

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE MAGNETO-IMUNOENSAIOS PARA
DETECÇÃO DE ANTICORPOS EM AMOSTRAS DE PLASMA E
APLICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DA COVID-19 E DA COVID
LONGA**

Pablo Roberto Lins da Silva*

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 e CNPq**

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 Pablo Roberto Lins da Silva, realizada em 30/08/2024.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria (UFSCar)

Prof. Dr. Oldair Donizeti Leite (UTFPR)

Profa. Dra. Juliana Cancino Bernardi (FFCLRP/USP)

Profa. Dra. Roberta Antigo Medeiros (UEL)

Prof. Dr. Ricardo Lopes Tortorela de Andrade (UFMT - Campus Sinop)

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

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Marciana, e ao meu pai, Jefferson.

Vocês são minha base e minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao Ser Superior deste universo, que nos oferece oportunidades contínuas de evolução.

Aos meus pais, Jefferson Roberto e Marciana Vieira, por sempre me apoiarem e incentivarem ao longo da minha trajetória. Sem o amor, apoio e sacrifícios de vocês, nada disso seria possível. Sou eternamente grato por tudo o que fizeram e continuam a fazer por mim.

Às minhas irmãs, Nubia Roberta e Thayla Roberta, que me incentivaram desde o início da jornada acadêmica.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria, pela confiança, orientação, paciência e por todos os ensinamentos recebidos durante esses quatro anos de doutorado, que tanto contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Aos membros da banca, pela disponibilidade em participar e contribuir para o aprimoramento deste trabalho.

À Dra. Sthéfane Valle de Almeida, pela ajuda nos experimentos e pelas discussões sempre que solicitadas.

Aos colegas do Laboratório de Bioanalítica e Eletroanalítica (LABIE), pelas colaborações em discussões científicas, ensinamentos, trabalhos em equipe e por serem um grupo receptivo e acolhedor, que me fizeram sentir em casa e me deram apoio moral sempre que necessário.

Ao meu namorado, Matheus Rosales, e minha nova e segunda família, por me fornecerem apoio, segurança e um lar aqui em São Carlos.

À coordenação e secretaria de Pós-Graduação em Química da UFSCar (PPGQ), 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) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa concedida (CNPq), pelas bolsas concedidas. (O presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES – Código de Financiamento 88887.513710/2020-20 e pela CNPq – Código de Financiamento 164792/2022-8).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-WEs	Oito eletrodos de trabalho (do inglês <i>8-Working Electrodes</i>)
ANOVA	Análise de variância
anti-Ig/HRP	Anticorpo contra a imunoglobulina G ou M conjugado com a enzima <i>horseradish peroxidase</i>
anti-IgG/HRP	Anticorpo contra a imunoglobulina G conjugado com a enzima <i>horseradish peroxidase</i>
anti-IgM/HRP	Anticorpo contra a imunoglobulina M conjugado com a enzima <i>horseradish peroxidase</i>
anti-N	Anticorpos contra a proteína de Nucleocapsídeo
anti-S	Anticorpos contra a proteína <i>Spike</i>
AUC	Área sob a curva (do inglês <i>Area Under the Curve</i>)
AuNPs	Nanopartículas de ouro
BQ	p-benzoquinona
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CE	Contra eletrodo (do inglês <i>Countre Electrode</i>)
COVID-19	Doença do coronavírus (do inglês <i>Coronavirus Disease 2019</i>)
CNTs	Nanotubos de carbono
CT	Amostra de plasma de indivíduos saudáveis
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
ETA	Etalonamina
GL	Graus de liberdade

GO	Óxido de grafeno
HQ	Hidroquinona
HRP	Enzima <i>horseradish peroxidase</i>
I	Corrente transiente
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LFA	Ensaio de fluxo lateral (do inglês <i>Lateral Flow Assay</i>)
MES	Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico
MQ	Média quadrática
N	Nucelocapsídeo
NHS	N-hidroxisuccinimida
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PC	Amostra de plasma de pacientes positivos para COVID-19
PMs	Partículas magnéticas
r	Coefficiente de correlação
RE	Eletrodo de referência (do inglês <i>Reference Electrode</i>)
ROC	Característica de Operação do Receptor (do inglês <i>Receiver Operating Characteristic</i>)
RT-PCR	Transcrição reversa - Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês <i>Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction</i>)
S	<i>Spike</i> e Poli- <i>Spike</i>
SARS-CoV-2	Síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2 (do inglês <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>)

SD	Desvio padrão do intercepto da curva analítica
SPE	Eletrodos serigrafados (do inglês <i>Screen-Printed Electrode</i>)
SQ	Soma quadrática
$-\Delta I$	Diferença de corrente ou subtração entre a corrente do branco e corrente da solução padrão (ou amostra)
θ	Inclinação da curva analítica
\bar{X}	Média

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 – Experimentos realizados para o teste de reação cruzada para anticorpos anti-IgG/HRP e anti-IgM/HRP.....	44
TABELA 3.2 – Concentração de anticorpos anti-S IgG e IgM determinadas para amostras CT e PC. Parâmetros empregados: FIGURA 3.12 e FIGURA 3.13. ..	66
TABELA 4.1 – Níveis codificados para as quatro variáveis do planejamento fatorial 2^4 com ponto central.	78
TABELA 4.2 – Experimentos do planejamento fatorial 2^4 com as variáveis codificadas.....	80
TABELA 4.3 – Experimentos realizados para o teste de reação cruzada para anticorpos anti-IgG/HRP.....	82
TABELA 4.4 – Planejamento fatorial 2^4 com as devidas respostas de corrente obtidas.....	83
TABELA 4.5 – Tabela ANOVA para o modelo recalculado usando apenas coeficientes significativos para análise de variância. Onde, SQ: soma quadrática, GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática.....	84
TABELA 4.6 – Concentração de anticorpos anti-N IgG determinadas para amostras CT e PC. Parâmetros empregados: FIGURA 4.5.	100

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Morfologia do vírus SARS-CoV-2.	4
FIGURA 1.2 – Mecanismo de infecção e disseminação do coronavírus.	6
FIGURA 1.3 – Intensidade da resposta imunológica versus dias de infecção e principais testes a serem realizados.....	8
FIGURA 1.4 – Métodos de diagnóstico da COVID-19 disponíveis comercialmente: testes moleculares (alvo: RNA) e testes sorológicos (alvo: antígenos e/ou anticorpos).....	10
FIGURA 1.5 – Estrutura de um anticorpo composto por cadeias leves e pesadas e fragmentos F_{ab} e F_c	15
FIGURA 1.6 – Representação das PMs funcionalizadas e modificadas com diferentes materiais biológicos.....	20
FIGURA 1.7 – SPEs em diferentes formatos e em arranjos de oito eletrodos para aplicações simultâneas. Sendo: (A) Célula unitária completa, (B) arranjo de oito células eletroquímicas completas, (C) arranjo contendo oito eletrodos de trabalho e (D) arranjo contendo os eletrodos de referência e contra eletrodo.	23
FIGURA 3.1 – <i>Western Blot</i> para a proteína S polimerizada (<i>Poli-Spike</i>).....	32
FIGURA 3.2 – Fabricação dos arranjos de 8-WEs, RE e CE e montagem do sistema microfluídico descartável. Onde: A) Impressora de recorte Silhouette Cameo 4; B) Folhas de vinil adesivo recortadas no <i>layout</i> dos arranjos; C) Colagem das folhas de vinil adesivo em papel poliéster transparente; D) Aplicação da tinta de carbono e serigrafia dos eletrodos; E) Cura da tinta de carbono na estufa; F) Aplicação de tinta de prata no RE; G) Cura da tinta de prata na estufa; H) Folha de poliéster com os arranjos contendo RE e CE após a cura da tinta de prata. I) Remoção do vinil adesivo; J) Arranjos de eletrodos sem vinil adesivo; K) Arranjo recortado contendo eletrodo de RE e o CE com dois orifícios nas laterais. Em paralelo: G’) Remoção do vinil adesivo dos arranjos de 8-WEs; H’) Folha de poliéster com os arranjos de eletrodos sem vinil adesivo; I’) Arranjo dos 8-WEs	

recortados e cartão adesivo dupla face; J') Prensa térmica e K') Arranjo colado ao cartão adesivo dupla face expondo no canal microfluídico somente os 8-WEs. 35

FIGURA 3.3 – Construção do dispositivo microfluídico descartável. Onde: A) Colagem entre o arranjo de 8-WEs juntamente com o cartão adesivo dupla face e a base impressa em 3D com oito ímãs; B) Colagem do dispositivo com arranjo de RE e CE; e C) Dispositivo microfluídico descartável fechado..... 37

FIGURA 3.4 – Imagem do sistema microfluídico. A) Constituintes do sistema: bomba de seringa, válvula manual, multipotenciostato, computador pessoal e o dispositivo microfluídico descartável. B) Conexão elétrica do dispositivo ao cabo do potenciostato..... 38

FIGURA 3.5 – Esquema do ciclo catalítico da enzima HRP. A enzima reduzida (forma nativa) é oxidada pelo H_2O_2 . Depois disso, a enzima é reduzida pelas moléculas de HQ formando moléculas de BQ que são reduzidas novamente a HQ na superfície dos eletrodos de trabalho. 39

FIGURA 3.6 – Modificação das PMs funcionalizadas com grupos carboxílicos seguida da ativação das PMs com EDC/NHS sob agitação lenta por 30 min. Formado o intermediário, adição da Poli-*Spike* e incubação por 13 h, seguindo da adição de BSA 0,1% e ETA $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ por 30 e 60 min, respectivamente, para bloquear sítios não específicos de ligação livres afim de evitar ligações não específicas. 41

FIGURA 3.7 – Etapas do magneto-imunoensaio desenvolvido. A) Adição das PMs modificadas para captura dos anticorpos alvo, seguido pela separação magnética, lavagem das PMs e adição de anti-Ig/HRP. B) Incubação para formação do bioconjugado final seguido pela separação magnética, lavagem e suspensão das partículas..... 42

FIGURA 3.8 – Gráfico de barras dos sinais de correntes obtidas para os métodos de bloqueio das PMs testados na ausência (■) e na presença (■) de 100 fg mL^{-1} de anti-S IgG. Parâmetros utilizados: $[H_2O_2] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[HQ] = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, volume da alça de amostragem = $50 \text{ }\mu\text{L}$, vazão = $100 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$, tempo de

incubação PMs/proteína S + anti-S IgG = 30 min e tempo de incubação PMs/proteína S/anti-S IgG + anti-IgG/HRP = 30 min. 47

FIGURA 3.9 – A) Valores de correntes transiente obtidas para análises de ensaios realizados sem (■) e com 100 fg mL^{-1} de anti-S (■) dentro de vinte dias diferentes. B) $-\Delta I$ obtidos no estudo de estabilidade das PMs. Parâmetros utilizados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{HQ}] = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, volume da alça de amostragem = $50 \text{ }\mu\text{L}$, vazão = $100 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$, tempo de incubação PMs/proteína S + anti-S IgG = 30 min e tempo de incubação PMs/proteína S/anti-S IgG + anti-IgG/HRP = 30 min. 49

FIGURA 3.10 – A) Respostas de correntes transientes referentes ao branco (—) e a 100 fg mL^{-1} anti-S (—) para diferentes volumes da alça de amostragem. B) Gráficos de barras correlacionado $-\Delta I$ com os volumes da alça de amostragem. Parâmetros utilizados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{HQ}] = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, vazão = $100 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$, tempo de incubação PMs/proteína S + anti-S IgG = 30 min e tempo de incubação PMs/proteína S/anti-S IgG + anti-IgG/HRP = 30 min. 51

FIGURA 3.11 – A) Sinais de correntes transientes referentes a branco (—) e a 100 fg mL^{-1} anti-S (—) para vazão de 50, 100 e $150 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$. B) Gráficos de barras correlacionado $-\Delta I$ com os volumes de vazão estudado. Parâmetros utilizados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{HQ}] = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, volume da alça de amostragem = $100 \text{ }\mu\text{L}$, tempo de incubação PMs/proteína S + anti-S IgG = 30 min e tempo de incubação PMs/proteína S/anti-S IgG + anti-IgG/HRP = 30 min. 53

FIGURA 3.12 – A) Sinais de correntes transientes referentes a branco (—) e a 100 fg mL^{-1} anti-S (—) para tempos de incubação de 15, 30, 45 e 60 min. B) Gráficos de barras correlacionado $-\Delta I$ com os tempos de captura estudados. Parâmetros utilizados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{HQ}] = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, volume da alça de amostragem = $100 \text{ }\mu\text{L}$, vazão = $100 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ e tempo de incubação PMs/proteína S/anti-S IgG + anti-IgG/HRP = 30 min. 55

- FIGURA 3.13 – A) Sinais de correntes transientes referentes a branco (—) e a 100 fg mL⁻¹ anti-S (—) para tempos de incubação de 15, 30, 45 e 60 min. B) Gráficos de barras correlacionado $-\Delta I$ com os tempos de captura estudados. Parâmetros utilizados: [H₂O₂] = 1,0 mmol L⁻¹, [HQ] = 2,0 mmol L⁻¹, volume da alça de amostragem = 100 µL, vazão = 100 µL min⁻¹ e tempo de incubação PMS/proteína S + anti-S IgG = 30 min. 57
- FIGURA 3.14 – A) As respostas de corrente transiente para diferentes concentrações de anticorpos anti-S IgG na faixa de 0,01–10.000 fg mL⁻¹. B) Correlação da diferença de corrente em função do logaritmo da concentração de anticorpos anti-S (n = 6). Parâmetros utilizados: [H₂O₂] = 1,0 mmol L⁻¹, [HQ] = 2,0 mmol L⁻¹, volume da alça de amostragem = 100 µL, vazão = 100 µL min⁻¹, tempo de incubação PMS/proteína S + anti-S IgG = 30 min e tempo de incubação PMS/proteína S/anti-S IgG + anti-IgG/HRP = 30 min. 59
- FIGURA 3.15 – FIGURA 3.13 – A) As respostas de corrente transiente para diferentes concentrações de anticorpos anti-S IgM na faixa de 0,1–1.000 fg mL⁻¹. B) Correlação da diferença de corrente em função do logaritmo da concentração de anticorpos anti-S (n = 6). Parâmetros utilizados: [H₂O₂] = 1,0 mmol L⁻¹, [HQ] = 2,0 mmol L⁻¹, volume da alça de amostragem = 100 µL, vazão = 100 µL min⁻¹, tempo de incubação PMS/proteína S + anti-S IgM = 30 min e tempo de incubação PMS/proteína S/anti-S IgM + anti-IgM/HRP = 30 min. 60
- FIGURA 3.16 – Estudo da repetibilidade (A) análise intradia (mesmo dia) e (B) análise interdia (dias diferentes). Parâmetros utilizados: FIGURA 3.12. 61
- FIGURA 3.17 – A) Avaliação de reação cruzada de anticorpos anti-IgG/HRP frente a 100 fg mL⁻¹ de anticorpos não específicos (■) e validação da interação específica PMS/proteína S/anti-S IgG/anti-IgG/HRP (■). B) Teste de reação cruzada de anticorpos anti-IgM/HRP frente a 100 fg mL⁻¹ de anticorpos não específicos, como anti-S IgG e anti-N IgG (■), e validação da interação específica de PMS/proteína S/anti-S IgM/anti-IgM/HRP (■). Parâmetros utilizados: FIGURA 3.12. 62

FIGURA 3.18 – Gráfico de barras correlacionando a diferença de corrente obtidas para diferentes diluições de 1:50 até 1:550,000 para a amostra PC14. Ampliação da escala para melhor visualização das respostas de corrente transiente obtidas nas diluições de 1:80,000 a 1:550,000. Parâmetros utilizados: FIGURA 3.12. .	64
FIGURA 3.19 – Curva ROC para diagnóstico de COVID-19 por meio da detecção de anticorpos anti-S IgG (A) e IgM (B). Resposta de indivíduos saudáveis vs. pacientes positivos para COVID-19. Parâmetros utilizados: FIGURA 3.12 e FIGURA 3.13.	67
FIGURA 3.20 – Diagrama de pontos referentes aos resultados obtidos para detecção de anticorpos anti-S IgG (A) e anti-S IgM (B) em amostras CT e PC. Ampliação de escala dos diagramas de pontos referentes a detecção de anticorpos anti-S IgG (A') e anti-S IgM (B').	68
FIGURA 4.1 – Modificação das PMs meio da ativação dos grupos carboxílicos das PMs com EDC/NHS. Após, proteínas N do SARS-CoV-2 foram ancoradas às PMs e foi adicionada uma solução de ETA 1,0 mmol L ⁻¹ para bloquear sítios ativos das PMs.	75
FIGURA 4.2 – Etapas do magneto-imunoensaio proposto. A) Adição das PMs modificadas para captura dos anticorpos anti-N, seguido pela separação magnética e lavagem do bioconjugado e adição de anti-Ig/HRP. B) Incubação para formação do bioconjugado final PM/proteína N/anti-N/anti-Ig/HRP seguido pela separação magnética, lavagem e suspensão das partículas.	77
FIGURA 4.3 – Gráficos de contorno correlacionando duas variáveis significativas para diferentes respostas previstas foram analisados. A) A relação entre a concentração de PMs e o tempo de incubação entre PMs/proteína N e anti-N IgG. B) A relação entre a concentração de PMs e o tempo de incubação entre PMs/proteína N/anti-N IgG e anti-IgG/HRP. C) A relação entre o tempo de incubação entre PMs/proteína N e anti-N IgG e o tempo de incubação entre PMs/proteína N/anti-N IgG e anti-IgG/HRP.	87

FIGURA 4.4 – A) Respostas de correntes transientes referentes a branco (—) e ao padrão (—) de 100 fg mL⁻¹ anti-N IgG para diferentes volumes da alça de amostragem. B) Gráficos de barras correlacionado $-\Delta I$ com as alças de 20, 50 e 100 μL . Parâmetros utilizados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{HQ}] = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, vazão = 100 $\mu\text{L min}^{-1}$, tempo de incubação PMs/proteína N + anti-N IgG = 20 min e tempo de incubação PMs/proteína N/anti-N IgG + anti-IgG/HRP = 40 min.

..... 89

FIGURA 4.5 – A) Respostas de correntes transientes referentes a branco (—) e na presença de 100 fg mL⁻¹ anti-N IgG (—) para diferentes vazões estudadas. B) Gráfico de barras correlacionado $-\Delta I$ com a vazão de 50, 100 e 150 $\mu\text{L min}^{-1}$. Parâmetros utilizados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{HQ}] = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, volume da alça de amostragem = 100 μL , tempo de incubação PMs/proteína N + anti-N IgG = 20 min e tempo de incubação PMs/proteína N/anti-N IgG + anti-IgG/HRP = 40 min..... 91

FIGURA 4.6 – A) Respostas de corrente transiente para diferentes concentrações de anticorpos anti-N IgG na faixa de 0,1–100.000 fg mL⁻¹. B) Curva analítica em função do logaritmo da concentração de anticorpos anti-N IgG (n = 6). Parâmetros utilizados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{HQ}] = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, volume da alça de amostragem = 100 μL , vazão = 100 $\mu\text{L min}^{-1}$, tempo de incubação PMs/proteína N + anti-N IgG = 20 min e tempo de incubação PMs/proteína N/anti-N IgG + anti-IgG/HRP = 40 min..... 93

FIGURA 4.7 – Estudo da repetibilidade (A) análise intradia (mesmo dia) e (B) análise interdia (dias diferentes). Parâmetros utilizados: FIGURA 4.6..... 94

FIGURA 4.8 – A) Gráfico de barras representando as respostas de corrente para medidas realizadas na ausência (■) e presença de 100 fg mL⁻¹ de anti-N IgG (■) dentro de 28 dias. B) Diferença de corrente obtidos para os 28 dias de análise. Parâmetros utilizados: FIGURA 4.6. 95

FIGURA 4.9 – Avaliação da reação cruzada de anticorpos anti-IgG/HRP frente a 100 fg mL⁻¹ de anticorpos não específicos (■) e validação da interação específica

PMs/proteína N/anti-N IgG/anti-IgG/HRP (■). Parâmetros utilizados: FIGURA 4.6.	97
FIGURA 4.10 – Respostas de corrente transiente obtidas para diluições da amostra de plasma PC14 de 1:10 até 1:1.000.000. Parâmetros utilizados são os mesmos da FIGURA 4.6.	98
FIGURA 4.11 – Curva ROC para diagnóstico de COVID-19 por meio da detecção de anticorpos anti-N IgG. Resposta de indivíduos saudáveis vs. pacientes positivos para COVID-19. Parâmetros utilizados: FIGURA 4.6.....	101
FIGURA 4.12 – Diagrama de pontos referentes aos resultados obtidos para detecção de anticorpos anti-N IgG em amostras CT e PC.....	102
FIGURA 4.13 – Curva ROC (A) e diagrama de pontos (B) para detecção de anticorpos anti-N IgM nas amostras CT e PC. Parâmetros utilizados: FIGURA 4.6.	104

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE UM MAGNETO-IMUNOENSAIO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS EM AMOSTRAS DE SORO E APLICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DA COVID-19 E DA COVID LONGA. Em 2019, o vírus denominado Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (SARS-CoV-2) causou surpresa global devido à sua alta transmissibilidade, levando a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarar a pandemia de COVID-19. O diagnóstico da doença é predominantemente realizado por RT-PCR e testes rápidos, ambos com certas limitações. A detecção de anticorpos é uma estratégia eficaz para o diagnóstico e prognóstico, contribuindo para a redução da taxa de transmissão. Este estudo propõe um método diagnóstico para detectar anticorpos IgM, indicativos de infecção recente ou ativa, e IgG, para monitoramento pós-vacinação. O imunoensaio proposto consiste em utilizar partículas magnéticas (PMs) funcionalizadas e modificadas com as proteínas *Spike* (S) e Nucleocapsídeo (N) do SARS-CoV-2, que reconhecem os anticorpos na amostra de plasma. O método desenvolvido utilizou um dispositivo microfluídico eletroquímico descartável contendo oito eletrodos de carbono serigrafados, permitindo oito análises simultaneamente. O método alcançou um limite de detecção ultrabaixo de $7,13 \text{ ag mL}^{-1}$ para anticorpos anti-S IgG, $55,4 \text{ ag mL}^{-1}$ para anti-S IgM e 51 ag mL^{-1} para anti-N IgG. O método foi testado em amostras de plasma de indivíduos saudáveis e pacientes diagnosticados com COVID-19 pela técnica de RT-PCR. A validação do magneto-imunoensaio, avaliada por curva ROC e gráfico de pontos, demonstrou alta especificidade e sensibilidade. Assim, o imunoensaio eletroquímico proposto mostrou-se altamente específico e sensível para a detecção de anticorpos IgG e IgM, sendo uma ferramenta útil e rápida para o diagnóstico da COVID-19 e COVID longa.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A MAGNETO-IMMUNOASSAY FOR DETECTING ANTIBODIES IN SERUM SAMPLES AND APPLICATION IN THE DIAGNOSIS OF COVID-19 AND LONG COVID. In 2019, the virus known as Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) caused a global surprise due to its high transmissibility, leading the World Health Organization (WHO) to declare the COVID-19 pandemic. The diagnosis of the disease is predominantly performed by RT-PCR and rapid tests, both of which have certain limitations. Antibody detection is an effective strategy for diagnosis and prognosis, contributing to the reduction of the transmission rate. This study proposes a diagnostic method to detect IgM antibodies, indicative of recent or active infection, and IgG antibodies for post-vaccination monitoring. The proposed immunoassay involves using magnetic particles (MPs) functionalized and modified with the Spike (S) and Nucleocapsid (N) proteins of SARS-CoV-2, which recognize antibodies in the plasma sample. The developed method employed a disposable electrochemical microfluidic device containing eight screen-printed carbon electrodes, allowing for eight simultaneous analyses. The method achieved an ultra-low detection limit of 7.13 ag mL^{-1} for anti-S IgG antibodies, 55.4 ag mL^{-1} for anti-S IgM, and 51 ag mL^{-1} for anti-N IgG. The method was tested on plasma samples from healthy individuals and patients diagnosed with COVID-19 by RT-PCR. The validation of the magneto-immunoassay, evaluated by ROC curve and scatter plot, demonstrated high specificity and sensitivity. Thus, the proposed electrochemical immunoassay proved to be highly specific and sensitive for the detection of IgG and IgM antibodies, making it a useful and rapid tool for the diagnosis of COVID-19 and long COVID.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	Pandemia da COVID-19	2
1.2	O vírus SARS-CoV-2	3
1.2.1	<i>Mecanismo de infecção do SARS-CoV-2</i>	5
1.2.2	<i>Fases pós infecção pelo SARS-CoV-2</i>	7
1.3	Métodos de diagnóstico da COVID-19	9
1.3.1	<i>Métodos alternativos para diagnóstico da COVID-19</i>	12
1.4	Biossensores e imunossensores	12
1.5	Imunoensaios	14
1.6	Sensores eletroquímicos para diagnóstico da COVID-19	16
1.6.1	<i>Sensores eletroquímicos para detecção de SARS-CoV-2</i>	16
1.6.2	<i>Importância da detecção de anticorpos</i>	17
1.6.3	<i>Sensores eletroquímicos para detecção de anticorpos contra o SARS-CoV-2</i>	18
1.7	Partículas magnéticas em imunoensaios	19
1.8	Dispositivos eletroquímicos descartáveis	22
1.8.1	<i>Eletrodos serigrafados</i>	22
1.9	Sistema microfluídico	24
2	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivo geral	28
2.2	Objetivos específicos	28
3	DESENVOLVIMENTO DE UM MAGNETO-IMUNOENSAIO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-S UTILIZANDO A PROTEÍNA S DO SARS-COV-2	30
3.1	Procedimento experimental	30
3.1.1	<i>Reagentes e soluções</i>	30
3.1.2	<i>Obtenção e polimerização da proteína S do SARS-CoV-2</i>	31
3.1.3	<i>Instrumentação e materiais</i>	32
3.1.4	<i>Construção do dispositivo microfluídico descartável</i>	33

3.1.5	<i>Sistema microfluídico com detecção eletroquímica.....</i>	38
3.1.6	<i>Modificação das PMs com a proteína S do SARS-CoV-2.....</i>	39
3.1.7	<i>Magneto-imunoensaio para detecção de anticorpos anti-S</i>	41
3.1.8	<i>Repetibilidade do magneto-imunoensaio</i>	43
3.1.9	<i>Avaliação da reatividade cruzada.....</i>	43
3.1.10	<i>Avaliação da capacidade do magneto-imunoensaio para o diagnóstico da COVID-19.....</i>	44
3.1.11	<i>Normalização das respostas de sinal de corrente transiente</i>	46
3.2	Resultados e discussão.....	47
3.2.1	<i>Otimização das condições experimentais</i>	47
3.2.2	<i>Curva analítica.....</i>	58
3.2.3	<i>Repetibilidade do magneto-imunoensaio</i>	60
3.2.4	<i>Estudo de reação cruzada</i>	61
3.2.5	<i>Diluição da amostra de plasma humano</i>	63
3.2.6	<i>Avaliação do magneto-imunoensaio em amostras controle e de pacientes diagnosticados com COVID-19</i>	65
3.3	Considerações parciais	70
4	DESENVOLVIMENTO DE UM MAGNETO-IMUNOENSAIO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-N UTILIZANDO A PROTEÍNA N DO SARS-COV-2	74
4.1	Procedimento experimental	74
4.1.1	<i>Reagentes e soluções.....</i>	74
4.1.2	<i>Modificação das PMs com a proteína N do SARS-CoV-2</i>	74
4.1.3	<i>Magneto-imunoensaio para determinação de anticorpos anti-N....</i>	75
4.1.4	<i>Planejamento fatorial com ponto central</i>	78
4.1.5	<i>Repetibilidade do magneto-imunoensaio</i>	81
4.1.6	<i>Avaliação de reação cruzada</i>	82
4.2	Resultados e discussão.....	82
4.2.1	<i>Otimização pelo planejamento fatorial 2⁴ com ponto central</i>	82
4.2.2	<i>Otimização do sistema microfluídico</i>	88

4.2.3	<i>Curva analítica</i>	92
4.2.4	<i>Repetibilidade do magneto-imunoensaio</i>	93
4.2.5	<i>Estabilidade do conjugado PMs/proteína N</i>	94
4.2.6	<i>Avaliação da reação cruzada</i>	96
4.2.7	<i>Estudo da diluição da amostra</i>	98
4.2.8	<i>Avaliação do magneto-imunoensaio em amostras controle e de pacientes diagnosticados com COVID-19</i>	99
4.2.9	<i>Aplicação do magneto-imunoensaio em amostras de plasma humano para detecção de anticorpos IgM</i>	104
4.3	Considerações parciais	105
5	CONCLUSÕES	108
6	REFERÊNCIAS	111

INTRODUÇÃO

Capítulo 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pandemia da COVID-19

O surgimento do SARS-CoV-2, o novo coronavírus responsável pela pandemia de COVID-19, ocorreu em dezembro de 2019 na cidade de Wuhan, China¹. O nome SARS-CoV-2 significa "*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*", reflete sua semelhança genética com o coronavírus que causou a epidemia de SARS (Síndrome Respiratória Aguda Grave) em 2002-2003². Pertencente à família *Coronaviridae*, classe *Nidovirales* e gênero *Betacoronavirus*, o SARS-CoV-2 compartilha características estruturais e comportamentais com outros coronavírus³, mas possui especificidades que o tornaram altamente transmissível e patogênico⁴.

A rápida disseminação do vírus levou à declaração de pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em março de 2020⁵. Desde então, o SARS-CoV-2 causou uma crise global de saúde pública, resultando em milhões de infecções e mortes. A doença resultante da infecção por este vírus foi denominada COVID-19, que significa "*Coronavirus Disease 2019*"⁴. Desde o início da pandemia, a COVID-19 teve um impacto devastador, com mais de 775 milhões de casos confirmados e cerca de 7 milhões de mortes em todo o mundo até junho de 2024^{6,7}. Esses números evidenciam a magnitude da emergência sanitária que o mundo enfrentou e que necessitou de respostas rápidas e eficazes.

Para combater a disseminação do vírus, a comunidade científica e a indústria farmacêutica mobilizaram-se rapidamente para desenvolver vacinas. Diversas vacinas foram aprovadas e distribuídas globalmente em tempo recorde, utilizando tecnologias como mRNA (Pfizer-BioNTech e Moderna), vetor viral (AstraZeneca e Johnson & Johnson) e vírus inativado (Sinovac e Sinopharm)^{8,9}. A vacinação em massa foi crucial para reduzir a gravidade das infecções, controlar a transmissão do vírus e diminuir significativamente as taxas de mortalidade¹⁰. No entanto, variantes emergentes do SARS-CoV-2, como as variantes Delta e Omicron, desafiaram a eficácia das vacinas e resultaram em surtos recorrentes,

ressaltando a necessidade de vigilância contínua e adaptações nas formulações vacinais¹¹⁻¹³.

No Brasil, a pandemia teve um impacto profundo e prolongado. Com mais de 37 milhões de casos confirmados e mais de 700 mil mortes^{6,7}, o país enfrentou desafios consideráveis na gestão da crise sanitária. A implementação de medidas de contenção e a distribuição de vacinas encontraram obstáculos logísticos e políticos¹⁴. No entanto, a campanha de vacinação avançou, com a maioria da população já vacinada ao menos com a primeira dose. Atualmente, o Brasil está em uma fase de recuperação, mas casos de COVID-19 ainda exigem vigilância constante.

