min-Max)	43.9 (20-89)	55.1 (21-89)	61.3 (27-83)	59.7 (39-74)	55.9 (43-63)
Feminino	27 (40.4)	21 (54.8)	10 (59)	7 (58.9)	4 (56.3)
Masculino	28 (46.5)	35 (55.3)	6 (68.3)	11 (60.2)	3 (55.3)
Sintomas					
Febre	0 (0.0)	34 (60.7)	5 (31.3)	8 (44.4)	3 (42.9)
Tosse	0 (0.0)	39 (69.6)	10 (62.3)	11 (61.1)	5 (71.4)
Mialgia	0 (0.0)	13 (23.2)	1 (6.3)	3 (16.7)	1 (14.3)
Dor de garganta	0 (0.0)	11 (19.6)	3 (18.8)	0 (0.0)	1 (14.3)
Dor de cabeça	1 (1.8)	13 (23.2)	3 (18.8)	0 (0.0)	2 (28.6)
Coriza	0 (0.0)	10 (17.9)	3 (18.8)	0 (0.0)	1 (14.3)
Dispneia	0 (0.0)	35 (62.5)	10 (62.3)	13 (72.2)	5 (71.4)
Sat O ₂ < 95%	0 (0.0)	20 (35.7)	4 (25.0)	7 (38.9)	2 (28.6)
Cansaço fadiga	0 (0.0)	6 (10.7)	3 (18.8)	0 (0.0)	1 (14.3)
Perda de olfato ou paladar	0 (0.0)	10 (17.9)	5 (31.3)	3 (16.7)	2 (28.6)
Vômitos ou náuseas	0 (0.0)	4 (7.1)	2 (12.5)	4 (22.2)	1 (14.3)
Diarreia	0 (0.0)	15 (26.8)	2 (12.5)	2 (11.1)	2 (28.6)
Comorbidade					
HAS ¹	11 (20.0)	25 (44.6)	8 (50.0)	13 (72.2)	2 (28.6)
Doença cardiovascular	0 (0.0)	10 (17.9)	3 (18.8)	3 (16.7)	2 (28.6)
Obesidade	14 (24.4)	16 (28.6)	3 (18.8)	7 (38.9)	1 (14.3)
Diabetes Mellitus	2 (3.6)	18 (32.1)	1 (6.3)	5 (27.8)	1 (14.3)
Neoplasias	0 (0.0)	2 (3.6)	1 (6.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
Doença pulmonar	3 (5.4)	4 (7.1)	3 (18.8)	2 (11.1)	0 (0.0)
DPOC ²	0 (0.0)	2 (3.6)	1 (6.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
Fumante ou Ex-fumante,	4 (7.2)	5 (8.9)	1 (6.3)	1 (5.6)	1 (14.3)
Asma	1 (1.8)	1 (1.8)	2 (12.5)	1 (5.6)	0 (0.0)
Doença renal	0 (0.0)	1 (1.8)	1 (6.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
Achados tomográficos					
Opacidade em vidro fosco	0 (0.0)	51 (91.1)	14 (87.5)	18 (100.0)	7 (100.0)
Consolidações	0 (0.0)	28 (50.0)	8 (50.0)	11 (61.1)	5 (71.4)
Padrão reticular	0 (0.0)	10 (17.9)	2 (12.5)	7 (38.9)	2 (28.6)
GCP ³	0 (0.0)	45 (80.3)	10 (62.3)	17 (94.4)	7 (100.0)
Sugestivo de infecção viral	0 (0.0)	51 (91.1)	14 (87.5)	18 (100.0)	7 (100.0)

¹HAS: hipertensão arterial sistêmica; ²DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica e ³GCP: Grau de Comprometimento Pulmonar.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização morfológica das PMs, AuNPs e do bioconjugado

Neste item as PMs, as AuNPs obtidas após a síntese e o bioconjugado final foram caracterizados por TEM e EDS. Como pode ser observado na imagem de TEM na Figura 4.1A, as PMs comerciais apresentam-se como esferas uniformes e bem definidas e possuem diâmetro próximo ao indicado pelo fornecedor. As AuNPs também possuem formato esférico (Figura 4.1B) com diâmetro médio de 21 nm (Figura 4.1C), conforme descrito na literatura ¹⁵⁸.

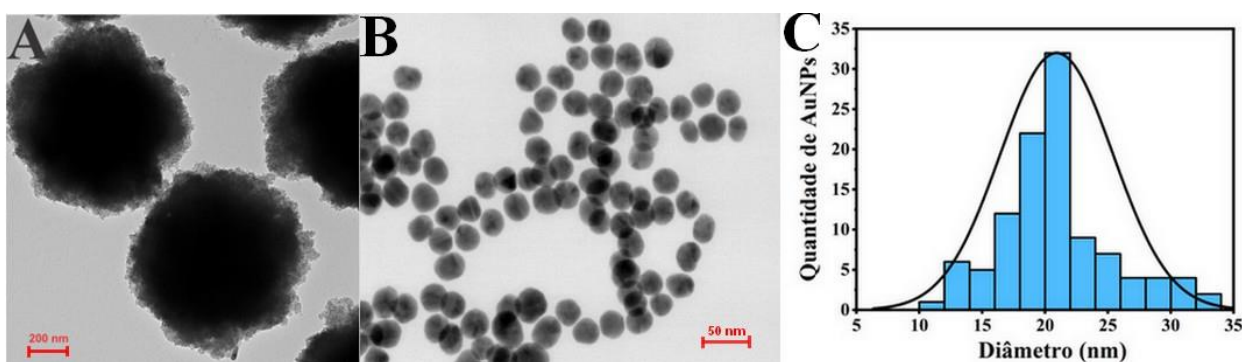


FIGURA 4.1: A) TEM das PMs e B) AuNPs e C) histograma referentes a distribuição média das AuNPs

Fonte: O autor

As Figuras 4.2A e 4.2B mostram as imagens TEM do bioconjugado PMs-ACE2/proteína S/ACE2-AuNPs formado após o procedimento relatado no item 3.9.

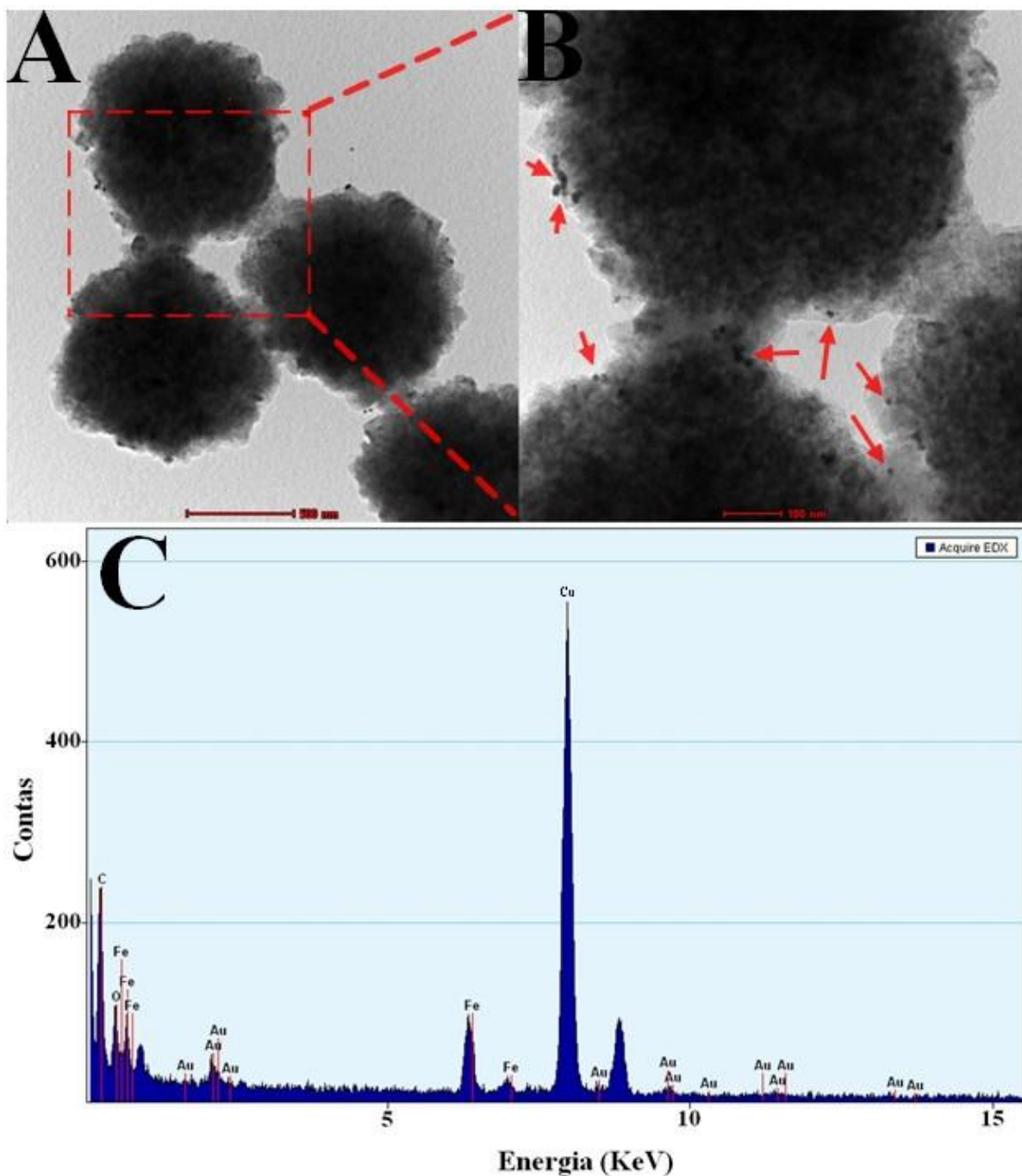


FIGURA 4.2: A) e B) TEM do bioconjugado PMs-ACE2/proteína S/ACE2-AuNPs em diferentes magnificações e C) Análise EDS do bioconjugado PMs-ACE2/proteína S/ACE2-AuNPs.

Fonte: O autor

Como pode ser observado na Figura 4.2, próximo as bordas das PMs, há

pequenas esferas indicando a presença das AuNPs devido a etapa de detecção da proteína S do SARS-CoV-2 que foi capturada com sucesso pelo ACE2. Este resultado também é corroborado pelas análises de EDS, como pode ser visto na Figura 4.2C. As respostas referentes ao Fe e Au confirmam a presença do bioconjugado formado durante a captura e separação da proteína S nas amostras de saliva. Estas observações concordaram com estudos relatados na literatura que utilizam estratégias semelhantes^{103,159}. O pico intenso de Cu está relacionado ao *grid* utilizado nas medições de TEM^{103,160}. Estes resultados demonstram que o ensaio magnético proposto foi aplicado com sucesso e indicam que as etapas de captura e detecção da proteína S e a detecção eletroquímica envolvendo o uso das AuNPs como marcador redox ocorreram como previsto. Demonstrando a viabilidade do método para o diagnóstico da COVID-19.

4.2. Caracterização espectroscópica do bioconjugado

Medidas espectrofotométricas na região do UV-Vis foram realizadas para caracterizar a solução de ACE2 ($8 \mu\text{g mL}^{-1}$) e as dispersões de AuNPs e do conjugado ACE2-AuNPs (Figura 4.3). A banda de absorção do peptídeo ACE2 (linha preta) pode ser observada na região UV a 209 nm; isso é tipicamente característico dos aminoácidos, incluindo histidina e cisteína, presentes na estrutura peptídica¹⁶¹. Sobre a dispersão de AuNPs, os espectros de absorção foram encontrados na região que correspondeu à absorbância de ressonância plasmônica de superfície (A_{SPR} , do inglês: *surface plasmon resonance absorbance*) em 520 nm - linha vermelha; esta região indicou estabilidade das AuNPs e foram caracterizadas por um formato esférico¹⁶². Por outro lado, os ACE2-AuNPs exibiram uma diminuição na A_{SPR} , linha azul na Figura 4.3. O grupo tiol presente na cisteína ACE2 interagiu com as AuNPs, possivelmente por meio de uma ligação covalente^{163,164}, e isso pode ter levado a uma

diminuição significativa na A_{SPR} através da formação do bioconjugado¹⁶⁵. Além disso, em 209 nm, a banda que correspondia ao peptídeo permaneceu presente, embora em menor intensidade, indicando sua presença após ligação com AuNPs^{166,167}. Estes resultados apontam para a formação do conjugado ACE2-AuNPs. E com base na aplicação da técnica de medição proposta por Haiss et al, 2007¹⁶⁸ a concentração de AuNPs foi estimada em $2,2 \text{ nmol L}^{-1}$.

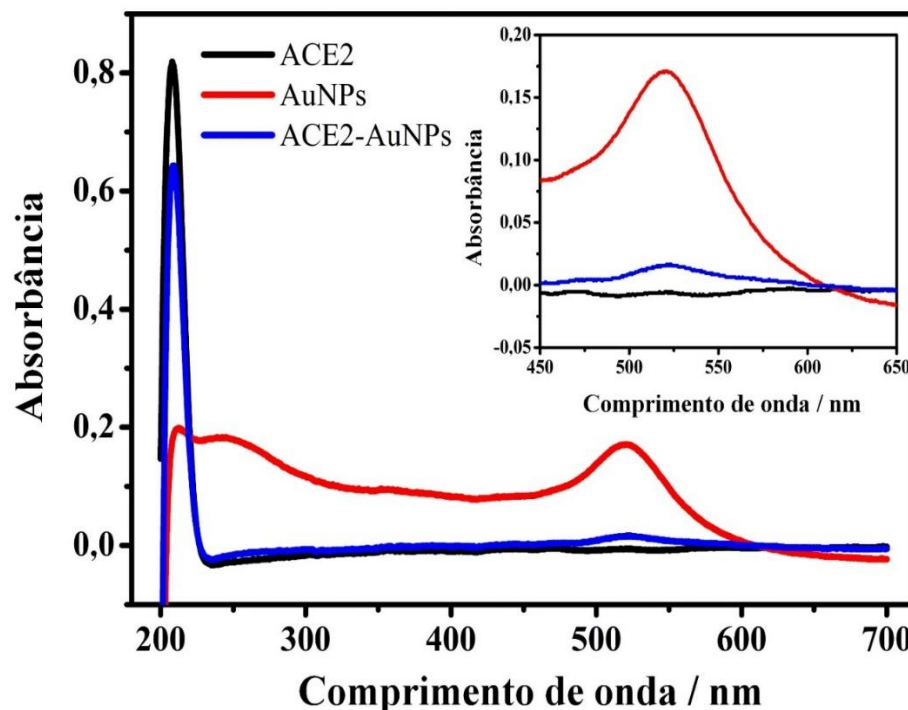


FIGURA 4.3: Espectros de UV-vis obtidos da solução de ACE2 ($8 \mu\text{g mL}^{-1}$) e das dispersões de AuNPs e do conjugado ACE2-AuNPs.

Fonte: O autor

4.3. Análise da interação entre o peptídeo ACE2 e a proteína S SARS-CoV-2 por microbalança de cristal de quartzo (QCM)

Estudos anteriores publicados na literatura relataram a ligação da proteína S do SARS-CoV-2 à ACE2 humana com alta afinidade^{8,169} sendo a via de entrada do vírus na célula^{105,170}. Para mostrar que o peptídeo ACE2 sintetizado neste estudo é

capaz de se ligar seletivamente à proteína S, o peptídeo ACE2 foi imobilizado covalentemente na superfície de ouro do cristal de quartzo por meio da interação tiol-ouro (ver Figura 3.7)¹⁷¹.

Além da sequência referente a ACE2, foi utilizado também um peptídeo não reativo para SARS-CoV-2 como controle negativo, o peptídeo utilizado foi o APDDPAWQNIFNLRR que é um peptídeo derivado de uma parte da sequência de aminoácidos da proteína 85B de micobacilos. Este peptídeo foi aliqotado em água ultrapura e mantido a -20°C até o uso, quando foi diluído em PBS pH 7,4 a concentração desejada ($0,6 \text{ mg mL}^{-1}$). Os resultados mostraram que quando a proteína S foi injetada na célula que continha o cristal com o peptídeo ACE2, a frequência de oscilação do cristal de quartzo diminui, indicando um aumento da massa depositada no cristal. Isto é um indicativo da ligação entre a proteína S e o peptídeo ACE2. Após a injeção no cristal com um peptídeo de controle negativo, foi observada uma diminuição da frequência de oscilação, no entanto foi muito menor do que na presença do peptídeo ACE2 (Figura 4.4A e 4.4B). Isto demonstra que o peptídeo ACE2 interage com elevada afinidade com a proteína S do SARS-CoV-2.