Para garantir a proteção contínua da população, é essencial administrar doses de reforço das vacinas e manter um monitoramento das variantes emergentes do SARS-CoV-2¹⁵. Nesse contexto, o desenvolvimento contínuo de diagnósticos precisos e a avaliação da resposta imunológica ao vírus e às vacinas são fundamentais¹⁶. Essas medidas são cruciais para prevenir novos surtos e assegurar a saúde pública no futuro.

1.2 O vírus SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é composto por várias proteínas estruturais essenciais para sua função e infectividade. Essas proteínas incluem a proteína *Spike* (S), a de Membrana (M), a de Envelope (E), a de Nucleocapsídeo (N) e o material genético que é um RNA de fita simples¹⁷. A estrutura do vírus SARS-CoV-2 pode ser observada na FIGURA 1.1.

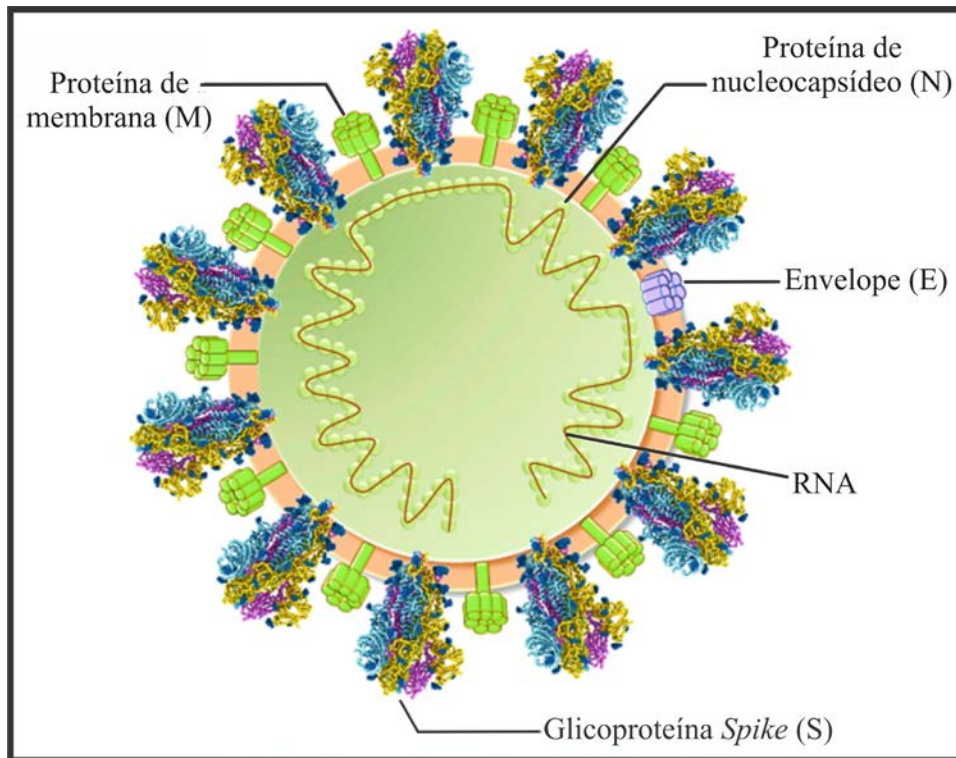


FIGURA 1.1 – Morfologia do vírus SARS-CoV-2.

Fonte: Adaptada de Kumar, S. *et al*¹⁸.

Dentre as proteínas constituintes do SARS-CoV-2, a proteína S é crucial para a infecção do hospedeiro. Ela se projeta da superfície do vírus e medeia a ligação e fusão com a célula hospedeira¹⁹. A proteína S é dividida em duas subunidades: S1, que contém o domínio de ligação ao receptor (RBD) responsável pela ligação ao receptor enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) da célula hospedeira, e S2, que facilita a fusão da membrana viral com a membrana celular do hospedeiro²⁰. Já a proteína M é a proteína mais abundante no envelope do vírus. Ela desempenha um papel fundamental na montagem e morfogênese do vírus, dando forma ao envelope viral. Assim, esta proteína contribui para o empacotamento do genoma do RNA viral²¹.

Por sua vez, a proteína E é uma pequena proteína presente no envelope viral. Ela está envolvida na montagem e liberação do vírus e também pode influenciar a patogenicidade do vírus²². Ademais, a proteína N associa-se ao RNA genômico viral, formando o nucleocapsídeo. Ela é essencial para a replicação do RNA viral e a montagem do novo vírus dentro das células

hospedeiras^{23,24}. Além disso, O SARS-CoV-2 possui um genoma de RNA de fita simples positivo (+RNA). Este RNA não apenas codifica as proteínas virais, mas também serve como molde para a replicação do genoma viral²⁵.

1.2.1 Mecanismo de infecção do SARS-CoV-2

O mecanismo de infecção pelo vírus SARS-CoV-2 pode ser separado em três etapas principais, sendo: i) ligação e entrada na célula hospedeira, ii) replicação do RNA viral; e iii) propagação do vírus. Primeiramente, a infecção pelo SARS-CoV-2 começa quando a proteína S se liga ao receptor ACE2, presente na superfície das células do hospedeiro, expressa em vários órgãos como no trato respiratório, coração, pulmões, trato gastrointestinal e rins²⁶. Após a ligação, a proteína S é clivada por proteases do hospedeiro, como a TMPRSS2, ativando a proteína S para mediar a fusão da membrana viral com a membrana celular do hospedeiro²⁷. Esse processo permite que o RNA viral entre na célula hospedeira²⁸.

Uma vez dentro da célula, o RNA viral é traduzido pela maquinaria celular para produzir poliproteínas virais que são clivadas em proteínas funcionais, incluindo as proteínas envolvidas na replicação do RNA²⁹. O complexo de replicação-transcrição viral sintetiza novas cópias do RNA genômico viral e subgenômico, que são necessários para a tradução de outras proteínas virais^{25,30}. Novos vírions são montados no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi da célula hospedeira, incorporando as proteínas estruturais e o RNA genômico viral. Esses novos vírions são transportados para a superfície celular em vesículas e liberados por exocitose, permitindo que o vírus infecte células vizinhas e se espalhe pelo organismo^{31,32}. O mecanismo de infecção do vírus SARS-CoV-2 é ilustrado na FIGURA 1.2.

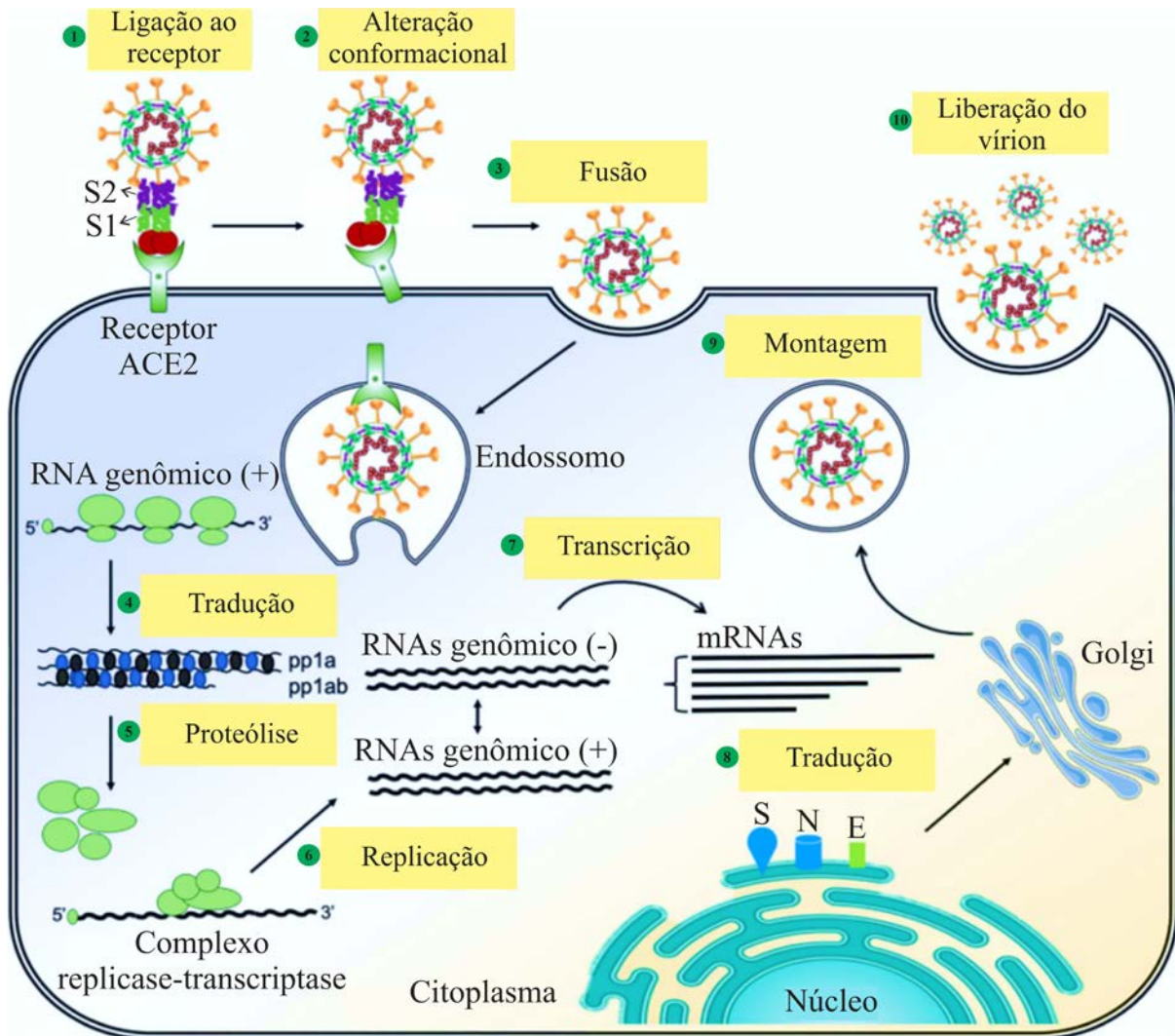


FIGURA 1.2 – Mecanismo de infecção e disseminação do SARS-CoV-2.

Fonte: Adaptado de LI, Shiqin *et al.*³¹.

A gravidade da COVID-19 pode ser influenciada por vários fatores, incluindo a carga viral, a resposta imunológica do hospedeiro, a presença de comorbidades e a virulência da variante específica do SARS-CoV-2³³. As novas variantes do SARS-CoV-2 surgem devido a mutações no genoma viral, especialmente na proteína S, que pode alterar a afinidade de ligação ao receptor ACE2 e a afinidade a anticorpos neutralizantes³⁴. Essas mutações podem aumentar a transmissibilidade do vírus, como observado nas variantes Alpha, Delta e Omicron, ou permitir a evasão parcial da resposta imunológica, tanto natural quanto induzida por vacinas³⁵.

1.2.2 Fases pós infecção pelo SARS-CoV-2

A infecção pelo SARS-CoV-2, envolve diversas fases, desde o período de incubação até a fase crônica, incluindo a possibilidade de desenvolvimento da COVID longa. Compreender essas fases é crucial para o manejo adequado da doença e para minimizar suas complicações a longo prazo. O período de incubação é o intervalo entre a exposição ao vírus e o aparecimento dos primeiros sintomas. Para o SARS-CoV-2, esse período varia de 2 a 14 dias, com uma média de 5 a 6 dias³⁶⁻³⁸. Durante a incubação, o vírus se replica silenciosamente nas vias respiratórias superiores e inferiores, preparando para a fase aguda.

A fase aguda (FIGURA 1.3) pós infecção pelo SARS-CoV-2 é marcada pelo início dos sintomas, que podem incluir febre, tosse, fadiga, perda de olfato e paladar, entre outros. Essa fase geralmente dura de 7 a 10 dias e pode ser dividida em dois subperíodos: a proliferação viral e a resposta imune inicial³⁹. Durante os primeiros dias da fase aguda, o vírus prolifera rapidamente nas células epiteliais do trato respiratório. A carga viral atinge seu pico, especialmente nas vias respiratórias superiores, tornando a pessoa altamente contagiosa⁴⁰. A replicação viral massiva pode levar a sintomas respiratórios e sistêmicos. Conforme o sistema imunológico reconhece a presença do vírus, inicia-se a produção de anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas (Ig). No corpo humano, são produzidos cinco tipos principais de anticorpos: IgA, IgG, IgM, IgD e IgE⁴¹. Dentre estes, os anticorpos IgG e IgM são os mais importantes para neutralizar o vírus e prevenir sua disseminação. Os anticorpos IgM são geralmente os primeiros a serem produzidos após a exposição a um antígeno, com uma meia-vida curta, indicando infecção recente. Os anticorpos IgG, por sua vez, são produzidos posteriormente e possuem uma meia-vida maior, sendo responsáveis pela imunidade de longo prazo e memória imunológica⁴²⁻⁴⁴. Assim, a carga viral diminui à medida que o sistema imunológico controla a infecção. No

entanto, a eliminação completa do vírus pode demorar, especialmente em casos graves e em pacientes imunocomprometidos⁴⁵.

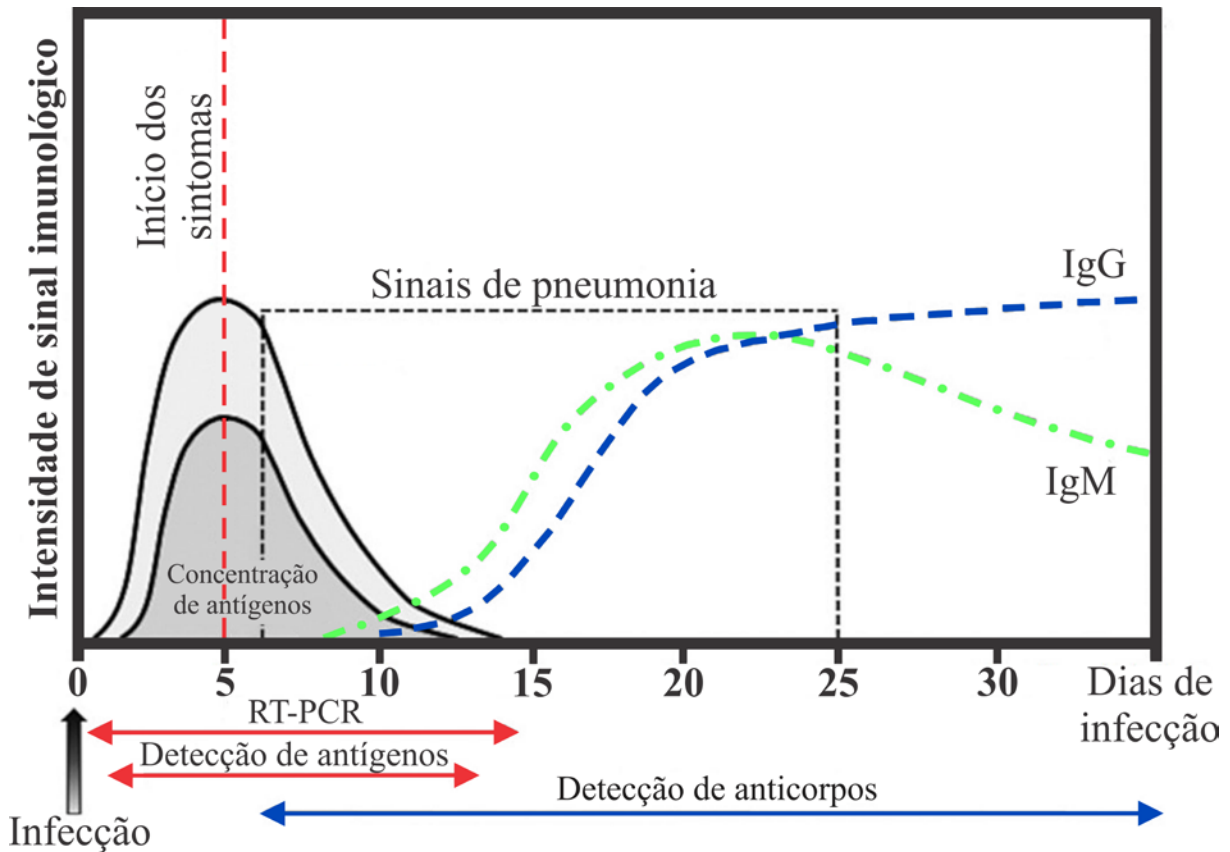


FIGURA 1.3 – Intensidade da resposta imunológica versus dias de infecção e principais testes a serem realizados.

Fonte Xavier, A. R *et al*³⁶.

A fase pós-aguda, também conhecida como fase contínua, é caracterizada pela persistência dos sintomas ou pelo desenvolvimento de sequelas após três semanas do início dos sintomas⁴⁶. Durante essa fase, a carga viral começa a diminuir significativamente, mas o processo de recuperação ainda está em andamento. A resposta imune continua a se desenvolver, com os níveis de anticorpos IgG aumentando e proporcionando uma proteção mais duradoura⁴⁴. Alguns pacientes podem experimentar sintomas persistentes, como fadiga e tosse, enquanto o corpo se recupera⁴⁶.

A fase crônica se refere aos sintomas e complicações que persistem por mais de 12 semanas após a fase aguda da infecção. As fases pós-aguda e crônica são designadas coletivamente como COVID longa^{39,47}. Aproximadamente 10% a 30% dos pacientes podem desenvolver essa condição⁴⁸. A COVID longa é caracterizada por uma variedade de sintomas persistentes, incluindo fadiga extrema, falta de ar, dores musculares e articulares, problemas cognitivos, e sintomas neurológicos⁴⁹⁻⁵¹. Esses sintomas podem durar meses e têm um impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes. A patogênese da COVID longa ainda está sendo estudada, mas acredita-se que esteja relacionada a uma resposta imunológica prolongada, inflamação persistente e danos residuais aos órgãos causados pela infecção aguda³⁹.

O entendimento detalhado das fases pós-infecção pelo SARS-CoV-2 é crucial para o manejo clínico eficaz da COVID-19 e suas complicações a longo prazo. Identificar os fatores que contribuem para a COVID longa e desenvolver estratégias para mitigar seus efeitos é essencial para melhorar a qualidade de vida dos pacientes e reduzir o impacto global da pandemia^{50,52}. A pesquisa contínua é necessária para elucidar os mecanismos subjacentes a essas fases e para desenvolver intervenções terapêuticas mais eficazes.

1.3 Métodos de diagnóstico da COVID-19

Atualmente, a vacinação é a principal estratégia para prevenir e controlar a propagação do vírus⁵³. No entanto, continuam ocorrendo casos de infecção, mortes e surgimento de novas variantes, gerando novas ondas de contágio e aumentando o número de óbitos. Portanto, é ainda essencial manter cuidados específicos e realizar diagnósticos para controlar novos surtos. Nesse sentido, os métodos mais empregados em larga escala são classificados (FIGURA 1.4) como métodos moleculares e sorológicos. Para diagnóstico da COVID-19, os métodos moleculares detectam a presença de material genético (RNA) do vírus em uma amostra como o de reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa

(RT-PCR, do inglês *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*). Em contrapartida, os métodos sorológicos detectam a presença de anticorpos ou antígenos na amostra como os testes rápidos de fluxo lateral (LFA, do inglês *Lateral Flow Assay*) e o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)^{54,55}. Para a detecção do SARS-CoV-2, os biomarcadores mais usados são os anticorpos e as proteínas N e S do vírus⁵⁶, sendo que a proteína S o alvo mais promissor devido a sua alta afinidade com o receptor ACE2, sendo que alguns estudos indicam que essa afinidade tende a aumentar com as mutações virais⁵⁷.

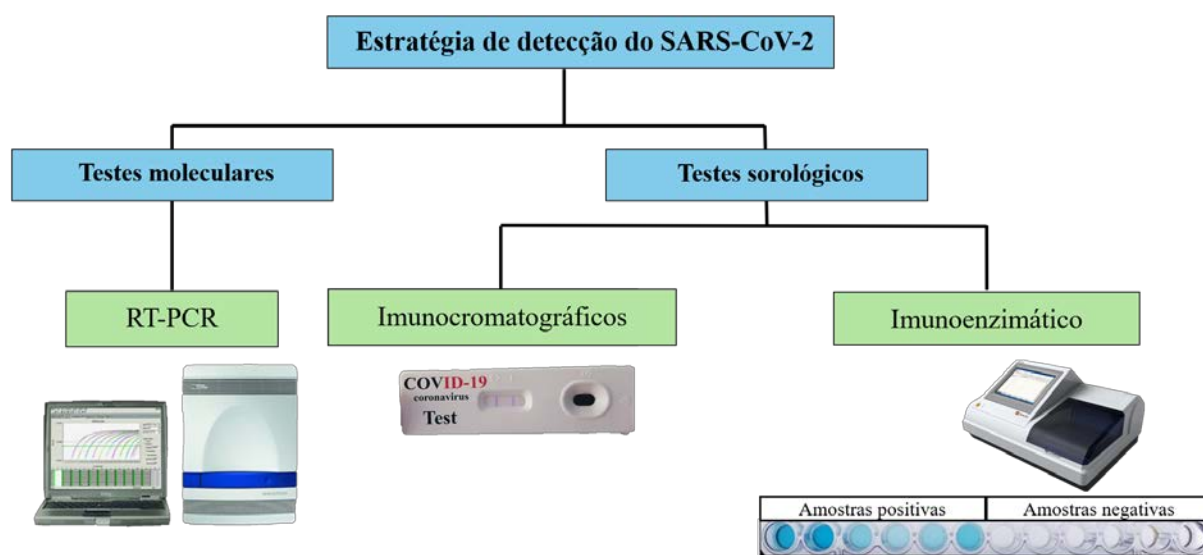


FIGURA 1.4 – Métodos de diagnóstico da COVID-19 disponíveis comercialmente: testes moleculares (alvo: RNA) e testes sorológicos (alvo: antígenos e/ou anticorpos).

Fonte: próprio autor.

Dentre esses métodos, o RT-PCR é considerado o padrão ouro para o diagnóstico da COVID-19⁵⁸. Este método envolve a transcrição reversa do RNA viral em DNA complementar (cDNA), seguida pela amplificação desse cDNA através da reação em cadeia da polimerase. A técnica permite a detecção de quantidades mínimas de material genético do vírus, garantindo a sensibilidade^{59,60}. No RT-PCR é mais comumente utilizada amostras *swabs* nasofaríngeos e orofaríngeos⁶¹, e menos usualmente saliva⁶². Este método é mais

adequado durante a fase aguda da infecção, geralmente nos primeiros dias após o aparecimento dos sintomas, quando a carga viral é mais alta³⁶. Entretanto, o RT-PCR apresenta limitações como o custo elevado dos insumos e equipamentos, a necessidade de mão de obra especializada, baixa disponibilidade da técnica, restrito a grandes laboratórios e centros de pesquisa e o longo tempo para obtenção dos resultados⁶³⁻⁶⁵. Ademais, para a COVID-19, o RT-PCR é altamente dependente da qualidade da coleta da amostra, que pode afetar a quantidade de RNA viral a ser detectado. Além disso, apesar de ser sensível, o RT-PCR é essencialmente qualitativo, indicando apenas a presença ou ausência do vírus⁶⁶.

Por outro lado, os testes rápidos de LFA são amplamente utilizados para a detecção de antígenos virais ou anticorpos específicos contra o SARS-CoV-2. Estes testes baseiam-se na interação específica antígeno-anticorpo e oferecem resultados em cerca de 15-30 min⁶⁷. A capacidade de aplicação em ambientes de ponto de atendimento ao paciente (POC, do inglês *Point-of-Care*) e a comercialização ampla são pontos positivos desta técnica⁶⁸. Além disso, os LFA são versáteis na detecção tanto de antígenos virais quanto de anticorpos. No entanto, os LFAs apresentam algumas limitações significativas como: alta probabilidade de resultados incorretos como falsos positivos e falsos negativos, resultados puramente qualitativos e a variabilidade na sensibilidade e especificidade clínica, dependendo da qualidade do teste^{69,70}. Assim, na maioria dos casos é necessário utilizar a RT-PCR posteriormente para confirmar efetivamente um possível diagnóstico positivo^{70,71}.

Por fim, o ELISA é uma técnica amplamente utilizada para a detecção de anticorpos ou antígenos específicos em amostras biológicas, utilizando a interação antígeno-anticorpo seguida por uma reação enzimática⁷². As vantagens do ELISA incluem alta especificidade na interação antígeno-anticorpo, confiabilidade e a capacidade de fornecer análises qualitativas e quantitativas dos níveis de antígenos ou anticorpos⁷³. Apesar disso, a técnica não foi largamente utilizada para o diagnóstico de COVID-19, sendo a prevalência do

RT-PCR. O ELISA, apresenta limitações como o custo elevado dos equipamentos e reagentes, a necessidade de grandes quantidades de amostras e insumos, e a inadequação para uso como POC devido à sua natureza laboratorial⁷⁴. Diante disso, diversos estudos e métodos alternativos visando o diagnóstico da COVID-19 vêm sendo desenvolvidos a fim de suprir as principais limitações das técnicas como RT-PCR, LFA e ELISA.

1.3.1 Métodos alternativos para diagnóstico da COVID-19

Desde o surgimento da pandemia da COVID-19, diversos métodos alternativos as técnicas padrão têm sido desenvolvidos para auxiliar no diagnóstico da COVID-19. Nesse sentido, pode-se destacar métodos baseados em amplificação isotérmica medida por loop de transcrição reversa (RT-LAMP)^{75,76}, amplificação da polimerase recombinante de transcrição reversa (RT-RPA)^{77,78}, amplificação assistida por recombinase de transcrição reversa (RT-RAA)⁷⁹, métodos baseados em repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaciaadas (CRISPR)⁸⁰⁻⁸², espectrometria de massas^{83,84}, raios-X⁸⁵, tomografia computadorizada^{86,87} e ultrassom⁸⁸. Além disso, os sensores eletroquímicos têm emergido como uma alternativa promissora para auxiliar no diagnóstico da COVID-19 por apresentarem vantagens importantes como baixo custo de análise, simplicidade, rapidez na obtenção de resultados, detecção quantitativa com alta sensibilidade e seletividade, potencial de portabilidade e custo-efetividade⁸⁹⁻⁹¹. Portanto, há grande interesse e elevadas perspectivas no uso de sensores eletroquímicos para o diagnóstico e gestão do surto de SARS-CoV-2, podendo ser facilmente adaptado para outras doenças e possíveis futuras epidemias⁹².

1.4 Biossensores e imunossensores

Dentre os sensores eletroquímicos, pode-se destacar os biossensores que são dispositivos que usam elementos biológicos (biorreceptores) para

interagir com o analito de interesse e converte as respostas de reações bioquímicas em um sinal adequado para medição. Os biossensores podem ser classificados de acordo com o biorreceptor usado e o transdutor empregado. Portanto, os biossensores podem ser nomeados como: i) aptassensores quando aptâmeros são usados como biorreceptor; ii) genossensores quando uma sequência de RNA ou DNA é usada para detecção de alvo, iii) enzimáticos quando são usadas enzimas, iv) microbianos quando empregado microrganismos como elementos biológicos em biossensores e v) imunossensores ao empregar interação antígeno/anticorpo para detecção. Além disso, os biossensores eletroquímicos podem ser classificados de acordo com o transdutor utilizado como condutométrico, voltamétrico, amperométrico e impedimétrico^{93,94}.

Nesse sentido, os imunossensores são baseados na formação de um imunocomplexo e diversas aplicações podem ser observadas na literatura, incluindo monitoramento ambiental⁹⁵, controle de qualidade de alimentos e análises clínicas⁹⁶. Portanto, a estratégia de detecção pode variar conforme as particularidades da análise – tipo de amostra, alvo escolhido, objetivo da detecção. Além disso, o biorreceptor por ser responsável pela seletividade da detecção, deve ser escolhido com cautela^{94,97}. Para diagnósticos, é comum o uso de imunossensores para monitorar uma substância relacionada à doença que se quer identificar. Deste modo, qualquer proteína relacionada à um processo biológico cuja concentração possa ser monitorada é passível de ser aplicada como um biomarcador^{98,99}.

Nesse sentido, há métodos que utilizam anticorpos como biorreceptores para detectar um antígeno específico. Estes métodos são comumente utilizados para identificar a fase aguda de uma infecção, podendo fornecer dados acerca da gravidade da doença. Por outro lado, há também sistemas cujo objetivo é detectar anticorpos, utilizando para isso um antígeno como biorreceptor. Usar um anticorpo como biomarcador pode ser uma ferramenta valiosa para monitorar a resposta imune causada por uma infecção ou

por uma vacina, avaliando quanto tempo os anticorpos produzidos permanecem ativos no organismo. Assim, é possível estimar se a doença pode ser contraída novamente, se a vacina é eficaz e em quanto tempo deve ser reforçada¹⁰⁰.

1.5 Imunoensaios

Os imunoensaios são métodos que utilizam a interação específica entre antígeno e anticorpo. O antígeno pode ser um patógeno como vírus e bactérias ou substâncias como toxinas e alérgenos¹⁰¹. Por outro lado, os anticorpos são proteínas produzidas pelos linfócitos B do sistema imunológico em resposta à presença de ameaça detectada no organismo¹⁰². Os anticorpos têm aproximadamente 150 kDa de massa molecular e são constituídos por quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias leves (~25 kDa) e duas cadeias pesadas (~50 kDa), que juntas formam uma estrutura em forma de Y¹⁰³, conforme apresentado na FIGURA 1.5. O fragmento de ligação ao antígeno (Fab) é composto por duas regiões principais: a região variável e a região constante¹⁰². A região variável é responsável pela especificidade de ligação ao antígeno, permitindo que o anticorpo reconheça e se ligue a um epítipo específico do antígeno. Já a região constante determina a classe do anticorpo (IgG, IgM, IgA, etc.) e medeia a interação com outras moléculas do sistema imunológico¹⁰⁴. O fragmento cristalizável (Fc) não se liga ao antígeno, mas pode se ligar a receptores Fc em células do sistema imunológico, como macrófagos e células NK¹⁰².