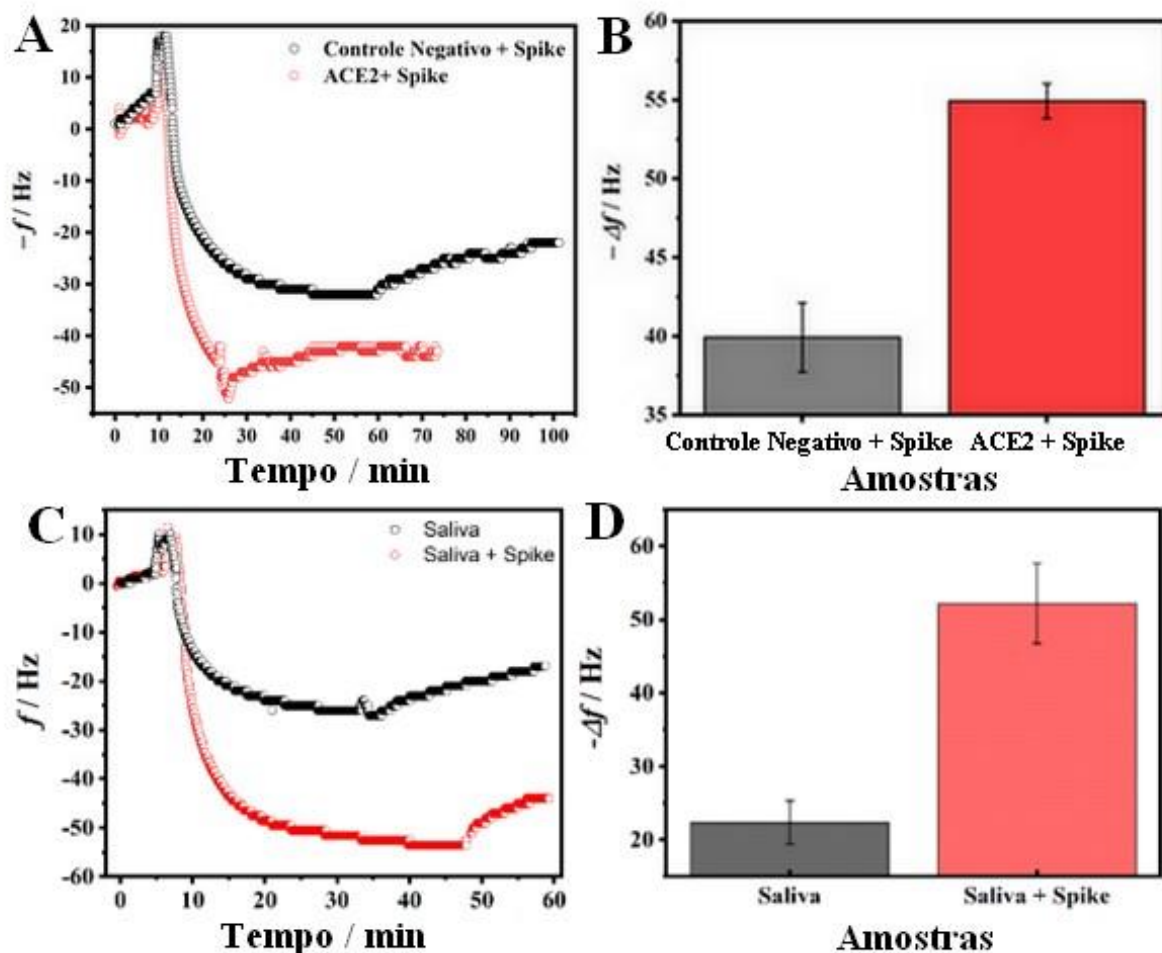


FIGURA 4.4: A) e B) Estudo da frequência de ressonância em função do tempo e da variação de frequência, respectivamente, obtida pela injeção de $52,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ da proteína S do SARS-CoV-2 no cristal de quartzo modificado com peptídeo de controle negativo e no cristal modificado com ACE2; C) e D) Estudo da frequência de ressonância em função do tempo e da variação de frequência, respectivamente, obtida na injeção de amostra de saliva na ausência e presença de $52,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína S do SARS-CoV-2, preparada em tampão PBS.

Fonte: O autor

Com objetivo de verificar a interferência da amostra de saliva na interação ACE2 e a proteína S utilizou-se amostras de indivíduos saudáveis que foram fortificadas com proteína S e foram utilizadas para a análise da interação via

QCM. Assim, uma mistura de 50 μL proteína S $52,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, 50 μL de amostras de saliva de indivíduos saudáveis e 100 μL de PBS pH 7,4 foi preparada e injetada na célula microfluídica. O mesmo procedimento foi realizado utilizando amostras de saliva não-fortificada com a proteína S (Figura 4.4C e 4.4D).

Embora tenha sido observado padrão de comportamento semelhante para as curvas na presença e ausência da proteína S, houve uma significativa queda na frequência de ressonância quando da saliva contendo a proteína S do SARS-CoV-2 (Figura 4.4C e D). A saliva é uma matriz complexa com alto teor de proteínas incluindo mucinas que são glicoproteínas de alto peso molecular fortemente glicosiladas que são responsáveis pelas propriedades viscoelásticas da saliva^{172,173}. O aumento da variação de frequência do cristal de quartzo observado quando a saliva não fortificada foi injetada pode estar ligado à absorção inespecífica das proteínas da saliva na superfície do cristal que não foram completamente removidas após o procedimento de lavagem. Este estudo indica que a ligação entre a proteína S e peptídeo ACE2 imobilizado na superfície do cristal foi bem sucedida^{174,175}.

4.4. Caracterização eletroquímica do arranjo SPCE

A caracterização eletroquímica do arranjo SPCE foi realizada por voltametria cíclica, as várias velocidades de varredura e observando a relação entre a corrente de pico anódica (I_{pa}) e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) (Figura 4.5).

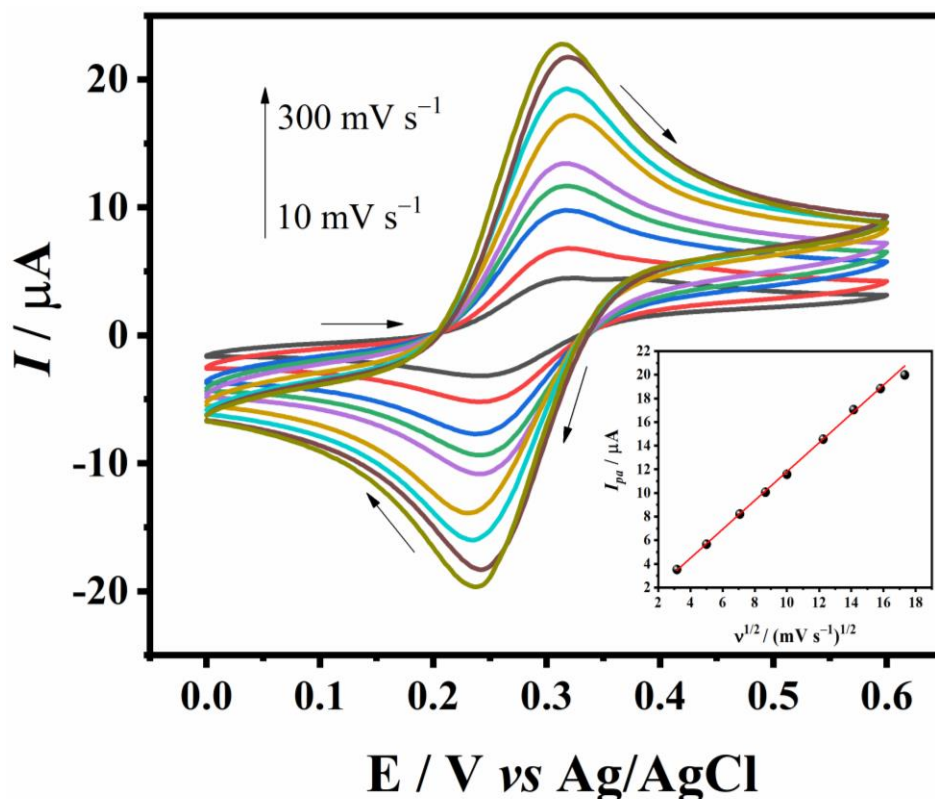


FIGURA 4.5: Voltamogramas cíclicos obtidos, contendo FMA (1,0 mmol L⁻¹) em solução aquosa 0,5 mol L⁻¹ KCl (pH 8,0) usando arranjo SPCE com 8 células independentes com velocidades de varredura variando de 10 a 300 mV s⁻¹.

Inserção: corrente de pico anódica *vs.* $v^{1/2}$.

Fonte: O autor

A diferença entre os potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) em todas as velocidades de varredura foi de aproximadamente 74,7 mV; esse valor foi superior ao valor esperado para processos reversíveis ($\sim 59 \text{ mV}$)¹⁷⁶. Segundo de Oliveira et al. (2019), o processo redox para FMA pode ser afetado pela resistividade da tinta de carbono que se reflete na diferença nos potenciais de pico. Entretanto, a relação entre as correntes de pico anódica e catódica (I_{pa}/I_{pc}) em cada velocidade de varredura avaliada foi próxima de uma unidade; isso mostra que a reação redox do FMA no arranjo SPCE apresentou uma característica reversível¹⁷⁸. Além disso, foi observada uma relação linear entre I_{pa} e $v^{1/2}$ - Figura 4.5, com coeficiente de

correlação (r) de 0,999, que foi representado pela equação: $I_{pa}(\mu A) = - 0,3974 + 1,2206 (v^{1/2}) (mV s^{-1})^{1/2}$. Com base na equação de Randles-Sevick, os resultados obtidos mostram que o processo de transferência de massa é controlado por difusão na superfície do eletrodo de trabalho¹⁷⁹. Assim, o arranjo SPCE proposto neste estudo apresentou resultados eletroquímicos que estão de acordo com os resultados obtidos por estudos anteriores relatados na literatura; em essência, isso indica que os SPCE possuem as características necessárias para aplicação destes como eletrodos na construção de dispositivos sensores.

4.5. Detecção eletroquímica da proteína S do SARS-CoV-2

A detecção eletroquímica da proteína S, via AuNPs, foi realizada em soluções padrão de PBS-Ca-Mg com ou sem 360 fg mL^{-1} de proteína S do SARS-CoV-2 para imitar a estrutura viral com muitas proteínas S na superfície. O bioconjugado PMs-ACE2/Proteína S/ACE2-AuNPs obtido foi colocado na superfície de um eletrodo de trabalho não modificado com um ímã posicionado externamente sob o eletrodo. Em seguida, uma solução diluída de HCl ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) foi adicionada à mistura do bioconjugado e o potencial de $+1,25 \text{ V}$ foi aplicado por 120 segundos para oxidar o Au presente nos AuNPs, levando à formação do complexo $[\text{AuCl}_4]^-$. Posteriormente, a aplicação do DPV levou à geração de um pico catódico em aproximadamente $0,3 \text{ V}$ (Figura 4.6) devido à redução de $[\text{AuCl}_4]^-$ para Au¹⁸⁰.

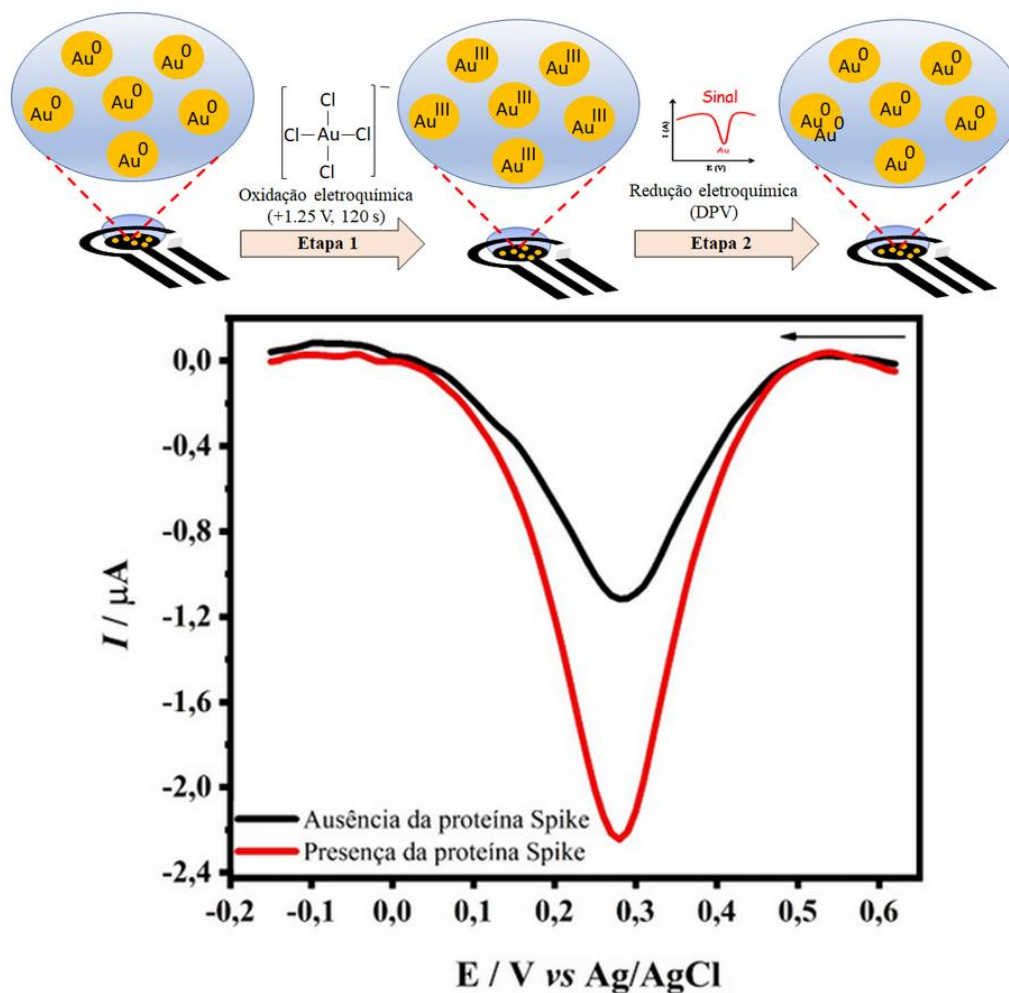


FIGURA 4.6: Representação do processo de oxirredução das AuNPs e as curvas DPV obtidas a partir da aplicação do bioconjugado PMS-ACE2/proteína S/ACE2-AuNPs, gerado na presença e ausência de 360 fg mL^{-1} de proteína S do SARS-CoV-2, juntamente com PBS- Ca-Mg; tempo de incubação: 30 minutos. $E_{\text{dep}} = +1.25 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 120 \text{ s}$, $\nu = 34 \text{ mV s}^{-1}$, $\Delta E_s = 10 \text{ mV}$, and $a = 50 \text{ mV}$.

Fonte: O autor

A corrente de pico observada para a amostra sem a proteína S do SARS-CoV-2 fornece um indicativo de que interações inespecífica dos ACE2-AuNPs e adsorção das proteínas da saliva na superfície das PMS durante a etapa de incubação, isto influenciou na resposta analítica do material de controle^{181,182}. Por outro lado, foi

observada uma corrente de pico mais intensa na presença da proteína S do SARS-CoV-2; isto aponta claramente para a interação entre a proteína S e o peptídeo ACE2^{175,183}.

Além disso, realizou-se o estudo de repetibilidade do ensaio magnético analisando a proteína S em solução padrão PBS na concentração de 78 fg mL^{-1} no mesmo dia (intradia), usando arranjos diferentes de eletrodos e entre dias (interdia) avaliando a resposta do método. O desvio padrão relativo (RSD) obtido para intradia ($n = 4$) (Figura 4.7A) e interdia ($n = 5$) (Figura 4.7B) foram de 2,62% e 3,81%, respectivamente; esses resultados apontam para a precisão do método analítico proposto neste estudo.

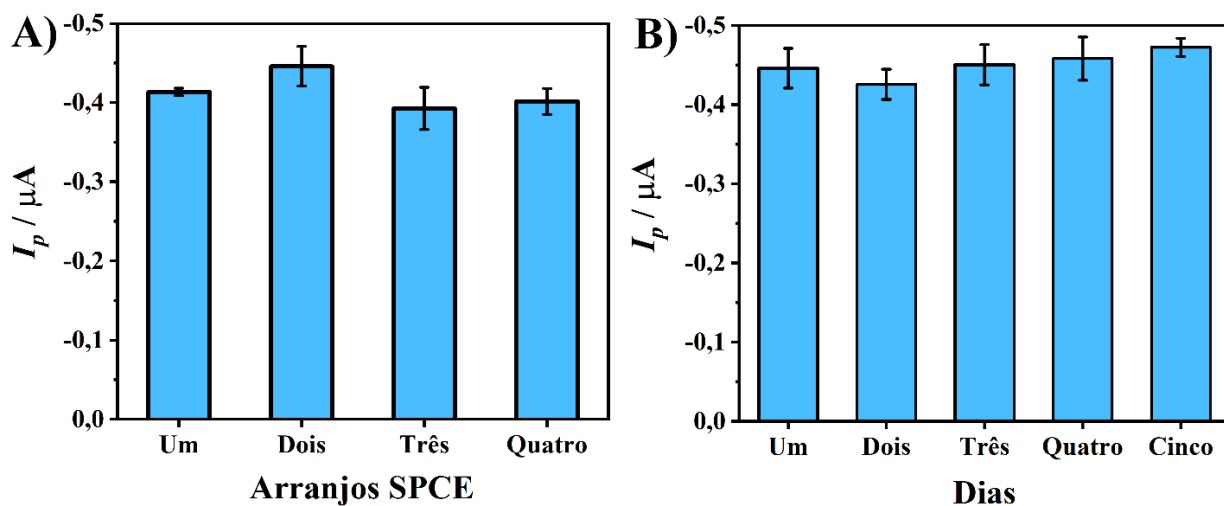


FIGURA 4.7: Estudo de repetibilidade A) análise intradia e B) análise interdia usando para cada medida um arranjo SPCE com uma solução padrão de Proteína S do SARS-CoV-2 a 78 fg mL^{-1} .

Fonte: O autor

4.6. Otimização da quantidade de ACE2-AuNPs e tempo de incubação utilizado no ensaio

Um estudo foi realizado para avaliar a influência da quantidade de ACE2-

AuNPs e do tempo de incubação na captura da proteína S empregadas no ensaio magnético (Figura 4.8A e 4.8B). A quantidade do conjugado foi obtida adicionando uma dispersão de ACE2-AuNPs com volumes variando de 20 a 80 μL (Figura 4.8A). Nesta análise, um volume de 400 μL de 78 fg mL^{-1} de proteína S e 20 μL de PMs-ACE2 foram mantidos constantes para a formação do bioconjugado da proteína S: PMs-ACE2/proteína S/ACE2-AuNPs, utilizando um tempo de incubação de 30 minutos. Um aumento na quantidade de ACE2-AuNPs resultou em um aumento na corrente de pico até o maior valor de corrente ser obtido, o que ocorreu no volume de 50 μL . Após isso, houve uma diminuição significativa na resposta, o que pode estar relacionado à saturação do peptídeo ACE2 com os sítios de ligação da proteína S. Assim, o volume de 30 μL de ACE2-AuNPs foi escolhido como o volume ideal a ser empregado com PMs-ACE2 para a captura da proteína S no ensaio proposto, pois apresentou um bom desempenho analítico e respostas com desvio padrão relativamente menor.

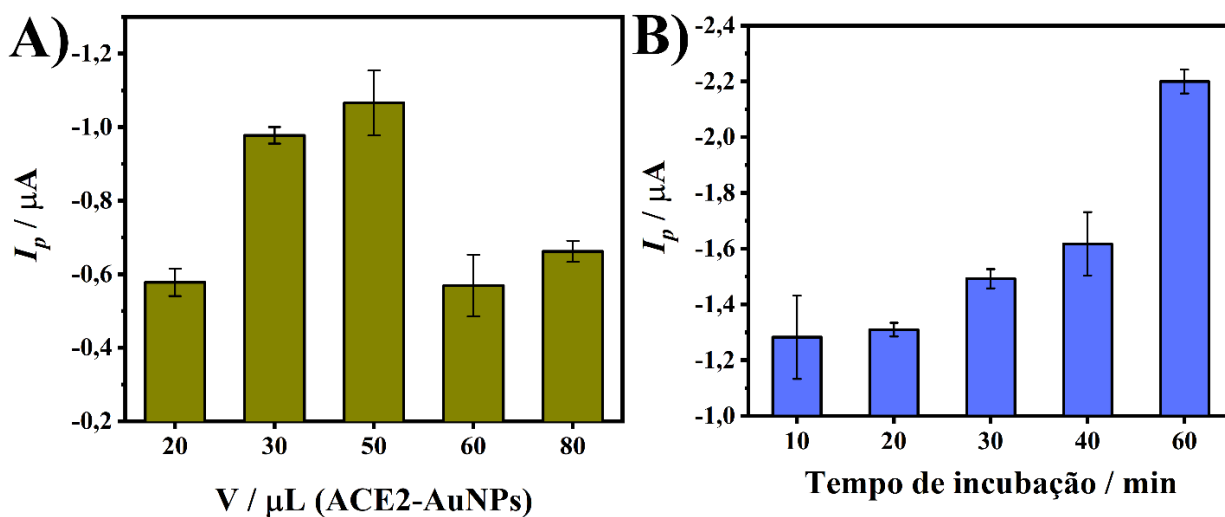


FIGURA 4.8: A) Média dos valores de corrente de pico para diferentes volumes de ACE2-AuNPs na presença de 78 fg mL^{-1} de proteína S do SARS-CoV-2 no bioconjugado PMs-ACE2/Proteína S/ACE2-AuNPs; tempo de incubação: 30 minutos. B) Corrente de pico para diferentes tempos de incubação com base na aplicação de 78 fg mL^{-1} de proteína S do SARS-CoV-2 na dispersão de

bioconjugado PMs-ACE2/Proteína S/ACE2-AuNPs contendo 20 μ L PMs-ACE2 e 30 μ L de ACE2-AuNPs.

Fonte: O autor

O outro parâmetro investigado para a análise de otimização foi o tempo de incubação para a formação do bioconjugado PMs-ACE2/proteína S/ACE2-AuNPs. Foram avaliados tempos de incubação variando de 10 a 60 minutos, e o sinal analítico obtido para os diferentes tempos investigados são apresentados na Figura 4.8B. Como pode ser observado, um aumento no tempo de incubação levou a um aumento na resposta eletroquímica. O maior pico de corrente foi obtido a partir da aplicação de 60 minutos de incubação; isso pode ser atribuído à maior interação do domínio RBD da proteína S do SARS-CoV-2 com o ACE2^{183,184}. Estes resultados sugerem que a interação do peptídeo ACE2 com a proteína S do SARS-CoV-2 é um processo relativamente lento, conforme descrito por Kuznetsov et al. (2020)¹⁸⁶. Assim, o tempo de incubação de 60 minutos foi selecionado para a captura da proteína S no ensaio magneto-controlado proposto neste estudo.

4.7. Interação da ACE2 com a proteína S do SARS-CoV-2

Para avaliar esta seletividade do peptídeo ACE2 com a proteína S, foi realizado um estudo de reação cruzada, ou seja, foram realizadas três incubações com três proteínas diferentes para avaliar possíveis interações não específicas com a ACE2. Na Figura 4.9, pode-se observar que para a albumina sérica bovina (BSA, do inglês: *Bovine serum albumin*) e a proteína N do SARS-CoV-2, não houve interação significativa com a ACE2 utilizada tanto para as etapas de captura quanto para detecção. Porém, quando adicionada a proteína S, observa-se uma intensidade de corrente muito significativa, corroborando os resultados obtidos na análise via QCM

(Figura 4.4), que indicaram uma interação específica entre proteína S e o peptídeo ACE2 através de regiões específicas como representado na imagem em inserção da figura 4.9.

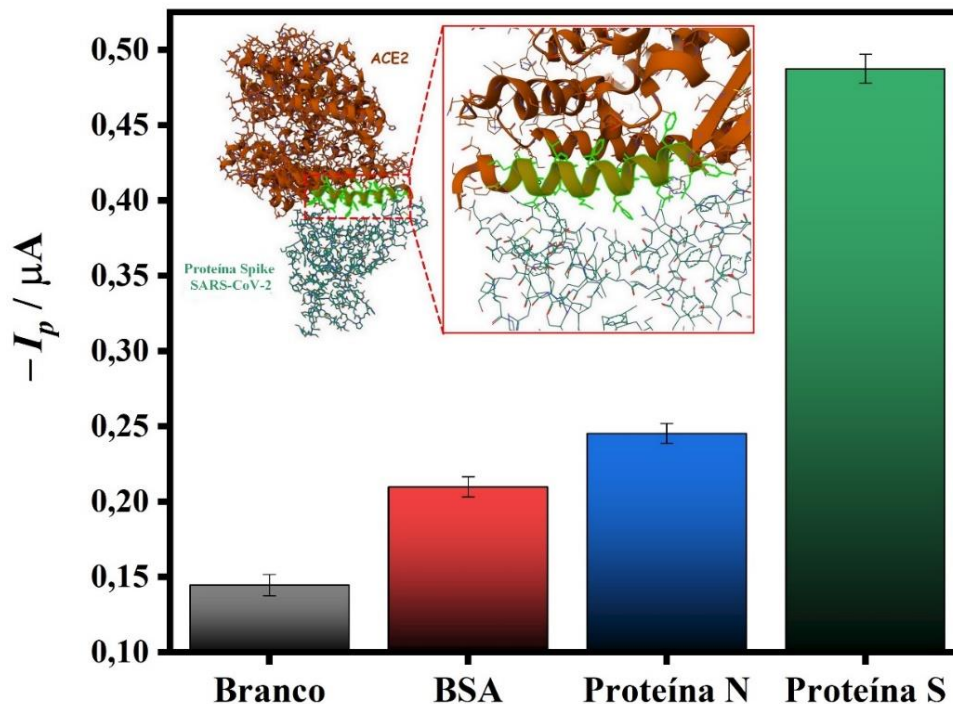


FIGURA 4.9: Estudo da seletividade de interação entre a ACE2 e a proteínas S do SARS-CoV-2 em relação a outras proteínas, todas a $0,1 \text{ fg mL}^{-1}$. inserção: Estrutura da proteína S do SARS-CoV-2 e ACE2. O zoom destacado em verde é a região de 19 resíduos de aminoácidos (${}_{24}\text{QAKTFLDKFNHEAEDLFYQ}_{42}\text{C}$) da ACE2 que se ligam à glicoproteína S do SARS-CoV-2.

Fonte: O Autor. Insete adaptado de PDB: 6VW1^{150,187}.

A imagem em inserção mostra a região ${}_{24}\text{QAKTFLDKFNHEAEDLFYQ}_{42}$ destacado em verde (hélice α_1), no qual apresenta os resíduos que se ligam aos aminoácidos da RBD da proteína S do SARS-CoV-2. De acordo Yan (2020) o segmento médio de α_1 reforça a interação ao envolver dois resíduos polares. No terminal N de α_1 , Gln⁴⁹⁸, Thr⁵⁰⁰ e Asn⁵⁰¹ do RBD formam uma rede de ligações de Hidrogênio com Tyr⁴¹, Gln⁴² de ACE2 (Figura

4.10A). No meio da ponte, Lys⁴¹⁷ e Tyr⁴⁵³ do RBD interagem com Asp³⁰ e His³⁴ do ACE2 (Figura 4.10B), respectivamente. No terminal C de $\alpha 1$, Gln⁴⁷⁴ do RBD está ligado por H à Gln²⁴ da ACE2 (Figura 4.10C)¹⁵⁰.

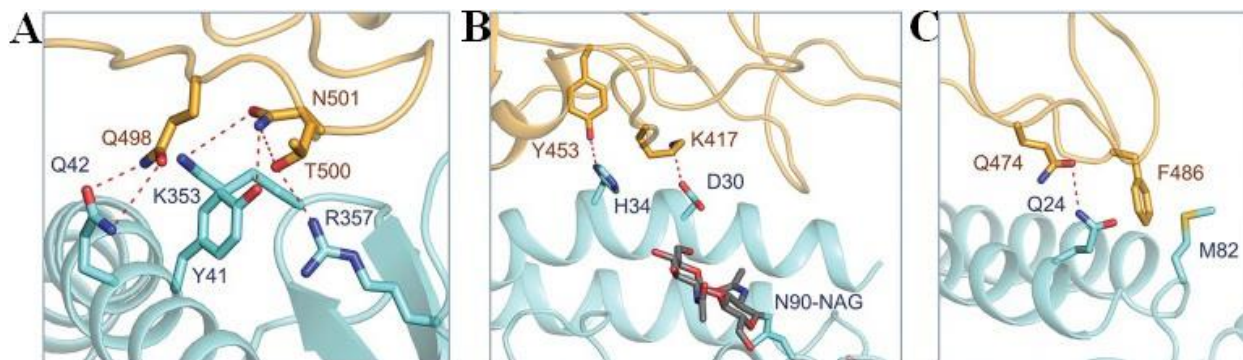


FIGURA 4.10: A, B e C Análise detalhada da interface entre SARS-CoV-2-RBD e ACE2. As interações polares são indicadas por linhas tracejadas vermelhas

Fonte: Yan, *et al.*¹⁵⁰.

Capítulo 5

AMOSTRAS DE SALIVA

5. APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO EM NAS AMOSTRAS DE SALIVA

5.1. Desempenho Analítico do Magneto-Ensaio

Após os estudos e a seleção dos melhores parâmetros experimentais, o ensaio magnético foi aplicado para detecção da proteína S em soluções padrão contendo a proteína em concentrações variando de 0,0009 a 360,00 fg mL⁻¹, conforme mostrado na Figura 5.1A. Os valores de corrente de pico foram obtidos em função das respostas obtidas utilizando diferentes concentrações da proteína S e utilizados para construir a curva de calibração (Figura 5.1B). A equação de regressão linear obtida a partir dos resultados foi a seguinte: $-I_p$ (μA) = 0,0887 + 0,0918 log [proteína S] (fg mL⁻¹), com r de 0,998. O LD calculado foi de 0,35 ag mL⁻¹; esse valor foi calculado com base na seguinte relação: $3,3 \times SD/\theta$, onde SD é o desvio padrão do intercepto da curva analítica e θ é a inclinação da curva analítica¹⁸⁸.

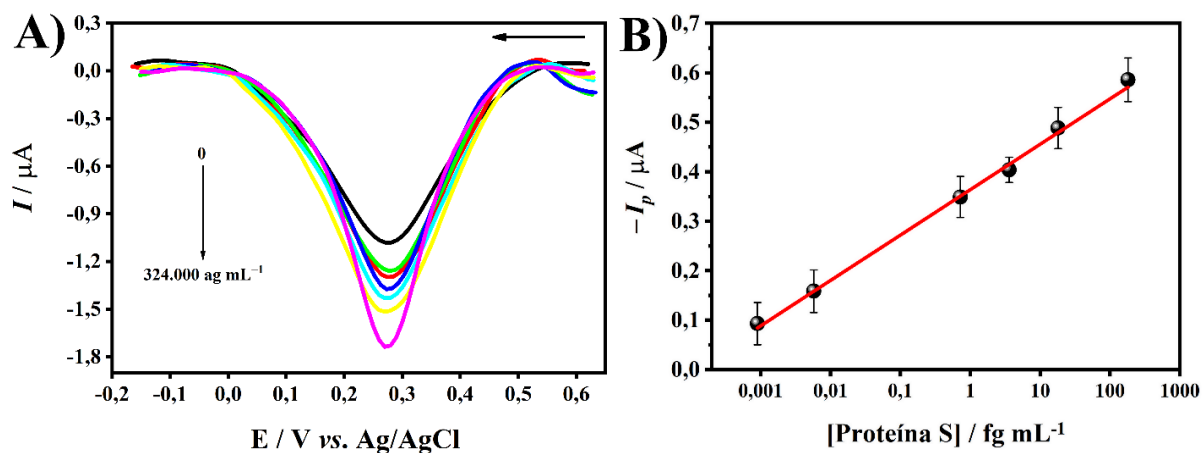


FIGURA 5.1: A) Curvas DPV obtidas a partir da aplicação do ensaio magnético utilizando soluções padrão contendo proteína S na faixa de concentração de 0,0009 – 360,00 fg mL⁻¹.; B) Valores de corrente de pico catódico obtidos em função da concentração da proteína S. Parâmetros DPV aplicado: $E_{\text{dep}} = + 1,25$ V, $t_{\text{dep}} = 120$ s, $v = 34$ mV s⁻¹, $\Delta E_s = 10$ mV e $a = 50$ mV.

Fonte: O autor

5.2. Análise de amostras de saliva das coortes de indivíduos saudáveis e indivíduos infectados por SARS-CoV-2 usando o ensaio magnético proposto

Dezesseis amostras de saliva foram coletadas de indivíduos saudáveis livres de SARS-CoV-2 (grupo negativo) e dezesseis amostras de saliva foram coletadas de indivíduos infectados por SARS-CoV-2 (grupo positivo). As amostras de saliva foram diluídas 1000 vezes em solução de PBS-Ca-Mg antes de avaliar o desempenho analítico do ensaio magnético desenvolvido. Foi realizada uma análise comparativa utilizando os resultados obtidos a partir da análise de amostras de saliva de indivíduos saudáveis e indivíduos infectados por SARS-CoV-2 com o ensaio magnético e os resultados obtidos com a aplicação da técnica de RT-PCR, usando amostras de *swab* nasofaríngeo e orofaríngeos coletados dos mesmos indivíduos. Os valores do *cycle threshold* (Ct) obtidos no teste RT-PCR para os genes N1 e N2 foram correlacionados com a carga viral dos indivíduos. No geral, os indivíduos com cargas virais mais elevadas apresentam valores de Ct mais baixos e apresentaram níveis mais elevados de proteína S do SARS-CoV-2 no ensaio magnético (Figura 5.2A). Estes resultados apontam claramente para valores satisfatórios de seletividade e especificidade clínica do ensaio magnético proposto para a detecção da proteína S em amostras de saliva humana (Figura 5.2B e 5.2C).

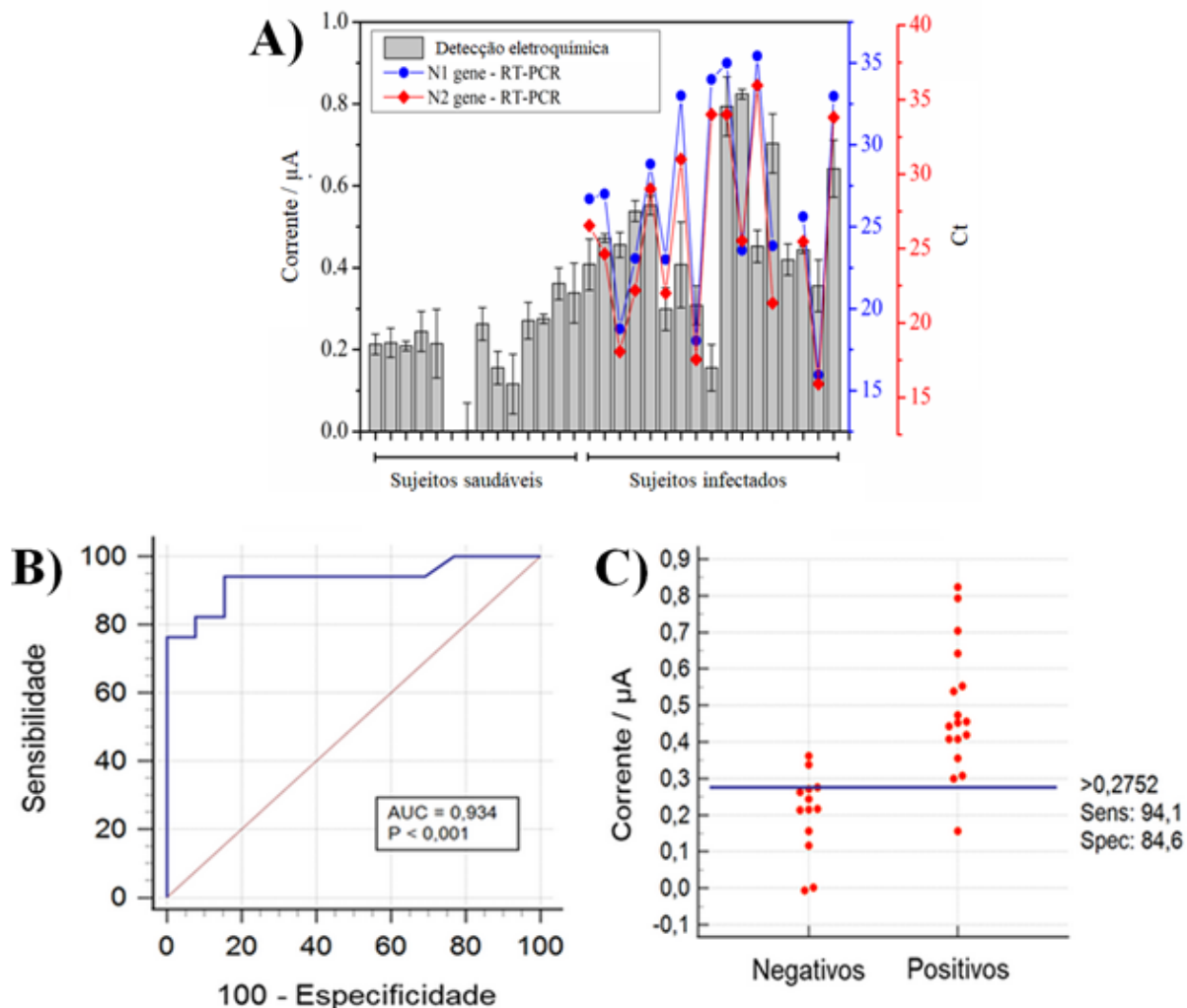


FIGURA 5.2: A) Valores de corrente de pico obtidos a partir da análise de amostras de saliva de indivíduos saudáveis e infectados por SARS-CoV-2 usando o ensaio magnético e valores Ct para Genes N1 e N2 de amostras de *swab* obtidas via RT-PCR. B) Curva ROC para detecção da proteína S do SARS-CoV-2 usando o ensaio magnético. C) Diagrama de pontos interativo de respostas de corrente de pico obtidas para a proteína S do SARS-CoV-2 em amostras de saliva para indivíduos saudáveis e infectados. *teste t, $p < 0,0001$.