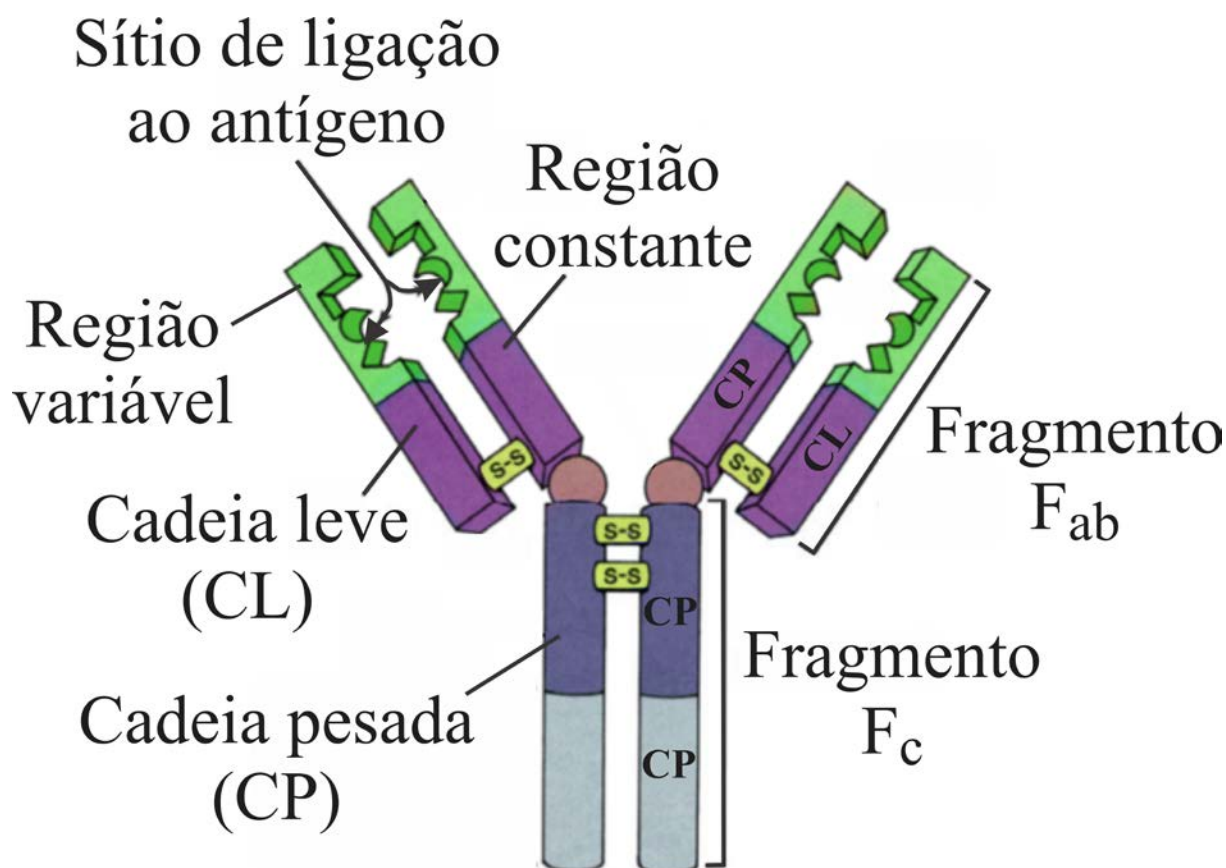
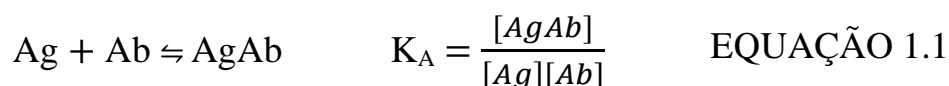


FIGURA 1.5 – Estrutura de um anticorpo composto por cadeias leves e pesadas e fragmentos F_{ab} e F_c .

Fonte: Adaptado de Moser, M; Leo, O¹⁰⁵.

Em um imunensaio, o anticorpo (Ab) combina-se ao antígeno (Ag) formando um imunocomplexo (AbAg) de forma altamente específica. O imunocomplexo é caracterizado pela constante de afinidade (K_A) definida pela concentração do imunocomplexo, e do antígeno livre e sítios livres dos anticorpos no equilíbrio¹⁰⁶, como mostrado na EQUAÇÃO 1.1.



Os valores de K_A para reação de formação de um imunocomplexo podem chegar até $10^{15} \text{ L mol}^{-1}$ ¹⁰⁶. Assim, os imunocomplexos são considerados praticamente irreversíveis devido a constante de afinidade ser muito grande o que

torna o sensor de uso único¹⁰⁷. A ligação específica antígeno-anticorpo permite obter métodos analíticos confiáveis, com baixos limites de detecção e de alta sensibilidade e seletividade, especialmente vantajosos para detecções eletroquímicas^{108,109}. Esse método tem sido amplamente utilizado para quantificar anticorpos ou antígenos em diversas amostras biológicas, como sangue¹¹⁰, saliva¹¹¹, urina¹¹², entre outros fluídos biológicos¹¹³⁻¹¹⁵.

A interação antígeno-anticorpos nos sensores eletroquímicos também pode ser empregada para a detecção de anticorpos. Neste caso, é necessário a resposta imunológica do organismo, que leva de 4 a 7 dias para se desenvolver após o contágio⁴⁴. Contudo, a detecção de anticorpos IgM permite diagnosticar casos recentes de contaminação, enquanto a detecção de anticorpos IgG não só possibilita o diagnóstico de infecções passadas, como também possibilita o monitoramento da doença e a avaliação da eficácia das vacinas¹¹⁶.

1.6 Sensores eletroquímicos para auxiliar no diagnóstico da COVID-19

Na literatura, diversos tipos de sensores eletroquímicos para auxiliar no diagnóstico da COVID-19 podem ser encontrados. Entre eles estão sensores baseados em eletroquimiluminescência (ECL)¹¹⁷⁻¹²⁰, fotoeletroquímicos¹²¹⁻¹²³, potenciométricos^{124,125} e de transistor de efeito de campo (FET)¹²⁶⁻¹²⁸. No entanto, a maioria dos sensores eletroquímicos relatados utiliza principalmente técnicas voltamétricas, impedimétricas e amperométricas. Ademais, o alvo também varia, de modo que estes sistemas podem ser utilizados para detectar antígenos ou anticorpos específicos do SARS-CoV-2.

1.6.1 Sensores eletroquímicos para detecção de SARS-CoV-2

Entre os sensores eletroquímicos desenvolvidos para a detecção do vírus SARS-CoV-2, é possível classificar as metodologias com base na técnica empregada. Dentro da categoria de sensores voltamétricos, destacam-se aqueles

que empregam voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*) e voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *Differential Pulse Voltammetry*). Além disso, dentre os sensores voltamétricos, vários trabalhos desenvolvidos foram de biossensores que utilizaram a enzima ACE2 para a detecção da proteína S do SARS-CoV-2^{129,130}. Também foram desenvolvidos imunossensores nos quais utilizaram anticorpos específicos como biorreceptores para detectar proteínas virais S¹³¹⁻¹³⁷ e N¹³⁸⁻¹⁴⁰, aptassensores no qual utilizaram aptâmeros específicos para as proteínas S¹⁴¹⁻¹⁴³ e N^{144,145} do vírus, enquanto genossensores utilizam sondas de cDNA para detectar o RNA do SARS-CoV-2 nas amostras¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Além disso, sensores baseados em polímero impresso molecularmente (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*) também são relatados para detectar alvos da COVID-19^{149,150}.

Além dos sensores voltamétricos, há vários sensores impedimétricos desenvolvidos para detecção do SARS-CoV-2 como biossensores¹⁵¹⁻¹⁵⁴, imunossensores¹⁵⁵⁻¹⁵⁹ e aptassensores¹⁶⁰⁻¹⁶³. Sensores de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, do inglês: *Electrochemical Impedance Spectroscopy*) medem mudanças na resistência elétrica quando um analito se liga ao biorreceptor no eletrodo. Sensores com detecção por amperometria ou cronoamperometria também são frequentes na literatura, assim como as variedades de imunossensores^{164,165} e genossensores¹⁶⁶.

Os sensores eletroquímicos para o diagnóstico da COVID-19 têm avançado significativamente desde 2020. A modificação dos eletrodos com nanomateriais, a utilização de biorreceptores específicos e a utilização de amostras reais permitem a detecção de proteínas virais e RNA do SARS-CoV-2 e a validação dos métodos desenvolvidos.

1.6.2 Importância da detecção de anticorpos

Além do desenvolvimento de imunossensores para a detecção de antígenos do SARS-CoV-2, a detecção de anticorpos também é essencial para o

diagnóstico da COVID-19. Essa abordagem permite identificar infecções recentes (IgM) e passadas (IgG) pelo SARS-CoV-2¹⁶⁷. A determinação de anticorpos pode auxiliar no diagnóstico de indivíduos vacinados (soroconvertidos), uma vez que as respostas imunológicas em indivíduos vacinados não apresentam anticorpos anti-N, sendo os anti-N um biomarcador natural^{168,169}. Estudos revizados na literatura sugerem que os níveis de anticorpos anti-S após a vacinação são maiores do que em indivíduos previamente infectados de forma natural pelo SARS-CoV-2¹⁶⁸⁻¹⁷². Dessa forma, a detecção de anticorpos contra o SARS-CoV-2 pode ajudar a identificar indivíduos soropositivos, soronegativos e soroconvertidos.

Além de auxiliar no diagnóstico da infecção, a detecção de anticorpos IgG é crucial para monitorar a eficácia das vacinas e avaliar a duração da imunidade adquirida^{116,168}. Para aqueles que sofrem de COVID longa, a identificação dos anticorpos pode fornecer informações sobre a persistência da resposta imunológica, ajudar a distinguir entre sintomas prolongados de uma infecção passada e novas infecções, e auxiliar no desenvolvimento de estratégias de tratamento. Portanto, a detecção de anticorpos desempenha um papel vital na gestão e compreensão da COVID-19, tanto em termos de diagnóstico quanto no desenvolvimento de vacinas, no monitoramento pós-vacinação e na avaliação de condições de longo prazo¹⁷³.

1.6.3 Sensores eletroquímicos para detecção de anticorpos contra o SARS-CoV-2

Além do desenvolvimento de sensores para detecção do vírus, há estudos recentes que exploram a detecção de anticorpos IgM e IgG. Diferentes técnicas eletroquímicas, como SWV^{131,174-176}, DPV¹⁷⁷⁻¹⁸², EIS^{176,183-189} e de amperometria¹⁹⁰⁻¹⁹², são utilizadas para a detecção desses anticorpos.

Nos desenvolvimentos de imunossensores para diagnóstico da COVID-19, vários nanomateriais foram empregados para modificar os eletrodos de trabalho. Essas modificações aumentam a eficiência de imobilização dos

biorreceptores e amplificam o sinal analítico¹⁹³. Assim, muitos estudos empregam estratégias variadas para modificar os sensores, utilizando materiais como nanopartículas de ouro (AuNPs)^{178,186}, nanopartículas de dióxido de titânio¹⁸², óxido de grafeno (GO, do inglês *Graphene Oxide*)^{131,177}, GO reduzido^{180,181,188}, nanotubos de carbono (CNTs)¹⁸⁷, nanofios de óxido de zinco¹⁸⁹, ouro eletrodepositado^{174,176,177,179}, nanopartículas de hidróxido de níquel¹⁹² ou biomoléculas como estreptavidina¹⁹⁰.

Limites de detecção extremamente baixos foram obtidos em diversos trabalhos. Por exemplo, Liv *et al.*¹⁷⁴ desenvolveram um imunossensor com eletrodo de carbono vítreo modificado com a proteína S, alcançando um limite de detecção de 0,03 fg mL⁻¹. Outro exemplo é o trabalho de Rahmati *et al.*¹⁹², que desenvolveram um imunossensor modificado com nanopartículas de hidróxido de níquel eletrodepositado para imobilização da proteína S, detectando anticorpos IgM e IgG contra a proteína S do SARS-CoV-2 com um limite de detecção de 0,3 fg mL⁻¹.

Além disso, imunossensores eletroquímicos para diagnóstico e monitoramento da COVID-19 por meio da detecção de anticorpos têm mostrado ótimos resultados de sensibilidade e especificidade. Isso comprova sua eficácia na capacidade de diagnóstico. Os avanços na detecção eletroquímica de anticorpos contra o SARS-CoV-2 têm grande potencial para melhorar o diagnóstico da COVID-19. A diversidade de sensores permite uma detecção específica e sensível dos anticorpos. A combinação dessas tecnologias pode proporcionar métodos de diagnóstico mais eficazes e acessíveis, contribuindo significativamente para o controle de novos surtos.

1.7 Partículas magnéticas em imunoenaios

As partículas magnéticas (PMs) são tipicamente compostas por óxidos de ferro como magnetita (Fe₃O₄) e maghemita (γ-Fe₂O₃)¹⁹⁴. Essas partículas podem ser sintetizadas ou adquiridas em diversos tamanhos e com

vários possíveis grupos funcionais na superfície, como tiol, aminas, carboxilas e hidroxilas¹⁹⁵. Os grupos funcionais permitem a imobilização de diversos tipos de materiais biológicos como anticorpos, proteínas, enzimas e sondas de DNA e RNA, garantindo adaptação a diferentes finalidades analíticas¹⁹⁶, conforme apresentado na FIGURA 1.6. A principal vantagem das PMs consiste na sua biocompatibilidade com materiais biológicos e sua ampla área superficial, que possibilita a imobilização de uma quantidade significativa de biomoléculas¹⁹⁷. A exemplo, Mani *et. al.*¹⁹⁸ relatou que em uma PM com diâmetro de 1 μm é possível imobilizar entre 200.000 a 400.000 enzimas como a *Horseradish Peroxidase* (HRP) e entre 90.000 a 120.000 anticorpos.

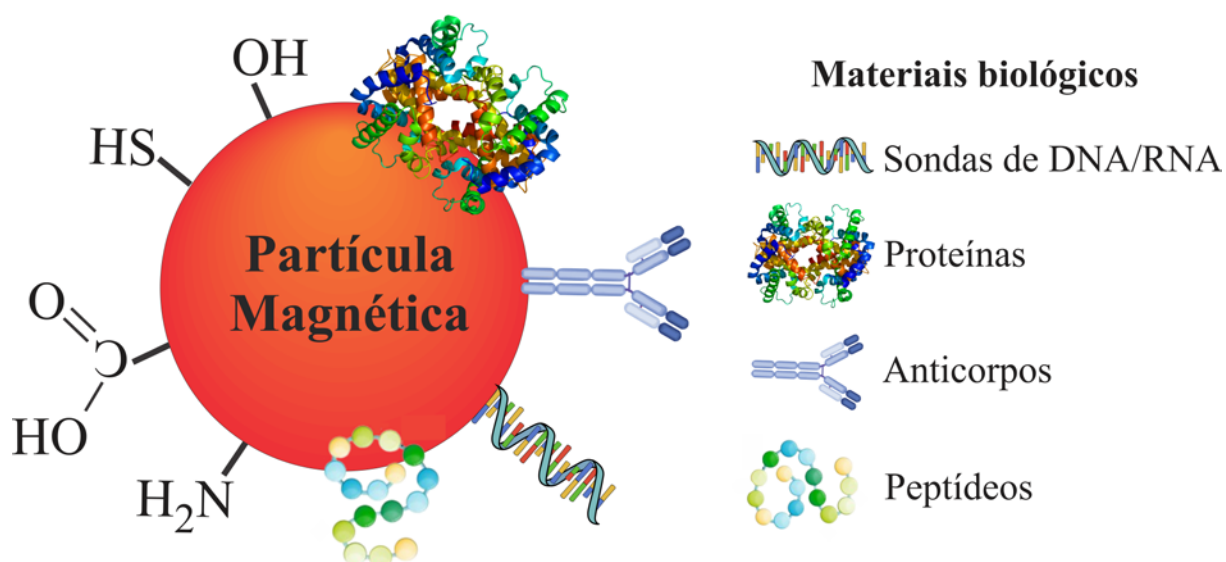


FIGURA 1.6 – Representação das PMs funcionalizadas e modificadas com diferentes materiais biológicos.

Fonte: próprio autor.

Os imunoenaios baseados em PMs, conhecidos como magneto-imunoenaios, são altamente eficientes na captura e pré-concentração do analito¹⁹⁹. A aplicação de campos magnéticos externos, como o uso de ímãs por exemplo, permite a separação eficaz das PMs e das biomoléculas nelas ancoradas dos demais componentes da amostra, melhorando a sensibilidade, o que pode levar a uma maior precisão do ensaio²⁰⁰. Além disso, as propriedades magnéticas

facilitam os processos de lavagem entre etapas de conjugação. Esse método é especialmente útil para análises em matrizes biológicas complexas, onde a remoção de interferentes é de extrema importância²⁰¹. Ademais, a separação magnética também pode garantir a pré-concentração do analito para amplificação do sinal analítico²⁰².

Por conseguinte, as PMs têm sido amplamente empregadas em ensaios para diagnósticos clínicos como hanseníase²⁰³, doença de Alzheimer²⁰⁴, Zika²⁰⁵ e câncer de cabeça e pescoço²⁰⁶, assim como para diagnóstico da COVID-19 por meio da detecção das proteínas^{130,164,207}, RNA do vírus²⁰⁸ ou anticorpos contra o SARS-CoV-2²⁰⁹. A exemplo, em um trabalho foi desenvolvido um magneto-imunoensaio para detecção do SARS-CoV-2 em amostras de saliva¹³⁰. Nesse estudo, as PMs foram revestidas com peptídeos que mimetizam a enzima ACE2 para captura da proteína S do SARS-CoV-2. A detecção eletroquímica foi mediada por AuNPs, e o método apresentou alta sensibilidade para o diagnóstico da COVID-19, permitindo discriminar as amostras de indivíduos saudáveis e pacientes diagnosticados por RT-PCR.

Outro exemplo é o trabalho de Torrente-Rodríguez *et al.*²⁰⁹, onde foram desenvolvidas bioplataformas nas quais as proteínas N e S do SARS-CoV-2 foram imobilizadas nas PMs. Essas bioplataformas foram utilizadas para detectar anticorpos (IgM, IgG e IgA) em soros de indivíduos infectados ou vacinados com as vacinas Pfizer-BioNTech ou AstraZeneca. O ensaio indireto foi aplicado, com a adição de um segundo anticorpo conjugado com a enzima HRP, e a detecção eletroquímica foi realizada por meio do ciclo catalítico da enzima. A bioplataforma desenvolvida apresentou excelentes resultados de sensibilidade, sendo eficaz tanto para o diagnóstico da COVID-19 quanto para a avaliação de variantes da proteína S do SARS-CoV-2.

Ademais, a aplicação de PMs em magneto-imunoensaios acoplados a dispositivos eletroquímicos descartáveis é extremamente importante para o desenvolvimento de uma metodologia rápida, de baixo custo, eficiente e precisa,

essencial para aplicações clínicas e epidemiológicas em larga escala²⁰². Além disso, a imobilização de proteínas como a S e a N do SARS-CoV-2 em PMs pode ser fundamental para o desenvolvimento de imunoenaios destinados à detecção e quantificação de anticorpos IgG e IgM. Isso pode auxiliar no diagnóstico preciso da COVID-19, na avaliação de casos de COVID longa e no monitoramento de níveis de anticorpos em indivíduos vacinados.

1.8 Dispositivos eletroquímicos descartáveis

Sensores eletroquímicos são altamente versáteis na aplicação devido à sua capacidade de serem fabricados com uma variedade de materiais. Eletrodos como carbono vítreo, ouro e platina são comumente empregados devido à sua ampla janela de potencial, características essenciais para aplicações analíticas. No entanto, na área das análises clínicas, os sensores e dispositivos descartáveis têm se destacado significativamente. Estes dispositivos são atrativos devido ao seu custo reduzido, capacidade de produção em larga escala e adaptação para uso em POC²¹⁰. Além disso, não requerem renovação da superfície do eletrodo entre as medidas, uma vez que são descartados após o uso, permitindo uma frequência analítica mais elevada. Essa característica é crucial para realizar múltiplas análises rapidamente, aumentando a eficiência diagnóstica e o monitoramento contínuo de pacientes.

1.8.1 Eletrodos serigrafados

Eletrodos serigrafados (SPEs, do inglês *Screen-Printed Electrodes*) são fabricados aplicando uma tinta condutora sobre um substrato isolante, como PVC, poliéster, alumina, cerâmica, tecido²¹¹ ou papel²¹². A técnica de serigrafia é amplamente utilizada para este fim, permitindo a produção de eletrodos com boa reprodutibilidade e diferentes formatos²¹³, conforme apresentado na FIGURA 1.7. As tintas disponíveis no mercado, feitas de carbono, prata ou ouro, influenciam diretamente as propriedades eletroquímicas do sensor²¹¹. A produção de eletrodos

por serigrafia é simples e de baixo custo, requerendo apenas a tinta condutora, o substrato, um molde com o *layout* do eletrodo, um rodo para aplicação da tinta e uma estufa para cura²¹⁴.

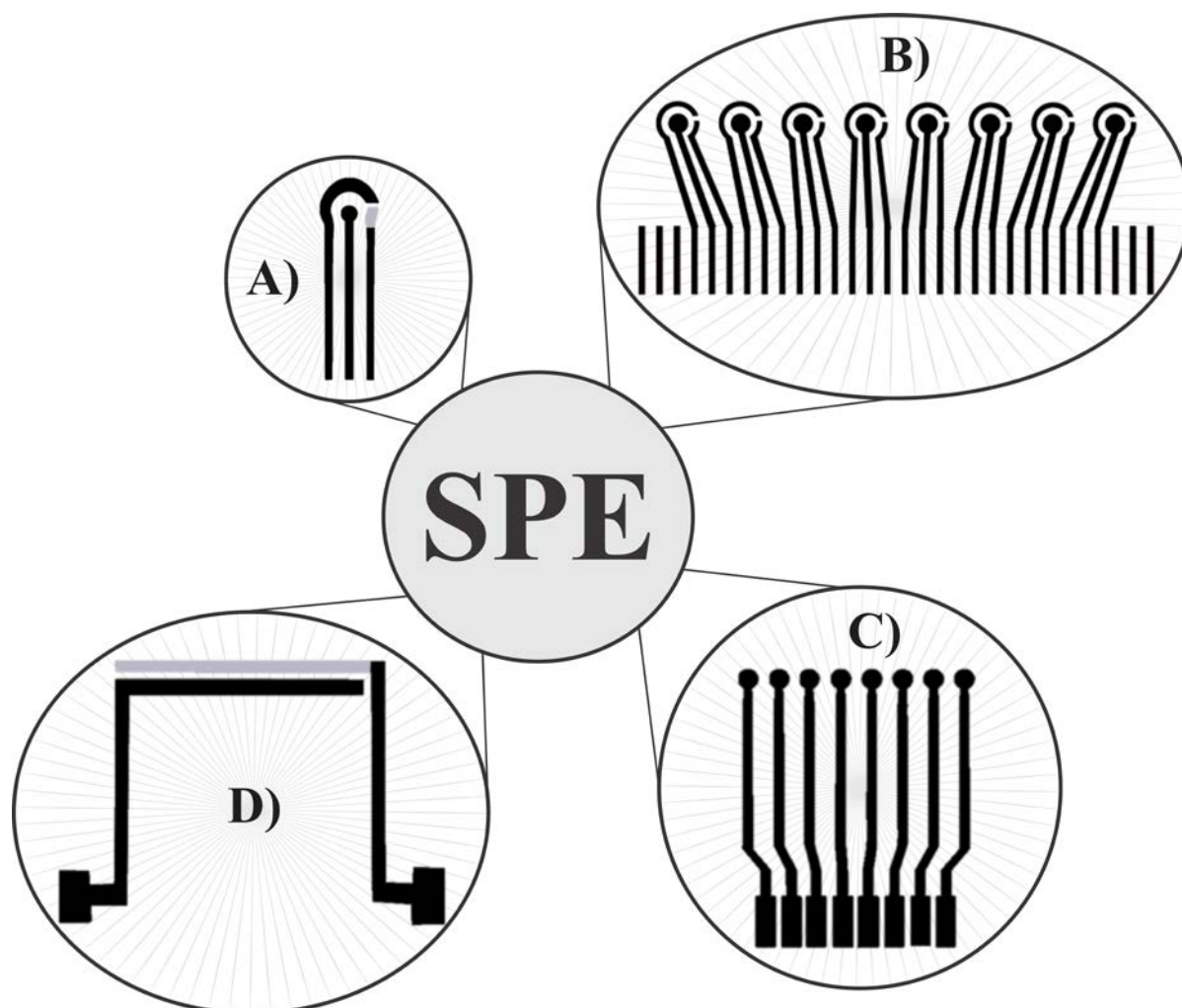


FIGURA 1.7 – SPEs em diferentes formatos e em arranjos de oito eletrodos para aplicações simultâneas. Sendo: (A) Célula unitária completa, (B) arranjo de oito células eletroquímicas completas, (C) arranjo contendo oito eletrodos de trabalho e (D) arranjo contendo os eletrodos de referência e contra eletrodo.

Fonte: próprio autor.

Assim, os SPEs podem ser produzidos em laboratório, proporcionando um método econômico e acessível para a construção de dispositivos descartáveis. Por exemplo, Afonso *et al.*²¹⁵ desenvolveram SPEs utilizando tinta condutora de carbono e folhas de poliéster, que são moldáveis em

altas temperaturas e recicláveis. Eles utilizaram uma impressora de corte eletrônica para formar uma máscara negativa em vinil adesivo, permitindo a produção manual dos SPEs sem a necessidade de máquinas específicas para realização da serigrafia. Este método reduz significativamente o custo de produção dos dispositivos.

A serigrafia possibilita a fabricação de células eletroquímicas inteiras em tamanho miniaturizado, reduzindo o consumo de amostras e reagentes²¹⁶. Estes dispositivos são amplamente aplicados em análises clínicas^{214,217,218}, ambientais e de alimentos²¹⁹, e podem ser produzidos em arranjos que permitem até oito análises simultâneas, tornando-os adequados para análises de rotina e potencialmente convertíveis para dispositivos POC. A utilização de SPEs como eletrodos descartáveis e sua miniaturização para acoplamento em sistemas microfluídicos são de extrema importância para o desenvolvimento de métodos analíticos portáteis, rápidos e de baixo custo, essenciais para diagnósticos em ambientes com recursos limitados²²⁰.

1.9 Sistema microfluídico

Sistemas microfluídicos são dispositivos que operam com o transporte de fluidos em canais de dimensões micrométricas, com um volume interno máximo de 100 μL ^{221,222}. A principal vantagem destes sistemas é a capacidade de realizar análises com volumes de micro ou nanolitros de reagentes e amostras, o que reduz custos e gera poucos resíduos²²². No contexto das análises clínicas, dispositivos microfluídicos descartáveis compostos por SPEs são notavelmente vantajosos devido à simplicidade de fabricação e manuseio. Além disso, sensores eletroquímicos mantêm alta sensibilidade mesmo em tamanhos reduzidos, tornando-os ideais para integração em sistemas microfluídicos²²³. A entrega automatizada de fluidos à plataforma de detecção aumenta a precisão e a portabilidade do sistema, minimizando o manuseio e o risco de contaminação, além de reduzir a necessidade de treinamento especializado²²⁴.

Neste sentido, as plataformas microfluídicas com detecção eletroquímica são amplamente aplicadas em análises clínicas e no desenvolvimento de sistemas de diagnósticos POC devido ao baixo consumo de reagentes, baixo custo e potencial de automação^{225,226}. Nosso grupo de pesquisa tem avançado na fabricação rápida de tais dispositivos, utilizando filmes adesivos como cartão de poliestireno com adesivo dupla face recortado com impressora doméstica para criar canais microfluídicos. A integração de SPEs como eletrodos descartáveis em sistemas microfluídicos justifica-se pela necessidade de métodos analíticos portáteis, rápidos e de baixo custo, essenciais para diagnósticos em ambientes com recursos limitados.

A exemplo, um trabalho desenvolveu um magneto-imunoensaio com uso da microfluídica e eletrodos descartáveis para diagnóstico sorológico da hanseníase²⁰³. Nesse estudo, peptídeos sintéticos de epítomos específicos da bactéria *Mycobacterium leprae* foram imobilizados na superfície das PMs para a captura de anticorpos anti-*M. leprae* IgG em amostras de soro humano. Foi realizado um magneto-imunoensaio do tipo indireto, no qual posteriormente foi adicionado um anticorpo marcado com a enzima fosfatase alcalina (ALP, do inglês *Alkaline Phosphatase*). A detecção eletroquímica ocorreu por meio dos processos do ciclo catalítico da enzima. Além disso, dispositivos microfluídicos descartáveis foram empregados para realização das medidas. O método apresentou alta sensibilidade, além de ser eficiente em identificar casos positivos de hanseníase sem a necessidade de pré-tratamento das amostras.

Nesse contexto, este trabalho propõe o desenvolvimento de um método inovador baseado em um magneto-imunoensaio que envolveu o uso das proteínas S e N do SARS-CoV-2 imobilizadas em PMs para a detecção e quantificação de anticorpos IgG e IgM. A detecção de anticorpos anti-S e anti-N pode fornecer informações valiosas sobre a infecção passada e a resposta à vacinação. Os anticorpos anti-S estão associados à resposta imunológica induzida tanto pela infecção natural quanto pela vacinação, enquanto os anticorpos anti-N

são indicadores específicos de infecção natural, pois a proteína N não está presente nas vacinas atualmente empregadas. O uso de dispositivos microfluídicos descartáveis garante a praticidade e acessibilidade do método, tornando-o ideal para uso em larga escala, especialmente em ambientes com recursos limitados. Assim, a realização de ensaios magnéticos simples e rápidos podem auxiliar no diagnóstico preciso da COVID-19 e da COVID longa, além de possibilitar o monitoramento dos níveis de anticorpos em indivíduos vacinados. Ademais, o uso de PMs para a imobilização das proteínas S e N, como antígenos, pode levar a uma elevada sensibilidade e seletividade dos imunoenaios, proporcionando uma ferramenta eficaz para a detecção de anticorpos anti-S e anti-N. Em suma, este trabalho visa preencher lacunas significativas no diagnóstico e monitoramento da COVID-19 e da COVID longa. Ele poderá contribuir para uma melhor gestão de futuras epidemias e para a avaliação contínua da eficácia das campanhas de vacinação contra o SARS-CoV-2.

OBJETIVOS

Capítulo 2

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é desenvolver e validar magneto-imunoensaios de alta sensibilidade e seletividade para a detecção e quantificação de anticorpos anti-S IgG, anti-S IgM, anti-N IgG e anti-N IgM em amostras de plasma, visando auxiliar no diagnóstico da COVID-19 e prognóstico da COVID longa.

2.2 Objetivos específicos

- Construir dispositivos microfluídicos descartáveis contendo eletrodos serigrafados;
- Desenvolver magneto-imunoensaios utilizando proteínas S e N do SARS-CoV-2 como antígenos para a captura específica de anticorpos anti-S IgG, anti-S IgM, anti-N IgG e anti-N IgM;
- Otimizar e estabelecer as melhores condições para o magneto-imunoensaio proposto, visando à obtenção de resultados precisos e reprodutíveis;
- Avaliar a linearidade, sensibilidade, limite de detecção e precisão dos magneto-imunoensaios desenvolvidos;
- Avaliar a estabilidade dos conjugados utilizados nos ensaios;
- Aplicar o método desenvolvido em amostras de plasma humano e quantificar os níveis de anticorpos presentes;
- Verificar a capacidade dos magneto-imunoensaios na distinção entre infecções recentes e passadas, por meio da detecção específica dos anticorpos IgG e IgM.

***DESENVOLVIMENTO DE
UM MAGNETO-
IMUNOENSAIO PARA
DETECÇÃO DE
ANTICORPOS ANTI-S
UTILIZANDO A PROTEÍNA
S DO SARS-COV-2***

Capítulo 3

3 DESENVOLVIMENTO DE UM MAGNETO-IMUNOENSAIO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-S UTILIZANDO A PROTEÍNA S DO SARS-COV-2

3.1 Procedimento experimental

3.1.1 Reagentes e soluções

Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico (MES), albumina de soro bovino (BSA), borohidreto de sódio, citrato trissódico, etanolamina (ETA), hidroquinona (HQ, $\geq 99\%$), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 30%), e Tween 20 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), hidróxido de sódio (NaOH) e metanol foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). As PMs funcionalizadas com grupo carboxílico (concentração de 10 mg mL^{-1} e $1,0 \mu\text{m}$ de diâmetro) foram obtidas da Invitrogen (Dynabeads MyOne™ Carboxylic Acid, Prod. nº 65012, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Os anticorpos humanos IgG conjugados com a enzima HRP (anti-IgG/HRP, cód. ab97165) e os anticorpos humanos IgM conjugados com a enzima HRP (anti-IgM/HRP, cod. ab97205) foram obtidos da Abcam (Cambridge, MA, EUA). Além disso, o anticorpo quimérico monoclonal glicoproteína *Spike* do SARS-CoV-2 [H6] IgG (anti-S IgG, cod. ab272854), o anticorpo anti-SARS-CoV-2 *Spike* glicoproteína S1 IgM (anti-S IgM, cod. ab278111) e o anticorpo quimérico monoclonal anti-proteína de Nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 [1A6] (anti-N IgG, cod. ab272852) também foram obtidos da mesma empresa.