Fonte: O autor

A capacidade do ensaio magnético em discriminar entre amostras de saliva de indivíduos saudáveis e de infectadas por SARS-CoV-2 foi avaliada via

curva ROC (Do inglês: *Receiver Operating Characteristic*) (Figura 5.2B). Pela curva ROC é possível avaliar que o método proposto apresentou uma área sob a curva (AUC) de 0,996 ($p < 0,001$), o que é claramente um excelente valor¹⁸⁹. Vale a pena notar que existem compromissos visíveis entre sensibilidade e especificidade; em outras palavras, à medida que a sensibilidade aumenta, a especificidade diminui e vice-versa. Uma sensibilidade alta exclui a presença da doença se o teste de uma pessoa for negativo. Enquanto isso, um teste com alta especificidade confirma a presença da doença se o teste de uma pessoa for positivo¹⁹⁰.

O diagrama de pontos interativo é outra importante ferramenta para avaliar a capacidade de um método para o diagnóstico de uma doença. No diagrama de pontos entre os sujeitos negativos e positivos observa-se uma boa separação entre as coortes com um ponto de corte ideal de $> 0,2752 \mu\text{A}$, o que equivale $> 81 \text{ fg mL}^{-1}$, com base no índice de Youden. Este ponto de corte diferenciou amostras de saliva de indivíduos saudáveis livres de SARS-CoV-2 daquelas de indivíduos infectados por SARS-CoV-2 com sensibilidade de 100,0% e especificidade de 93,7% (Figura 5.2C). Essas descobertas mostram que o ensaio magnético proposto neste estudo tem um bom grau de precisão para o diagnóstico da COVID-19 comparável ao da técnica de RT-PCR¹⁹¹⁻¹⁹⁴.

É preciso ressaltar que o uso de amostras de saliva sem tratamento térmico pode melhorar a eficiência do ensaio magnético o que poderia ser obtido por meio da aplicação de um sistema totalmente automatizado garantindo a mínima manipulação da amostra^{195,196}. O aquecimento da amostra de saliva a altas temperaturas pode desnaturar a proteína S do SARS-CoV-2 e impedir que o seu domínio de ligação ao receptor interaja com o peptídeo ACE2. Assim, o uso de tratamento térmico pode ser um fator limitante na análise de amostras de saliva humana, no entanto, os resultados obtidos indicam que para o método proposto o tratamento térmico não foi um problema¹⁹⁷.

Capítulo 6

AMOSTRAS DE URINA

6. APLICAÇÃO NAS AMOSTRAS DE URINA

6.1. Desempenho analítico do ensaio magnético

A fim de verificar a reprodutibilidade e a confiabilidade do método realizou-se a construção de uma nova curva analítica, variando para este ensaio a concentração da proteína S de 0,048 a 483.000 ag mL^{-1} . Conforme mostrado na Figura 6.1A e 6.1B, apresentou-se uma forte correlação linear com um r de 0,9989 entre a intensidade de corrente e a concentração da proteína S (Figura 6.1B). Assim, a curva de calibração, obteve a seguinte equação: $-I_p$ (A) = 0,1819 + 0,0912 \log [proteína S] (fg mL^{-1}), apresentando um coeficiente angular próximo ao obtido na primeira curva analítica, descrita no item 5.1, importante ressaltar que houve um intervalo de aproximadamente 24 meses entre estes dois ensaios. E a partir dos resultados, foi obtido um LD de 0,13 ag mL^{-1} .

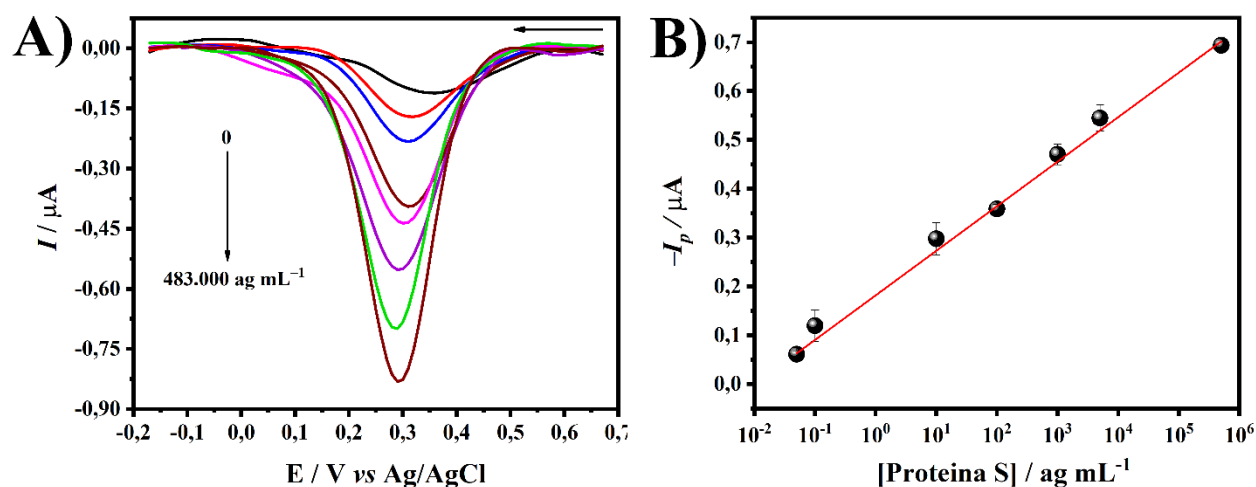


FIGURA 6.1: A) Curvas DPV obtidas a partir da aplicação do ensaio magnético na solução do branco e em soluções padrão contendo proteína S na faixa de concentração de 0,048 a 483.000 ag mL^{-1} . B) Valores de corrente de pico catódico obtidos em função da concentração da proteína S. Parâmetros DPV aplicados: $E_{\text{dep}} = +1,25$ V, $t_{\text{dep}} = 120$ s, $\nu = 34$ mV s^{-1} , $\Delta E_s = 10$ mV e $a = 50$ mV;

Fonte: O autor

6.2. Avaliação da diluição das amostras de urina

Este estudo foi realizado com objetivo de identificar a diluição ideal para amostras de urina para uso no ensaio magnético proposto, uma vez que a uma maior diluição pode minimizar o efeito de matriz, diluindo os possíveis interferentes presentes nas amostras¹⁹⁸. Seguindo o ensaio proposto, uma combinação de 20 μL de PMs-ACE2 e 30 μL de ACE2-AuNPs foi dispersa em 450 μL de amostras de urina, negativas e positivas, confirmados por RT-PCR, em diluições de 100; 1.000; 5.000 e 10.000 vezes, com período de incubação de 60 minutos. Na Figura 6.2 são apresentados os resultados deste estudo.

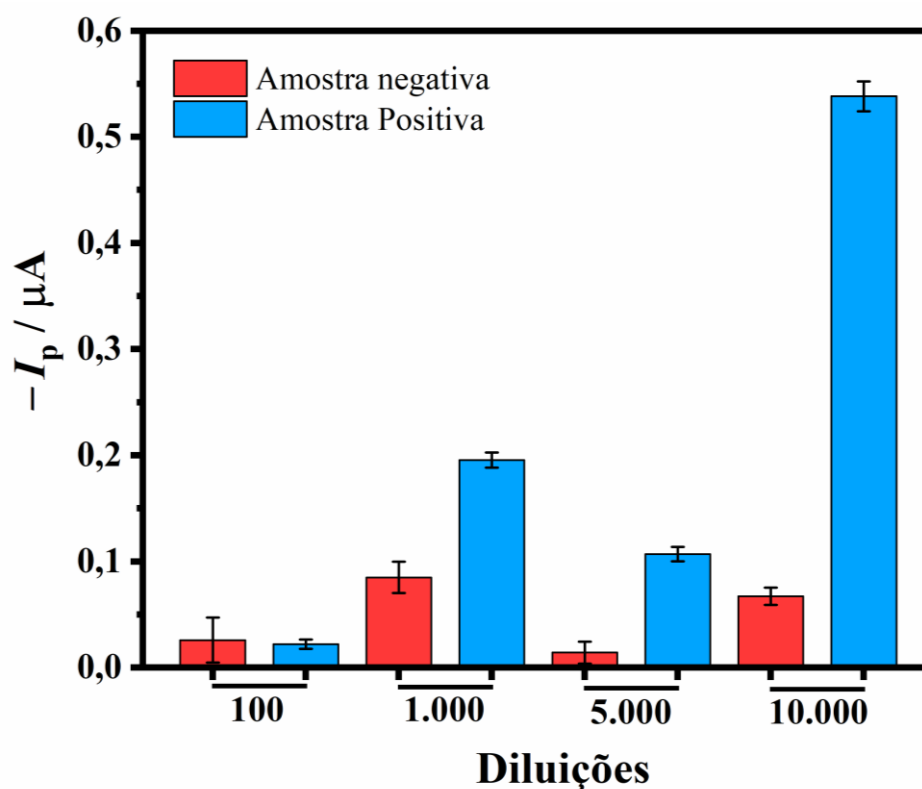


FIGURA 6.2: Estudo do efeito da diluição das amostras de urina na aplicação do ensaio proposto para determinação da proteína S em indivíduo saudável e diagnosticado com COVID-19.

Fonte: O autor

Os resultados do estudo sugerem que a diluição de 10.000 vezes das amostras de urina resultou num aumento na diferença das correntes de pico obtidas entre amostras negativas e positivas. O resultado observado pode estar relacionado a grande afinidade do domínio RBD da proteína S com a ACE2 e da grande capacidade de captura e de amplificação de sinal do método proposto devido ao uso de PMs e AuNPs, respectivamente. Ou seja, com maiores valores de diluição evita-se a interferência de constituintes da matriz da amostra e a elevada capacidade do método proposto de garantir, que mesmo com a elevada diluição, a detecção do vírus via a proteína S presente nas amostras de urina. Assim, a diluição de 10.000 vezes foi seleccionada para detecção do vírus SARS-CoV-2 em amostras de voluntários.

6.3. Avaliação da aplicabilidade do ensaio proposto para a detecção da proteína S em amostras de urina de voluntários

O método desenvolvido foi testado em 152 amostras de urina de voluntários, dos quais 74 testaram positivo para infecção por SARS-CoV-2 em amostras de *swab* nasofaríngeo por RT-PCR. As amostras de urina foram diluídas 10.000 vezes em solução aquosa de PBS-Ca-Mg, e o ensaio proposto foi aplicado. Quando o método foi testado no conjunto total de amostras (Figura 6.3A), observou-se que o método apresentou uma capacidade limitada na identificação dos indivíduos infectados.

A AUC foi de 70% (Figura 6.3A), indicando que o método precisava de ajustes, como diminuir o intervalo entre as coletas das amostras de urina e *swab*. Utilizando histórico clínico dos pacientes, foi realizada uma análise exploratória que revelou diferença significativa no tempo entre a coleta do *swab* e da amostra de urina entre os indivíduos Neg-NH e Pos-H (conforme Tabela 3.2).

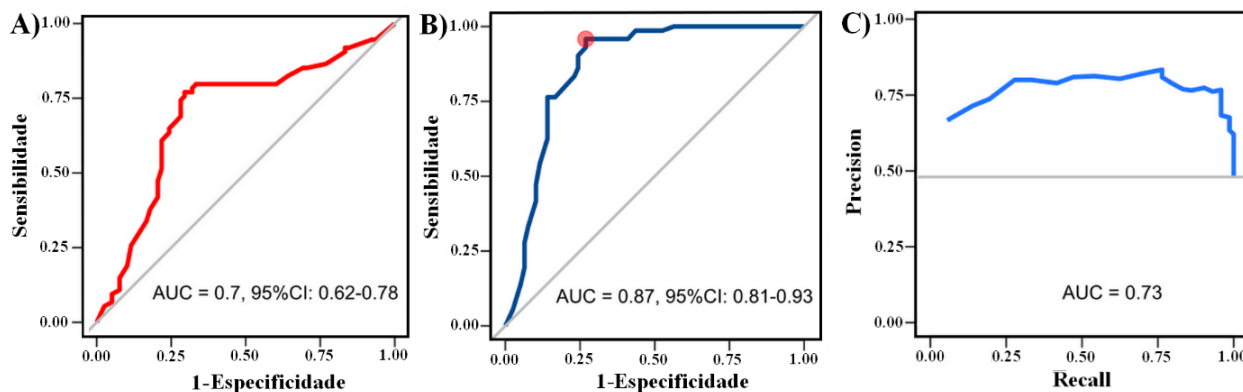


FIGURA 6.3: A) Curva ROC para o modelo não ajustado; B) Curva ROC e C) Curva AUC-PR para o modelo ajustado levando em conta o tempo entre a coleta do *swab* e a da amostra de urina.

Fonte: O autor

Após esse *screening*, o intervalo entre as coletas das amostras foi reduzido para 2 dias, já que aqueles que testaram negativo no *swab* tinham menor tempo entre as coletas ($n = 0$ dias), restando 109 indivíduos do total de 152 ao final do ajuste. Isso impactou no desempenho do teste, conforme pode ser observado pela Figura 6.3B, que apresenta o desempenho ajustado do método com AUC de 87%. Além disso, na Figura 6.3C, é possível observar a curva *Precision-Recall* para o modelo ajustado, e a Tabela 6.1 apresenta os resultados da análise de desempenho usando a estatística J de Youden. Assim, o teste apresentou excelente desempenho quando aplicado a amostras de urina, com 87% AUC-ROC e 73% de área sob a curva de precisão (AUC-PR). Estes resultados apontam que o método proposto para a detecção da proteína S em amostras de urina humana apresentou seletividade e especificidade satisfatórias, demonstrando sua capacidade para diagnóstico da COVID-19.

TABELA 6.1: Métricas de avaliação do desempenho do modelo em amostras de urina utilizando o método proposto.

Métricas	Modelo não ajustado	Modelo Ajustado
Sensibilidade	0,797	0,958
Especificidade	0,667	0,731
Precisão	0,694	0,767
F1 Score	0,742	0,852
AUC-ROC*	0,700	0,870
AUC-PR*	0,610	0,730

Fonte: O Autor

Entre os indivíduos hospitalizados, alguns apresentaram resultado de RT-PCR negativo (Neg-H, N = 23), apesar de apresentarem sintomas e alterações clínicas que sugeriam infecção viral. Essas amostras foram agrupadas para formar o conjunto Retido 1 e 2 (ver Tabela 3.2). Portanto, além da diferença significativa no tempo de coleta entre o *swab* e a amostra de urina, outro fator que também pode influenciar no desempenho do método é o tipo de amostra. Alguns indivíduos que realizaram o teste padrão ouro RT-PCR testaram negativo para COVID-19, mas estavam hospitalizados, apresentando sintomas e quadro clínico indicativos de infecção viral. Isso sugere que o classificador proposto reflete principalmente o estado de infecção do paciente, dada a concordância com os resultados da tomografia computadorizada (TC) de tórax (Tabela 3.2). A TC de tórax é uma ferramenta fundamental para o diagnóstico e monitoramento da COVID-19. No entanto, não consegue diferenciar entre uma infecção viral ativa ou anterior nem indicar o patógeno viral, resultando em menor especificidade do que o RT-PCR para o diagnóstico de COVID-19^{199–203}.

Para os pacientes no Conjunto Retido 1, o resultado negativo do teste RT-PCR estava em desacordo com o seu perfil clínico e os resultados da TC do tórax na maioria dos casos (14 de 16; 87,5%). Dos 14 pacientes Neg-H com TC de tórax sugestiva de vírus, o método desenvolvido neste trabalho classificou 7 como

positivos para COVID-19. Por exemplo, a paciente nº 92, uma mulher de 69 anos, recebeu um resultado de RT-PCR negativo, enquanto foi classificada como positiva pelo nosso classificador. A paciente apresentou TC de tórax sugestiva de infecção viral com opacidade em vidro fosco (GCO), consolidações e envolvimento pulmonar (30-50%). A paciente permaneceu na unidade de terapia intensiva (UTI) por 19 dias, onde necessitou de ventilação mecânica durante esses 19 dias, até seu óbito. Conforme reconhecido por muitos estudos^{199-201,203}, testes PCR repetidos devem ser usados para pacientes com diagnóstico inconclusivo para diagnosticar COVID-19 com mais precisão. Embora testes RT-PCR repetidos não tenham sido realizados para pacientes em nosso estudo, isso poderia resultar em um diagnóstico falso-negativo. A discordância dos resultados de RT-PCR e TC de tórax para os voluntários Neg-H, presumida como ausência de teste de segunda linha ou confirmatório para esses indivíduos, motivou sua exclusão dos conjuntos de treinamento/validação e também na opção de manter - aqueles fornecidos no Conjunto Retido 1.

Ao inspecionar os resultados do Conjunto Retido 2, o lapso de tempo entre a coleta da amostra de urina e o teste RT-PCR, ou dias desde o início dos sintomas, não afetou fortemente o desempenho do modelo, pois 16 (88,9%) das 18 amostras Pos-H foram corretamente classificadas como positivo. As amostras Neg-H não foram consideradas no cálculo, uma vez que o diagnóstico dos pacientes não foi conclusivo com base em seus atributos clínicos. No entanto, 2 das 7 amostras Neg-H no Conjunto Retidas 2 foram classificadas de acordo com os achados da TC de tórax.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido um método simples e com baixo custo para o diagnóstico rápido e precoce da covid-19 em amostras de saliva e urina. Além disso, este método apresentou duas etapas: a etapa de captura da proteína S do SARS-CoV-2 utilizando o conjugado PMs-ACE2 e a etapa de detecção com o conjugado ACE2-AuNPs, construindo assim no final do processo o bioconjugado PMs-ACE2/proteína S/ACE2-AuNPs. Para validar a eficácia do método, foram realizadas diversas otimizações e caracterizações.

Durante as etapas de otimização, o método apresentou valores excelentes de intensidade de corrente em parâmetros críticos como tempo de incubação e volumes de conjugados utilizados nas etapas de captura e detecção, além de ótimas imagens por TEM e composição por EDS. Essas otimizações possibilitaram este método ser utilizado em amostras de saliva e urina de indivíduos saudáveis e indivíduos infectados.

Os resultados mostram que o método proposto é capaz de discriminar indivíduos saudáveis - livres de SARS-CoV-2 de indivíduos infectados por SARS-CoV-2. Os resultados obtidos mostraram o potencial de aplicação da técnica proposta em termos de sucesso no diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2. Apresentando uma AUC de 93,4%, sensibilidade de 94,1% e especificidade de 84,6% para amostras de saliva. O modelo ajustado em amostras de urina apresentou uma AUC de 87% e uma AUC-PR de 73%, indicando excelente seletividade e especificidade na detecção da proteína S do SARS-CoV-2. Além disso, a análise dos indivíduos hospitalizados, especialmente aqueles com resultados de RT-PCR negativos, mas com sintomas clínicos sugestivos de infecção viral, destacou a robustez do biossensor desenvolvido. Esses casos evidenciaram a capacidade do método em detectar infecções que os testes RT-PCR não identificaram, possivelmente devido às

limitações intrínsecas do RT-PCR, como amostragem inadequada ou cargas virais abaixo do limite de detecção. A concordância entre os resultados do nosso biossensor e os achados de tomografias computadorizadas de tórax reforça ainda mais a confiabilidade do método proposto.

Adicionalmente, comparado à técnica de RT-PCR, o ensaio proposto apresentou vantagens significativas, como o curto tempo de análise (aproximadamente 60 minutos), preparação simples de amostras sem a necessidade de etapas longas e tediosas, como extrações de RNA, transcrição reversa e etapas de ciclagem térmica, e o uso de equipamentos simples, de baixo custo. Cada dispositivo SPCE tem um custo em material de aproximadamente R\$ 0,80. Como cada dispositivo contém 8 eletrodos, cada medida teria um custo de R\$ 0,10, enquanto que o teste por RT-PCR tem um custo de em média R\$ 300,00 reais por análise. Assim, o baixo custo e a facilidade de fabricação possibilitam o dispositivo SPCE ser viável, podendo vir a ser utilizado em larga escala o que pode levar a uma redução significativa dos custos de produção.

As vantagens do ensaio desenvolvido para a detecção de SARS-CoV-2 tornam o método de detecção altamente relevante para políticas de saúde pública. A implementação da técnica pode ajudar a expandir a capacidade de detecção da infecção por SARS-CoV-2, pois este método pode ser facilmente adaptado para outros alvos do SARS-CoV-2. Além disso, pode ser útil na luta contra a propagação da doença COVID-19 e também útil para ajudar no diagnóstico precoce de doenças de futuras endemias e/ou pandemias.

REFERÊNCIAS

1. LIU, J.; ZHENG, X.; TONG, Q.; LI, W.; WANG, B.; SUTTER, K.; TRILLING, M.; LU, M.; DITTMER, U.; & YANG, D. "Overlapping and Discrete Aspects of the Pathology and Pathogenesis of the Emerging Human Pathogenic Coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-NCoV." *J. Med. Virol.*, 92 (5): 491, 2020.
2. DIAS, V. M. de C. H.; CUNHA, C. A. da; VIDAL, C. F. de L.; CORRADI, M. F. D. Ben; MICHELIN, L.; MUGLIA, V.; ROCHA, J. L. L.; COSTA, S. F.; OLIVEIRA, P. R. D. de; CARRILHO, C. M.; CHEBABO, A.; NUNES, R. R.; DIEGO, L. A. dos S.; SANTOS, A. S.; CARNEIRO, M.; JUNIOR, A. S. S.; ESCUISSATO, D.; NETO, C. A.; WAIB, L. F.; MARTINS, R.; MAURICI, R.; CHATKIN, J. M.; BRANDÃO, D.; LOBO, S. M. A.; OLIVEIRA, M. C. de; ALVES, J. S.; NASCIMENTO, M. M.; & MOURA-NETO, J. A. "Guidelines on Diagnosis, Treatment and Isolation of Patients with COVID-19." *J. Infect. Control*, 9 (2): 56, 2020.
3. ANTIOCHIA, R. "Developments in Biosensors for CoV Detection and Future Trends." *Biosens. Bioelectron.*, 173 (October 2020): 112777, 2021.
4. WORLD HEALTH ORGANIZATION; & MISSION CHINA JOINT. "Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)." WHO-China Jt. Mission Coronavirus Dis. 2019, 2019 (February): 16, 2020.
5. CHEN, Y.; LIU, Q.; & GUO, D. "Emerging Coronaviruses: Genome Structure, Replication, and Pathogenesis." *J. Med. Virol.*, 92 (4): 418, 2020.
6. NGUYEN, L. C.; RENNER, D. M.; SILVA, D.; YANG, D.; PARENTI, N. A.; MEDINA, K. M.; NICOLAESCU, V.; GONZALEZ, A.; STOCK, L.; CAO, M.; QIAO, Z.; MOELLERING, R. E.; TAY, S.; RANDALL, G.; & BEERS, M. F. "SARS-CoV-2 Diverges from Other Betacoronaviruses in Only Partially Activating the IRE1 a / XBP1 Endoplasmic Reticulum." *MBio*, No. September 2022.
7. WU, D.; WU, T.; LIU, Q.; & YANG, Z. "The SARS-CoV-2 Outbreak: What We Know." *Int. J. Infect. Dis.*, 94: 44, 2020.
8. ZHOU, P.; YANG, X. Lou; WANG, X. G.; HU, B.; ZHANG, L.; ZHANG, W.; SI, H. R.; ZHU, Y.; LI, B.; HUANG, C. L.; CHEN, H. D.; CHEN, J.; LUO, Y.; GUO, H.; JIANG, R. Di; LIU, M. Q.; CHEN, Y.; SHEN, X. R.; WANG, X.; ZHENG, X. S.; ZHAO, K.; CHEN, Q. J.; DENG, F.; LIU, L. L.; YAN, B.; ZHAN, F. X.; WANG, Y. Y.; XIAO, G. F.; & SHI, Z. L. "A Pneumonia Outbreak Associated with a New Coronavirus of Probable Bat Origin." *Nature*, 579 (7798): 270, 2020.
9. TAN, Z. H.; YONG, K. Y.; & SHU, J. J. "Predicting Potential SARS-CoV-2 Spillover and Spillback in Animals." *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 57 (2): 225, 2024.
10. ORGANIZATION, W. H. "SARS Statistics. Summary of Probable SARS Cases with Onset of Illness from 1 November 2002 to 31 July 2003." WHO, 2003 (December 2003): 2002, 2003.
11. DA, P.; MARTIN, S.; GONÇALVES, S. L.; DO, P.; GOULARTE, S.; DIAS, E. P.; LEONARDI, A. E.; GUIMARÃESTIEZZI, D.; GABRIEL, S. A.; & CHIN, C. M. "História e Epidemiologia Da COVID-19." *Ulakes J. Med.*, 1: 11, 2020.
12. ANAND, S. P.; CHEN, Y.; PRÉVOST, J.; GASSER, R.; BEAUDOIN-BUSSIÈRES, G.; ABRAMS, C. F.; PAZGIER, M.; & FINZI, A. "Interaction of Human ACE2 to Membrane-Bound SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 S Glycoproteins." *Viruses*, 12 (10): 6, 2020.
13. ORGANIZATION, W. H. "Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus." WHO, 2016

- (9781849840705): 21, 2016.
14. HARDENBROOK, N. J.; & ZHANG, P. "A Structural View of the SARS-CoV-2 Virus and Its Assembly." *Curr. Opin. Virol.*, 52: 123, 2022.
 15. ORTIZ-PRADO, E.; SIMBAÑA-RIVERA, K.; GÓMEZ- BARRENO, L.; RUBIO-NEIRA, M.; GUAMAN, L. P.; KYRIAKIDIS, N. C.; MUSLIN, C.; JARAMILLO, A. M. G.; BARBA-OSTRIA, C.; CEVALLOS-ROBALINO, D.; SANCHES-SANMIGUEL, H.; UNIGARRO, L.; ZALAKEVICIUTE, R.; GADIAN, N.; & LÓPEZ-CORTÉS, A. "Clinical, Molecular, and Epidemiological Characterization of the SARS-CoV-2 Virus and the Coronavirus disease 2019 (COVID-19), a Comprehensive Literature Review." *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 98 (1): 115094, 2020.
 16. BAKHSHANDEH, B.; JAHANAFROOZ, Z.; ABBASI, A.; GOLI, M. B.; SADEGHI, M.; MOTTAQI, M. S.; & ZAMANI, M. "Mutations in SARS-CoV-2; Consequences in Structure, Function, and Pathogenicity of the Virus." *Microb. Pathog.*, 154: 104831, 2021.
 17. AHMED, W.; BERTSCH, P. M.; BIVINS, A.; BIBBY, K.; FARKAS, K.; GATHERCOLE, A.; HARAMOTO, E.; GYAWALI, P.; KORAJKIC, A.; MCMINN, B. R.; MUELLER, J. F.; SIMPSON, S. L.; SMITH, W. J. M.; SYMONDS, E. M.; THOMAS, K. V.; VERHAGEN, R.; & KITAJIMA, M. "Comparison of Virus Concentration Methods for the RT-QPCR-Based Recovery of Murine Hepatitis Virus, a Surrogate for SARS-CoV-2 from Untreated Wastewater." *Sci. Total Environ.*, 739 (June)2020.
 18. WALLS, A. C.; PARK, Y. J.; TORTORICI, M. A.; WALL, A.; MCGUIRE, A. T.; & VEESLER, D. "Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein." *Cell*, 181 (2): 281, 2020.
 19. ASTUTI, I.; & YSRAFIL. "Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An Overview of Viral Structure and Host Response." *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.*, 14 (4): 407, 2020.
 20. WU, A.; PENG, Y.; HUANG, B.; DING, X.; WANG, X.; NIU, P.; MENG, J.; ZHU, Z.; ZHANG, Z.; WANG, J.; SHENG, J.; QUAN, L.; XIA, Z.; TAN, W.; CHENG, G.; & JIANG, T. "Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-NCoV) Originating in China." *Cell Host Microbe*, 27 (3): 325, 2020.
 21. YIN, C. "Genotyping Coronavirus SARS-CoV-2: Methods and Implications." *Genomics*, 112 (5): 3588, 2020.
 22. STARR, T. N.; GREANEY, A. J.; HILTON, S. K.; ELLIS, D.; CRAWFORD, K. H. D.; DINGENS, A. S.; NAVARRO, M. J.; BOWEN, J. E.; TORTORICI, M. A.; WALLS, A. C.; KING, N. P.; VEESLER, D.; & BLOOM, J. D. "Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding." *Cell*, 182 (5): 1295, 2020.
 23. REUSKEN, C. B. E. M.; BROBERG, E. K.; HAAGMANS, B.; MEIJER, A.; CORMAN, V. M.; PAPA, A.; CHARREL, R.; DROSTEN, C.; KOOPMANS, M.; & LEITMEYER, K. "Laboratory Readiness and Response for Novel Coronavirus (2019-NCoV) in Expert Laboratories in 30 EU/EEA Countries, January 2020." *Eurosurveillance*, 25 (6)2020.
 24. SRIVASTAVA, M.; SRIVASTAVA, N.; MISHRA, P. K.; & MALHOTRA, B. D. "Prospects of Nanomaterials-Enabled Biosensors for COVID-19 Detection." *Sci. Total Environ.*, 754: 142363, 2021.
 25. AI, T.; YANG, Z.; HOU, H.; ZHAN, C.; CHEN, C.; LV, W.; TAO, Q.; SUN, Z.; & XIA, L. "Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases." *Radiology*, 296 (2): E32, 2020.
 26. SONG, F.; SHI, N.; SHAN, F.; ZHANG, Z.; SHEN, J.; LU, H.; LING, Y.; JIANG, Y.; & SHI, Y. "Emerging 2019 Novel Coronavirus (2019-NCoV) Pneumonia." *Radiology*, 295

- (1): 210, 2020.
27. DRAMÉ, M.; TABUE TEGUO, M.; PROYE, E.; HEQUET, F.; HENTZIEN, M.; KANAGARATNAM, L.; & GODAERT, L. “Should RT-PCR Be Considered a Gold Standard in the Diagnosis of COVID-19?” *J. Med. Virol.*, 92 (11): 2312, 2020.
 28. MAGNO, L.; ROSSI, T. A.; DE MENDONÇA-LIMA, F. W.; DOS SANTOS, C. C.; CAMPOS, G. B.; MARQUES, L. M.; PEREIRA, M.; PRADO, N. M. de B. L.; & DOURADO, I. “Challenges and Proposals for Scaling up COVID-19 Testing and Diagnosis in Brazil.” *Cienc. e Saude Coletiva*, 25 (9): 3355, 2020.
 29. FALZONE, L.; GATTUSO, G.; TSATSAKIS, A.; SPANDIDOS, D. A.; & LIBRA, M. “Current and Innovative Methods for the Diagnosis of COVID-19 Infection (Review).” *Int. J. Mol. Med.*, 47 (6): 1, 2021.
 30. REUSKEN, C. B. E. M.; BROBERG, E. K.; HAAGMANS, B.; MEIJER, A.; CORMAN, V. M.; PAPA, A.; CHARREL, R.; DROSTEN, C.; KOOPMANS, M.; & LEITMEYER, K. “Laboratory Readiness and Response for Novel Coronavirus (2019-NCoV) in Expert Laboratories in 30 EU/EEA Countries, January 2020.” *Eurosurveillance*, 25 (6): 1, 2020.
 31. FERNANDES, L. L.; PACHECO, V. B.; BORGES, L.; ATHWAL, H. K.; DE PAULA EDUARDO, F.; BEZINELLI, L.; CORREA, L.; JIMENEZ, M.; DAME-TEIXEIRA, N.; LOMBAERT, I. M. A.; & HELLER, D. “Saliva in the diagnosis of COVID-19: A Review and New Research Directions.” *J. Dent. Res.*, 99 (13): 1435, 2020.
 32. PEGORARO, M.; MILITELLO, V.; SALVAGNO, G. L.; GAINO, S.; BASSI, A.; CALOI, C.; PERETTI, A.; BIZZEGO, S.; POLETTI, L.; BOVO, C.; LIPPI, G.; & LO CASCIO, G. “Evaluation of Three Immunochromatographic Tests in COVID-19 Serologic Diagnosis and Their Clinical Usefulness.” *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 40 (4): 897, 2021.
 33. SACRISTAN, M. S.; COLLAZOS-BLANCO, A.; CINTAS, M. I. Z.; GARCÍA, A. S.; DE VILLAVICENCIO, C. Y.; & MAESTRE, M. M. “Comparison of Various Serological Assays for Novel SARS-CoV-2.” *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2020.
 34. MICHEL, M.; BOUAM, A.; EDOUARD, S.; FENOLLAR, F.; DI PINTO, F.; MÈGE, J. L.; DRANCOURT, M.; & VITTE, J. “Evaluating ELISA, Immunofluorescence, and Lateral Flow Assay for SARS-CoV-2 Serologic Assays.” *Front. Microbiol.*, 11 (December): 1, 2020.
 35. SPELETAS, M.; KYRITSI, M. A.; VONTAS, A.; THEODORIDOU, A.; CHRYSANTHIDIS, T.; HATZIANASTASIOU, S.; PETINAKI, E.; & HADJICHRISTODOULOU, C. “Evaluation of Two Chemiluminescent and Three ELISA Immunoassays for the Detection of SARS-CoV-2 IgG Antibodies: Implications for Disease Diagnosis and Patients’ Management.” *Front. Immunol.*, 11 (December): 1, 2020.
 36. MEHALKO, J.; DREW, M.; SNEAD, K.; DENSON, J. P.; WALL, V.; TAYLOR, T.; SADTLER, K.; MESSING, S.; GILLETTE, W.; & ESPOSITO, D. “Improved Production of SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain (RBD) for Serology Assays.” *bioRxiv*, 179 (November 2020)2020.
 37. LISBOA BASTOS, M.; TAVAZIVA, G.; ABIDI, S. K.; CAMPBELL, J. R.; HARAOU, L. P.; JOHNSTON, J. C.; LAN, Z.; LAW, S.; MACLEAN, E.; TRAJMAN, A.; MENZIES, D.; BENEDETTI, A.; & KHAN, F. A. “Diagnostic Accuracy of Serological Tests for Covid-19: Systemation Review and Meta-Analysis.” *BMJ*, 3702020.
 38. SHEN, B.; ZHENG, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, W.; WANG, D.; JIN, J.; LIN, R.; ZHANG, Y.; ZHU, G.; ZHU, H.; LI, J.; XU, J.; DING, X.; CHEN, S.; LU, R.; HE, Z.; ZHAO, H.; YING, L.; ZHANG, C.; LV, D.; CHEN, B.; CHEN, J.; ZHU, J.; HU, B.; HONG, C.; XU, X.; CHEN, J.; LIU, C.; ZHOU, K.; LI, J.; ZHAO, G.; SHEN, W.; CHEN,