Todos os reagentes utilizados no preparo das soluções eram de pureza analítica. A solução tampão fosfato salino (PBS) 10 mmol L^{-1} era constituída de KCl $2,7 \text{ mmol L}^{-1}$, KH_2PO_4 $1,8 \text{ mmol L}^{-1}$, NaCl 137 mmol L^{-1} e Na_2HPO_4 10 mmol L^{-1} e tampão MES 50 mmol L^{-1} pH 6,0 foram preparados em água desionizada (Millipore, Bedford, EUA) e seu pH foi ajustado com HCl $0,1$

mol L⁻¹ e NaOH 0,1 mol L⁻¹. A solução de EDC 0,4 mol L⁻¹ foi diluída em solução de NHS 0,1 mol L⁻¹ preparada em MES pH 6,0, ambas preparadas imediatamente antes do uso. Anticorpos, antígenos e solução de BSA 0,1% (m/v) e de ETA 1,0 mmol L⁻¹ foram preparados em PBS 7,4. O anticorpo anti-IgG/HRP e anti-IgM/HRP 1,0 µg mL⁻¹ foram preparados em PBS pH 6,5. Ademais, a solução de detecção de HQ 1,0 mmol L⁻¹ e H₂O₂ 2,0 mmol L⁻¹, utilizada para detecção eletroquímica, foi preparada em PBS pH 6,5 desaerada com N_{2(g)} por no mínimo 10 min antes do uso.

3.1.2 Obtenção e polimerização da proteína S do SARS-CoV-2

A proteína S trimérica recombinante do SARS-CoV-2, composta por 1273 aminoácidos, 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.*²²⁷. Uma concentração final de 1% de formaldeído foi adicionada à proteína S purificada diluída em PBS. Após manter a proteína inativa por 60 min à temperatura ambiente, o formaldeído foi neutralizado com a adição de 2,5 mmol L⁻¹ de glicina por 15 min à temperatura ambiente. Para validar a polimerização da proteína S, as amostras foram analisadas por SDS-PAGE a 8% e coradas com anticorpos anti-S IgG 1,0 µg mL⁻¹, juntamente com anticorpos anti-IgG/HRP 0,13 µg mL⁻¹. A polimerização da proteína S e o estudo de *Western Blot* (FIGURA 3.1) foram realizados no laboratório de bioquímica celular do departamento de genética e evolução da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Considerando que a proteína S do SARS-CoV-2 possui um peso molecular aproximado de 180 a 200 kDa, a observação da FIGURA 3.1 revela que a banda correspondente à Poli-*Spike* (S) ultrapassou 116 kDa, o que sugere que a proteína S foi polimerizada, excedendo os pesos moleculares de referência.

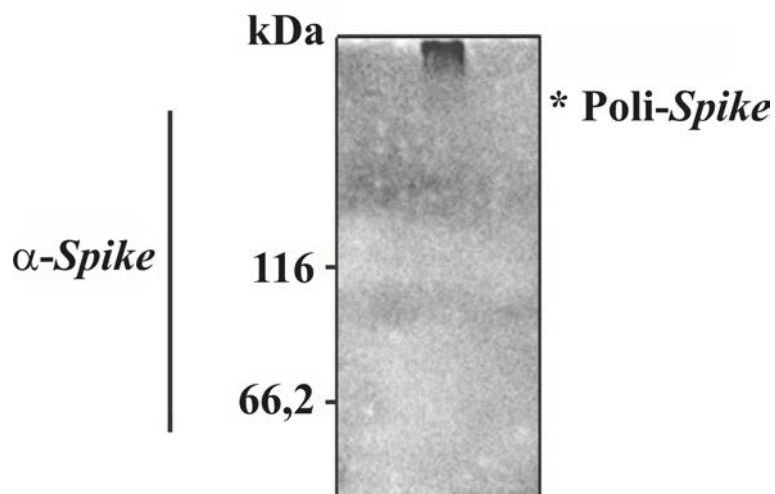


FIGURA 3.1 – *Western Blot* para a proteína S polimerizada (*Poli-Spike*).

3.1.3 Instrumentação e materiais

Para a produção dos arranjos de eletrodos descartáveis, foi empregado uma impressora de recorte Sillhouette Cameo 4 (Silhouette, Brasil) e uma *plotter* de recorte (F1 Suprimentos, Brasil). Os eletrodos foram serigrafados usando tinta de carbono Carbon ink (C2160602D2) e pintados com tinta de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl, cod: C2130429D3), ambas obtidas na Gwent Electronic Materials Ltd (Pontypool, UK). Vinil Adesivo, folha de poliéster (transparência), adesivo dupla face (3M Command) e cartões adesivos de dupla face foram adquiridos no comércio local.

Os experimentos eletroquímicos foram realizados utilizando um multipotenciostato portátil μ STAT8000 da Dropsens (Metrohm, Espanha) acoplado a um computador pessoal utilizando o *software* DropView 8400.

No sistema microfluídico, foram utilizados uma bomba de seringa (New Era Pumping System NE-1000, USA) e uma válvula cromatográfica manual (Rheodyne 9725i, Thermo Scientific, EUA), juntamente com a alça de amostragem e conectores de poliéter-éter-cetona de 0,2 mm (PEEK, IDEX Health & Science, USA) para conectar a bomba de seringa a válvula manual e à célula microfluídica. As PMs foram agitadas no Thermo Shaker (Kasvi, Brasil). Além

disso, foi utilizado um medidor de pH Digimed DM20 (Digimed, Brasil) para as medições de pH das soluções.

3.1.4 Construção do dispositivo microfluídico descartável

O dispositivo microfluídico consistiu em uma folha contendo um arranjo de oito eletrodos de trabalho (8-WEs) serigrafados (cada um com 2,0 mm de diâmetro), acoplado a uma segunda folha contendo o arranjo contendo um eletrodo de pseudo-referência (RE) de dimensão 30 mm × 1,25 mm e um contra eletrodo (CE) de dimensão 28 mm × 1,8 mm. Ambas as folhas foram aderidas utilizando um cartão adesivo dupla face. O dispositivo foi construído utilizando materiais de baixo custo e seguindo as etapas propostas por Afonso *et. al.*²¹⁵.

3.1.4.1 SPE de carbono

O molde dos arranjos dos eletrodos foi projetado utilizando o *software* Silhouette Studio™ versão 4.4 e cortado com a impressora de recorte artesanal Silhouette Cameo 4, conforme ilustrado na FIGURA 3.2A. Após o corte do *layout* usado na impressora de corte (FIGURA 3.2B), o vinil adesivo foi fixado em uma folha de poliéster transparente (FIGURA 3.2C), sobre o qual foi aplicada tinta de carbono, cobrindo toda a extensão da folha com a ajuda de um pequeno rodo (FIGURA 3.2D). Após a serigrafia, as folhas com os arranjos dos eletrodos foram colocadas na estufa a 90°C por 30 min (FIGURA 3.2E).

Depois da secagem da tinta de carbono, as folhas de poliéster foram removidas da estufa, e os REs foram pintados com tinta de Ag/AgCl, como mostrado na FIGURA 3.1F. Em seguida, as folhas com os arranjos de RE e CE foram novamente colocadas na estufa a 60°C por 30 min (FIGURA 3.2G). Após a cura da tinta de Ag/AgCl, as folhas de poliéster foram retiradas da estufa (FIGURA 3.2H) e o vinil adesivo foi removido, conforme apresentado na FIGURA 3.2I. Com o vinil removido (FIGURA 3.2J), os arranjos foram

recortados e dois orifícios foram abertos nas laterais, um para a entrada e outro para a saída da solução, como mostrado na FIGURA 3.2K.

Em paralelo, o vinil adesivo foi retirado das folhas de poliéster contendo os arranjos dos 8-WEs (FIGURA 3.2G' e 3.2H'), para então recortar cada arranjo. Em seguida, um cartão adesivo dupla face (52 mm × 32 mm) previamente recortado foi colado sobre cada arranjo, como ilustrado na FIGURA 3.2I'. O cartão apresentava um recorte interno (35 mm × 4 mm × 0,4 mm) para formar o canal microfluídico, com um volume interno de 56 µL. Para garantir uma melhor fixação do cartão adesivo aos arranjos de 8-WEs, os sensores foram colocados em uma prensa térmica a 120°C por 200 s. Após 30 min, tempo necessário para a prensa esfriar, os arranjos de 8-WEs foram retirados, estando prontos para uso. Como apresentado na FIGURA 3.2J', o cartão adesivo dupla face foi colado de forma a expor apenas a área desejada dos 8-WEs.

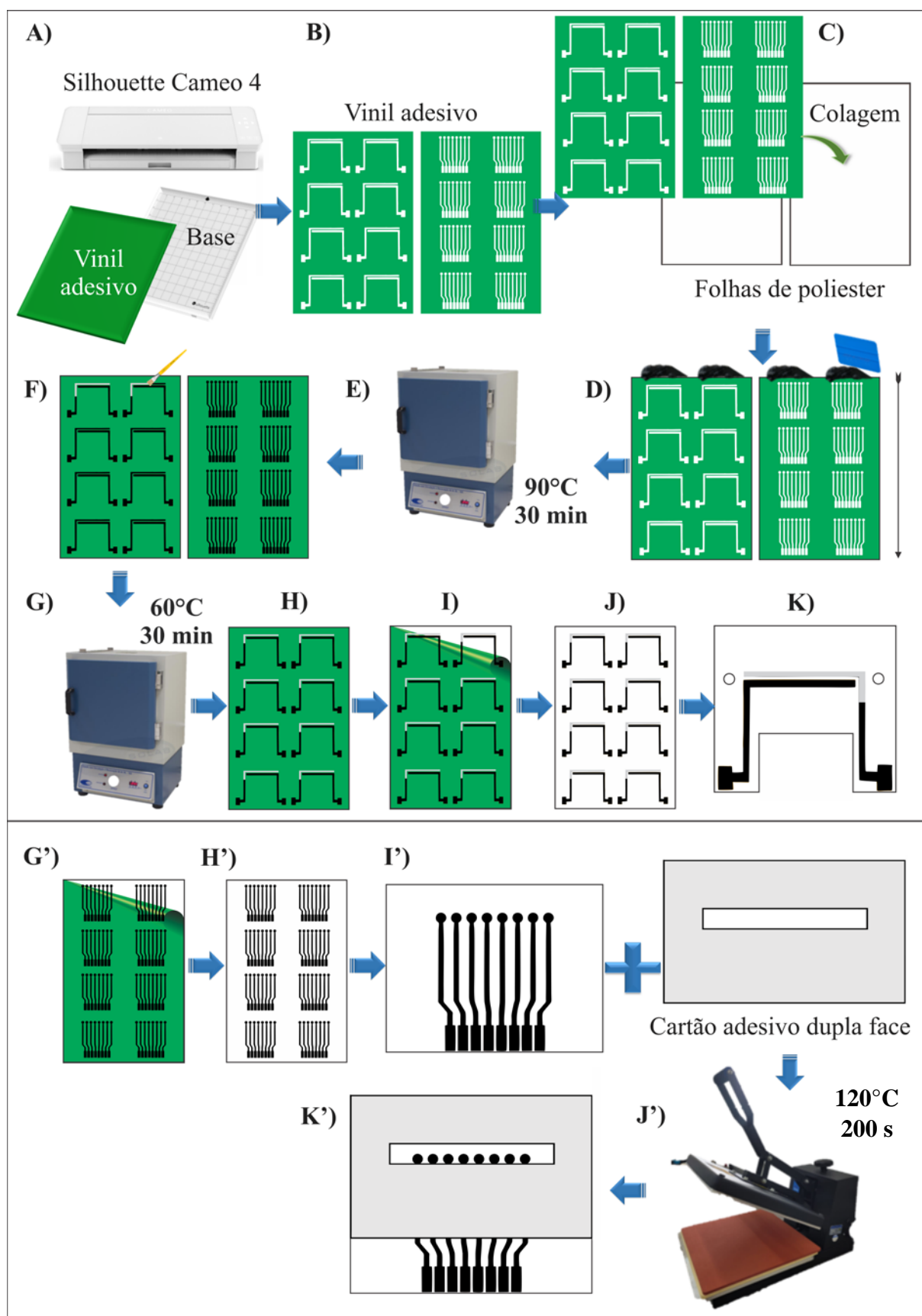


FIGURA 3.2 – Fabricação dos arranjos de 8-WEs, RE e CE e montagem do sistema microfluídico descartável. Onde: A) Impressora de recorte Silhouette Cameo 4; B) Folhas de vinil adesivo recortadas no *layout* dos arranjos; C) Colagem das folhas de vinil adesivo em

papel poliéster transparente; D) Aplicação da tinta de carbono e serigrafia dos eletrodos; E) Cura da tinta de carbono na estufa; F) Aplicação de tinta de prata no RE; G) Cura da tinta de prata na estufa; H) Folha de poliéster com os arranjos contendo RE e CE após a cura da tinta de prata. I) Remoção do vinil adesivo; J) Arranjos de eletrodos sem vinil adesivo; K) Arranjo recortado contendo eletrodo de RE e o CE com dois orifícios nas laterais. Em paralelo: G') Remoção do vinil adesivo dos arranjos de 8-WEs; H') Folha de poliéster com os arranjos de eletrodos sem vinil adesivo; I') Arranjo dos 8-WEs recortados e cartão adesivo dupla face; J') Prensa térmica e K') Arranjo colado ao cartão adesivo dupla face expondo no canal microfluídico somente os 8-WEs.

Fonte: próprio autor.

3.1.4.2 *Montagem do dispositivo microfluídico*

Como descrito anteriormente, o arranjo de 8-WEs foi colado a um lado da face do cartão adesivo. Em seguida, o arranjo com cartão adesivo foi colado à uma base impressa 3D com oito ímãs fixados exatamente nas posições referente as áreas dos 8-WEs conforme representado na FIGURA 3.3A. Ademais, o arranjo contendo o RE e CE foi colado a outra face do cartão adesivo (FIGURA 3.3B) e, após fechado, foi fixado o conector PEEK com uma fita adesiva 3M Command™ no orifício de entrada e de saída do dispositivo descartável, como mostra a FIGURA 3.2C.

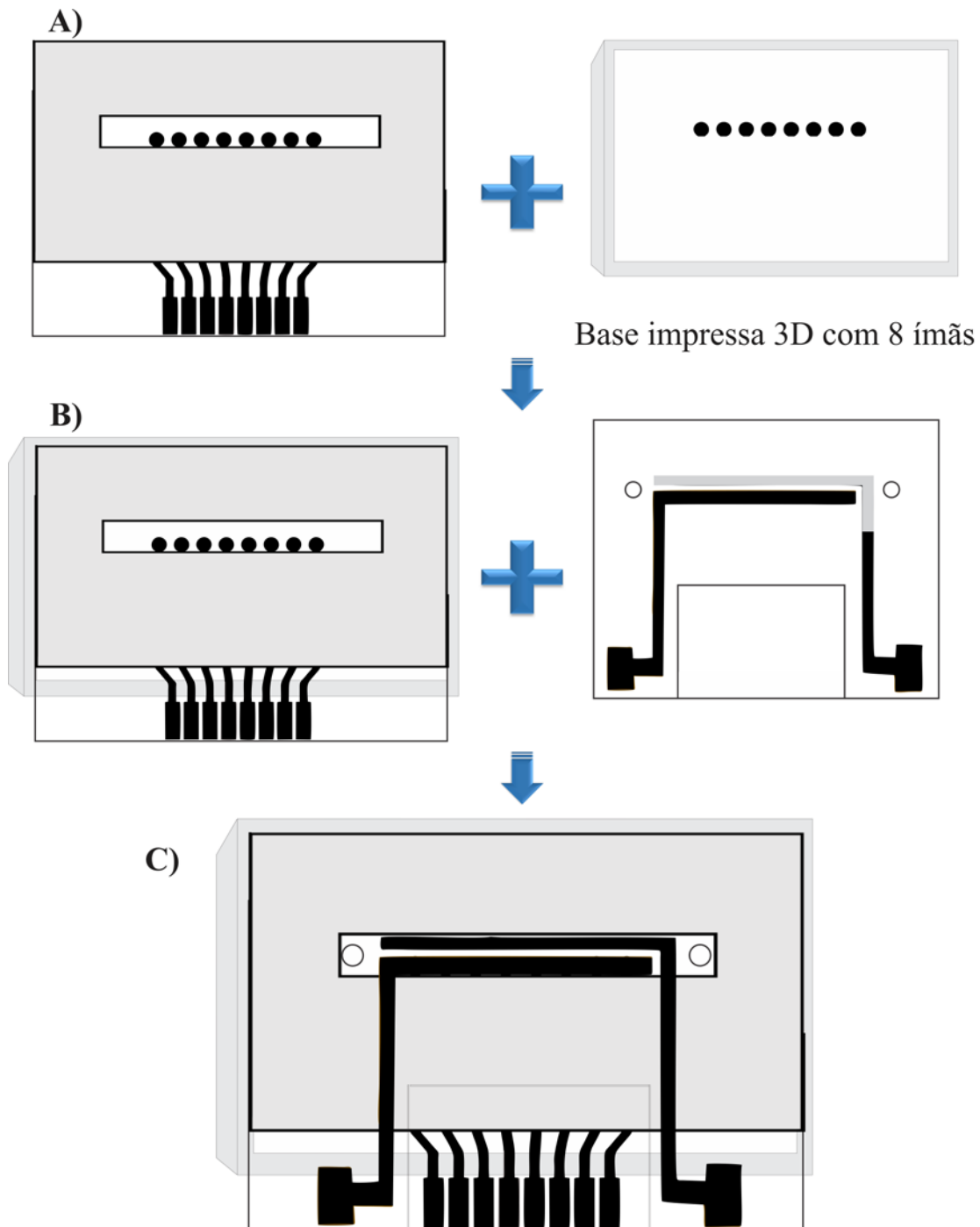


FIGURA 3.3 – Construção do dispositivo microfluídico descartável. Onde: A) Colagem entre o arranjo de 8-WEs juntamente com o cartão adesivo dupla face e a base impressa em 3D com oito ímãs; B) Colagem do dispositivo com arranjo de RE e CE; e C) Dispositivo microfluídico descartável fechado.

Fonte: próprio autor.

3.1.5 Sistema microfluídico com detecção eletroquímica

Como mostrado na FIGURA 3.4, o sistema microfluídico desenvolvido foi composto por uma bomba de seringa utilizando uma seringa de 10 mL e uma válvula cromatográfica manual de injeção, que foram conectadas ao dispositivo desenvolvido, por meio de um conector PEEK. A bomba de seringa foi empregada para controlar a vazão da solução carreadora no dispositivo microfluídico. Além disso, a bomba de seringa foi conectada a válvula manual a qual foi empregada para injeções da solução de detecção composta por H₂O₂ e HQ que posteriormente foi encaminhada até o canal microfluídico. O dispositivo também foi ligado ao multipotenciostato DropSens (ustat8000), conectado a um computador pessoal. Para as análises eletroquímicas, utilizou-se a técnica de amperometria (*software* Drop View 8400). Após a estabilização da corrente amperométrica, a solução de detecção foi injetada, gerando a resposta transiente de corrente.

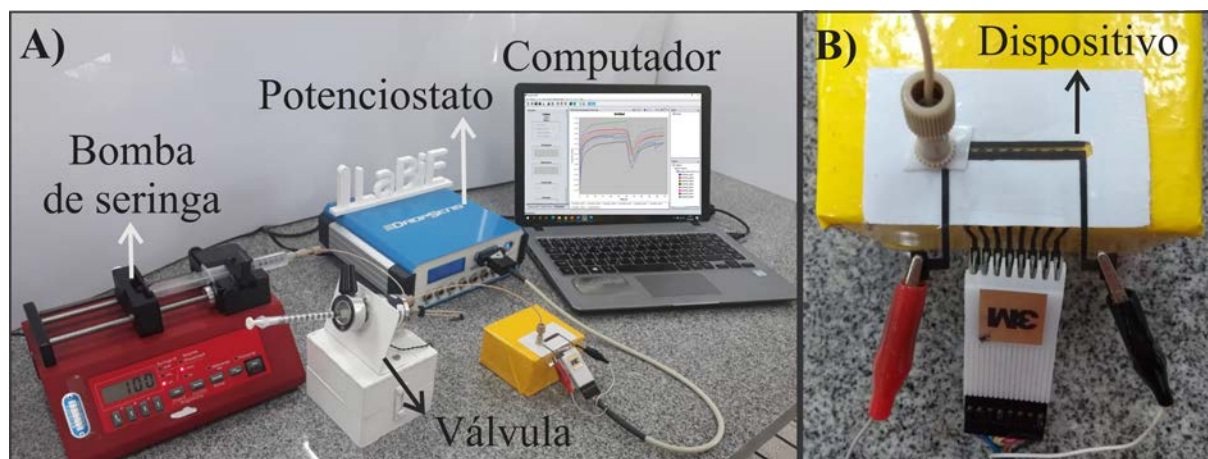


FIGURA 3.4 – Imagem do sistema microfluídico. A) Constituintes do sistema: bomba de seringa, válvula manual, multipotenciostato, computador pessoal e o dispositivo microfluídico descartável. B) Conexão elétrica do dispositivo ao cabo do potenciostato.

Fonte: próprio autor.

O potencial fixo aplicado para a detecção foi de $-0,2 \text{ V}^{205,228}$ durante um período de 900 s. Como solução carreadora, utilizou-se PBS com pH 6,5

previamente desaerado com N_2 (g), uma alça de amostragem de 100 μL e uma vazão de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ para a injeção da solução de detecção. Esta solução de detecção continha 2,0 mmol L^{-1} de HQ e 1,0 mmol L^{-1} de H_2O_2 , e a detecção baseou-se no ciclo catalítico da enzima HRP, conforme ilustrado na FIGURA 3.5. Na presença de H_2O_2 e da enzima HRP, a HQ é oxidada à p-benzoquinona (BQ), que é subsequentemente reduzida novamente à HQ na superfície do eletrodo a um potencial de $-0,2\text{ V}$, em um processo que envolve dois elétrons e dois prótons, gerando a resposta de corrente transiente utilizada como sinal analítico^{229–231}.

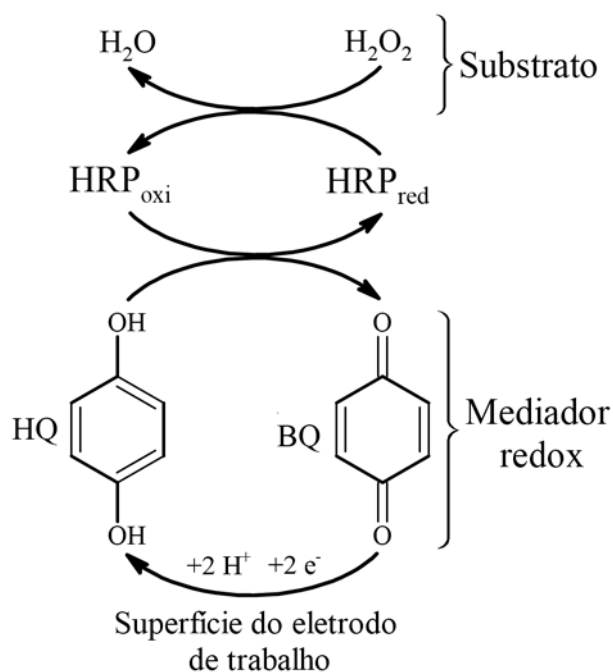


FIGURA 3.5 – Esquema do ciclo catalítico da enzima HRP. A enzima reduzida (forma nativa) é oxidada pelo H_2O_2 . Depois disso, a enzima é reduzida pelas moléculas de HQ formando moléculas de BQ que são reduzidas novamente a HQ na superfície dos eletrodos de trabalho.

Fonte: próprio autor.

3.1.6 Modificação das PMs com a proteína S do SARS-CoV-2

A modificação das PMs foi realizada seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (Polysciences, Inc) com algumas adaptações. Primeiramente, o frasco de PMs foi colocado no *Shaker* a 1000 rpm por 15 min à 25°C . Após a agitação, 100 μL de PMs comerciais foram dispersas em 1 mL de solução tampão

MES 50 mmol L⁻¹ pH 6,0; todos os processos após a agitação foram realizados em microtubos de 2 mL. As PMs foram separadas magneticamente com auxílio de um suporte magnético com ímãs fixados nas laterais. Após a separação magnética e remoção do sobrenadante, foi adicionado 1 mL de uma solução de EDC 0,4 mol L⁻¹ recém preparada em solução de NHS 0,1 mol L⁻¹ em tampão MES 50 mmol L⁻¹ pH 6,0 para ativar o grupamento carboxila, deixando em agitação suave por 30 min à temperatura ambiente. As PMs foram novamente separadas magneticamente e o sobrenadante foi descartado e lavado uma única vez com 1 mL de solução tampão MES 50 mmol L⁻¹ pH 6,0.

Após a ativação dos grupos carboxílicos, foi adicionado 1 mL uma solução de proteína S 1,0 µg mL⁻¹ preparada em PBS pH 7,4. Em seguida, a mistura foi agitada lentamente por aproximadamente 13 h à temperatura ambiente para formar o conjugado de PMs com a proteína S (PMs/proteína S). Nesta etapa, ocorre a formação de uma ligação amida entre as aminas da proteína S com os grupos carboxilas das PMs previamente ativados com o EDC/NHS. O conjugado foi separado magneticamente e lavado três vezes com 1 mL de PBS pH 7,4 com Tween 0,05%. Nas PMs/proteína S obtidas, foi adicionado 1 mL de uma solução de BSA 0,1% preparada em PBS pH 7,4 e a mistura foi agitada lentamente por 30 min. Após essa etapa, a mistura foi separada magneticamente e o sobrenadante foi descartado, seguido de três lavagens com 1 mL de PBS pH 7,4 com Tween 0,05%. Em seguida, a dispersão contendo o conjugado foi adicionado 2 mL de ETA 1,0 mmol L⁻¹ preparada em PBS pH 7,4 e foi deixando sob agitação por 1 h. Tanto BSA quanto ETA foram adicionados a fim de bloquear os sítios de ligação livres e evitar futuras ligações não específicas. Assim, o conjugado formado (PMs/proteína S) foi lavado e disperso em 500 µL de tampão PBS pH 7,4 e mantido sob refrigeração à 4°C. Na FIGURA 3.6 é mostrado a representação esquemática e resumida da modificação das PMs com a proteína S.

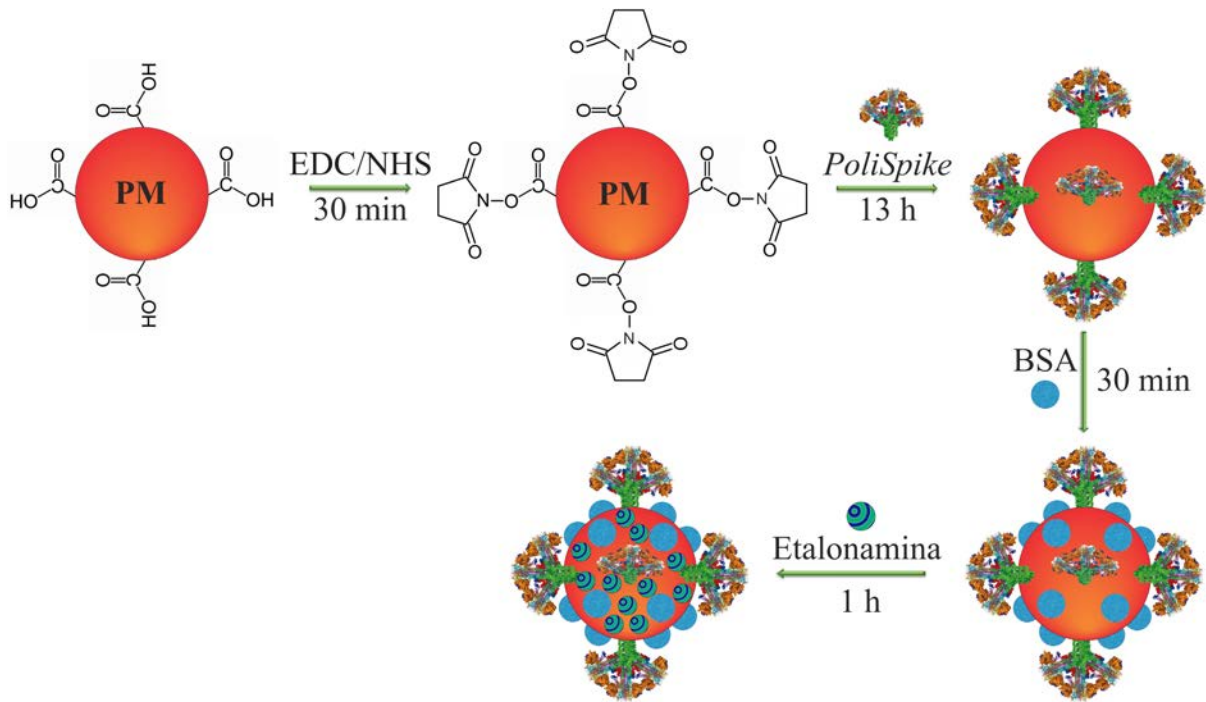


FIGURA 3.6 – Modificação das PMs funcionalizadas com grupos carboxílicos seguida da ativação das PMs com EDC/NHS sob agitação lenta por 30 min. Formado o intermediário, adição da Poli-Spike e incubação por 13 h, seguindo da adição de BSA 0,1% e ETA 1,0 mmol L⁻¹ por 30 e 60 min, respectivamente, para bloquear sítios não específicos de ligação livres afim de evitar ligações não específicas.

Fonte: próprio autor.

3.1.7 Magneto-imunoensaio para detecção de anticorpos anti-S

Para a realização do magneto-imunoensaio com anticorpos comerciais (padrão), foram adicionados 20 μL do conjugado PMs/proteína S a 480 μL de solução padrão anti-S IgG ou anti-S IgM, preparada em PBS pH 7,4, na concentração desejada. No caso das amostras de plasma humano, o mesmo volume de conjugado foi adicionado à amostra previamente diluída em PBS pH 7,4. Após a adição das PMs à solução padrão anti-S ou à amostra, a mistura foi mantida sob agitação suave por 30 min à temperatura ambiente para a captura dos anticorpos alvo. Em seguida, o bioconjugado PMs/proteína S/anti-S foi separado magneticamente e lavado três vezes com 500 μL de PBS pH 7,4 com Tween 0,05%. O esquema do processo de captura do anticorpo de interesse na solução padrão/amostra está apresentado na FIGURA 3.7A.

Após a etapa de lavagem do bioconjugado, o sobrenadante foi removido e descartado, sendo adicionados 500 μL de uma solução de anti-Ig/HRP 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (podendo ser anti-IgG ou anti-IgM) preparada em PBS pH 6,5. A mistura foi então submetida a agitação suave por 30 min para formar o bioconjugado final PMs/proteína S/anti-S/anti-Ig/HRP, conforme ilustrado na FIGURA 3.7B. Em seguida, o bioconjugado foi separado magneticamente, o sobrenadante foi descartado e foram realizadas três lavagens com 500 μL de PBS pH 6,5 com Tween 0,05%. Por fim, o bioconjugado foi suspenso em 60 μL de PBS pH 6,5.