- C.; SHAO, C.; SHEN, X.; SONG, J.; WANG, Z.; MENG, Y.; WANG, C.; HAN, J.; CHEN, A.; LU, D.; QIAN, B.; CHEN, H.; & GAO, H. "Clinical Evaluation of a Rapid Colloidal Gold Immunochromatography Assay for SARS-Cov-2 IgM/IgG." *Am. J. Transl. Res.*, 12 (4): 1348, 2020.
39. DEMEY, B.; DAHER, N.; FRANÇOIS, C.; LANOIX, J. P.; DUVERLIE, G.; CASTELAIN, S.; & BROCHOT, E. "Dynamic Profile for the Detection of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies Using Four Immunochromatographic Assays." *J. Infect.*, 81 (2): e6, 2020.
 40. BEAVIS, K. G.; MATUSHEK, S. M.; ABELEDA, A. P. F.; BETHEL, C.; HUNT, C.; GILLEN, S.; MORAN, A.; & TESIC, V. "Evaluation of the EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA Assay for Detection of IgA and IgG Antibodies." *J. Clin. Virol.*, 129 (May): 104468, 2020.
 41. MAVRIKOU, S.; MOSCHOPOULOU, G.; TSEKOURAS, V.; & KINTZIOS, S. "Development of a Portable, Ultra-Rapid and Ultra-Sensitive Cell-Based Biosensor for the Direct Detection of the SARS-COV-2 S1 Spike Protein Antigen." *Sensors (Switzerland)*, 20 (11)2020.
 42. XAVIER, A. R.; SILVA, J. S.; ALMEIDA, J. P. C. L.; CONCEIÇÃO, J. F. F.; LACERDA, G. S.; & KANAAN, S. "COVID-19: Clinical and Laboratory Manifestations in Novel Coronavirus Infection." *J. Bras. Patol. e Med. Lab.*, 56: 1, 2020.
 43. PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K. De; RITTA, A. G. S. L.; & AUCÉLIO, R. Q. "Voltametriás : Uma Breve Revisão Sobre Os Conceitos Abstract : The Present Work Presents a Simple and Didactic Approach Regarding Some Voltametriás : Uma Breve Revisão Sobre Os Conceitos." *Rev. Virtual Química*, 5 (4): 516, 2013.
 44. CUI, F.; & ZHOU, H. S. "Diagnostic Methods and Potential Portable Biosensors for Coronavirus Disease 2019." *Biosens. Bioelectron.*, 165 (May)2020.
 45. ZHAO, Z.; HUANG, C.; HUANG, Z.; LIN, F.; HE, Q.; TAO, D.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; & GUO, Z. "Advancements in Electrochemical Biosensing for Respiratory Virus Detection: A Review." *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 139: 116253, 2021.
 46. SEO, G.; LEE, G.; KIM, M. J.; BAEK, S. H.; CHOI, M.; KU, K. B.; LEE, C. S.; JUN, S.; PARK, D.; KIM, H. G.; KIM, S. J.; LEE, J. O.; KIM, B. T.; PARK, E. C.; & KIM, S. II. "Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor-Based Biosensor." *ACS Nano*, 14 (4): 5135, 2020.
 47. PICCININI, E.; FENOY, G. E.; CANTILLO, A. L.; ALLEGRETTO, J. A.; SCOTTO, J.; PICCININI, J. M.; MARMISOLLÉ, W. A.; & AZZARONI, O. "Biofunctionalization of Graphene-Based FET Sensors through Heterobifunctional Nanoscaffolds: Technology Validation toward Rapid COVID-19 Diagnostics and Monitoring." *Adv. Mater. Interfaces*, 9 (15): 1, 2022.
 48. GHAFARY, Z.; SALIMI, A.; & HALLAJ, R. "Exploring the Role of 2D-Graphdiyne as a Charge Carrier Layer in Field-Effect Transistors for Non-Covalent Biological Immobilization against Human Diseases." *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 8 (9): 3986, 2022.
 49. CHANG, H.; JIANG, M.; ZHU, Q.; LIU, A.; WU, Y.; LI, C.; JI, X.; GONG, L.; LI, S.; CHEN, Z.; KONG, L.; & HAN, L. "A Novel Photoelectrochemical Immunosensor Based on TiO₂@Bi₂WO₆ Hollow Microspheres and Ag₂S for Sensitive Detection of SARS-COV-2 Nucleocapsid Protein." *Microchem. J.*, 182 (August): 107866, 2022.
 50. CHEN, Y.; DUAN, W.; XU, L.; LI, G.; WAN, Y.; & LI, H. "Nanobody-Based Label-Free Photoelectrochemical Immunoassay for Highly Sensitive Detection of SARS-CoV-2 Spike Protein." *Anal. Chim. Acta*, 1211 (May): 1, 2022.

51. JIANG, Z. W.; ZHAO, T. T.; LI, C. M.; LI, Y. F.; & HUANG, C. Z. "2D MOF-Based Photoelectrochemical Aptasensor for SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Detection." *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 13 (42): 49754, 2021.
52. HOSSEINI, M.; SOBHANIE, E.; SALEHNIA, F.; XU, G.; RABBANI, H.; NAGHAVI SHEIKHOLESLAMI, M.; FIROOZBAKHTIAN, A.; SADEGHI, N.; HOSSEIN FARAJOLLAH, M.; REZA GANJALI, M.; & VOSOUGH, H. "Development of Sandwich Electrochemiluminescence Immunosensor for COVID-19 Diagnosis by SARS-CoV-2 Spike Protein detection Based on Au@BSA-Luminol Nanocomposites." *Bioelectrochemistry*, 147 (May): 108161, 2022.
53. GUERRERO-ESTEBAN, T.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, C.; VILLA-MANSO, A. M.; REVENGA-PARRA, M.; PARIENTE, F.; & LORENZO, E. "Sensitive SARS-CoV-2 Detection in Wastewaters Using a Carbon Nanodot-Amplified Electrochemiluminescence Immunosensor." *Talanta*, 247 (May)2022.
54. CHEN, Y.; HE, Y.; ZHAO, J.; ZHANG, J.; YUAN, R.; & CHEN, S. "Hydrophobic Localized Enrichment of Co-Reactants to Enhance Electrochemiluminescence of Conjugated Polymers for Detecting SARS-CoV-2 Nucleocapsid Proteins." *Anal. Chem.*, 94 (10): 4446, 2022.
55. ZHANG, K.; FAN, Z.; DING, Y.; ZHU, S.; XIE, M.; & HAO, N. "Exploring the Entropy-Driven Amplification Reaction and: Trans -Cleavage Activity of CRISPR-Cas12a for the Development of an Electrochemiluminescence Biosensor for the Detection of the SARS-CoV-2 RdRp Gene in Real Samples and Environmental Surveillance." *Environ. Sci. Nano*, 9 (1): 162, 2022.
56. FAN, Z.; YAO, B.; DING, Y.; ZHAO, J.; XIE, M.; & ZHANG, K. "Entropy-Driven Amplified Electrochemiluminescence Biosensor for RdRp Gene of SARS-CoV-2 Detection with Self-Assembled DNA Tetrahedron Scaffolds." *Biosens. Bioelectron.*, 178 (December 2020): 113015, 2021.
57. KARUNAKARAN, C.; RAJKUMAR, R.; & BHARGAVA, K. *Introduction to Biosensors*. Elsevier Inc., 2015.
58. BALDO, T. A.; PROENÇA, C. dos A.; FELIX, F. da S.; FREITAS, T. A.; SAKATA, S. K.; ANGNES, L.; & FARIA, R. C. "Disposable Electrochemical Microfluidic Device for Ultrasensitive Detection of Egg Allergen in Wine Samples." *Talanta*, 232 (May): 122447, 2021.
59. SOLDATKIN, O. O.; BURDAK, O. S.; SERGEYEVA, T. A.; ARKHYPOVA, V. M.; DZYADEVYCH, S. V.; & SOLDATKIN, A. P. "Acetylcholinesterase-Based Conductometric Biosensor for Determination of Aflatoxin B1." *Sensors Actuators, B Chem.*, 188: 999, 2013.
60. QUINCHIA, J.; ECHEVERRI, D.; CRUZ-PACHECO, A. F.; MALDONADO, M. E.; & OROZCO, J. A. "Electrochemical Biosensors for Determination of Colorectal Tumor Biomarkers." *Micromachines*, 11 (4): 1, 2020.
61. CORDEIRO, M.; CARLOS, F. F.; PEDROSA, P.; LOPEZ, A.; & BAPTISTA, P. V. "Gold Nanoparticles for Diagnostics: Advances towards Points of Care." *Diagnostics*, 6 (4)2016.
62. DRAZ, M. S.; & SHAFIEE, H. "Applications of Gold Nanoparticles in Virus Detection." *Theranostics*, 8 (7): 1985, 2018.
63. JING, X.; CAO, X.; WANG, L.; LAN, T.; LI, Y.; & XIE, G. "DNA-AuNPs Based Signal Amplification for Highly Sensitive Detection of DNA Methylation, Methyltransferase Activity and Inhibitor Screening." *Biosens. Bioelectron.*, 58: 40, 2014.
64. LIU, P.; LI, C.; ZHANG, R.; TANG, Q.; WEI, J.; LU, Y.; & SHEN, P. "An Ultrasensitive

- Electrochemical Immunosensor for Procalcitonin Detection Based on the Gold Nanoparticles-Enhanced Tyramide Signal Amplification Strategy.” *Biosens. Bioelectron.*, 126 (October 2018):543, 2019.
65. LIU, G.; LIU, J.; DAVIS, T. P.; & GOODING, J. J. “Electrochemical Impedance Immunosensor Based on Gold Nanoparticles and Aryl Diazonium Salt Functionalized Gold Electrodes for the Detection of Antibody.” *Biosens. Bioelectron.*, 26 (8): 3660, 2011.
 66. QUESADA-GONZÁLEZ, D.; & MERKOÇI, A. “Nanomaterial-Based Devices for Point-of-Care Diagnostic Applications.” *Chem. Soc. Rev.*, 47 (13): 4697, 2018.
 67. APOGEE. “Principais Tipos de Biosensores.” : 1, 2024.
 68. ANTIOCHIA, R. “Electrochemical Biosensors for SARS-CoV-2 Detection: Voltametric or Impedimetric Transduction?” *Bioelectrochemistry*, 147 (April): 108190, 2022.
 69. JAEWJAROENWATTANA, J.; PHOOLCHAROEN, W.; PASOMSUB, E.; TEENGAM, P.; & CHAILAPAKUL, O. “Electrochemical Paper-Based Antigen Sensing Platform Using Plant-Derived Monoclonal Antibody for Detecting SARS-CoV-2.” *Talanta*, 251 (August 2022): 123783, 2023.
 70. NANDESHWAR, R.; KUMAR, M. S.; KONDABAGIL, K.; & TALLUR, S. “Electrochemical Immunosensor Platform Using Low-Cost ENIG PCB Finish Electrodes: Application for SARS-CoV-2 Spike Protein Sensing.” *IEEE Access*, 9: 154368, 2021.
 71. ISSA, B.; OBAIDAT, I. M.; ALBISS, B. A.; & HAIK, Y. “Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications.” *Int. J. Mol. Sci.*, 14 (11): 21266, 2013.
 72. RASMI, Y.; LI, X.; KHAN, J.; OZER, T.; & CHOI, J. R. “Emerging Point-of-Care Biosensors for Rapid Diagnosis of COVID-19: Current Progress, Challenges, and Future Prospects.” *Anal. Bioanal. Chem.*, 413 (16): 4137, 2021.
 73. ANG, W. L.; LIM, R. R. X.; AMBROSI, A.; & BONANNI, A. “Rapid Electrochemical Detection of COVID-19 Genomic Sequence with Dual-Function Graphene Nanocolloids Based Biosensor.” *FlatChem*, 32 (December 2021): 100336, 2022.
 74. BEDUK, T.; BEDUK, D.; DE OLIVEIRA FILHO, J. I.; ZIHNIOGLU, F.; CICEK, C.; SERTOZ, R.; ARDA, B.; GOKSEL, T.; TURHAN, K.; SALAMA, K. N.; & TIMUR, S. “Rapid Point-of-Care COVID-19 Diagnosis with a Gold-Nanoarchitecture-Assisted Laser-Scribed Graphene Biosensor.” *Anal. Chem.*, 93 (24): 585, 2021.
 75. EISSA, S.; ALHADRAMI, H. A.; AL-MOZAINI, M.; HASSAN, A. M.; & ZOUROB, M. “Voltammetric-Based Immunosensor for the Detection of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Antigen.” *Microchim. Acta*, 188 (6): 199, 2021.
 76. HASHEMI, S. A.; BAHRANI, S.; MOUSAVI, S. M.; OMIDIFAR, N.; BEHBAHAN, N. G. G.; ARJMAND, M.; RAMAKRISHNA, S.; DIMIEV, A. M.; LANKARANI, K. B.; MOGHADAMI, M.; & FIROOZSANI, M. “Antibody Mounting Capability of 1D/2D Carbonaceous Nanomaterials toward Rapid-Specific Detection of SARS-CoV-2.” *Talanta*, 239 (Agust 2021): 123113, 2022.
 77. ALIREZA HASHEMI, S.; BAHRANI, S.; MOJTABA MOUSAVI, S.; OMIDIFAR, N.; GHALEH GOLAB BEHBAHAN, N.; ARJMAND, M.; RAMAKRISHNA, S.; BAGHERI LANKARANI, K.; MOGHADAMI, M.; SHOKRIPOUR, M.; FIROOZSANI, M.; & CHIANG, W. H. “Ultra-Precise Label-Free Nanosensor Based on Integrated Graphene with Au Nanostars toward Direct Detection of IgG Antibodies of SARS-CoV-2 in Blood.” *J. Electroanal. Chem.*, 894 (May): 115341, 2021.
 78. MANI, V.; CHIKKAVEERIAIAH, B. V.; PATEL, V.; GUTKIND, J. S.; & RUSLING, J. F. “Ultrasensitive Immunosensor for Cancer Biomarker Proteins Using Gold Nanoparticle Film Electrodes and Multienzyme-Particle Amplification.” *ACS Nano*, 3 (3): 585, 2009.

79. JAZAYERI, M. H.; AMANI, H.; POURFATOLLAH, A. A.; PAZOKI-TOROUDI, H.; & SEDIGHIMOOGHADDAM, B. "Various Methods of Gold Nanoparticles (GNPs) Conjugation to Antibodies." *Sens. Bio-Sensing Res.*, 9: 17, 2016.
80. CURTI, F.; FORTUNATI, S.; KNOLL, W.; GIANNETTO, M.; CORRADINI, R.; BERTUCCI, A.; & CARERI, M. "A Folding-Based Electrochemical Aptasensor for the Single-Step Detection of the SARS-CoV-2 Spike Protein." *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 14 (17): 19204, 2022.
81. SARI, A. K.; HARTATI, Y. W.; GAFFAR, S.; ANSHORI, I.; HIDAYAT, D.; & WIRASWATI, H. L. "The Optimization of an Electrochemical Aptasensor to Detect RBD Protein S SARS-CoV-2 as a Biomarker of COVID-19 Using Screen-Printed Carbon Electrode/AuNP." *J. Electrochem. Sci. Eng.*, 12 (1): 219, 2022.
82. XUE, J.; LI, Y.; LIU, J.; ZHANG, Z.; YU, R.; HUANG, Y.; LI, C.; CHEN, A.; & QIU, J. "Highly Sensitive Electrochemical Aptasensor for SARS-CoV-2 Antigen Detection Based on Aptamer-Binding Induced Multiple Hairpin Assembly Signal Amplification." *Talanta*, 248 (May): 123605, 2022.
83. FARZIN, L.; SADJADI, S.; SHEINI, A.; & MOHAGHEGHPOUR, E. "A Nanoscale Genosensor for Early Detection of COVID-19 by Voltammetric Determination of RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRP) Sequence of SARS-CoV-2 Virus." *Microchim. Acta*, 188 (4)2021.
84. ZHAO, H.; LIU, F.; XIE, W.; ZHOU, T. C.; OUYANG, J.; JIN, L.; LI, H.; ZHAO, C. Y.; ZHANG, L.; WEI, J.; ZHANG, Y. P.; & LI, C. P. "Ultrasensitive Supersandwich-Type Electrochemical Sensor for SARS-CoV-2 from the Infected COVID-19 Patients Using a Smartphone." *Sensors Actuators, B Chem.*, 327 (September 2020): 128899, 2021.
85. PENG, R.; PAN, Y.; LI, Z.; QIN, Z.; RINI, J. M.; & LIU, X. "SPEEDS: A Portable Serological Testing Platform for Rapid Electrochemical Detection of SARS-CoV-2 Antibodies." *Biosens Bioelectron.*, 197: 113762, 2022.
86. SAMPER, I. C.; SÁNCHEZ-CANO, A.; KHAMCHAROEN, W.; JANG, I.; SIANGPROH, W.; BALDRICH, E.; GEISS, B. J.; DANDY, D. S.; & HENRY, C. S. "Electrochemical Capillary-Flow Immunoassay for Detecting Anti-SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Antibodies at the Point of Care." *ACS Sensors*, 6 (11): 4067, 2021.
87. ERDEM, A.; SENTURK, H.; YILDIZ, E.; & MARAL, M. "Amperometric Immunosensor Developed for Sensitive Detection of SARS-CoV-2 Spike S1 Protein in Combined with Portable Device." *Talanta*, 244 (March): 123422, 2022.
88. MEHMANDOUST, M.; GUMUS, Z. P.; SOYLAK, M.; & ERK, N. "Electrochemical Immunosensor for Rapid and Highly Sensitive Detection of SARS-CoV-2 Antigen in the Nasal Sample." *Talanta*, 240: 123211, 2022.
89. SOTO, D.; & OROZCO, J. "Peptide-Based Simple Detection of SARS-CoV-2 with Electrochemical Readout." *Anal. Chim. Acta*, 1205: 339739, 2022.
90. ERDEM, A.; SENTURK, H.; YILDIZ, E.; & MARAL, M. "Impedimetric Detection Based on Label-Free Immunoassay Developed for Targeting Spike S1 Protein of SARS-CoV-2." *Diagnostics*, 12 (8)2022.
91. POLA, C. C.; RANGNEKAR, S. V.; SHEETS, R.; SZYDŁOWSKA, B. M.; DOWNING, J. R.; PARATE, K. W.; WALLACE, S. G.; TSAI, D.; HERSAM, M. C.; GOMES, C. L.; & CLAUSSEN, J. C. "Aerosol-Jet-Printed Graphene Electrochemical Immunosensors for Rapid and Label-Free Detection of SARS-CoV-2 in Saliva." *2D Mater.*, 9 (3)2022.
92. EHSAN, M. A.; KHAN, S. A.; & REHMAN, A. "Screen-Printed Graphene/Carbon Electrodes on Paper Substrates as Impedance Sensors for Detection of Coronavirus in Nasopharyngeal Fluid Samples." *Diagnostics*, 11 (6)2021.

93. PERDOMO, S. A.; ORTEGA, V.; JARAMILLO-BOTERO, A.; MANCILLA, N.; MOSQUERA-DELACRUZ, J. H.; VALENCIA, D. P.; QUIMBAYA, M.; CONTRERAS, J. D.; VELEZ, G. E.; LOAIZA, O. A.; GÓMEZ, A.; & ROCHE, J. De. "SenSARS : A Low-Cost Portable Electrochemical Diagnostics of SARS-CoV-2 Infections." *Ieee Trans. Instrum. Meas.*, 70: 1, 2021.
94. AYALA-CHARCA, G.; SALAHANDISH, R.; KHALGHOLLAH, M.; SADIGHBAYAN, D.; HAGHAYEGH, F.; SANATI-NEZHAD, A.; & GHAFAR-ZADEH, E. "A Low-Cost Handheld Impedimetric Biosensing System for Rapid Diagnostics of SARS-CoV-2 Infections." *IEEE Sens. J.*, 22 (16): 15673, 2022.
95. BIAŁOBRZESKA, W.; FICEK, M.; DEC, B.; OSELLA, S.; TRZASKOWSKI, B.; JARAMILLO-BOTERO, A.; PIERPAOLI, M.; RYCEWICZ, M.; DASHKEVICH, Y.; ŁĘGA, T.; MALINOWSKA, N.; CEBULA, Z.; BIGUS, D.; FIRGANIEK, D.; BIĘGA, E.; DZIĄBOWSKA, K.; BRODOWSKI, M.; KOWALSKI, M.; PANASIUK, M.; GROMADZKA, B.; ŻOŁĘDOWSKA, S.; NIDZWORSKI, D.; PYRĆ, K.; GODDARD, W. A.; & BOGDANOWICZ, R. "Performance of Electrochemical Immunoassays for Clinical Diagnostics of SARS-CoV-2 Based on Selective Nucleocapsid N Protein Detection: Boron-Doped Diamond, Gold and Glassy Carbon Evaluation." *Biosens. Bioelectron.*, 209 (March)2022.
96. BARUAH, S.; & BETTY, C. A. "Point of Care Devices for Detection of Covid-19, Malaria and Dengue Infections: A Review." *Bioelectrochemistry*, 158 (April): 108704, 2024.
97. VALERIO, T. L.; ANASTÁCIO, R.; DA SILVA, S. S.; DE OLIVEIRA, C. C.; & VIDOTTI, M. "An Overview of Electrochemical Biosensors Used for COVID-19 Detection." *Anal. Methods*, 16 (15): 2164, 2024.
98. SHER, M.; FAHEEM, A.; ASGHAR, W.; & CINTI, S. "Nano-Engineered Screen-Printed Electrodes: A Dynamic Tool for Detection of Viruses." *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 143: 116374, 2021.
99. DE OLIVEIRA, T. R.; MANZINE, P. R.; COMINETTI, M. R.; LEITE, O. D.; & FARIA, R. C. "Electrochemical Magneto-Immunoassay for Detection of ADAM10 Alzheimer's Biomarker Using Gold Nanoparticles as Label." *Talanta*, 266 (August 2023)2024.
100. DE OLIVEIRA, T. R.; ERBERELI, C. R.; MANZINE, P. R.; MAGALHÃES, T. N. C.; BALTHAZAR, M. L. F.; COMINETTI, M. R.; & FARIA, R. C. "Early Diagnosis of Alzheimer's Disease in Blood Using a Disposable Electrochemical Microfluidic Platform." *ACS Sensors*, 5 (4): 1010, 2020
101. PROENÇA, C. A.; FREITAS, T. A.; BALDO, T. A.; MATERÓN, E. M.; SHIMIZU, F. M.; FERREIRA, G. R.; SOARES, F. L. F.; FARIA, R. C.; & OLIVEIRA, O. N. "Use of Data Processing for Rapid Detection of the Prostate-Specific Antigen Biomarker Using Immunomagnetic Sandwich-Type Sensors." *Beilstein J. Nanotechnol.*, 10: 2171, 2019.
102. PROENÇA, C. A.; BALDO, T. A.; FREITAS, T. A.; MATERÓN, E. M.; WONG, A.; DURÁN, A. A.; MELENDEZ, M. E.; ZAMBRANO, G.; & FARIA, R. C. "Novel Enzyme-Free Immunomagnetic Microfluidic device Based on Co_{0.25}Zn_{0.75}Fe₂O₄ for Cancer Biomarker Detection." *Anal. Chim. Acta*, 1071: 59, 2019.
103. FONSECA, W. T.; CINCOTTO, F. H.; LOURENCAO, B. C.; DE ALMEIDA, S. V.; MORAES, F. C.; FATIBELLO-FILHO, O.; DE CARVALHO, A. C.; CARVALHO, A. L.; MELENDEZ, M. E.; & FARIA, R. C. "Ultrasensitive Magnetogenoassay for Detection of MicroRNA for Diagnosis of Metastatic Lymph Nodes in Head and Neck Cancer Using Disposable Electrodes." *Sensors Actuators B Chem.*, 352 (October 2021)2022.

104. DOS SANTOS, DANIEL JÚNIOR ALMEIDA; DE OLIVEIRA, TASSIA REGINA; ARAÚJO, GABRIELA MARTINS DE; POTT-JUNIOR, HENRIQUE; MELENDEZ, MATIAS ELISEO; SABINO, ESTER CERDEIRA; LEITE, OLDAIR DONIZETI; FARIA, R. C. "An Electrochemical Genomagnetic Assay for Detection of SARS-CoV-2 and Influenza A Viruses in Saliva." *Biosens. Bioelectron.*, 255 (February)2024.
105. WALLS, A. C.; PARK, Y. J.; TORTORICI, M. A.; WALL, A.; MCGUIRE, A. T.; & VEESLER, D. "Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein." *Cell*, 181 (2): 281, 2020.
106. HATI, S.; & BHATTACHARYYA, S. "Impact of Thiol-Disulfide Balance on the Binding of Covid-19 Spike Protein with Angiotensin-Converting Enzyme 2 Receptor." *ACS Omega*, 5 (26): 16292, 2020.
107. KIM, S. E.; VAN TIEU, M.; HWANG, S. Y.; & LEE, M. H. "Magnetic Particles: Their Applications from Sample Preparations to Biosensing Platforms." *Micromachines*, 11 (3): 1, 2020.
108. SANDHU, A.; HANDA, H.; & ABE, M. "Synthesis and Applications of Magnetic Nanoparticles for Biorecognition and Point of Care Medical Diagnostics." *Nanotechnology*, 21 (44)2010.
109. KABE, Y.; SAKAMOTO, S.; HATAKEYAMA, M.; YAMAGUCHI, Y.; SUEMATSU, M.; ITONAGA, M.; & HANDA, H. "Application of High-Performance Magnetic Nanobeads to Biological Sensing Devices." *Anal. Bioanal. Chem.*, 411 (9): 1825, 2019.
110. ANDREWS, W. T.; SKUBE, S. B.; & HUMMON, A. B. "Magnetic Bead-Based Peptide Extraction Methodology for Tissue Imaging." *Analyst*, 143 (1): 133, 2018.
111. MODH, H.; SCHEPER, T.; & WALTER, J. G. "Aptamer-Modified Magnetic Beads in Biosensing." *Sensors (Switzerland)*, 18 (4)2018.
112. SULTAN, F. and M. C. "Magnetic Bead Coatings : Today and Tomorrow." : 1, 2015.
113. MORAL-VICO, J.; BARALLAT, J.; ABAD, L.; OLIVÉ-MONLLAU, R.; MUÑOZ-PASCUAL, F. X.; GALÁN ORTEGA, A.; DEL CAMPO, F. J.; & BALDRICH, E. "Dual Chronoamperometric Detection of Enzymatic Biomarkers Using Magnetic Beads and a Low-Cost Flow Cell." *Biosens. Bioelectron.*, 69: 328, 2015.
114. REVERTÉ, L.; PRIETO-SIMÓN, B.; & CAMPÀS, M. "New Advances in Electrochemical Biosensors for the Detection of Toxins: Nanomaterials, Magnetic Beads and Microfluidics Systems. A Review." *Anal. Chim. Acta*, 908: 8, 2016.
115. RUIZ-VALDEPEÑAS MONTIEL, V.; CAMPUZANO, S.; TORRENTE-RODRÍGUEZ, R. M.; REVIEJO, A. J.; & PINGARRÓN, J. M. "Electrochemical Magnetic Beads-Based Immunosensing Platform for the Determination of α -Lactalbumin in Milk." *Food Chem.*, 213: 595, 2016.
116. XU, Y.; & WANG, E. "Electrochemical Biosensors Based on Magnetic Micro/Nano Particles." *Electrochim. Acta*, 84: 62, 2012.
117. BARALLAT, J.; OLIVÉ-MONLLAU, R.; GONZALO-RUIZ, J.; RAMÍREZ-SATORRAS, R.; MUÑOZ-PASCUAL, F. X.; ORTEGA, A. G.; & BALDRICH, E. "Chronoamperometric Magneto Immunosensor for Myeloperoxidase Detection in Human Plasma Based on a Magnetic Switch Produced by 3d Laser Sintering." *Anal. Chem.*, 85 (19): 9049, 2013.
118. DUTTA, G.; PARK, S.; SINGH, A.; SEO, J.; KIM, S.; & YANG, H. "Low-Interference Washing-Free Electrochemical Immunosensor Using Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase as an Enzyme Label." *Anal. Chem.*, 87 (7): 3574, 2015.
119. LASCHI, S.; CENTI, S.; & MASCINI, M. "Electrochemical Arrays Coupled with Magnetic Separators for Immunochemistry." *Bioanal. Rev.*, 3 (1): 11, 2011.

120. URBANOVA, V.; MAGRO, M.; GEDANKEN, A.; BARATELLA, D.; VIANELLO, F.; & ZBORIL, R. "Nanocrystalline Iron Oxides, Composites, and Related Materials as a Platform for Electrochemical, Magnetic, and Chemical Biosensors." *Chem. Mater.*, 26 (23): 6653, 2014.
121. PROENÇA, C. A.; BALDO, T. A.; FREITAS, T. A.; MATERÓN, E. M.; WONG, A.; DURÁN, A. A.; MELENDEZ, M. E.; ZAMBRANO, G.; & FARIA, R. C. "Novel Enzyme-Free Immunomagnetic Microfluidic Device Based on $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ for Cancer Biomarker Detection." *Anal. Chim. Acta*, 1071: 59, 2019.
122. FONSECA, W. T.; CINCOTTO, F. H.; LOURENCAO, B. C.; DE ALMEIDA, S. V.; MORAES, F. C.; FATIBELLO-FILHO, O.; DE CARVALHO, A. C.; CARVALHO, A. L.; MELENDEZ, M. E.; & FARIA, R. C. "Ultrasensitive Magnetogenoassay for Detection of MicroRNA for Diagnosis of Metastatic Lymph Nodes in Head and Neck Cancer Using Disposable Electrodes." *Sensors Actuators B Chem.*, 352 (October 2021): 131040, 2021.
123. VARGAS, E.; POVEDANO, E.; MONTIEL, V. R. V.; TORRENTE-RODRÍGUEZ, R. M.; ZOUARI, M.; MONTOYA, J. J.; RAOUAFI, N; CAMPUZANO, S.; & PINGARRÓN, J. M. "Single-Step Incubation Determination of MiRNAs in Cancer Cells Using an Amperometric Biosensor Based on Competitive Hybridization onto Magnetic Beads." *Sensors (Switzerland)*, 18 (3)2018.
124. IMMUNOSENSOR, G.; ZACCARIOTTO, G. C.; SILVA, M. K. L.; ROCHA, G. S.; & CESARINO, I. "A Novel Method for the Detection of SARS-CoV-2 Based On." 2021.
125. HSING, I. M.; XU, Y.; & ZHAO, W. "Micro- and Nano-Magnetic Particles for Applications in Biosensing." *Electroanalysis*, 19 (7–8): 755, 2007.
126. CASTRO, K. R.; SETTI, G. O.; DE OLIVEIRA, T. R.; RODRIGUES-JESUS, M. J.; BOTOSSO, V. F.; PERINI DE ARAUJO, A. P.; DURIGON, E. L.; FERREIRA, L. C. S.; & FARIA, R. C. "Electrochemical Magneto-Immunoassay for Detection of Zika Virus Antibody in Human Serum." *Talanta*, 256: 124277, 2023.
127. LOMBARDI, A. F.; AFSAHI, A. M.; GUPTA, A.; & GHOLAMREZANEZHAD, A. "Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), Middle East Respiratory Syndrome (MERS), Influenza, and COVID-19, beyond the Lungs: A Review Article." *Radiol. Medica*, 126 (4): 561, 2021.
128. NARITA, F.; WANG, Z.; KURITA, H.; LI, Z.; SHI, Y.; JIA, Y.; & SOUTIS, C. "A Review of Piezoelectric and Magnetostrictive Biosensor Materials for Detection of COVID-19 and Other Viruses." *Adv. Mater.*, 33 (1): 2005448, 2021.
129. ABID, S. A.; AHMED MUNEER, A.; AL-KADMY, I. M. S.; SATTAR, A. A.; BESHBIHSHY, A. M.; BATIHA, G. E.-S.; & HETTA, H. F. "Biosensors as a Future Diagnostic Approach for COVID-19." *Life Sci.*, 273: 119117, 2021.
130. CHOI, J. R. "Development of Point-of-Care Biosensors for COVID-19." *Front. Chem.*, 82020.
131. MORALES-NARVÁEZ, E.; & DINCER, C. "The Impact of Biosensing in a Pandemic Outbreak: COVID-19." *Biosens. Bioelectron.*, 163: 112274, 2020.
132. SANTIAGO, I. "Trends and Innovations in Biosensors for COVID-19 Mass Testing." *ChemBioChem*, 21 (20): 2880, 2020.
133. TRIPATHY, S.; AGARKAR, T.; TALUKDAR, A.; SENGUPTA, M.; KUMAR, A.; & GHOSH, S. "Evaluation of Indirect Sequence-Specific Magneto-Extraction-Aided LAMP for Fluorescence and Electrochemical SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection." *Talanta*, 252 (April 2022): 123809, 2023.
134. LI, T.; PAN, R.; WEN, Y.; XU, J.; ZHANG, L.; HE, S.; & LIANG, G. "A Simple and Universal Nucleic Acid Assay Platform Based on Personal Glucose Meter Using SARS-

- CoV-2 N Gene as the Model.” *Biosensors*, 12 (4)2022.
135. CHAIBUN, T.; PUENPA, J.; NGAMDEE, T.; BOONAPATCHAROEN, N.; ATHAMANOLAP, P.; O’MULLANE, A. P.; VONGPUNSAWAD, S.; POOVORAWAN, Y.; LEE, S. Y.; & LERTANANTAWONG, B. “Rapid Electrochemical Detection of Coronavirus SARS-CoV-2.” *Nat. Commun.*, 12 (1): 1, 2021.
 136. NASCIMENTO, E. D.; FONSECA, W. T.; DE OLIVEIRA, T. R.; DE CORREIA, C. R. S. T. B.; FAÇA, V. M.; DE MORAIS, B. P.; SILVESTRINI, V. C.; POTT-JUNIOR, H.; TEIXEIRA, F. R.; & FARIA, R. C. “COVID-19 Diagnosis by SARS-CoV-2 Spike Protein Detection in Saliva Using an Ultrasensitive Magneto-Assay Based on Disposable Electrochemical Sensor.” *Sensors Actuators B Chem.*, 353 (October 2022)2022.
 137. VÁSQUEZ, V.; NAVAS, M. C.; JAIMES, J. A.; & OROZCO, J. “SARS-CoV-2 Electrochemical Immunosensor Based on the Spike-ACE2 Complex.” *Anal. Chim. Acta*, 1205 (December 2019): 1, 2022.
 138. MALLA, P.; LIAO, H. P.; LIU, C. H.; WU, W. C.; & SREEARUNOTHAI, P. “Voltammetric Biosensor for Coronavirus Spike Protein Using Magnetic Bead and Screen-Printed Electrode for Point-of-Care Diagnostics.” *Microchim. Acta*, 189 (4)2022.
 139. ZHAO, J.; ZHAO, F.; LI, H.; XIONG, Y.; CAI, S.; WANG, C.; CHEN, Y.; HAN, N.; & YANG, R. “Magnet-Assisted Electrochemical Immunosensor Based on Surface-Clean Pd-Au Nanosheets for Sensitive Detection of SARS-CoV-2 Spike Protein.” *Electrochim. Acta*, 404: 1, 2022.
 140. LI, J.; & LILLEHOJ, P. B. “Microfluidic Magneto Immunosensor for Rapid, High Sensitivity Measurements of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein in Serum.” *ACS Sensors*, 6 (3): 1270, 2021.
 141. FABIANI, L.; SAROGLIA, M.; GALATÀ, G.; DE SANTIS, R.; FILLO, S.; LUCA, V.; FAGGIONI, G.; D’AMORE, N.; REGALBUTO, E.; SALVATORI, P.; TEROVA, G.; MOSCONE, D.; LISTA, F.; & ARDUINI, F. “Magnetic Beads Combined with Carbon Black-Based Screen-Printed Electrodes for COVID-19: A Reliable and Miniaturized Electrochemical Immunosensor for SARS-CoV-2 Detection in Saliva.” *Biosens. Bioelectron.*, 171: 112686, 2021.
 142. TORRENTE-RODRÍGUEZ, R. M.; MONTERO-CALLE, A.; SAN BARTOLOMÉ, C.; CANO, O.; VÁZQUEZ, M.; IGLESIAS-CABALLERO, M.; CORRAL-LUGO, A.; MCCONNELL, M. J.; PASCAL, M.; MAS, V.; PINGARRÓN, J. M.; BARDERAS, R.; & CAMPUZANO, S. “Towards Control and Oversight of SARS-CoV-2 Diagnosis and Monitoring through Multiplexed Quantitative Electroanalytical Immune Response Biosensors.” *Angew. Chemie*, 134 (28)2022.
 143. YANG, F.; LIU, L.; NEUENSCHWANDER, P. F.; IDELL, S.; VANKAYALAPATI, R.; JAIN, K. G.; DU, K.; JI, H.; & YI, G. “Phage Display-Derived Peptide for the Specific Binding of SARS-CoV-2.” *ACS Omega*, 7 (4): 3203, 2022.
 144. LAMBERT, C. J.; JAYAMOHAN, H.; GALE, B. K.; LAURENTIUS, L. B.; PATEL, D.; HANSEN, M.; MAHMOOD, T.; & SANT, H. J. “Electrochemical Detection of SARS-CoV-2 Using Immunomagnetic Separation and Gold Nanoparticles on Unmodified Screen-Printed Carbon Electrodes.” *Appl. Sci.*, 132023.
 145. TORRENTE-RODRÍGUEZ, R. M.; MONTERO-CALLE, A.; SAN BARTOLOMÉ, C.; CANO, O.; VÁZQUEZ, M.; IGLESIAS-CABALLERO, M.; CORRAL-LUGO, A.; MCCONNELL, M. J.; PASCAL, M.; MAS, V.; PINGARRÓN, J. M.; BARDERAS, R.; & CAMPUZANO, S. “Towards Control and Oversight of SARS-CoV-2 Diagnosis and Monitoring through Multiplexed Quantitative Electroanalytical Immune Response Biosensors.” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 61 (28)2022.