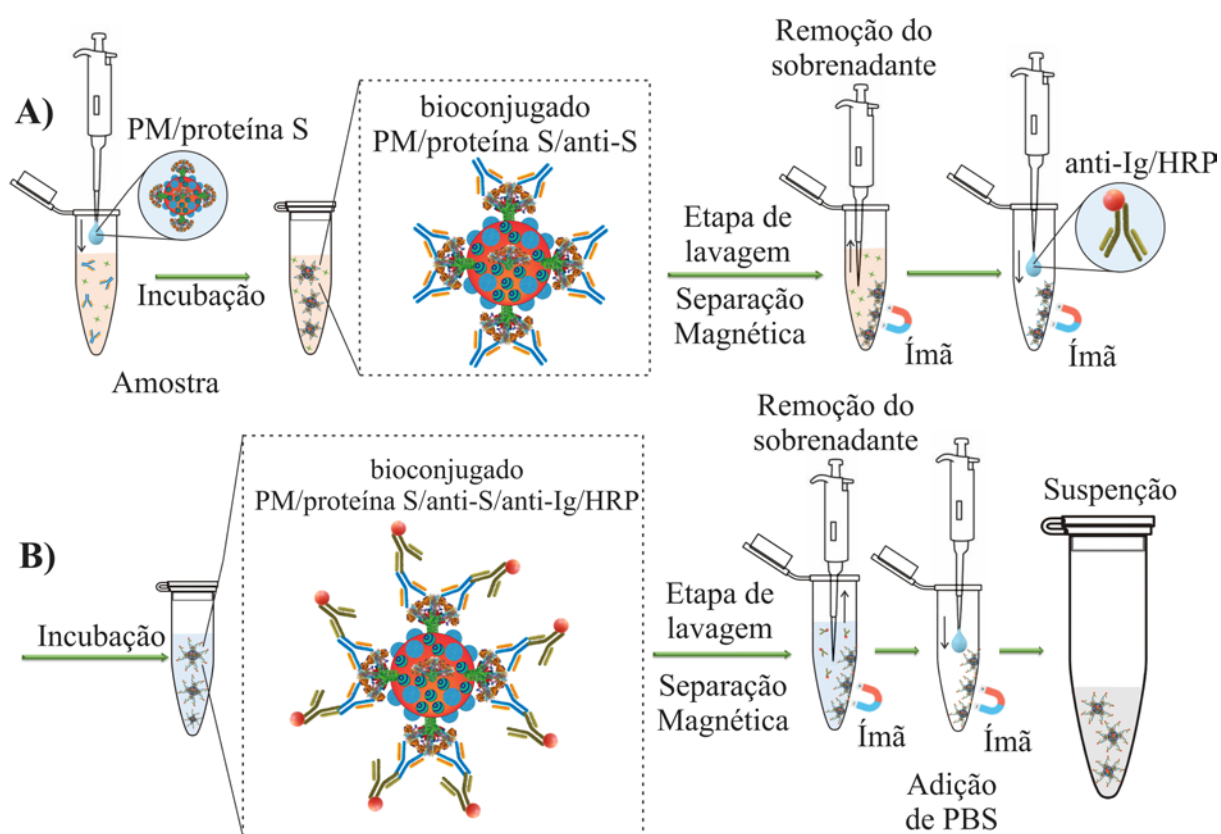


FIGURA 3.7 – Etapas do magneto-imunoensaio desenvolvido. A) Adição das PMs modificadas para captura dos anticorpos alvo, seguido pela separação magnética, lavagem das PMs e adição de anti-Ig/HRP. B) Incubação para formação do bioconjugado final seguido pela separação magnética, lavagem e suspensão das partículas.

Fonte: próprio autor.

Como descrito anteriormente, o arranjo com 8-WEs aderidos ao cartão adesivo dupla face foi colado a base construída em impressora 3D de modo a permitir que os ímãs ficassem alinhados a cada um dos 8-WEs. Em seguida, foi adicionado manualmente 3 μL do bioconjugado PMs/proteína S/anti-S/anti-Ig/HRP na superfície de cada eletrodo e o dispositivo foi fechado. Após conectar os tubos PEEK, o fluxo da solução carregadora foi iniciado e mantido até o final da medida em uma vazão constante.

3.1.8 Estudo de repetibilidade

A precisão do método foi avaliada por meio de duas abordagens distintas: a análise de cinco réplicas de dispositivos construídos no mesmo dia (intradia); e a análise de cinco réplicas de dispositivos, cada um fabricado em dias distintos (interdia). Em cada dispositivo, foram escolhidas seis réplicas ($n = 6$) entre os 8-WEs. Os resultados obtidos foram expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR) em porcentagem conforme definido pela EQUAÇÃO 3.1, sendo: DP o desvio padrão e \bar{X} a média.

$$\text{DPR (\%)} = \left(DP / \bar{X} \right) \times 100 \quad (\text{EQUAÇÃO 3.1})$$

3.1.9 Avaliação da reatividade cruzada

A investigação sobre a seletividade dos anticorpos anti-IgG/HRP para a detecção de anticorpos anti-S IgG envolveu a incubação do conjugado PMs/proteína S em várias soluções padrão contendo os anticorpos anti-S IgM, anti-N IgG e anti-N IgM. O objetivo deste estudo foi demonstrar que o anticorpo anti-IgG/HRP não se liga a anticorpos IgM ou IgG inespecíficos.

De maneira análoga, foi realizada uma avaliação da seletividade dos anticorpos anti-IgM/HRP aos anticorpos anti-S IgM. As PMs modificadas foram expostas a uma solução padrão contendo os anticorpos anti-S IgG, anti-N IgG e anti-N IgM. Os experimentos empregados para a avaliação da reação cruzada são

apresentados na Tabela 3.1. Experimentos de magneto-imunoensaio foram conduzidos na ausência de anticorpos na solução padrão (branco), a fim de fornecer controle experimental e possibilitar a comparação dos resultados obtidos.

TABELA 3.1 – Experimentos realizados para o teste de reação cruzada para anticorpos anti-IgG/HRP e anti-IgM/HRP.

Conjugado adicionado	Solução padrão de anticorpos (100 fg mL⁻¹)	Anti-Ig/HRP (10 µg mL⁻¹)	Resposta esperada
PMs/proteína S	-	Anti-IgG/HRP	branco 1
PMs/proteína S	anti-S IgM	Anti-IgG/HRP	= branco 1
PMs/proteína S	anti-N IgG	Anti-IgG/HRP	= branco 1
PMs/proteína S	anti-N IgM	Anti-IgG/HRP	= branco 1
PMs/proteína S	anti-S IgG	Anti-IgG/HRP	> branco 1
PMs/proteína S	-	Anti-IgM/HRP	branco 2
PMs/proteína S	anti-S IgG	Anti-IgM/HRP	= branco 2
PMs/proteína S	anti-N IgG	Anti-IgM/HRP	= branco 2
PMs/proteína S	anti-S IgM	Anti-IgM/HRP	> branco 2

3.1.10 Avaliação da capacidade do magneto-imunoensaio para o diagnóstico da COVID-19

O magneto-imunoensaio foi aplicado a 36 amostras de plasma de indivíduos diagnosticados por RT-PCR. As amostras foram classificadas em dois grupos: indivíduos saudáveis (CT, controle) e pacientes positivos para COVID-19 (PC). Todas as amostras de plasma foram coletadas no mês de maio de 2021 e fornecidas pelo Departamento de Medicina da UFSCar (DMed) de São Carlos, sendo armazenadas a -80°C até o momento do uso. Além disso, 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).

Os ensaios para detecção de anticorpos nas amostras foram realizados em um Laboratório de Biossegurança Nível 2. O método foi desenvolvido para ser aplicado diretamente em amostras de plasma sem tratamento térmico, a fim de evitar a redução significativa da quantidade de anticorpos^{232,233}. Cada amostra foi analisada utilizando um dispositivo e descartado como lixo infectante e separados para coleta e tratamento adequado pelo órgão responsável.

A curva ROC (do inglês *Receiver Operating Characteristic*) foi então construída para avaliar a capacidade do magneto-imunoensaio desenvolvido para o diagnóstico clínico. Esta análise permitiu a avaliação conjunta da sensibilidade (verdadeiros positivos) e especificidade (verdadeiros negativos), estabelecendo um valor de corte para diferenciar entre os diagnósticos (verdadeiros positivos, falsos positivos, verdadeiros negativos e falsos negativos). Para construir a curva ROC, plota-se a sensibilidade em função de 100-especificidade (falsos positivos) para uma série de valores de "ponto de corte"²³⁴. A sensibilidade (EQUAÇÃO 3.2) representa a capacidade do teste de identificar corretamente as amostras de pacientes com a doença, enquanto a especificidade (EQUAÇÃO 3.3) reflete a capacidade de identificar corretamente as amostras de indivíduos saudáveis.

$$\text{Sensibilidade (100\%)} = \frac{(\text{Verdadeiros Positivos})}{(\text{Falsos Negativos} + \text{Falsos Positivos})}$$

(EQUAÇÃO 3.2)

$$100\text{-Especificidade (\%)} = \frac{(\text{Falsos positivos})}{(\text{Verdadeiros Negativos} + \text{Falsos Positivos})}$$

(EQUAÇÃO 3.3)

A área sob a curva ROC (AUC; do inglês *Area Under the Curve*) é utilizada como um parâmetro para determinar a precisão do teste diagnóstico²³⁵. Valores de AUC próximo de 0,5 sugere nenhuma discriminação, indicando que o

teste não consegue diferenciar pacientes com e sem a doença. Valores entre 0,7 e 0,8 são considerados aceitáveis, entre 0,8 e 0,9 são considerados bons, e valores acima de 0,9 são considerados excelentes. Quanto mais próximo o valor da AUC estiver de 1, maior é a eficiência do método em diferenciar indivíduos positivos e negativos²³⁶. Ademais, as análises dos resultados do magneto-imunoensaio foram realizadas utilizando os softwares MedCalc e OriginPro 8.6.

3.1.11 *Normalização das respostas de sinal de corrente transiente*

Para todos os estudos realizados neste trabalho, foram sempre realizados experimentos na presença e na ausência de anticorpos anti-S, com o objetivo de minimizar as variações de corrente entre diferentes dias de análise. Nos estudos de otimização, as medições foram realizadas na presença e na ausência (branco) do padrão de anticorpo anti-S IgG, e os resultados foram normalizados conforme a EQUAÇÃO 3.4. Para a realização do ensaio referente ao branco, o conjugado PMs/proteína S foi incubado apenas com tampão PBS pH 7,4, sem a presença de anticorpos anti-S. Em seguida, as partículas foram incubadas com anti-Ig/HRP e, finalmente, suspensas em um volume de 60 μ L.

$$-\Delta I \text{ (nA)} = I_{\text{branco}} - I_{\text{padrão}} \quad (\text{EQUAÇÃO 3.4})$$

Nos estudos com amostras de plasma humano, foram realizadas medições das amostras (controle e positivo) e a do branco, e os resultados foram normalizados conforme a EQUAÇÃO 3.5.

$$-\Delta I \text{ (nA)} = I_{\text{branco}} - I_{\text{amostra}} \quad (\text{EQUAÇÃO 3.5})$$

3.2 Resultados e discussão

3.2.1 Otimização das condições experimentais

3.2.1.1 Estudo da etapa de bloqueio das PMs

Primeiramente, foi avaliada a etapa de bloqueio do conjugado PMs/proteína S, conforme apresentado na FIGURA 3.8. A etapa de bloqueio é de extrema importância para a modificação das PMs, pois minimiza ligações inespecíficas e o magneto-imunoensaio pode discriminar de forma eficiente o sinal do branco do sinal obtido na presença de anticorpos anti-S IgG. Para a realização deste estudo, foram avaliados três métodos de bloqueio: utilizando apenas uma etapa com BSA 0,1% preparado em PBS pH 7,4 por 30 min, utilizando apenas uma etapa com ETA 1,0 mmol L⁻¹ preparada em PBS pH 7,4 por 1 h, e utilizando duas etapas consecutivas. No método de duas etapas, o bloqueio foi iniciado com uma solução de BSA 0,1% em PBS pH 7,4 por 30 min, seguido da adição de uma solução de ETA 1 mmol L⁻¹ em PBS pH 7,4 por 1 h. Os resultados obtidos são apresentados na FIGURA 3.8.

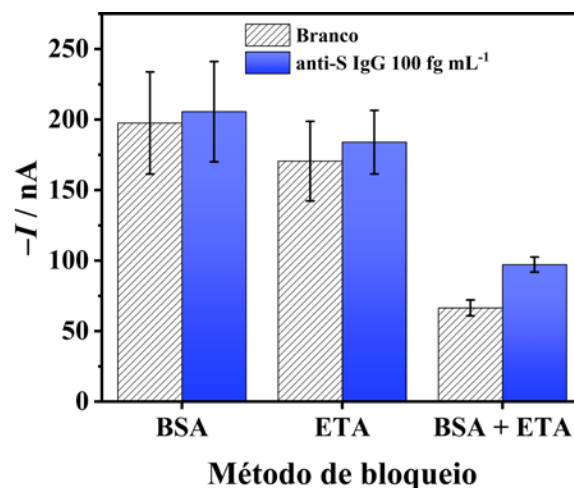


FIGURA 3.8 – Gráfico de barras dos sinais de correntes obtidas ($n = 6$) para os métodos de bloqueio das PMs testados na ausência (■) e na presença (■) de 100 fg mL⁻¹ de anti-S IgG. Parâmetros utilizados: [H₂O₂] = 1,0 mmol L⁻¹, [HQ] = 2,0 mmol L⁻¹, volume da alça de amostragem = 50 µL, vazão = 100 µL min⁻¹, tempo de incubação PMs/proteína S + anti-S IgG = 30 min e tempo de incubação PMs/proteína S/anti-S IgG + anti-IgG/HRP = 30 min.

Fonte: próprio autor.

De acordo com a FIGURA 3.8, observa-se que o sinal de corrente, tanto do branco quanto do padrão, diminuiu quando o bloqueio das PMs foi realizado com BSA e ETA consecutivamente. Além disso, este foi o único método capaz de discriminar efetivamente o sinal do branco do sinal do padrão. Com base nessa observação, supõe-se que os métodos que empregaram apenas uma etapa de bloqueio não foram eficazes, pois as moléculas de BSA e ETA não conseguiram bloquear totalmente os sítios ativos nas PMs. Dessa forma, mesmo sem a presença de anticorpos anti-S IgG, os anticorpos anti-IgG/HRP puderam se ligar às PMs através de sítios ativos não bloqueados adequadamente.

As moléculas de BSA (~66,8 kDa)²³⁷ são grandes e conseguem bloquear espaços disponíveis entre os sítios ativos, mas ainda deixam pequenos espaços livres. Por outro lado, a molécula de ETA, sendo menor, não é capaz de bloquear todas as regiões dos sítios ativos sozinha. Assim, dentre os três métodos utilizados para o bloqueio das PMs, o método que emprega BSA a 0,1% seguido de ETA a 1,0 mmol L⁻¹ foi o mais eficiente para discriminar o sinal de corrente do branco do sinal de corrente do magneto-imunoensaio na presença de anti-S IgG. Portanto, este método foi adotado para a modificação das PMs.

3.2.1.2 *Estabilidade do conjugado PMs/proteína S*

Determinado as condições de bloqueio, foi avaliada a estabilidade do conjugado PMs/proteína S. Para esse e demais estudos, os eletrodos foram serigrafados um dia antes da análise e seis réplicas entre os 8-WEs de cada dispositivo foram escolhidas para determinar o valor médio de $-\Delta I$. Um único lote de PMs modificadas foi utilizado ao longo de 20 dias, sendo que os magneto-imunoensaios com os anticorpos anti-S IgG e anti-IgG/HRP foram realizados no próprio dia da análise. Os tempos de incubação de cada etapa do imunoensaio foram de 30 min cada um. Ademais, um volume da alça de amostragem de 50 μL e uma vazão de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ foram utilizadas para a realização deste estudo. Na

FIGURA 3.9 é apresentado os valores de correntes obtidas a cada dia para os ensaios realizados sem e com 100 fg mL^{-1} de anti-S IgG.

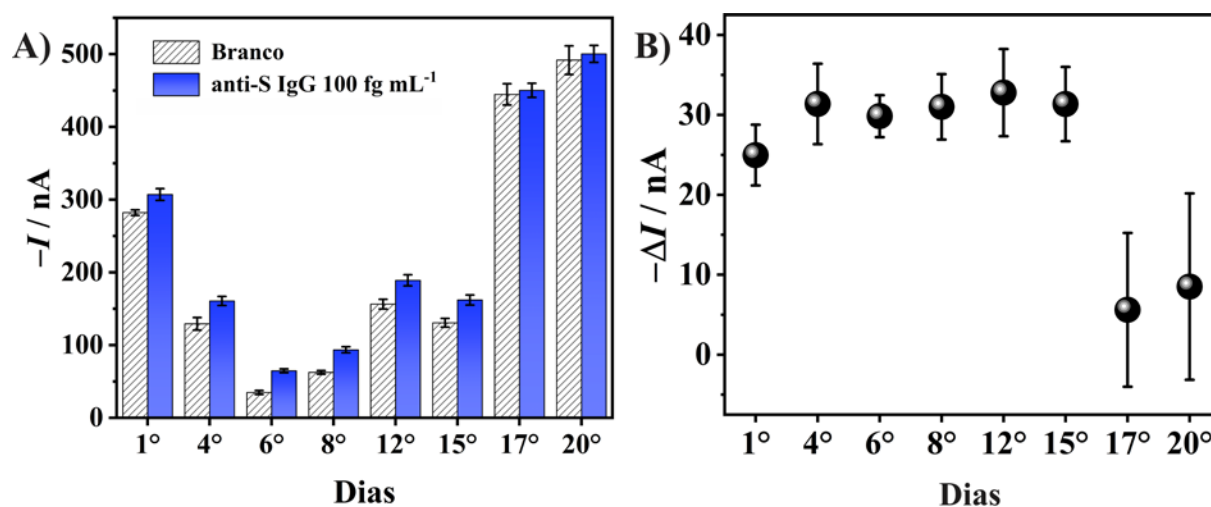


FIGURA 3.9 – A) Valores de correntes transiente obtidas ($n = 6$) para análises de ensaios realizados sem (■) e com 100 fg mL^{-1} de anti-S (■) dentro de vinte dias diferentes. B) Diferença de corrente obtidos no estudo de estabilidade do conjugado. Parâmetros utilizados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{HQ}] = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, volume da alça de amostragem = $50 \mu\text{L}$, vazão = $100 \mu\text{L min}^{-1}$, tempo de incubação PMS/proteína S + anti-S IgG = 30 min e tempo de incubação PMS/proteína S/anti-S IgG + anti-IgG/HRP = 30 min.

Fonte: próprio autor.

Na FIGURA 3.9 observa-se que o sinal de corrente transiente variou diariamente, apresentando uma amplitude entre aproximadamente 30 e 300 nA. No entanto, ao analisar a diferença de corrente entre o branco (■) e o padrão (■), verifica-se que os valores de $-\Delta I$ se mantiveram constantes em $30 \pm 4 \text{ nA}$ durante os 15 dias de análise, com um DPR de 15%, que é o limite reportado na literatura como aceitável para imunoenaios²³⁸. Esses resultados evidenciam a importância da medição do sinal do branco em todas as análises e reforçam a necessidade de trabalhar com a diferença de corrente $-\Delta I$ em vez do sinal de corrente medido ($-I$) devido às flutuações do sinal observadas em diferentes dias de análise.

Além disso, com base na FIGURA 3.9, observa-se que as PMS modificadas com proteína S podem ser utilizadas para a realização do magneto-

imunoensaio por até 15 dias. Após esse período, nota-se um aumento na corrente para as medições na presença e ausência de anticorpos anti-S IgG. Além disso, o ensaio se torna incapaz de diferenciar o sinal de corrente do branco do sinal obtido na presença dos anticorpos alvos. Este comportamento pode ser atribuído ao tempo e à temperatura em que as proteínas imobilizadas na superfície das PMs foram armazenadas. O estoque de PMs/proteína S foi mantido por 20 dias a 4°C. Assim, conclui-se que o armazenamento do conjugado PMs/proteína S por períodos prolongados resultou possivelmente na desnaturação da proteína S²³⁹. Isso pode ter afetado diretamente a ligação antígeno-anticorpo, comprometendo a capacidade de distinguir o sinal de corrente do branco do sinal obtido na presença dos anticorpos alvos.

3.2.1.3 *Otimização do volume da alça de amostragem*

Após a avaliação da estabilidade do conjugado PMs/proteína S, iniciou-se a otimização do método proposto, começando pelo volume da alça de amostragem empregada na válvula do sistema microfluídico. O volume da solução de detecção contendo H₂O₂ e HQ injetado no canal microfluídico é diretamente influenciado pelo volume da alça de amostragem utilizada na válvula manual do sistema microfluídico. Para determinar qual alça resultaria em melhores respostas, foram avaliadas as alças de amostragem com volumes de 20, 50 e 100 µL para a detecção de anticorpos anti-S IgG.

Na otimização do volume da alça de amostragem, as concentrações de H₂O₂ e HQ foram fixados em 1,0 e 2,0 mmol L⁻¹, respectivamente. A vazão da bomba de seringa foi mantida em 100 uL min⁻¹ e tanto o tempo de incubação de PMs/proteína S com anti-S IgG quanto o tempo de incubação de PMs/proteína S/anti-S IgG com anti-IgG/HRP foram fixados em 30 min. Na FIGURA 3.10A, são apresentadas as correntes transientes registradas na ausência (—) e presença (—) de 100 fg mL⁻¹ de anti-S IgG para os diferentes volumes da alça de

amostragem. Na FIGURA 3.10B, é apresentado o gráfico de barras correlacionando a diferença de corrente com os volumes das alças de amostragem.

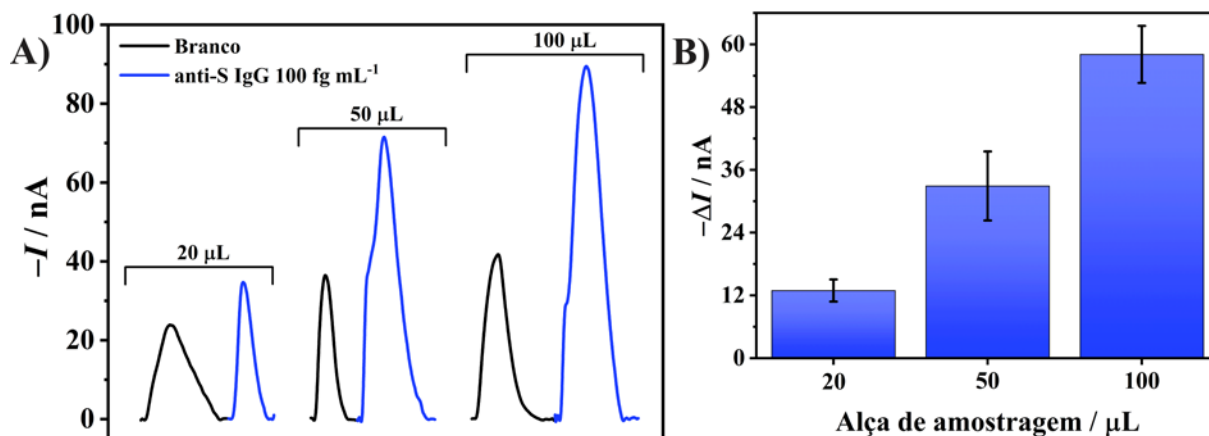


FIGURA 3.10 – A) Respostas de correntes transientes referentes ao branco (—) e a 100 fg mL⁻¹ anti-S (—) para diferentes volumes da alça de amostragem. B) Gráficos de barras correlacionado $-\Delta I$ ($n = 6$) com os volumes da alça de amostragem. Parâmetros utilizados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{HQ}] = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, vazão = 100 $\mu\text{L min}^{-1}$, tempo de incubação PMs/proteína S + anti-S IgG = 30 min e tempo de incubação PMs/proteína S/anti-S IgG + anti-IgG/HRP = 30 min.

Fonte: próprio autor.

Conforme observado na FIGURA 3.10A, a magnitude do sinal de corrente transiente do padrão aumentou com o incremento do volume da alça de amostragem. Esse comportamento pode ser explicado pela maior produção de BQ, que é reduzida a HQ na superfície dos eletrodos. Com maiores quantidades de substrato e mediador redox presentes no canal microfluídico, houve uma ampliação do ciclo catalítico da enzima HRP, resultando em um sinal registrado mais intenso.

Para o sinal de corrente transiente do branco, observou-se um leve aumento. Isso pode ocorrer porque as PMs conjugadas são incubadas sem anti-S IgG, mas depois são incubadas na presença de anti-IgG/HRP. Alguns anticorpos conjugados com a enzima HRP podem se ligar de forma não específica às PMs, permitindo que o ciclo catalítico da enzima ocorra da mesma forma. Por esse

motivo, o valor de corrente do branco é descontado do sinal de corrente obtido na presença do anti-S IgG.

O aumento do volume da alça de amostragem não apenas proporcionou um aumento do sinal de corrente transiente, mas também resultou em sinais mais largos, conforme mostrado na FIGURA 3.10A. Para a alça de 20 μL , foram necessários 120 s para a corrente voltar a estabilizar na linha de base; para a alça de 50 μL e de 100 μL , foram necessários 180 e 220 s, respectivamente. Esse comportamento também pode ser explicado pela quantidade de substrato e mediador redox injetados no canal microfluídico. Quanto maior o volume da alça de amostragem, mais da solução de detecção passa pelo canal microfluídico do dispositivo e, conseqüentemente, mais tempo é necessário para atravessá-lo.

Além disso, na FIGURA 3.10B nota-se que maiores valores de $-\Delta I$ foram obtidos à medida que foi aumentado o volume da alça de amostragem. Foi obtido um $-\Delta I$ de 13 ± 2 nA para a alça de 20 μL , 33 ± 7 nA para a alça de 50 μL e 58 ± 5 nA para a alça de 100 μL . Os valores de $-\Delta I$ e DP foram calculados após selecionar as seis primeiras réplicas dos 8-WEs. Portanto, para garantir maior magnitude de corrente nos estudos subsequentes, a alça de 100 μL foi escolhida como a ideal para a continuidade do trabalho.

3.2.1.4 Otimização da vazão

Determinado o melhor volume da alça de amostragem para detecção de anticorpos anti-S IgG, foram avaliadas três vazões da bomba de seringa: 50, 100 e 150 $\mu\text{L min}^{-1}$, conforme ilustrado na FIGURA 3.11. Na otimização da vazão, as concentrações de H_2O_2 e HQ foram fixadas em 1,0 e 2,0 mmol L^{-1} , respectivamente. Tanto o tempo de incubação de PMs/proteína S com anti-S IgG quanto o tempo de incubação de PMs/proteína S/anti-S IgG com anti-IgG/HRP foram fixados em 30 min cada um, e o volume da alça de amostragem foi mantido em 100 μL . Na FIGURA 3.11A, são apresentadas as correntes transientes registradas na ausência (—) e na presença (—) de 100 fg mL^{-1} de anti-S IgG para

as diferentes vazões. A FIGURA 3.11B mostra a diferença de corrente para cada vazão estudada.

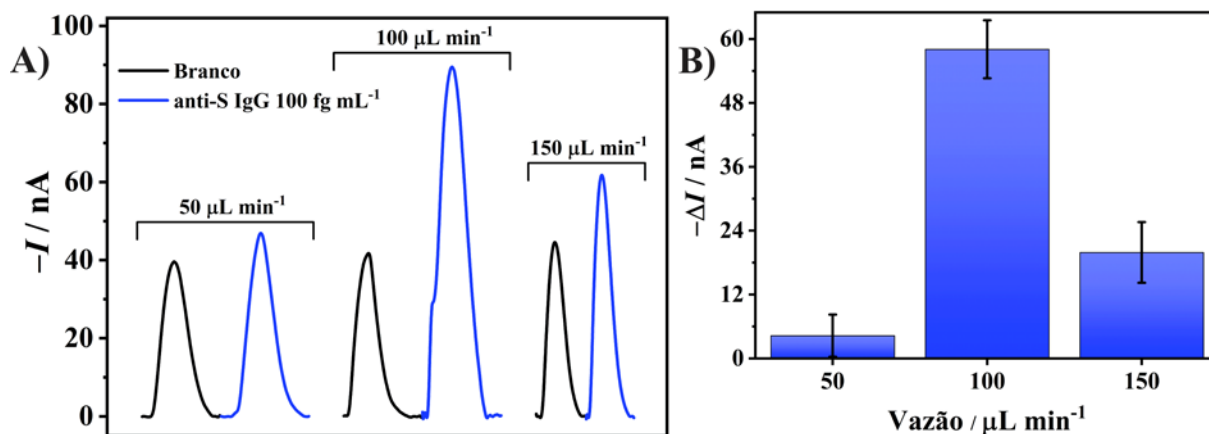


FIGURA 3.11 – A) Sinais de correntes transientes referentes a branco (—) e a 100 fg mL^{-1} anti-S (—) para vazão de 50, 100 e 150 μL min^{-1} . B) Gráficos de barras correlacionado $-\Delta I$ ($n = 6$) com as vazões estudadas. Parâmetros utilizados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{HQ}] = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, volume da alça de amostragem = 100 μL , tempo de incubação PMs/proteína S + anti-S IgG = 30 min e tempo de incubação PMs/proteína S/anti-S IgG + anti-IgG/HRP = 30 min.

Fonte: próprio autor.

Conforme apresentado na FIGURA 3.11A, para a vazão de 50 μL min^{-1} , foi obtida uma corrente transiente mais larga (241 s) e de menor magnitude na presença de 100 fg mL^{-1} de anti-S IgG. Esse comportamento pode ser observado devido a menor taxa de redução de BQ em HQ na superfície do eletrodo devido ao fluxo laminar. Com a menor vazão, há uma menor reposição dos reagentes na superfície do eletrodo quando comparado com uma maior vazão.

Por outro lado, em uma vazão de 150 μL min^{-1} , foi observado também um sinal de corrente transiente de baixa magnitude e um perfil mais estreito (150 s) do que os demais. Supõe-se que, devido à vazão ser alta, o ciclo catalítico da enzima não ocorreu de forma significativa, resultando em uma resposta de corrente transiente de menor magnitude devido ao tempo de retenção muito baixo da solução de detecção dentro do canal microfluídico. Além disso,

pode-se perceber que a vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ foi a que exibiu a maior resposta de corrente na presença de anticorpos anti-S IgG.

Com base na FIGURA 3.11A, nota-se também que, para as vazões estudadas, a magnitude de corrente dos brancos não foi afetada, apenas o perfil de corrente transiente foi alterado. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que as PMs sem o alvo têm a mesma taxa de erro para ligações inespecíficas quando incubadas com anticorpos anti-IgG/HRP, de modo que a vazão não altera a magnitude de corrente do branco.

Finalmente, na FIGURA 3.11B é apresentado a diferença de corrente obtida para cada vazão estudada. Para a vazão de $50 \mu\text{L min}^{-1}$, foi obtido um $-\Delta I$ de $4 \pm 4 \text{ nA}$, enquanto para a vazão de $150 \mu\text{L min}^{-1}$ foi obtido um $-\Delta I$ de $20 \pm 6 \text{ nA}$. A vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ apresentou um $-\Delta I$ de $58 \pm 6 \text{ nA}$, corroborando com os estudos anteriores. Nesse sentido, a vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ foi escolhida como a ideal para os demais estudos.

3.2.1.5 *Otimização do tempo de incubação PMs/proteína S + anti-S IgG*

Após a otimização no sistema microfluídico, foram estudados os tempos de incubação. A incubação entre o conjugado PMs/proteína S e os anticorpos anti-S IgG reflete a duração necessária para que as PMs modificadas com proteínas S capturem os anticorpos IgG presentes na solução. Nesse sentido, foram investigados tempos de incubação de 15, 30, 45 e 60 min, com os resultados apresentados na FIGURA 3.12. Neste estudo, o tempo de incubação do bioconjugado PMs/proteína S/anti-S IgG com anticorpos anti-IgG/HRP foi mantido fixo em 30 min. A FIGURA 3.12A mostra as correntes transientes registradas na ausência (—) e presença (—) de 100 fg mL^{-1} de anti-S IgG, enquanto a FIGURA 3.12B exhibe a diferença de corrente obtida para cada tempo de incubação estudado.

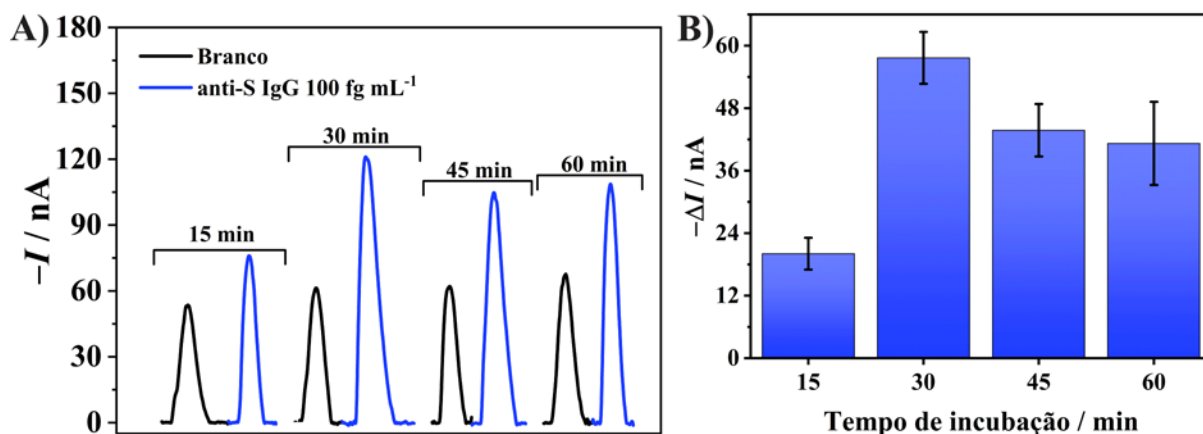


FIGURA 3.12 – A) Sinais de correntes transientes referentes a branco (—) e a 100 fg mL^{-1} anti-S (—) para tempos de incubação de 15, 30, 45 e 60 min. B) Gráficos de barras correlacionado $-\Delta I$ ($n = 6$) com os tempos de incubação estudados. Parâmetros utilizados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{HQ}] = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, volume da alça de amostragem = $100 \mu\text{L}$, vazão = $100 \mu\text{L min}^{-1}$ e tempo de incubação PMs/proteína S/ anti-S IgG + anti-IgG/HRP = 30 min.

Fonte: próprio autor.

Na FIGURA 3.12A, observa-se que houve um aumento na corrente ao comparar os tempos de incubação de 15 e 30 min. No entanto, para os tempos de 45 e 60 min, a magnitude da corrente transiente não apenas diminuiu, mas também se manteve constante. Com base nessa observação, conclui-se que o tempo de incubação de 15 min não foi suficiente para que o conjugado modificado capturasse todos os anticorpos anti-S IgG presentes na solução. Além disso, nota-se que o tempo necessário para obter uma maior magnitude de corrente transiente foi 30 min de incubação.

Contudo, para os tempos de 45 e 60 min, supõe-se que as longas incubações entre o conjugado PMs/proteína S e os anticorpos alvo resultaram na captura de uma quantidade significativa de anticorpos pelas PMs. Entretanto, devido à alta quantidade de anticorpos anti-S IgG capturados, os anticorpos marcados adicionados na segunda incubação provavelmente enfrentaram competitividade para se ligarem aos anticorpos alvos já capturados, o que explicaria a diminuição na corrente transiente registrada.

Além disso, na FIGURA 3.12A, percebe-se que as respostas de corrente transiente para os brancos foram praticamente iguais em todos os tempos de incubação estudados. Isso pode ter ocorrido porque as PMs foram incubadas inicialmente apenas com solução de PBS pH 7,4 e posteriormente com os anticorpos anti-IgG/HRP. Dessa forma, a taxa de ligação não específica dos anticorpos marcados nas PMs manteve-se constante, resultando na mesma magnitude de corrente para os brancos.

Por fim, na FIGURA 3.12B, nota-se a diferença de corrente obtida para os diferentes tempos de incubação estudados. Observa-se claramente que o tempo de incubação de 30 min apresentou a maior resposta de $-\Delta I$, na ordem de 62 ± 3 nA, sendo essa condição escolhida como a ótima para os demais estudos desenvolvidos.

3.2.1.6 *Otimização do tempo de incubação PMs/proteína S/anti-S IgG + anti-IgG/HRP*

O tempo de incubação entre o bioconjugado PMs/proteína S/anti-S IgG e os anticorpos anti-IgG/HRP reflete a duração necessária para que os anticorpos anti-S IgG capturados pelas PMs sejam reconhecidos pelos anticorpos anti-IgG/HRP. A FIGURA 3.13A mostra as correntes transientes registradas tanto para o branco (—) quanto para a detecção de 100 fg mL^{-1} de anti-S IgG (—) para tempos de incubação de 15, 30, 45 e 60 min. A FIGURA 3.13B exibe a diferença de corrente obtida para cada tempo de incubação estudado.

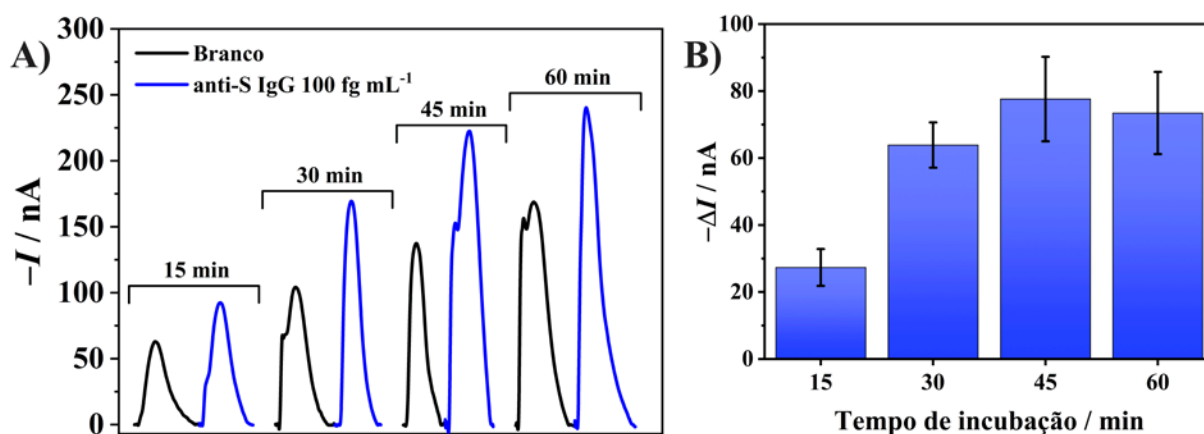


FIGURA 3.13 – A) Sinais de correntes transientes referentes a branco (—) e a 100 fg mL⁻¹ anti-S (—) para tempos de incubação de 15, 30, 45 e 60 min. B) Gráficos de barras correlacionado $-\Delta I$ ($n = 6$) com os tempos de incubação estudados. Parâmetros utilizados: $[H_2O_2] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[HQ] = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, volume da alça de amostragem = 100 μL , vazão = 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ e tempo de incubação PMs/proteína S + anti-S IgG = 30 min.

Fonte: próprio autor.

Na FIGURA 3.13A, observa-se que o tempo de incubação entre o bioconjugado com os anticorpos alvos já capturados e os anticorpos marcados com a enzima HRP influenciou diretamente a magnitude da corrente transiente registrada. É possível notar que, para o tempo de 15 min, o sinal de corrente foi menor, indicando que o tempo de incubação foi insuficiente para a ligação e reconhecimento eficazes de todos os anticorpos marcados presentes na solução. Além disso, percebe-se um aumento da corrente à medida que maiores tempos de incubação foram testados. Contudo, esse aumento foi observado tanto para os brancos (—) quanto para a detecção de anticorpos anti-S IgG (—). O aumento de corrente nos brancos pode ser explicado pelo fato de que o conjugado PMs/proteína S foi mantido na presença de anti-IgG/HRP por mais tempo, aumentando assim a taxa de ligação não específica dos anticorpos marcados nas PMs.

Na FIGURA 3.13B é ilustrado de forma mais clara o incremento da resposta nos primeiros 45 min, com valores de $-\Delta I$ de $27 \pm 6 \text{ nA}$ para 15 min, $64 \pm 7 \text{ nA}$ para 30 min e $78 \pm 13 \text{ nA}$ para 45 min. No entanto, para o tempo de

incubação de 60 min, foi observada uma estabilidade no sinal ($-\Delta I$ de 73 ± 12 nA), indicando que tempos superiores a 45 min não proporcionam uma captura significativamente maior de anticorpos presentes na solução. Com base na FIGURA 3.13B, a maior diferença de corrente foi obtida para o tempo de incubação de 45 min. Entretanto, devido ao alto valor de DPR de 16% para essa condição, foi escolhido o tempo de incubação de 30 min como ideal para os demais estudos, pois apresentou um DPR apenas de 11%. Além disso, a escolha do tempo de 30 min foi justificada pela ausência de grandes diferenças de $-\Delta I$ entre os tempos de 30 e 45 min.

3.2.2 Curva analítica

Após a otimização dos parâmetros, o magneto-imunoensaio proposto foi aplicado em soluções padrão contendo concentrações variadas de anticorpos anti-S IgG. Em cada medida realizada, foi utilizado um novo dispositivo, que foi descartado logo após a análise. As respostas amperométricas resultantes estão representadas na FIGURA 3.14A e a partir destas pode-se observar uma correlação linear entre a diferença do sinal de corrente transiente e a concentração de anticorpos na faixa de 0,01 a 10.000 fg mL⁻¹, conforme ilustrado na FIGURA 3.14B.

A equação de regressão linear derivada é expressa da seguinte forma: $-\Delta I / \text{nA} = -219,18 - 11,75 \log C_{\text{anti-S IgG}} / \text{fg mL}^{-1}$, com um coeficiente de correlação linear (r) de 0,990, indicando uma excelente relação linear entre a resposta obtida e a concentração de anticorpos IgG anti-S SARS-CoV-2. O limite de detecção alcançado foi de 7,13 ag mL⁻¹, calculado usando a equação $3,3 \times \text{SD} / \theta$, onde SD representa o desvio padrão do intercepto da curva analítica, e θ denota a inclinação da curva analítica²⁴⁰.

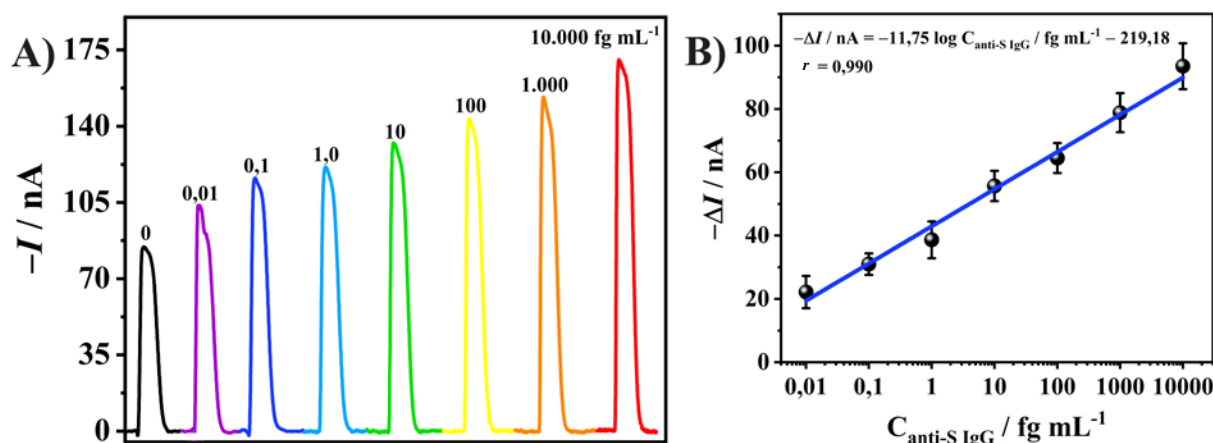


FIGURA 3.14 – A) As respostas de corrente transiente para diferentes concentrações de anticorpos anti-S IgG na faixa de 0,01–10.000 fg mL⁻¹. B) Curva analítica correlacionando a diferença de corrente em função do logaritmo da concentração de anticorpos anti-S IgG (n = 6). Parâmetros utilizados: [H₂O₂] = 1,0 mmol L⁻¹, [HQ] = 2,0 mmol L⁻¹, volume da alça de amostragem = 100 μL, vazão = 100 μL min⁻¹, tempo de incubação PMs/proteína S + anti-S IgG = 30 min e tempo de incubação PMs/proteína S/anti-S IgG + anti-IgG/HRP = 30 min.

Fonte: próprio autor.

Sob as mesmas condições otimizadas para os estudos com anticorpos IgG, foi avaliada a curva analítica para detecção de anticorpos anti-S IgM, utilizando anticorpos marcados anti-IgM/HRP. Para isso, o magneto-imunoensaio foi aplicado em soluções padrão contendo concentrações crescentes de anti-S IgM, e as respostas amperométricas resultantes estão representadas na FIGURA 3.15A. Uma correlação linear entre a diferença do sinal amperométrico e a concentração crescente de anticorpos foi estabelecida na faixa de 0,1 a 1.000 fg mL⁻¹, conforme ilustrado na FIGURA 3.15B.

A equação de regressão linear derivada é expressa da seguinte forma: $-\Delta I/nA = -221,6 - 11,6 \log C_{\text{anti-S IgM}} / \text{fg mL}^{-1}$, com um r de 0,997, indicando uma excelente relação linear entre a resposta de interesse e a concentração de anticorpos IgM anti-S SARS-CoV-2. O limite de detecção alcançado foi de 55,4 ag mL⁻¹, calculado usando a equação $3,3 \times \text{SD}/\theta$.

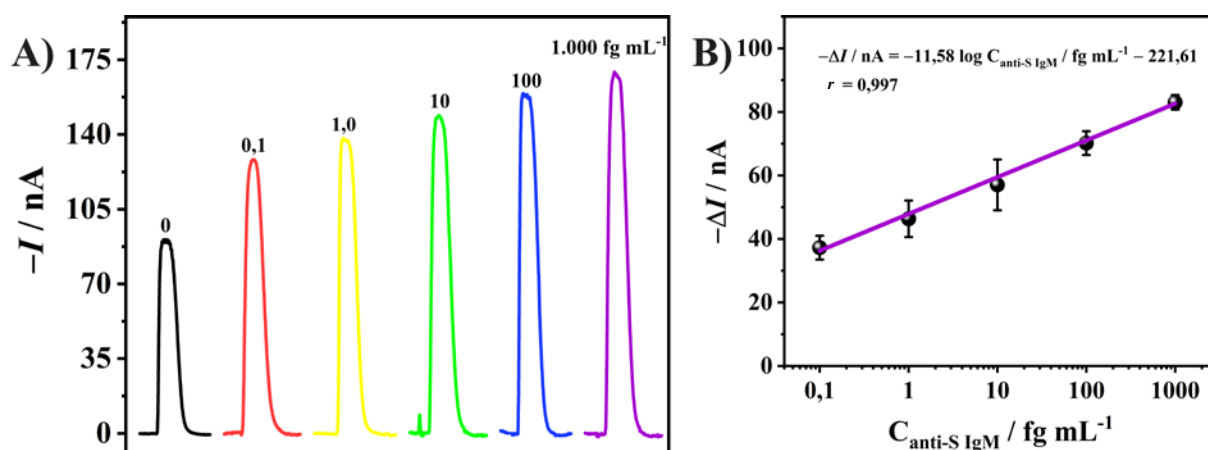


FIGURA 3.15 – FIGURA 3.13 – A) As respostas de corrente transiente para diferentes concentrações de anticorpos anti-S IgM na faixa de 0,1–1.000 fg mL⁻¹. B) Curva analítica correlacionando a diferença de corrente em função do logaritmo da concentração de anticorpos anti-S IgM (n = 6). Parâmetros utilizados: [H₂O₂] = 1,0 mmol L⁻¹, [HQ] = 2,0 mmol L⁻¹, volume da alça de amostragem = 100 μL, vazão = 100 μL min⁻¹, tempo de incubação PMS/proteína S + anti-S IgM = 30 min e tempo de incubação PMS/proteína S/anti-S IgM + anti-IgM/HRP = 30 min.

Fonte: próprio autor.

3.2.3 Repetibilidade do magneto-imunoensaio

A repetibilidade do magneto-imunoensaio para a determinação de anticorpos anti-S em solução padrão de PBS pH 7,4, na concentração de 100 fg mL⁻¹, foi avaliada de duas maneiras e os resultados estão apresentados na FIGURA 3.16. Para o estudo de repetibilidade intradia, foram realizadas análises utilizando cinco dispositivos diferentes no mesmo dia, resultando em uma diferença de corrente média de 62 ± 5 nA e um DPR de apenas 7,8%, conforme representado na FIGURA 3.16A.

Por fim, a avaliação da repetibilidade interdia foi realizada por meio de experimentos com 5 dispositivos diferentes em dias distintos, feitas pelo mesmo operador, resultando em uma $-\Delta I$ média de 60 ± 5 nA e um DPR de 9,0%, conforme apresentado na FIGURA 3.16B. Esses resultados destacam a alta precisão do método analítico proposto neste estudo.

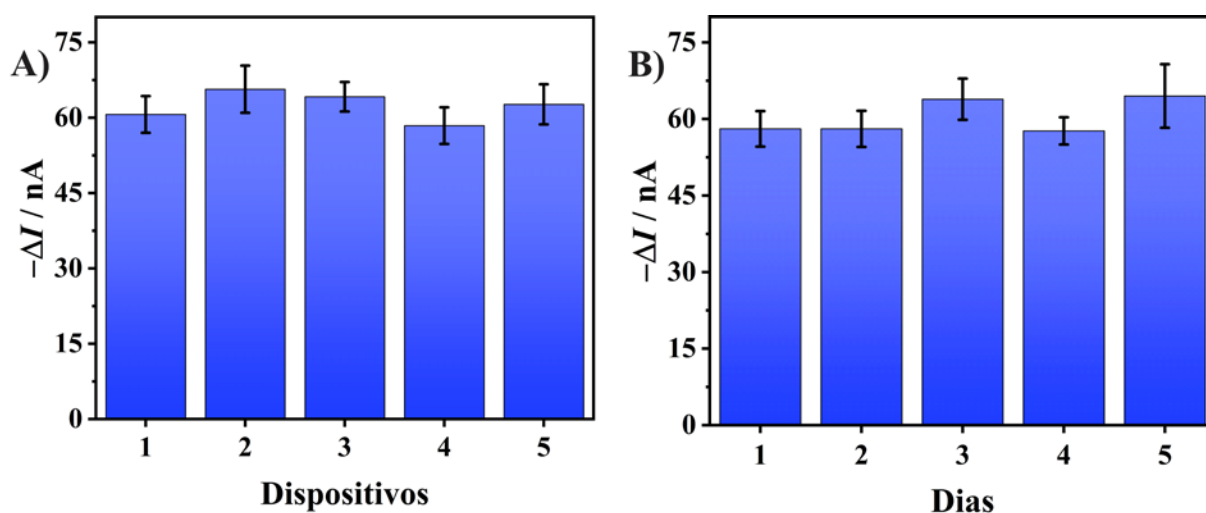


FIGURA 3.16 – Estudo da repetibilidade (A) análise intradia (mesmo dia) e (B) análise interdia (dias diferentes). Parâmetros utilizados: FIGURA 3.12.

Fonte: próprio autor.

3.2.4 Estudo de reação cruzada

A avaliação da seletividade do magneto-imunoensaio abrangeu não apenas a análise contra anticorpos anti-N do SARS-CoV-2, mas também um exame detalhado das interações dos anticorpos anti-Igs/HRP. Na FIGURA 3.17A, são apresentadas as diferenças de corrente obtidas referentes ao estudo com anticorpos anti-IgG/HRP adicionados após a incubação do conjugado PMs/proteína S com PBS pH 7,4 (■), após a incubação do conjugado com de anticorpos anti-S IgM (■), após a incubação das PMs modificadas com anticorpos anti-N IgG (■) e após a realização do ensaio com anticorpos anti-S IgG (■).

Na FIGURA 3.17B, são mostrados os resultados para os estudos com anticorpos anti-IgM/HRP adicionados após a incubação de PMs/proteína S com PBS pH 7,4 (■), após a incubação das PMs com anti-S IgG (■), após a incubação do conjugado com anti-N IgG (■) e após a incubação com anticorpos anti-S IgM (■), todos anticorpos estavam na concentração de 100 fg mL^{-1} .

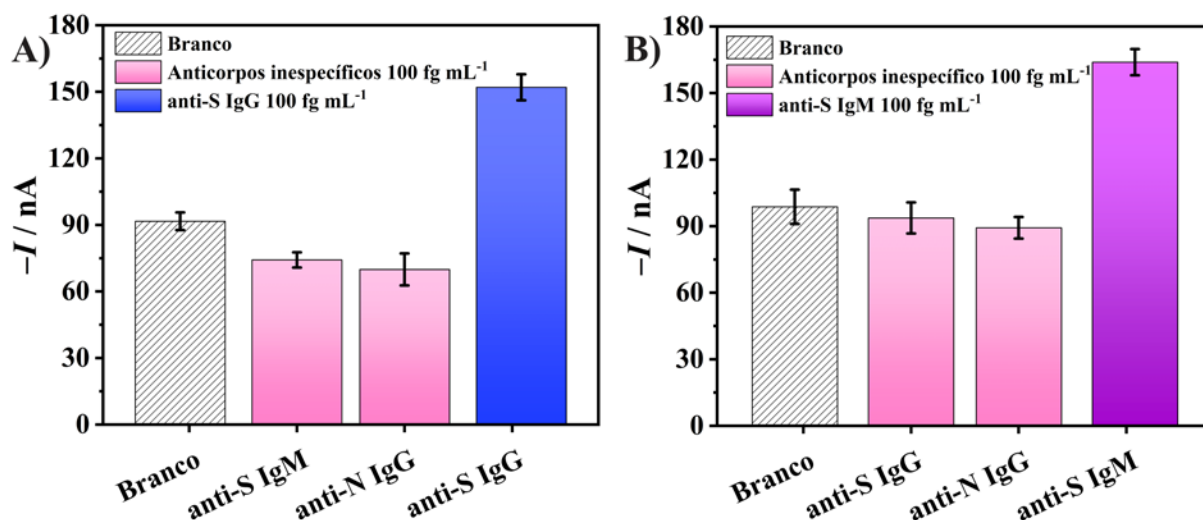


FIGURA 3.17 – A) Avaliação de reação cruzada de anticorpos anti-IgG/HRP frente a 100 fg mL⁻¹ de anticorpos não específicos (■) e validação da interação específica PMs/proteína S/anti-S IgG/anti-IgG/HRP (■). B) Teste de reação cruzada de anticorpos anti-IgM/HRP frente a 100 fg mL⁻¹ de anticorpos não específicos, como anti-S IgG e anti-N IgG (■), e validação da interação específica de PMs/proteína S/anti-S IgM/anti-IgM/HRP (■). Parâmetros utilizados: FIGURA 3.12.

Fonte: próprio autor.

Conforme apresentado na FIGURA 3.17A, os anticorpos anti-IgG/HRP não reagiram com os anticorpos anti-S IgM capturados pelas PMs modificadas com a proteína S. Essa conclusão é corroborada pela resposta de corrente do magneto-imunoensaio, que foi menor que o valor de corrente do branco. Além disso, a corrente obtida no estudo com anticorpos anti-N IgG também foi menor que a do branco, indicando que a proteína S imobilizada na superfície das PMs não apresentou interação não específica com as proteínas N do SARS-CoV-2. Assim, pode-se concluir que os anticorpos anti-S IgM e anticorpos anti-N IgG não causaram reação cruzada com os anticorpos anti-IgG/HRP e com a proteína utilizada neste trabalho, respectivamente. Essa conclusão é reforçada pela comparação das demais respostas como pode-se observar a barra em azul (■), que apresentou a maior magnitude de corrente, um incremento de 66%.

Na FIGURA 3.17B, o mesmo comportamento é observado ao comparar as respostas de corrente dos ensaios com os anticorpos não específicos (de magnitude próxima ao branco) com o magneto-imunoensaio desenvolvido (aumento de corrente em 53%). Isso confirma que os anticorpos anti-IgM/HRP não apresentaram interações não específicas com os anticorpos anti-S IgG e anti-N IgG. Além disso, reafirma que a proteína S utilizada na modificação das PMs não apresentou reação antígeno-anticorpo com os anticorpos contra a proteína N.

Portanto, os resultados apresentados demonstram a alta seletividade do magneto-imunoensaio desenvolvido. A ausência de interações não específicas dos anticorpos anti-IgG/HRP, dos anticorpos anti-S IgM, e da proteína S imobilizada nas PMs evidencia a precisão e a confiabilidade do método. A clara distinção nas respostas de corrente, conforme ilustrado nas FIGURAS 3.17A e 3.17B, reforça a eficácia do ensaio em discriminar interações específicas, confirmando sua aplicabilidade para a detecção de anticorpos anti-S IgG e IgM.

3.2.5 Diluição da amostra de plasma humano

Para o início dos testes em amostras clínicas, realizou-se um estudo para determinar a diluição mais adequada para a aplicação do magneto-imunoensaio proposto. Entre as 36 amostras de plasma disponíveis, havia 21 amostras PC (numeradas como PC1, PC2, PC3, ... PC21) e 15 amostras CT (numeradas como CT1, CT2, CT3, ... CT15). Uma amostra de plasma de um indivíduo diagnosticado com COVID-19 foi escolhida aleatoriamente (PC1) e avaliada em várias diluições, variando de 1:50 (menos diluída) a 1:550.000 (mais diluída), conforme apresentado na FIGURA 3.18.

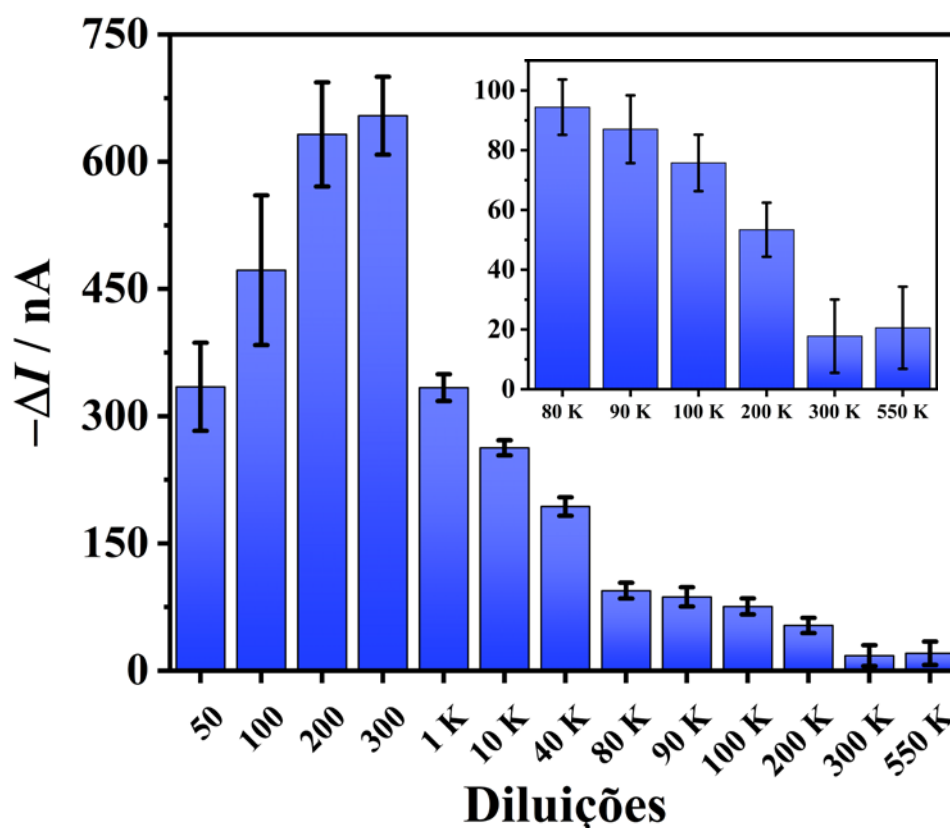


FIGURA 3.18 – Gráfico de barras correlacionando a diferença de corrente obtidas para diferentes diluições de 1:50 até 1:550,000 para a amostra PC1. Ampliação da escala para melhor visualização das respostas de corrente transiente obtidas nas diluições de 1:80,000 a 1:550,000. Parâmetros utilizados: FIGURA 3.12.

Fonte: próprio autor.

Conforme representado na FIGURA 3.18, observa-se que a partir da diluição 1:50 até 1:300, houve um aumento no valor de $-\Delta I$, indicando uma maior magnitude de corrente. Esse fenômeno pode ser explicado pela diminuição do efeito matriz em diluições mais elevadas, o que pode não só facilitar a captura de anticorpos pelas PMs, como também minimizar a interferência de materiais biológicos presentes na amostra.

No entanto, os valores de $-\Delta I$ na diluição de 1:300 apresentaram magnitudes muito altas, superando as correntes derivadas da curva analítica, uma vez que a última concentração da curva analítica de $10.000 \text{ fg mL}^{-1}$ obteve um $-\Delta I$ de $93 \pm 7 \text{ nA}$. Conseqüentemente, foram exploradas diluições adicionais para atingir valores proporcionais à curva analítica, a fim de aumentar a precisão

e a exatidão da quantificação. Conforme ilustrado na FIGURA 3.18, a partir da diluição 1:80.000, os sinais resultantes ficaram abaixo de 100 nA, uma magnitude de corrente menor que o último ponto da curva analítica. Portanto, a diluição 1:80.000 foi escolhida para a análise das demais amostras CT e PC, visando à validação do magneto-imunoensaio proposto para diagnóstico da COVID-19.

3.2.6 Avaliação do magneto-imunoensaio em amostras controle e de pacientes diagnosticados com COVID-19

A elevada sensibilidade do magneto-imunoensaio permitiu uma diluição significativa das amostras dos pacientes, o que é crucial para reduzir a interferência de constituintes presentes no plasma. Conforme estudado anteriormente, as amostras foram diluídas 80.000 vezes em PBS pH 7,4. O sinal de corrente para cada amostra foi subtraído do sinal de corrente do branco, e o valor de $-\Delta I$ foi utilizado na equação da curva analítica. Dessa forma, foi determinada a concentração de anticorpos anti-S IgG e IgM, conforme apresentado na TABELA 3.2.

TABELA 3.2 – Concentração de anticorpos anti-S IgG e IgM determinadas para amostras CT e PC. Parâmetros empregados: FIGURA 3.12 e FIGURA 3.13.