146. LIU, J.; RUAN, G.; MA, W.; SUN, Y.; YU, H.; XU, Z.; YU, C.; LI, H.; ZHANG, C. wu; & LI, L. "Horseradish Peroxidase-Triggered Direct in Situ Fluorescent Immunoassay Platform for Sensing Cardiac Troponin I and SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein in Serum." *Biosens. Bioelectron.*, 198 (October 2021): 113823, 2022.
147. TOK, K.; MOULAHOU, H.; GHORBANIZAMANI, F.; HARMANCI, D.; BALABAN HANOGLU, S.; DURMUS, C.; EVRAN, S.; CICEK, C.; SERTOZ, R.; ARDA, B.; GOKSEL, T.; TURHAN, K.; TIMUR, S.; & ZIHNIUGLU, F. "Simple Workflow to Repurpose SARS-CoV-2 Swab/Serum Samples for the Isolation of Cost-Effective Antibody/Antigens for Proteotyping Applications and Diagnosis." *Anal. Bioanal. Chem.*, 413 (29): 7251, 2021.
148. AFONSO, A. S.; ULIANA, C. V.; MARTUCCI, D. H.; & FARIA, R. C. "Simple and Rapid Fabrication of Disposable Carbon-Based Electrochemical Cells Using an Electronic Craft Cutter for Sensor and Biosensor Applications." *Talanta*, 146: 381, 2016.
149. DE OLIVEIRA, T. R.; FONSECA, W. T.; DE OLIVEIRA SETTI, G.; & FARIA, R. C. "Fast and Flexible Strategy to Produce Electrochemical Paper-Based Analytical Devices Using a Craft Cutter Printer to Create Wax Barrier and Screen-Printed Electrodes." *Talanta*, 195 (November 2018): 480, 2019.
150. YAN, R.; ZHANG, Y.; LI, Y.; XIA, L.; GUO, Y.; & ZHOU, Q. "Structural Basis for the Recognition of SARS-CoV-2 by Full-Length Human ACE2." *Science (80-.)*, 367 (6485): 1444, 2020.
151. GUNASEKARAN, K.; PENTONY, M.; SHEN, M.; GARRETT, L.; FORTE, C.; WOODWARD, A.; NG, S. Bin; BORN, T.; RETTER, M.; MANCHULENKO, K.; SWEET, H.; FOLTZ, I. N.; WITTEKIND, M.; & YAN, W. "Enhancing Antibody Fc Heterodimer Formation through Electrostatic Steering Effects: Applications to Bispecific Molecules and Monovalent IgG." *J. Biol. Chem.*, 285 (25): 19637, 2010.
152. ALVIM, R. G. F.; LIMA, T. M.; RODRIGUES, D. A. S.; MARSILI, F. F.; BOZZA, V. B. T.; HIGA, L. M.; MONTEIRO, F. L.; LEITÃO, I. C.; CARVALHO, R. S.; GALLIEZ, R. M.; CASTINEIRAS, T. M. P. P.; NOBREGA, A.; TRAVASSOS, L. H.; FERREIRA JR, O. C.; TANURI, A.; VALE, A. M.; & CASTILHO, L. R. "An Affordable Anti-SARS-COV-2 Spike Protein Elisa Test for Early Detection of IgG Seroconversion Suited for Large-Scale Surveillance Studies in Low-Income Countries." *SSRN Electron. J.*, 2020.
153. MIGOÑ, D.; WASILEWSKI, T.; & SUCHY, D. "Application of QCM in Peptide and Protein-Based Drug Product Development." *Molecules*, 25 (17)2020.
154. XUE, Y.; LI, X.; LI, H.; & ZHANG, W. "Quantifying Thiol-Gold Interactions towards the Efficient Strength Control." *Nat. Commun.*, 52014.
155. TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; & HILLIER, J. "A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold." *Discuss. Faraday Soc.*, 11 (c): 55, 1951.
156. AFONSO, A. S.; PÉREZ-LÓPEZ, B.; FARIA, R. C.; MATTOSO, L. H. C.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.; ROIG-SAGUÉS, A. X.; MALTEZ-DA COSTA, M.; & MERKOÇI, A. "Electrochemical Detection of Salmonella Using Gold Nanoparticles." *Biosens. Bioelectron.*, 40 (1): 121, 2013.
157. KAMPF, G.; VOSS, A.; & SCHEITHAUER, S. "Inactivation of Coronaviruses by Heat." *J. Hosp. Infect.*, 105 (2): 348, 2020.
158. IBRAHIM, H. M.; REDA, M. M.; & KLINGNER, A. "Preparation and Characterization of Green Carboxymethylchitosan (CMCS) – Polyvinyl Alcohol (PVA) Electrospun Nanofibers Containing Gold Nanoparticles (AuNPs) and Its Potential Use as Biomaterials." *Int. J. Biol. Macromol.*, 151: 821, 2020.

159. DE LA ESCOSURA-MUÑIZ, A.; MALTEZ-DA COSTA, M.; SÁNCHEZ-ESPINEL, C.; DÍAZ-FREITAS, B.; FERNÁNDEZ-SUAREZ, J.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Á.; & MERKOÇI, A. "Gold Nanoparticle-Based Electrochemical Magnetoimmunosensor for Rapid Detection of Anti-Hepatitis B Virus Antibodies in Human Serum." *Biosens. Bioelectron.*, 26 (4): 1710, 2010.
160. SHITTU, K. O.; BANKOLE, M. T.; ABDULKAREEM, A. S.; ABUBAKRE, O. K.; & UBAKA, A. U. "Application of Gold Nanoparticles for Improved Drug Efficiency." *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, 8 (3)2017.
161. PRASAD, S.; MANDAL, I.; SINGH, S.; PAUL, A.; MANDAL, B.; VENKATRAMANI, R.; & SWAMINATHAN, R. "Near UV-Visible Electronic Absorption Originating from Charged Amino Acids in a Monomeric Protein." *Chem. Sci.*, 8 (8): 5416, 2017.
162. MORIS, S.; SILVA, N.; SAITZ, C.; JARA, P.; & CHORNIK, B. "Nanodecoration of Single Crystals of 5,11,17,23-Tetra-Tert-Butyl-25,27- Bis(Cyanomethoxy)-26,28-Dihydroxycalix[4]Arene." *J. Chil. Chem. Soc.*, 62 (4): 3772, 2017.
163. ZHANG, L.; XU, C.; SONG, G.; & LI, B. "Self-Assembly of L-Cysteine-Gold Nanoparticles as Chiral Probes for Visual Recognition of 3,4-Dihydroxyphenylalanine Enantiomers." *RSC Adv.*, 5 (34): 27003, 2015.
164. ACRES, R. G.; FEYER, V.; TSUD, N.; CARLINO, E.; & PRINCE, K. C. "Mechanisms of Aggregation of Cysteine Functionalized Gold Nanoparticles." *J. Phys. Chem. C*, 118 (19): 10481, 2014.
165. HORMOZI-NEZHAD, M. R.; SEYEDHOSSEINI, E.; & ROBATJAZI, H. "Spectrophotometric Determination of Glutathione and Cysteine Based on Aggregation of Colloidal Gold Nanoparticles." *Sci. Iran.*, 19 (3): 958, 2012.
166. BOUSSOUFI, F.; GALLÓN, S. M. N.; CHANG, R.; & WEBSTER, T. J. "Synthesis and Study of Cell-Penetrating Peptide-Modified Gold Nanoparticles." *Int. J. Nanomedicine*, 13: 6199, 2018.
167. MAJZIK, A.; FÜLÖP, L.; CSAPÓ, E.; BOGÁR, F.; MARTINEK, T.; PENKE, B.; BÍRÓ, G.; & DÉKÁNY, I. "Functionalization of Gold Nanoparticles with Amino Acid, β -Amyloid Peptides and Fragment." *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 81 (1): 235, 2010.
168. HAISS, W.; THANH, N. T. K.; AVEYARD, J.; & FERNIG, D. G. "Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra." *Anal. Chem.*, 79 (11): 4215, 2007.
169. LU, J.; & SUN, P. D. "High Affinity Binding of SARS-Cov-2 Spike Protein Enhances ACE2 Carboxypeptidase Activity." *J. Biol. Chem.*, 295 (52): 18579, 2020.
170. BOURGONJE, A. R.; ABDULLE, A. E.; TIMENS, W.; HILLEBRANDS, J. L.; NAVIS, G. J.; GORDIJN, S. J.; BOLLING, M. C.; DIJKSTRA, G.; VOORS, A. A.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; VAN DER VOORT, P. H. J.; MULDER, D. J.; & VAN GOOR, H. "Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the Pathophysiology of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)." *J. Pathol.*, 251 (3): 228, 2020.
171. AFONSO, A. S.; ZANETTI, B. F.; SANTIAGO, A. C.; HENRIQUE-SILVA, F.; MATTOSO, L. H. C.; & FARIA, R. C. "QCM Immunoassay for Recombinant Cysteine Peptidase: A Potential Protein Biomarker for Diagnosis of Citrus Canker." *Talanta*, 104: 193, 2013.
172. KÄMÄRÄINEN, S.; MÄKI, M.; TOLONEN, T.; PALLESCHI, G.; VIRTANEN, V.; MICHELI, L.; & SESAY, A. M. "Disposable Electrochemical Immunosensor for Cortisol Determination in Human Saliva." *Talanta*, 188: 50, 2018.
173. FRENKEL, E. S.; & RIBBECK, K. "Salivary Mucins in Host Defense and Disease

- Prevention." *J. Oral Microbiol.*, 7 (1): 29759, 2015.
174. JOHN, T.; ABEL, B.; & MARTIN, L. L. "The Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring (QCM-D) Technique Applied to the Study Of Membrane-Active Peptides." *Aust. J. Chem.*, 71 (7): 543, 2018.
 175. MERCURIO, I.; TRAGNI, V.; BUSTO, F.; DE GRASSI, A.; & PIERRI, C. L. "Protein Structure Analysis of the Interactions between SARS-CoV-2 Spike Protein and the Human ACE2 Receptor: From Conformational Changes to Novel Neutralizing Antibodies." *Cell. Mol. Life Sci.*, 78 (4): 1501, 2021.
 176. NIE, Z.; NIJHUIS, C. A.; GONG, J.; CHEN, X.; KUMACHEV, A.; MARTINEZ, A. W.; NAROVLYANSKY, M.; & WHITESIDES, G. M. "Electrochemical Sensing in Paper-Based Microfluidic Devices †." No. c: 477, 2010.
 177. DE OLIVEIRA, T. R.; FONSECA, W. T.; DE OLIVEIRA SETTI, G.; & FARIA, R. C. "Fast and Flexible Strategy to Produce Electrochemical Paper-Based Analytical Devices Using a Craft Cutter Printer to Create Wax Barrier and Screen-Printed Electrodes." *Talanta*, 195: 480, 2019.
 178. YAO, Y.; & ZHANG, C. "A Novel Screen-Printed Microfluidic Paper-Based Electrochemical Device for Detection of Glucose and Uric Acid in Urine." *Biomed. Microdevices*, 18 (5): 1, 2016.
 179. LEE, S. H.; FANG, H. Y.; & CHEN, W. C. "Amperometric Glucose Biosensor Based on Screen-Printed Carbon Electrodes Mediated with Hexacyanoferrate-Chitosan Oligomers Mixture." *Sensors Actuators, B Chem.*, 117 (1): 236, 2006.
 180. PUMERA, M.; ALDAVERT, M.; MILLS, C.; MERKOÇI, A.; & ALEGRET, S. "Direct Voltammetric Determination of Gold Nanoparticles Using Graphite-Epoxy Composite Electrode." *Electrochim. Acta*, 50 (18): 3702, 2005.
 181. ZHU, M.; TANG, Y.; WEN, Q.; LI, J.; & YANG, P. "Dynamic Evaluation of Cell-Secreted Interferon Gamma in Response to Drug Stimulation via a Sensitive Electro-Chemiluminescence Immunosensor Based on a Glassy Carbon Electrode Modified with Graphene Oxide, Polyaniline Nanofibers, Magnetic Beads, an Gold N." *Microchim. Acta*, 183 (5): 1739, 2016.
 182. AFONSO, A. S.; ULIANA, C. V.; MARTUCCI, D. H.; & FARIA, R. C. "Simple and Rapid Fabrication of Disposable Carbon-Based Electrochemical Cells Using an Electronic Craft Cutter for Sensor and Biosensor Applications." *Talanta*, 146: 381, 2016.
 183. ORTEGA, J. T.; SERRANO, M. L.; PUJOL, F. H.; & RANGEL, H. R. "Role of Changes in SARS-CoV-2 Spike Protein in the Interaction with the Human ACE2 Receptor: An in Silico Analysis." *EXCLI J.*, 19: 410, 2020.
 184. RATH, S. L.; & KUMAR, K. "Investigation of the Effect of Temperature on the Structure of SARS-CoV-2 Spike Protein by Molecular Dynamics Simulations." *Front. Mol. Biosci.*, 7: 2020.
 185. KUZNETSOV, A.; ARUKUUSK, P.; HÄRK, H.; JURONEN, E.; LANGEL, Ü.; USTAV, M.; & JÄRV, J. "ACE2 Peptide Fragment Interacts with Several Sites on the SARS-CoV-2 Spike Protein S1." *bioRxiv*, 2020.
 186. KUZNETSOV, A.; ARUKUUSK, P.; HÄRK, H.; JURONEN, E.; USTAV, M.; LANGEL, Ü.; & JÄRV, J. "ACE2 Peptide Fragment Interaction with Different S1 Protein Sites." *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 28 (1): 1, 2022.
 187. SHANG, J.; YE, G.; SHI, K.; WAN, Y.; LUO, C.; AIHARA, H.; GENG, Q.; AUERBACH, A.; & LI, F. "Structural Basis of Receptor Recognition by SARS-CoV-2." *Nature*, 581 (7807): 221, 2020.
 188. HUSSEIN, H. A.; EL NASHAR, R. M.; EL-SHERBINY, I. M.; & HASSAN, R. Y. A.

- “High Selectivity Detection of FMDV- SAT-2 Using a Newly-Developed Electrochemical Nanosensors.” *Biosens. Bioelectron.*, 191: 113435, 2021.
189. MANDREKAR, J. N. “Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment.” *J. Thorac. Oncol.*, 5 (9): 1315, 2010.
 190. ZWEIG, M. H.; & CAMPBELL, G. “Receiver-Operating Characteristic (ROC) Plots: A Fundamental Evaluation Tool in Clinical Medicine.” *Clin. Chem.*, 39 (4): 561, 1993.
 191. PASOMSUB, E.; WATCHARANANAN, S. P.; BOONYAWAT, K.; JANCHOMPOO, P.; WONGTABTIM, G.; SUKSUWAN, W.; SUNGKANUPARPH, S.; & PHUPHUAKRAT, A. “Saliva Sample as a Non-Invasive Specimen for the Diagnosis of Coronavirus Disease 2019: A Cross-Sectional Study.” *Clin. Microbiol. Infect.*, 20192020.
 192. PADHYE, N. S. “Reconstructed Diagnostic Sensitivity and Specificity of the RT-PCR Test for COVID-19.” *medRxiv*, 2020.
 193. BÖGER, B.; FACHI, M. M.; VILHENA, R. O.; COBRE, A. F.; TONIN, F. S.; & PONTAROLO, R. “Systematic Review with Meta-Analysis of the Accuracy of Diagnostic Tests for COVID-19.” *Am. J. Infect. Control*, 49 (1): 21, 2021.
 194. BABADY, N. E.; MCMILLEN, T.; JANI, K.; VIALE, A.; ROBILOTTI, E. V.; ASLAM, A.; DIVER, M.; SOKOLI, D.; MASON, G.; SHAH, M. K.; KORENSTEIN, D.; & KAMBOJ, M. “Performance of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Real-Time RT-PCR Tests on Oral Rinses and Saliva Samples.” *J. Mo. Diagnostics*, 23 (1): 3, 2021.
 195. TIAN, F.; LIU, C.; DENG, J.; HAN, Z.; ZHANG, L.; CHEN, Q.; & SUN, J. “A Fully Automated Centrifugal Microfluidic System for Sample-to-Answer Viral Nucleic Acid Testing.” *Sci. China Chem.*, 63 (10): 1498, 2020.
 196. ARSHAVSKY-GRAHAM, S.; & SEGAL, E. “Lab-on-a-Chip Devices for Point-of-Care Medical Diagnostics.” 2020.
 197. RATH, S. L.; & KUMAR, K. “Investigation of the Effect of Temperature on the Structure of SARS-Cov-2 Spike Protein by Molecular Dynamics Simulations.” *bioRxiv*, 2020.
 198. FERRER, C.; LOZANO, A.; AGÜERA, A.; GIRÓN, A. J.; & FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. “Overcoming Matrix Effects Using the Dilution Approach in Multiresidue Methods for Fruits and Vegetables.” *J. Chromatogr. A*, 1218 (42): 7634, 2011.
 199. UFUK, F.; & SAVAŞ, R. “Chest CT Features of the Novel Coronavirus Disease (COVID-19).” *Turkish J. Med. Sci.*, 50 (4): 664, 2020.
 200. XIE, X.; ZHONG, Z.; ZHAO, W.; ZHENG, C.; WANG, F.; & LIU, J. “Chest CT for Typical Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pneumonia: Relationship to Negative RT-PCR Testing.” *Radiology*, 296 (2): E41, 2020.
 201. FENG, H.; LIU, Y.; LV, M.; & ZHONG, J. “A Case Report of COVID-19 with False Negative RT-PCR Test: Necessity of Chest CT.” *Jpn. J. Radiol.*, 38 (5): 409, 2020.
 202. HOSSEIN, H.; ALI, K. M.; HOSSEINI, M.; SARVEAZAD, A.; SAFARI, S.; & YOUSEFIFARD, M. “Value of Chest Computed Tomography Scan in Diagnosis of COVID-19; a Systematic Review and Meta-Analysis.” *Clin. Transl. Imaging*, 8 (6): 469, 2020.
 203. YANG, W.; SIRAJUDDIN, A.; ZHANG, X.; LIU, G.; TENG, Z.; ZHAO, S.; & LU, M. “The Role of Imaging in 2019 Novel Coronavirus Pneumonia (COVID-19).” *Eur. Radiol.*, 30: 4874, 2020.