CT	C _{anti-S IgG} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	C _{anti-S IgM} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	PC	C _{anti-S IgG} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	C _{anti-S IgM} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
CT1	0,0141	0,00368	PC1	90,7	128
CT2	0,0581	4,72	PC2	88,2	90,3
CT3	0,233	0,000313	PC3	0,295	0,174
CT4	0,00370	0,00255	PC4	2,53	0,150
CT5	0,000962	0,000156	PC5	0,0101	0,676
CT6	0,000168	0,00193	PC6	45,2	39,4
CT7	0,0000814	0,000103	PC7	0,479	0,0632
CT8	0,000269	0,000913	PC8	0,399	0,0445
CT9	0,0000275	0,0000698	PC9	0,303	0,0159
CT10	0,0218	0,00940	PC10	0,127	0,133
CT11	0,0378	0,00773	PC11	87,6	61,0
CT12	0,0338	0,0235	PC12	2,55	0,331
CT13	0,000211	0,000796	PC13	0,0315	32,0
CT14	0,000328	0,00223	PC14	0,0156	21,1
CT15	0,000124	0,000546	PC15	84,2	74,8
-	-	-	PC16	3,08	5,74
-	-	-	PC17	0,177	0,0108
-	-	-	PC18	51,0	0,984
-	-	-	PC19	9,89	4,54
-	-	-	PC20	0,554	0,710
-	-	-	PC21	12,2	4,83

Com base na TABELA 3.2, observa-se que as amostras dos pacientes positivos apresentaram consistência nas concentrações de anticorpos anti-S IgG e IgM. Em alguns casos, como nas amostras PC7, PC8, PC9, PC18 e PC17, foi

verificada uma maior concentração de anticorpos IgG em relação aos de IgM, o que pode sugerir a presença de infecção em um estágio mais avançado (maior tempo decorrido desde o início dos sintomas), resultando em menores concentrações de IgM. Por outro lado, maiores concentrações de IgM foram determinadas nas amostras PC13 e PC14, sugerindo que esses pacientes poderiam estar na fase inicial da infecção pelo SARS-CoV-2.

Os resultados obtidos para os níveis de anti-S IgG e IgM no plasma dos pacientes foram analisados utilizando a curva ROC. As curvas ROC para os biomarcadores anti-S IgG e IgM utilizando o magneto-imunoensaio são mostradas na FIGURA 3.19A e B, respectivamente. A partir dos resultados obtidos com as mesmas amostras CT e PC, a AUC foi de $0,946 \pm 0,066$ ($p < 0,001$) para IgG e $0,956 \pm 0,022$ ($p < 0,001$) para IgM, valores que indicam uma excelente capacidade discriminatória entre amostras positivas e negativas para COVID-19.

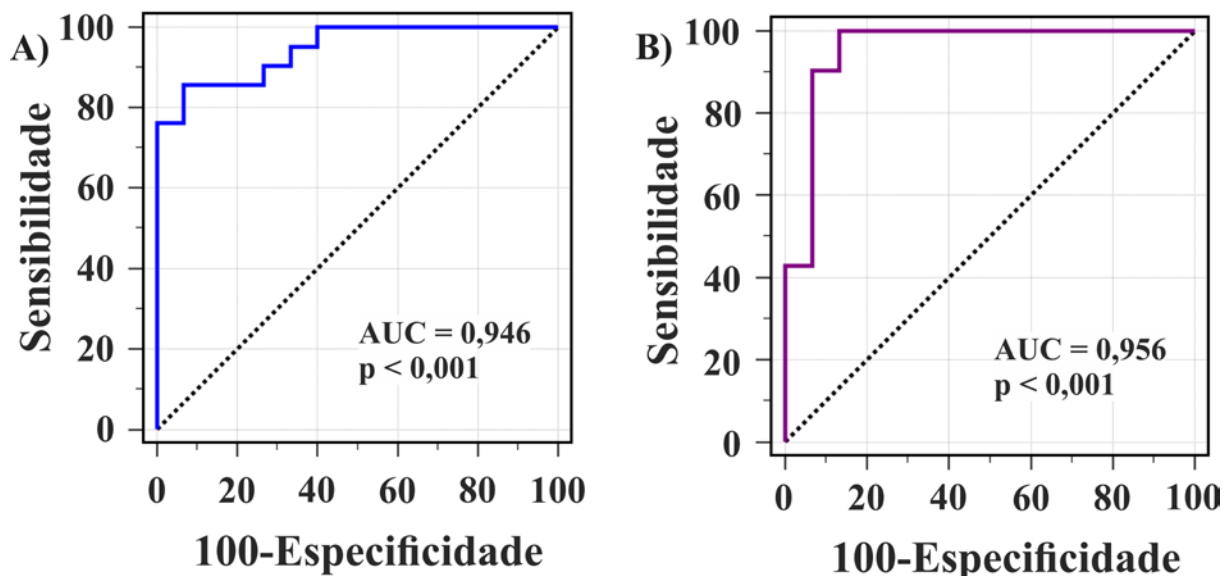


FIGURA 3.19 – Curva ROC para diagnóstico de COVID-19 por meio da detecção de anticorpos anti-S IgG (A) e IgM (B). Resposta de indivíduos saudáveis vs. pacientes positivos para COVID-19. Parâmetros utilizados: FIGURA 3.12 e FIGURA 3.13.

Fonte: próprio autor.

Para visualizar melhor a capacidade do magneto-imunoensaio em discriminar as amostras positivas das negativas, os dados foram representados por meio de diagramas de pontos (FIGURA 3.20). Esses diagramas mostram os resultados obtidos, com os pontos distribuídos nos eixos verticais representando as concentrações de cada amostra, e o valor de corte indicado por uma linha horizontal. Na FIGURA 3.20A, são apresentados os resultados da detecção de anticorpos IgG, enquanto na FIGURA 3.20B são mostrados os resultados para a detecção de anticorpos anti-S IgM.

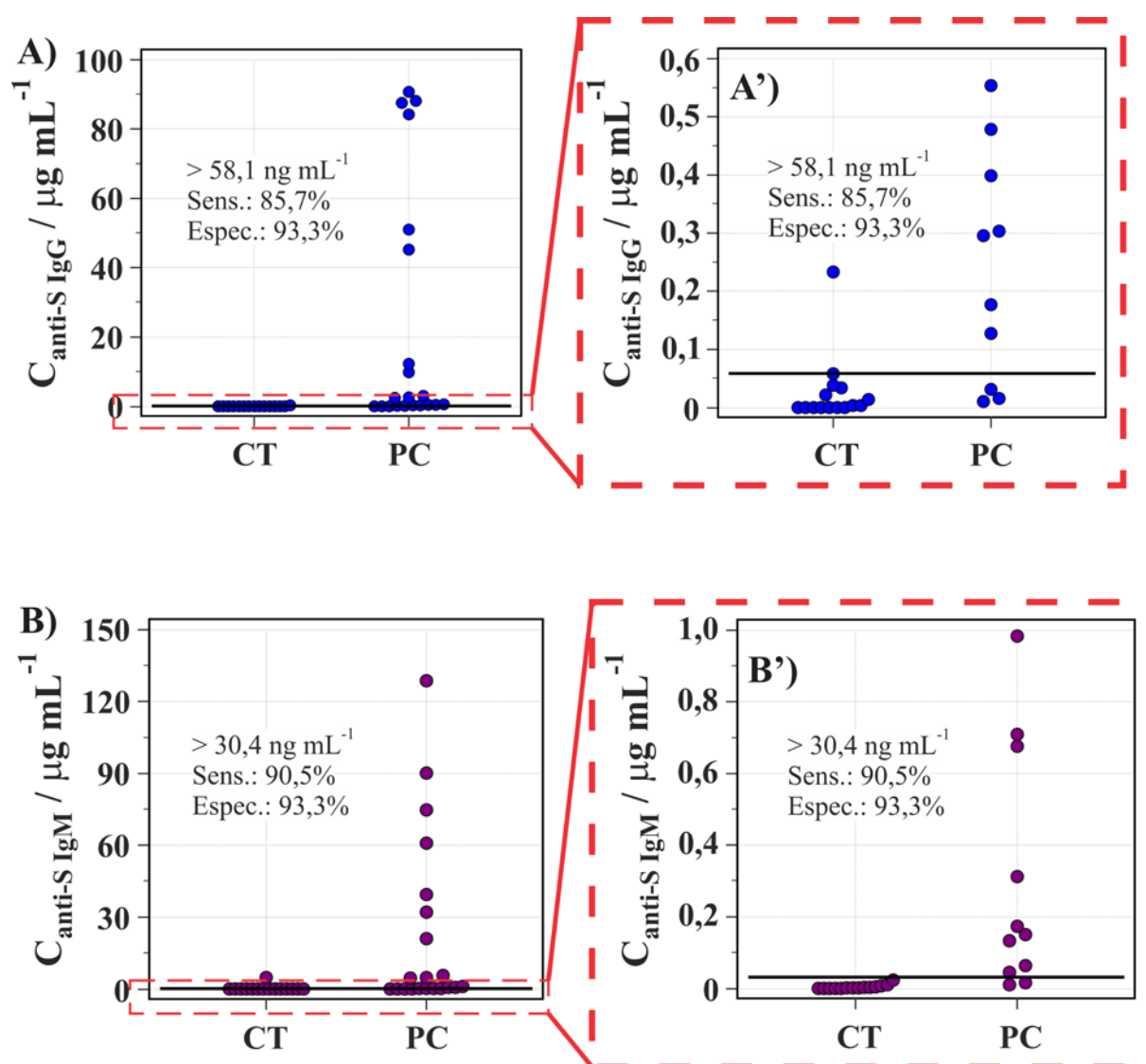


FIGURA 3.20 – Diagrama de pontos referentes aos resultados obtidos para detecção de anticorpos anti-S IgG (A) e anti-S IgM (B) em amostras CT e PC. Ampliação de escala dos diagramas de pontos referentes a detecção de anticorpos anti-S IgG (A') e anti-S IgM (B').

Fonte: próprio autor.

A análise dos diagramas de pontos representados na FIGURA 3.20A demonstrou que o magneto-imunoensaio proposto alcançou 85,7% de sensibilidade e 93,3% de especificidade para a detecção de anticorpos IgG, com um ponto de corte de $> 58,1 \text{ ng mL}^{-1}$. Esses valores indicam a eficiência do magneto-imunoensaio no diagnóstico, com excelente capacidade de diferenciar amostras de indivíduos saudáveis e contaminados com COVID-19. O diagrama foi ampliado para melhor visualização da separação das amostras. Na FIGURA 3.20A', observa-se que entre as amostras de indivíduos saudáveis, apenas uma foi classificada como falso positivo, sendo a amostra CT3, com concentração de $0,233 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Assim, é possível inferir que o paciente correspondente à amostra CT3 pode ter tido um contato prévio com o vírus SARS-CoV-2. Contudo, no momento da coleta da amostra, o paciente já não apresentava infecção ativa, motivo pelo qual o resultado foi negativo na análise pela técnica de RT-PCR.

Das 21 amostras PC, apenas três apresentaram valores abaixo da linha de corte: PC5 ($0,0101 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), PC13 ($0,0315 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e PC14 ($0,0156 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) de anti-S IgG. Dessa forma, acredita-se que os pacientes correspondentes às amostras PC5, PC13 e PC14 estavam em fase de infecção ativa, uma vez que foram diagnosticados com COVID-19 pela técnica de RT-PCR e apresentaram níveis elevados de anticorpos IgM, conforme demonstrado na Tabela 3.2. No entanto, não foi possível classificá-los como verdadeiros positivos com base nos níveis de anticorpos IgG, pois estes podem não ter sido produzidos no momento da coleta das amostras.

Conforme a FIGURA 3.20B, o método para detecção de IgM apresentou 90,5% de sensibilidade e 93,3% de especificidade, com um ponto de corte de $>30,4 \text{ ng/mL}$. Os resultados indicaram a boa capacidade do magneto-imunoensaio desenvolvido em medir os níveis de anti-S IgG e IgM em amostras de plasma, bem como sua aplicação no diagnóstico da COVID-19. Para melhor visualização da capacidade de diferenciação entre as amostras, o diagrama foi

ampliado, conforme apresentado na FIGURA 3.20B'. Entre as 21 amostras PC, apenas duas ficaram abaixo da linha de corte: PC17 ($0,0108 \mu\text{g mL}^{-1}$) e PC9 ($0,0159 \mu\text{g mL}^{-1}$) de anti-S IgM. Isso sugere que as amostras PC9 e PC17 podem ter sido coletadas em um período fora da janela imunológica para detecção dos anticorpos IgM, especialmente considerando que apresentaram maiores concentrações de IgG.

Além disso, devido à escala da FIGURA 3.20B', não foi possível observar nenhuma amostra CT acima da linha de corte; no entanto, na FIGURA 3.20B, pode-se ver um ponto acima da linha de corte, referente à amostra CT2, com $4,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-S IgM. Essa amostra pode ser classificada como falso positivo ou possivelmente uma infecção recente não diagnosticada pelo RT-PCR. Vale ressaltar que essas informações não podem ser totalmente validadas, uma vez que não se possui informações sobre as coletas das amostras e os inícios dos sintomas, ou estágio da doença.

Apesar disto, os resultados obtidos de sensibilidade e especificidade para a detecção de anticorpos IgG e IgM contra a proteína S do SARS-CoV-2 demonstram que o magneto-imunoensaio pode ser utilizado tanto para o diagnóstico de COVID-19 quanto para a classificação dos casos positivos, contribuindo para o início e a orientação de um tratamento adequado para o paciente.

3.3 Considerações parciais

No presente trabalho foi desenvolvido um magneto-imunoensaio de elevada sensibilidade e precisão para a detecção de anticorpos anti-S IgG e anti-S IgM em amostras de plasma, visando o diagnóstico da COVID-19. Diversas etapas foram otimizadas, incluindo a seleção das condições de bloqueio para formação do conjugado composto das PMs decoradas com o antígeno, vazão, volume da alça de amostragem e tempos necessários para as incubações.

O método demonstrou boa linearidade na resposta analítica, com um r de 0,990, e uma sensibilidade analítica de $-11,75 \text{ nA mL fg}^{-1} \log C_{\text{anti-S IgG}}$. Para detecção de anticorpos IgM, o método apresentou excelente linearidade de r de 0,997 e uma sensibilidade de $-11,6 \text{ nA mL fg}^{-1} \log C_{\text{anti-S IgM}}$. Os limites de detecção alcançados foram de $7,13 \text{ ag mL}^{-1}$ para anti-S IgG e $55,4 \text{ ag mL}^{-1}$ para anti-S IgM, evidenciando a capacidade do método de detectar concentrações extremamente baixas de anticorpos, essencial para trabalhar com pequenas quantidades de amostra.

A precisão do ensaio foi avaliada por meio das análises intradia e interdia, ambos apresentando DPR inferiores a 10%, comprovando a repetibilidade do método. Além disso, a metodologia proposta demonstrou ser eficaz na detecção seletiva e precisa dos anticorpos anti-S IgG e anti-S IgM, permitindo a diferenciação entre infecções agudas e crônicas de COVID-19. Estudos de diluição realizados com amostras de plasma de indivíduos diagnosticados com COVID-19 permitiram identificar a diluição ideal para minimizar os efeitos de matriz.

Por meio da curva ROC e dos diagramas de pontos, observou-se que o diagnóstico da COVID-19 pode ser realizado utilizando o magneto-imunoensaio desenvolvido, obtendo alta especificidade e sensibilidade clínica ($> 85\%$). Ademais, o imunoensaio foi capaz de identificar possíveis contaminações recentes e contaminações tardias pelo SARS-CoV-2.

Portanto, o magneto-imunoensaio desenvolvido oferece uma plataforma sensível e seletiva para o diagnóstico de COVID-19, com potencial para aplicação em estudos epidemiológicos e monitoramento de respostas imunológicas em indivíduos vacinados ou infectados. A metodologia estabelecida pode ser adaptada e ampliada para a detecção de outros biomarcadores, contribuindo significativamente para o avanço das técnicas de diagnóstico imunológico.

***DESENVOLVIMENTO DE
UM MAGNETO-
IMUNOENSAIO PARA
DETECÇÃO DE
ANTICORPOS ANTI-N
UTILIZANDO A PROTEÍNA
N DO SARS-COV-2***

Capítulo 4

4 DESENVOLVIMENTO DE UM MAGNETO-IMUNOENSAIO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-N UTILIZANDO A PROTEÍNA N DO SARS-COV-2

4.1 Procedimento experimental

4.1.1 Reagentes e soluções

A proteína recombinante de nucleocapsídeo (proteína N) do SARS-CoV-2 [His Tag] (cód. ab273530) foi obtida da Abcam (Cambridge, MA, EUA).

Os demais reagentes e soluções utilizados foram descritos nos capítulos anteriores (item 3.1.1).

4.1.2 Modificação das PMs com a proteína N do SARS-CoV-2

Para a modificação das PMs com a proteína N, o frasco contendo as PMs foi colocado em um *Shaker* a 1000 rpm por 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, 110 μL de PMs comerciais foram dispersas em 1 mL de solução tampão MES 50 mmol L^{-1} pH 6,0. Após separação magnética da dispersão, o sobrenadante foi removido e substituído por 1 mL de uma solução recém-preparada de EDC 0,4 mol L^{-1} em NHS 0,1 mol L^{-1} , preparada em tampão MES 50 mmol L^{-1} pH 6,0. A mistura foi então agitada suavemente por 30 min à temperatura ambiente. Novamente, as PMs foram separadas magneticamente, o sobrenadante foi descartado e as PMs foram lavadas uma vez com 1 mL de solução tampão MES 50 mmol L^{-1} pH 6,0.

Após a ativação dos grupos carboxílicos, foram adicionados 500 μL de uma solução de 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da proteína N preparada em PBS pH 7,4. A mistura foi agitada lentamente por aproximadamente 13 h à temperatura ambiente para formar o conjugado PMs/proteína N. Em seguida, a dispersão foi separada magneticamente e lavada três vezes com 500 μL de PBS pH 7,4 contendo 0,05% de Tween. Para bloquear os sítios de ligação livres e evitar futuras ligações não específicas, foram adicionados 2 mL de ETA 1,0 mmol L^{-1} em PBS pH 7,4, deixando sob agitação suave por 1 h. Por fim, as PMs modificadas foram lavadas

e dispersas em 500 μL de tampão PBS pH 7,4 e foram mantidas sob refrigeração a 4°C. A modificação das PMs para formação do conjugado PMs/proteína N é apresentada na FIGURA 4.1.

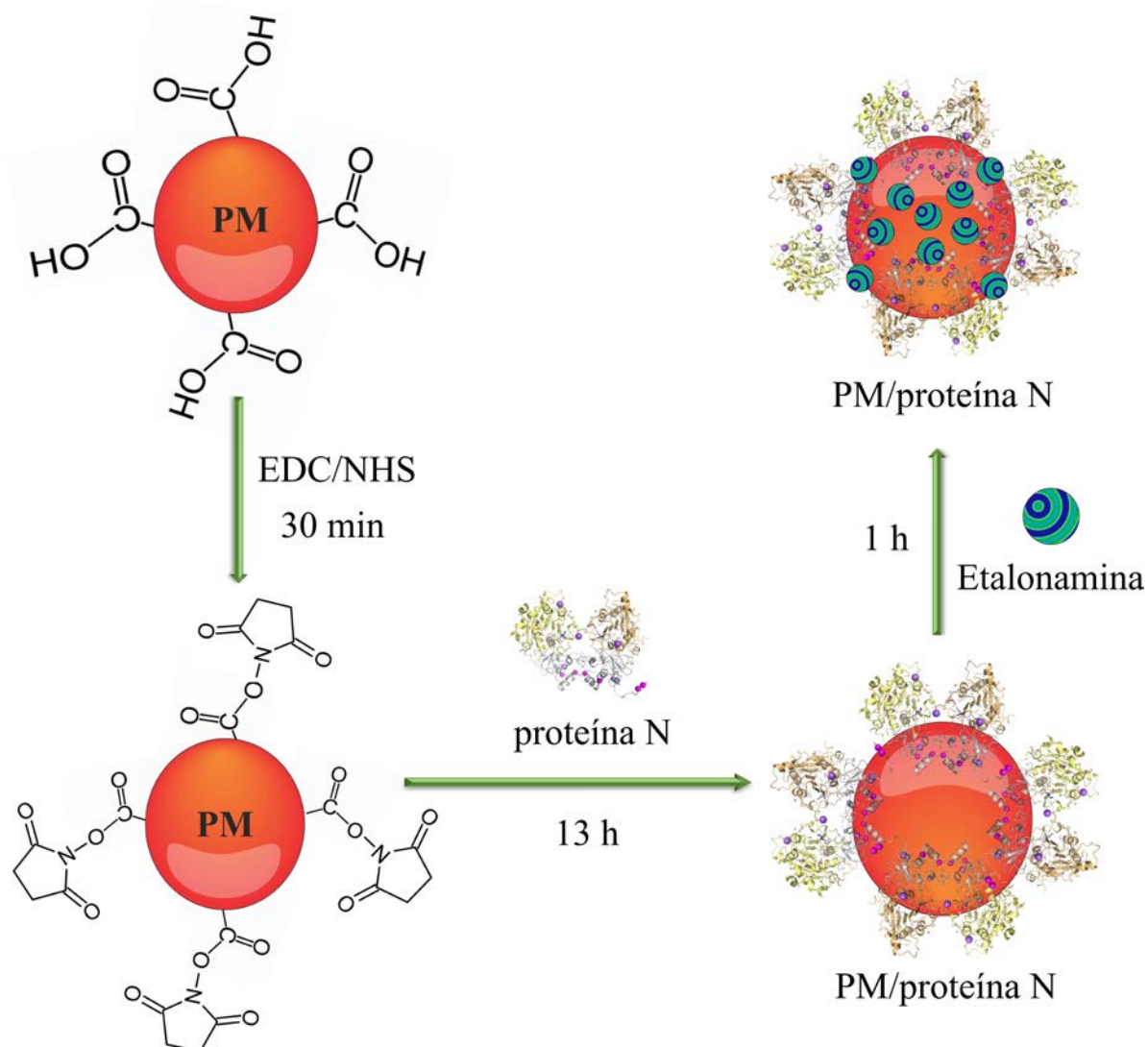


FIGURA 4.1 – Modificação das PMs por meio da ativação dos grupos carboxílicos das PMs com EDC/NHS. Após, proteínas N do SARS-CoV-2 foram ancoradas às PMs e foi adicionada uma solução de ETA $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para bloquear sítios ativos das PMs.

Fonte: próprio autor.

4.1.3 Magneto-imunoensaio para determinação de anticorpos anti-N

Para a realização do magneto-imunoensaio com anticorpos comerciais (padrão), 20 μL do conjugado PMs/proteína N foram adicionados a

um microtubo contendo 480 μL de solução padrão com a concentração desejada de anticorpos anti-N IgG, preparada em PBS pH 7,4. Nos estudos com amostras de plasma humano, o conjugado foi adicionado a 480 μL de amostras previamente diluídas em PBS pH 7,4. Para os ensaios de controle (branco), 20 μL de PMs/proteína N foram adicionados a 480 μL de PBS pH 7,4.

A mistura foi então colocada em uma base giratória impressa em 3D e mantida sob agitação lenta por 20 min à temperatura ambiente para formar o bioconjugado PMs/proteína N/anti-N Ig. Após a incubação, o microtubo foi colocado na estante magnética para separação magnética, assim o sobrenadante foi removido e foram realizadas três lavagens com PBS pH 7,4 contendo 0,05% de Tween. Após a lavagem do bioconjugado, o sobrenadante foi novamente removido e 500 μL de uma solução de anti-Ig/HRP na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada em PBS pH 6,5, foram adicionados. Nos estudos com anticorpos padrão, foram utilizados apenas anti-N IgG e anti-IgG/HRP. Estudos com o padrão anti-N IgM não foram realizados por falta de material. Contudo, os anticorpos anti-IgG/HRP e anti-IgM/HRP foram utilizados nos ensaios realizados com amostras.

A dispersão foi novamente colocada sob agitação lenta por 40 min para formar o bioconjugado final PMs/proteína N/anti-N/anti-Ig/HRP. Após a incubação, as PMs foram separadas magneticamente, o sobrenadante foi removido e foram realizadas três lavagens com PBS pH 6,5 contendo 0,05% de Tween. Após a remoção do sobrenadante, o bioconjugado foi suspenso em 50 μL de PBS pH 6,5. A FIGURA 4.2 apresenta esquematicamente o processo de realização do magneto-imunoensaio e os bioconjugados formados em cada etapa.

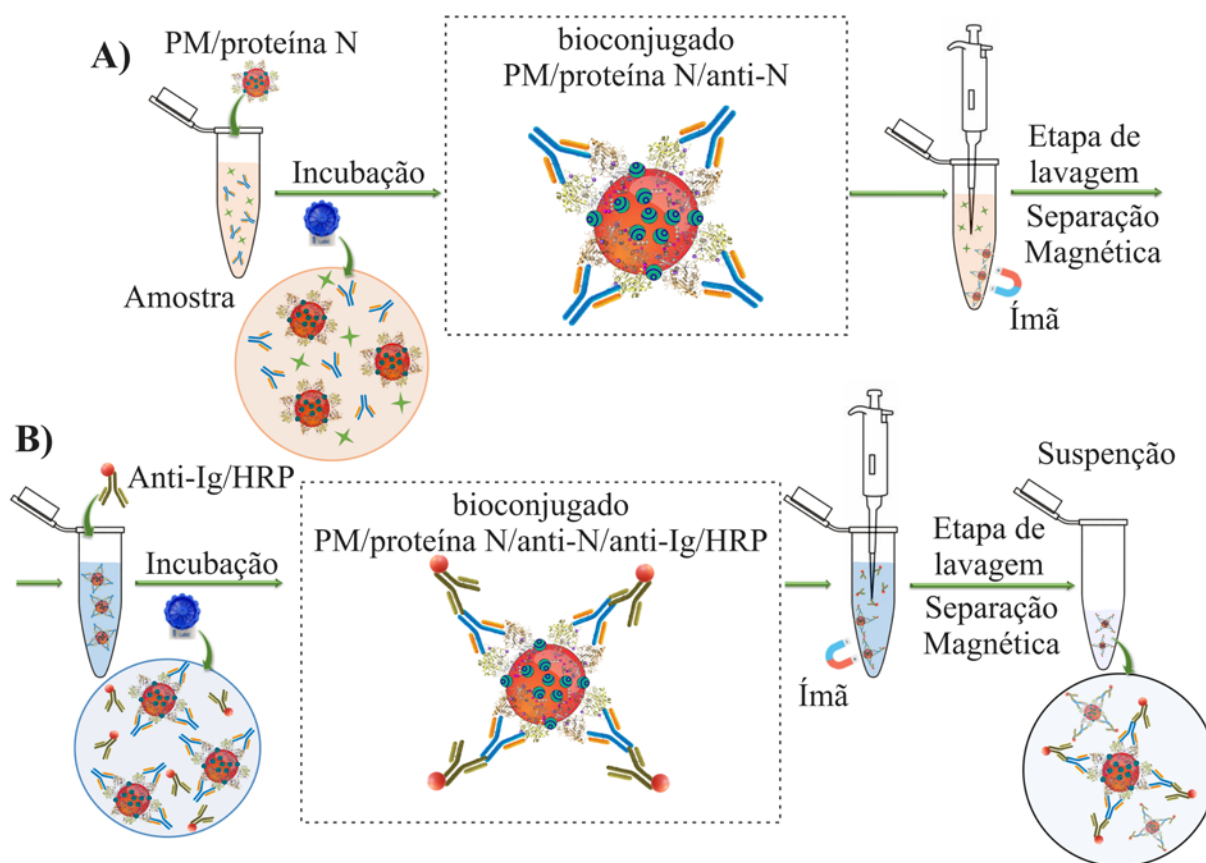


FIGURA 4.2 – Etapas do magneto-imunoensaio proposto. A) Adição das PMs modificadas para captura dos anticorpos anti-N, seguido pela separação magnética e lavagem do bioconjugado e adição de anti-Ig/HRP. B) Incubação para formação do bioconjugado final PM/proteína N/anti-N/anti-Ig/HRP seguido pela separação magnética, lavagem e suspensão das partículas.

Fonte: próprio autor.

Após a suspensão do bioconjugado final, 3 μL da solução de PMs/proteína N/anti-N/anti-Ig/HRP foram aplicados na superfície de cada um dos 8-WEs. Os ímãs posicionados atrás dos eletrodos mantiveram as PMs retidas na superfície, permitindo a remoção do sobrenadante. Em seguida, o arranjo com RE e CE foi fixado na outra face do cartão de dupla face e o dispositivo foi fechado. Os tubos PEEK foram conectados aos orifícios apropriados e ligados a uma bomba de seringa para iniciar as medidas eletroquímicas.

4.1.4 Planejamento fatorial composto central

Um planejamento fatorial 2^4 composto central foi realizado para otimizar as condições do magneto-imunoensaio na determinação de anticorpos anti-N. As variáveis independentes analisadas foram: a concentração de PMs a serem modificadas (C_{PMs} , variável 1), a concentração de proteína N a ser imobilizada na superfície das PMs ($C_{proteína\ N}$, variável 2), o tempo de incubação entre o bioconjugado PMs/proteína N e os anticorpos anti-N IgG (Tempo da 1° incubação, variável 3) e o tempo de incubação entre o bioconjugado PMs/proteína N/anti-N e os anticorpos anti-IgG/HRP (Tempo da 2° incubação, variável 4). As condições dessas quatro variáveis independentes foram codificadas em cinco níveis (-2, -1, 0, +1, +2), conforme apresentado na TABELA 4.1. A variável dependente analisada foi a diferença entre o sinal referente ao branco e ao padrão ($-\Delta I$).

TABELA 4.1 – Níveis codificados para as quatro variáveis do planejamento fatorial 2^4 composto central.

Parâmetros	Variável	-2	-1	0	+1	+2
C_{PMs} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1	200	335	470	605	740
$C_{proteína\ N}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0
Tempo da 1° incubação (min)	3	10	20	30	40	50
Tempo da 2° incubação (min)	4	10	20	30	40	50

O planejamento fatorial 2^4 composto central foi organizado com variáveis codificadas nos níveis -1 e +1, sendo testadas 16 diferentes combinações, como apresentado nos experimentos de 1 a 16 na TABELA 4.2. Os experimentos de 17 a 21 representam as réplicas do ponto central (variáveis codificadas no nível 0) e os experimentos de 22 a 29 representam os pontos axiais

(variáveis codificadas nos níveis -2 e $+2$). A Tabela 4.2 mostra as condições de cada experimento realizado, incluindo os níveis codificados para cada variável. Os experimentos descritos na TABELA 4.2 foram realizados em ordem aleatória para evitar erros sistemáticos. Além disso, foram fixados os seguintes parâmetros para a realização das medidas eletroquímicas: a concentração de HQ em $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, a concentração de H_2O_2 em $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, a concentração de anti-IgG/HRP em $1,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, o volume da alça de amostragem em $100 \text{ } \mu\text{L}$ e o vazão da bomba de seringa em $100 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$.

TABELA 4.2 – Experimentos do planejamento fatorial 2^4 com as variáveis codificadas.

Experimento	Variável 1	Variável 2	Variável 3	Variável 4
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	-1	-1	+1	-1
5	-1	-1	-1	+1
6	+1	+1	-1	-1
7	+1	-1	+1	-1
8	+1	-1	-1	+1
9	-1	+1	+1	-1
10	-1	+1	-1	+1
11	-1	-1	+1	+1
12	+1	+1	+1	-1
13	+1	+1	-1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
22	-2	0	0	0
23	+2	0	0	0
24	0	-2	0	0
25	0	+2	0	0
26	0	0	-2	0
27	0	0	+2	0
28	0	0	0	-2
29	0	0	0	+2

Com os resultados obtidos, um modelo de regressão linear e análise estatística foram calculados usando o programa Livre Octave, na versão *Guide User Interface* (GUI), com a rotina computacional "*Regression2*"²⁴¹ para a determinação dos coeficientes (*b*) significativos. Determinados os coeficientes significativos, os gráficos de contorno foram plotados utilizando um *template* fornecido por Pereira e Pereira-Filho²⁴¹ no *software* Excel para verificar a região de máxima resposta prevista pelo modelo gerado. Com as melhores condições das variáveis significativas e os coeficientes determinados, foi possível prever a resposta pelo planejamento fatorial desenvolvido por meio da EQUAÇÃO 4.1, que representa uma equação geral quando todos os coeficientes são significativos.

$$y = b_0 + b_1v_1 + b_2v_2 + b_3v_3 + b_4v_4 + b_{11}v_{11} + b_{22}v_{22} + b_{33}v_{33} + b_{44}v_{44} + b_{12}v_1v_2 \\ + b_{13}v_1v_3 + b_{14}v_1v_4 + b_{23}v_2v_3 + b_{24}v_2v_4 + b_{34}v_3v_4$$

(EQUAÇÃO 4.1)

Onde *y* é a variável dependente; *b*₀ é o coeficiente constante no qual o valor médio da população de todas as respostas é estimado; *b*₁, *b*₂, *b*₃, *b*₄ são os coeficientes lineares, *b*₁₁, *b*₂₂, *b*₃₃, *b*₄₄ são os coeficientes quadráticos dos efeitos principais, *b*₁₂, *b*₁₃, *b*₁₄, *b*₂₃, *b*₂₄, *b*₃₄ correspondem à interação entre as variáveis e *v*₁, *v*₂, *v*₃, *v*₄ são as variáveis.

4.1.5 Repetibilidade do magneto-imunoensaio

A precisão do magneto-imunoensaio foi avaliada por meio da análise intradia de seis dispositivos diferentes, construídos no mesmo dia. Também foi analisada a repetibilidade interdia, utilizando sete dispositivos distintos, fabricados em dias diferentes. Para cada dispositivo em análise, foram escolhidas seis réplicas (*n* = 6) entre os oito eletrodos. Os resultados obtidos foram expressos em DPR em porcentagem, conforme definido pela EQUAÇÃO 3.1.

4.1.6 Avaliação de reação cruzada

Para verificar a seletividade dos anticorpos anti-IgG/HRP e da proteína N utilizada nas PMs, foi realizado um estudo de reação cruzada. Assim, a investigação sobre a seletividade dos anticorpos anti-IgG/HRP para a detecção de anticorpos anti-N IgG envolveu a incubação do conjugado PMs/proteína N em várias soluções padrão contendo anticorpos anti-S IgG e anti-S IgM. Os experimentos empregados para a avaliação da reação cruzada estão apresentados na TABELA 4.3.

Além disso, foram conduzidos experimentos de magneto-imunoensaio na ausência de anticorpos na solução padrão (branco), com o objetivo de comparar os resultados com os demais ensaios e validar a formação do bioconjugado de interesse. O estudo utilizando anticorpos anti-IgM/HRP não foi conduzido devido à ausência de anticorpos-alvo anti-N IgM, necessários para serem utilizados como padrão.

TABELA 4.3 – Experimentos realizados para o teste de reação cruzada para anticorpos anti-IgG/HRP.

<i>Teste de reação cruzada</i>			
Conjugado adicionado	Solução padrão de anticorpos (100 fg mL⁻¹)	Anti-IgG/HRP (10 µg mL⁻¹)	Resposta esperada
PMs/proteína N	-	Anti-IgG/HRP	branco
PMs/proteína N	anti-S IgG	Anti-IgG/HRP	= branco
PMs/proteína N	anti-S IgM	Anti-IgG/HRP	= branco
PMs/proteína N	anti-N IgG	Anti-IgG/HRP	> branco

4.2 Resultados e discussão

4.2.1 Otimização pelo planejamento fatorial 2⁴ composto central

O planejamento fatorial 2⁴ composto central e pontos axiais foi realizado com um total de 29 experimentos e os respectivos $-\Delta I$ foram obtidos

conforme representado na TABELA 4.4. O estudo teve como objetivo avaliar as melhores condições para o processo de modificação das PMs e para realização do magneto-imunoensaio.

TABELA 4.4 – Planejamento fatorial 2^4 com as devidas respostas de corrente obtidas.

Experimento	Variável 1	Variável 2	Variável 3	Variável 4	$-\Delta I$ (nA)
1	-1	-1	-1	-1	23,39
2	+1	-1	-1	-1	33,47
3	-1	+1	-1	-1	27,31
4	-1	-1	+1	-1	31,29
5	-1	-1	-1	+1	39,11
6	+1	+1	-1	-1	39,34
7	+1	-1	+1	-1	47,09
8	+1	-1	-1	+1	75,62
9	-1	+1	+1	-1	47,09
10	-1	+1	-1	+1	44,86
11	-1	-1	+1	+1	60,49
12	+1	+1	+1	-1	62,49
13	+1	+1	-1	+1	78,20
14	+1	-1	+1	+1	86,25
15	-1	+1	+1	+1	46,53
16	+1	+1	+1	+1	82,71
17	0	0	0	0	29,78
18	0	0	0	0	30,88
19	0	0	0	0	34,20
20	0	0	0	0	32,81
21	0	0	0	0	31,97
22	-2	0	0	0	15,18
23	+2	0	0	0	41,85
24	0	-2	0	0	34,70
25	0	+2	0	0	32,26
26	0	0	-2	0	32,36

27	0	0	+2	0	71,18
28	0	0	0	-2	28,34
29	0	0	0	+2	87,43

Primeiramente, o comportamento das variáveis foi modelado por uma equação quadrática, considerando a análise de variância (ANOVA) e o teste *t* de Student (ao nível de confiança de 95%). Contudo, na primeira avaliação estatística do planejamento fatorial 2⁴ composto central foi determinado que nem todos coeficiente apresentados na EQUAÇÃO 4.1 foram significativos. Após aplicar o teste *t* novamente (com 4 graus de liberdade), verificou-se que seis coeficientes foram significativos ao nível de confiança de 95%, sendo os coeficientes b_0 , b_1 , b_3 , b_4 , b_{33} e b_{44} . Assim, os dados do novo planejamento (somente com coeficientes significativos) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) conforme apresentado na TABELA 4.5.

TABELA 4.5 – Tabela ANOVA para o modelo recalculado usando apenas coeficientes significativos para análise de variância. Onde, SQ: soma quadrática, GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática (SQ/GL).

	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	10257	5	2051,4	30,025
Resíduos	1571,5	23	68,323	
Total	11828	28	422,45	
Erro puro	420,48	14	30,034	4,2579
Falta de ajuste	1151	9	127,88	
R^2	0,86715	R	0,93121	
R^2_{max}	0,96445	R_{max}	0,98207	

Conforme apresentado na TABELA 4.2, o modelo exibiu uma regressão que difere de maneira estatisticamente significativa dos resíduos,

definidos como a quantidade de informações não modeladas pelos coeficientes de regressão calculados. A razão entre a média quadrada (MQ) da regressão e a MQ dos resíduos foi avaliada, e o valor de F calculado ($MQ_{regressão}/MQ_{resíduos}$), igual a 30,025, superou em onze vezes o valor F tabelado (2,640). Este resultado demonstra que o modelo é estatisticamente confiável e apropriado para realizar previsões. O valor F tabelado foi obtido utilizando a função INVF do Excel.

A razão entre a MQ da falta de ajuste (que reflete a incapacidade do modelo em ajustar-se aos dados experimentais) e a MQ do erro puro (representando o erro intrínseco dos experimentos) deve ser inferior ao valor F tabelado para assegurar que o modelo não apresenta falta de ajuste e que a incapacidade de ajuste do modelo se confunde ao erro intrínseco. Entretanto, o valor de F calculado ($MQ_{falta\ de\ ajuste}/MQ_{erro\ puro}$) foi de 2,646, o qual é menor que o valor F tabelado (2,675) para um nível de confiança de 95%, indicando uma leve falta de ajuste. Isto sugere que a falta de ajuste e o erro puro são distintos.

Finalmente, o valor de R^2 (86,72%) indica a proporção da variabilidade total dos dados que é explicada pelo modelo, com uma variação máxima explicável ($R^2\ max$) de 96,44%. Com base nesses resultados, conclui-se que o modelo revisado, que inclui apenas os coeficientes significativos, apresentou resultados consistentes e adequados.

Comprovado que os coeficientes fornecidos recalculados pelo modelo apresentaram ser estatisticamente significantes, foi obtida uma equação de segunda ordem. Assim, foi possível obter a equação ajustada que rege o modelo conforme apresentado na EQUAÇÃO 4.2:

$$-\Delta I / nA = 34,587 + 9,907v_1 + 7,539v_3 + 13,327v_4 + 6,023v_{33} + 7,553v_{44}$$

$$\pm 7,862 \quad \pm 5,322 \quad \pm 5,323 \quad \pm 5,323 \quad \pm 4,963 \quad \pm 4,963$$

(EQUAÇÃO 4.2)

Conforme pode ser observado na EQUAÇÃO 4.2, os coeficientes significativos foram b_0 , b_1 , b_3 , b_4 e os quadráticos b_{33} e b_{44} . Além disso, com base na EQUAÇÃO 4.2, nota-se que a resposta $-\Delta I$ é altamente influenciada positivamente pela variável 4 (Tempo da 2° incubação, $b_4 = 13,327$), enquanto o segundo fator mais importante para o ganho de corrente transiente é a variável 1 (C_{PMs}) de $b_1 = 9,907$. Por fim, a variável 3 (Tempo da 1° incubação) foi o fator que menos apresentou influência na resposta com coeficiente b_3 igual a 7,539.

Além disso, nota-se que nenhum coeficiente relacionado à variável 2 foi significativo, pôde-se concluir que a concentração de proteína N na modificação das PM não interfere significativamente na resposta analítica, podendo ser empregada em qualquer nível. Logo, foi mantida uma concentração de $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os demais estudos, essa concentração foi escolhida devido à quantidade de material gasto para modificação.

Por meio da EQUAÇÃO 4.2, os gráficos de contorno foram plotados conforme apresentado na FIGURA 4.3. Como os valores dos coeficientes b_1 , b_2 e b_3 e os quadráticos foram positivos, indicam que as condições colocadas em níveis mais altos fornecem uma resposta analítica mais intensa. Esse comportamento também pode ser observado na FIGURA 4.3, onde os gráficos de contorno indicam que em condições de maior resposta prevista pelo modelo quando correlacionado duas variáveis alternadamente.

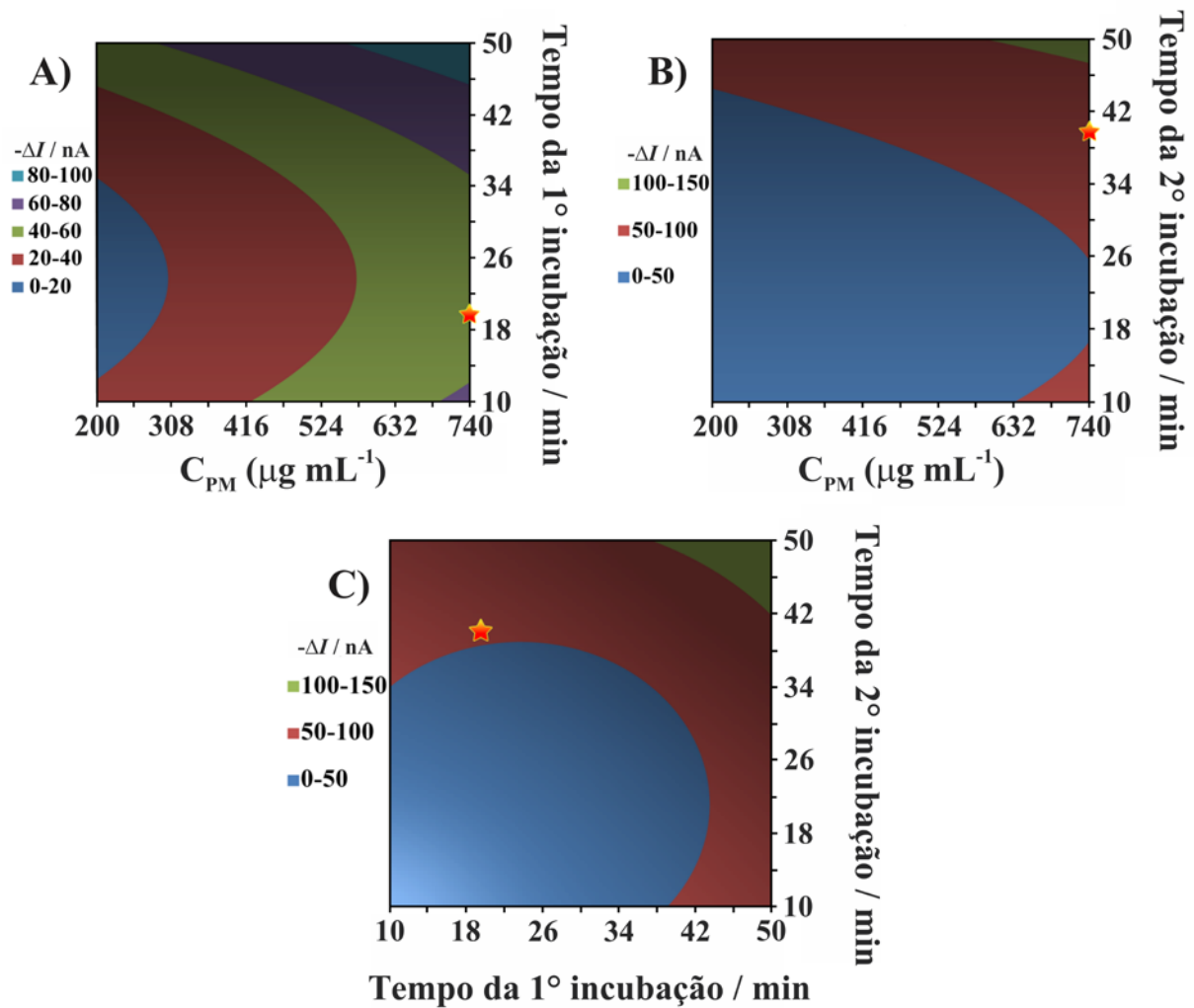


FIGURA 4.3 – Gráficos de contorno correlacionando duas variáveis significativas para diferentes respostas previstas foram analisados. A) A relação entre a concentração de PMs e o tempo de incubação entre PMs/proteína N e anti-N IgG. B) A relação entre a concentração de PMs e o tempo de incubação entre PMs/proteína N/anti-N IgG e anti-IgG/HRP. C) A relação entre o tempo de incubação entre PMs/proteína N e anti-N IgG e o tempo de incubação entre PMs/proteína N/anti-N IgG e anti-IgG/HRP.

Fonte: próprio autor.

De acordo com o gráfico de contorno da FIGURA 4.3A, observa-se que em altas concentrações de PMs e longos tempo de incubação de PMs/proteína N com anti-N IgG (> 46 min) há maiores respostas previstas pelo modelo, variando de 80 a 100 nA. Por outro lado, na FIGURA 4.3B a região de maior interesse seria referente a região verde do gráfico, o que implica em altas concentrações de PMs e tempos maiores que 46 min para incubação de

PMs/proteína N/anti-N IgG com os anticorpos anti-IgG/HRP. Por fim, na FIGURA 4.3C, observa-se que ambas as incubações em tempos maiores que 42 min resultariam na região de maior desejabilidade com uma resposta prevista de $-\Delta I$ variando de 100 a 150 nA.

Contudo, nas regiões ótimas são necessários tempos elevados para a realização dos ensaios o que levaria a tempos demasiadamente longos para a realização do diagnóstico. Nesse sentido, foi escolhida uma condição que proporcionasse uma resposta satisfatória no prazo de 1 h. Considerando que a resposta era mais influenciada pelo coeficiente b_4 , foi escolhido um tempo de incubação de PMs/proteína N/anti-N IgG com anticorpos anti-IgG/HRP de 40 min (nível +1) e um tempo de incubação entre o conjugado com anticorpos anti-N IgG de 20 min (nível -1), totalizando no prazo desejado. Por fim, a concentração de PMs foi definida no nível +2 ($740 \mu\text{g mL}^{-1}$) para os demais estudos. As regiões escolhidas são representadas por uma estrela vermelha na FIGURA 4.3.

Ademais, após escolher as condições de trabalho, pôde-se substituir os valores codificados das variáveis 1, 3 e 4 na EQUAÇÃO 4.2 ($v_1 = +2$, $v_3 = -1$, $v_4 = +1$) para descobrir a resposta prevista pelo modelo, $-\Delta I$ previsto = 73,77 nA. Para confirmar o valor previsto pelo planejamento, foram realizadas três medidas ($n = 6$) em três dispositivos diferentes por uma semana e foi observado que $-\Delta I$ medido em média foi de ~ 75 nA com DPR de 8,65%; validando assim que o sinal previsto pelos dados do planejamento foi de acordo com o observado experimentalmente.

4.2.2 Otimização do sistema microfluídico

4.2.2.1 Volume da alça de amostragem

Para otimizar o volume da alça de amostragem, a vazão foi mantida em $100 \mu\text{L min}^{-1}$, e as concentrações de HQ e H_2O_2 foram fixadas em 2,0 e 1,0 mmol L^{-1} , respectivamente. As demais condições seguiram o estabelecido pelo planejamento. A FIGURA 4.4A apresenta as correntes transientes na ausência e

presença de 100 fg mL^{-1} de anticorpos anti-N IgG para alças de 20, 50 e $100 \mu\text{L}$. O gráfico de barras na FIGURA 4.4B correlaciona $-\Delta I$ com os volumes das alças de amostragem estudadas.

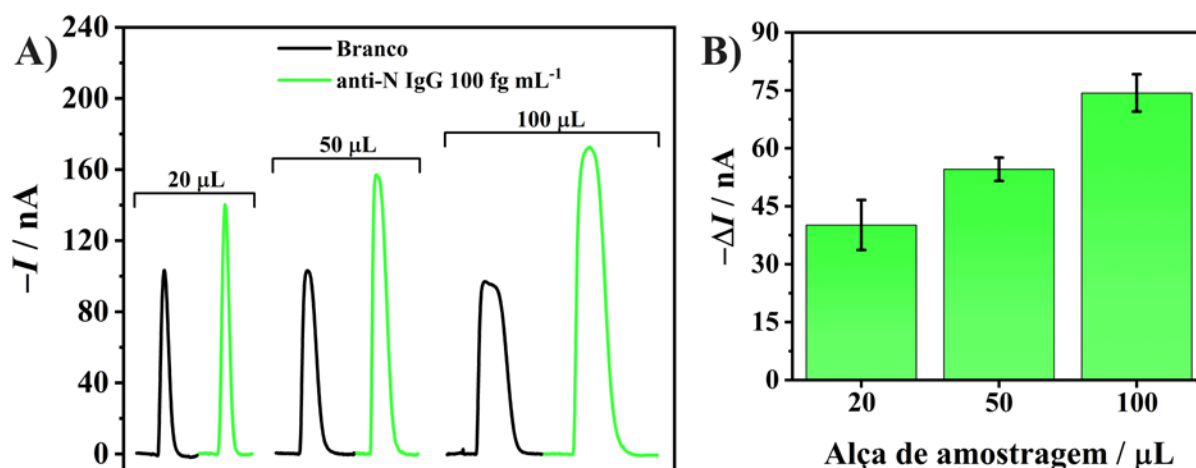


FIGURA 4.4 – A) Respostas de correntes transientes referentes a branco (—) e ao padrão (—) de 100 fg mL^{-1} anti-N IgG para diferentes volumes da alça de amostragem. B) Gráficos de barras correlacionado $-\Delta I$ com as alças de 20, 50 e $100 \mu\text{L}$. Parâmetros utilizados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{HQ}] = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, vazão = $100 \mu\text{L min}^{-1}$, tempo de incubação PMs/proteína N + anti-N IgG = 20 min e tempo de incubação PMs/proteína N/anti-N IgG + anti-IgG/HRP = 40 min.

Fonte: próprio autor.

Na FIGURA 4.4 é demonstrado que as correntes transientes do padrão aumentaram e exibiram um perfil mais largo com o aumento do volume da alça de amostragem, similar ao observado na seção 3.2.1.3. Esse comportamento é explicado pela maior quantidade de substrato e mediador redox injetados ao canal microfluídico, influenciando o ciclo catalítico da enzima HRP. Volumes maiores da alça de amostragem proporcionam maiores quantidades de solução de detecção para preencher o dispositivo, resultando na oxidação de maiores quantidades de HQ para BQ e na redução de maiores quantidades de BQ na superfície dos 8-WEs. Adicionalmente, o H_2O_2 e o HQ preenchem mais o canal microfluídico, gerando um sinal de corrente transiente mais amplo. Essa observação é corroborada pelo tempo necessário para a estabilização na linha de

base, que foi de cerca de 130 s para a alça de 20 μL , 180 s para a alça de 50 μL e 230 s para a alça de 100 μL .

Por outro lado, o sinal do branco manteve-se semelhante com o aumento do volume da alça de amostragem. A alça de 20 μL apresentou um branco de 104 ± 13 nA, enquanto as alças de 50 e 100 μL apresentaram valores de 102 ± 8 nA e 98 ± 3 nA, respectivamente. Esse comportamento sugere que o bloqueio das PMs com moléculas de etalonamina foi efetivo de forma que evitou interferências significativas no ciclo catalítico da enzima HRP ligada não especificamente nas PMs.

Ademais, a diferença de corrente entre o branco e o padrão aumenta com o volume da alça de amostragem conforme mostrado na FIGURA 4.4B. Foi obtido um $-\Delta I$ de 40 ± 6 nA para a alça de 20 μL , 55 ± 3 nA para a alça de 50 μL e 74 ± 5 nA para a alça de 100 μL . Nesse sentido, a alça de 100 μL foi escolhida como ideal para a continuidade do trabalho a fim de garantir maior magnitude de corrente nos estudos subsequentes.

4.2.2.2 *Avaliação da influência da vazão*

Para otimizar a vazão, o volume da alça de amostragem e as concentrações de HQ e H_2O_2 foram mantidas conforme descrito anteriormente. Na FIGURA 4.5A, são apresentadas as correntes transientes na ausência e presença de 100 fg mL^{-1} de anticorpos anti-N IgG para vazões de 50, 100 e 150 $\mu\text{L min}^{-1}$. O gráfico de barras na FIGURA 4.5B correlaciona $-\Delta I$ com as vazões estudadas.

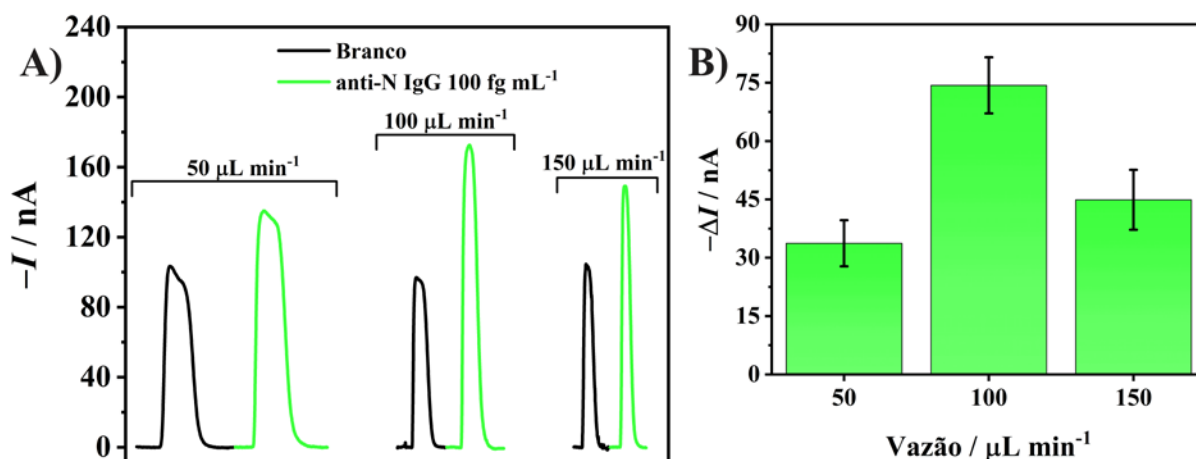


FIGURA 4.5 – A) Respostas de correntes transientes referentes a branco (—) e na presença de 100 fg mL^{-1} anti-N IgG (—) para diferentes vazões estudadas. B) Gráfico de barras correlacionado $-\Delta I$ com a vazão de 50, 100 e 150 $\mu\text{L min}^{-1}$. Parâmetros utilizados: $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $[\text{HQ}] = 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, volume da alça de amostragem = 100 μL , tempo de incubação PMs/proteína N + anti-N IgG = 20 min e tempo de incubação PMs/proteína N/anti-N IgG + anti-IgG/HRP = 40 min.

Fonte: próprio autor.

Conforme mostrado na FIGURA 4.5A, o sinal de corrente transiente na presença de anticorpos anti-N IgG e com vazão de 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ apresentou um perfil mais largo (430 s) e de menor magnitude, com uma corrente de $137 \pm 6 \text{ nA}$. Com uma vazão de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$, a corrente transiente foi mais estreita (230 s) e de maior magnitude, $177 \pm 7 \text{ nA}$. Para a vazão de 150 $\mu\text{L min}^{-1}$, o perfil de corrente transiente foi o mais estreito (160 s) que os demais, com uma magnitude de $150 \pm 8 \text{ nA}$.

Na vazão de 50 $\mu\text{L min}^{-1}$, o substrato e o mediador redox passam mais lentamente pelo canal microfluídico, o que não favorece o ciclo catalítico da enzima HRP. Assim, a vazão menor prolonga a resposta, resultando em um perfil de corrente transiente mais largo e uma magnitude de corrente reduzida. Por outro lado, na vazão de 150 $\mu\text{L min}^{-1}$, o fluxo excessivamente rápido influencia negativamente o ciclo catalítico da enzima HRP, produzindo um sinal de corrente transiente mais estreito e de menor magnitude.

A FIGURA 4.5A também mostra que a magnitude de corrente transiente do branco foi semelhante independentemente da vazão estudada. A resposta de corrente do branco na vazão de $50 \mu\text{L min}^{-1}$ foi de $103 \pm 8 \text{ nA}$, enquanto nas vazões de 100 e $150 \mu\text{L min}^{-1}$, foram de $100 \pm 4 \text{ nA}$ e $105 \pm 7 \text{ nA}$, respectivamente. Isso sugere que a taxa de reações não específicas dos anticorpos anti-IgG/HRP as PMs são baixas e constantes, com o ciclo catalítico da enzima HRP atingindo seu máximo mesmo em menores vazões. Portanto, a magnitude de corrente permanece semelhante, embora o perfil da corrente transiente variou tenha variado conforme a vazão.

Na FIGURA 4.5B, é apresentada a diferença de corrente para cada vazão estudada. Para a vazão de $50 \mu\text{L min}^{-1}$, o $-\Delta I$ foi de $34 \pm 6 \text{ nA}$, enquanto para a vazão de $150 \mu\text{L min}^{-1}$, o $-\Delta I$ foi de $45 \pm 8 \text{ nA}$. A vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ apresentou o maior $-\Delta I$, de $74 \pm 7 \text{ nA}$, sendo escolhida como a ideal para os estudos subsequentes.

4.2.3 Curva analítica

Após as otimizações, o magneto-imunoensaio foi aplicado em soluções padrão com concentrações crescentes de anticorpos anti-N IgG para construção da curva analítica. Em cada medida realizada, um novo dispositivo foi utilizado e descartado para cada concentração. Os sinais transientes de corrente utilizados para a construção da curva analítica estão apresentados na FIGURA 4.6A. Além disso, na FIGURA 4.6B é apresentado a curva analítica obtida, onde o valor do branco foi subtraído dos resultados.

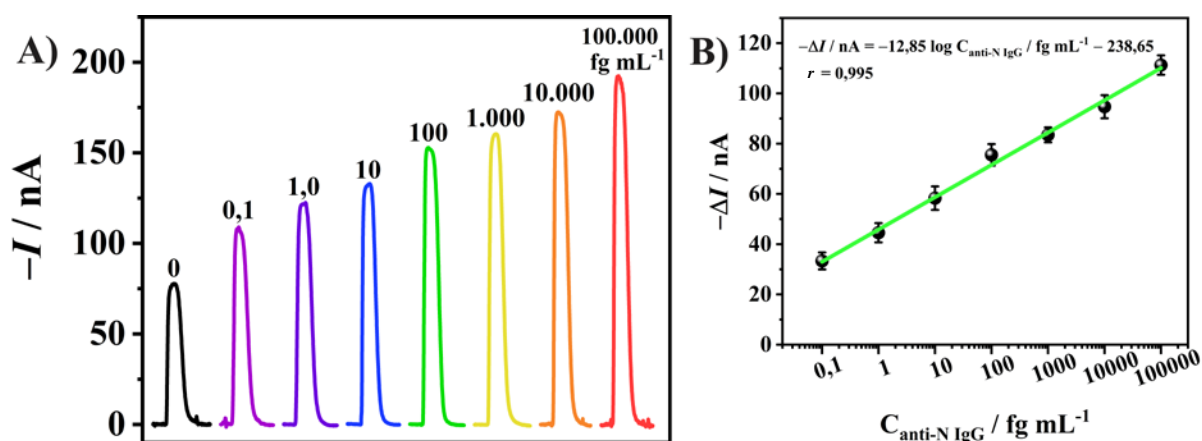


FIGURA 4.6 – A) Respostas de corrente transiente para diferentes concentrações de anticorpos anti-N IgG na faixa de 0,1–100.000 fg mL⁻¹. B) Curva analítica correlacionando a diferença de corrente em função do logaritmo da concentração de anticorpos anti-N IgG (n = 6). Parâmetros utilizados: [H₂O₂] = 1,0 mmol L⁻¹, [HQ] = 2,0 mmol L⁻¹, volume da alça de amostragem = 100 μL, vazão = 100 μL min⁻¹, tempo de incubação PMs/proteína N + anti-N IgG = 20 min e tempo de incubação PMs/proteína N/anti-N IgG + anti-IgG/HRP = 40 min.

Fonte: próprio autor.

As correntes transientes aumentaram linearmente com o logaritmo da concentração de anticorpos anti-N IgG, na faixa de 0,01 a 100.000 fg mL⁻¹. A equação de regressão linear derivada foi $-\Delta I / \text{nA} = -239 - 12,9 \times \log C_{\text{anti-N IgG}} / \text{fg mL}^{-1}$, com um r de 0,995, indicando uma excelente relação linear entre a resposta e a concentração de anticorpos IgG anti-N SARS-CoV-2. A sensibilidade analítica foi de $-12,9 \text{ nA mL fg}^{-1} \log C_{\text{anti-N IgG}}$ e o limite de detecção foi calculado usando a equação $3,3 \times \text{SD} / \theta^{240}$, resultando em 51 ag mL⁻¹. Ademais, a capacidade do magneto-imunoensaio de detectar concentrações muito baixas de anticorpos oferece a possibilidade de trabalhar com pequenas quantidades de amostra para realizar a análise.

4.2.4 Repetibilidade do magneto-imunoensaio

A repetibilidade do magneto-imunoensaio para a determinação de 100 fg mL⁻¹ de anticorpos anti-N IgG foi avaliada por meio das análises intradia e interdía. Todas as medidas foram feitas pelo mesmo operador. Para o estudo de

repetibilidade intradia, foram utilizados seis dispositivos diferentes para análise no mesmo dia. Conforme apresentado na FIGURA 4.7A, para cada dispositivo foi obtido um $-\Delta I$ médio ($n = 6$) e seu respectivo desvio padrão. Assim, o DPR foi calculado considerando os desvios de cada análise, resultando em uma diferença de corrente média de 75 ± 6 nA e um DPR de 8,6%.

Por fim, a avaliação da repetibilidade interdia foi realizada por meio de medições com sete dispositivos diferentes em dias distintos, resultando em uma $-\Delta I$ média de 77 ± 7 nA e um DPR de 9,6%, conforme apresentado na FIGURA 4.7B. Todos os resultados destes estudos apresentaram um DPR menor que 10%, indicando a alta precisão do método analítico proposto.

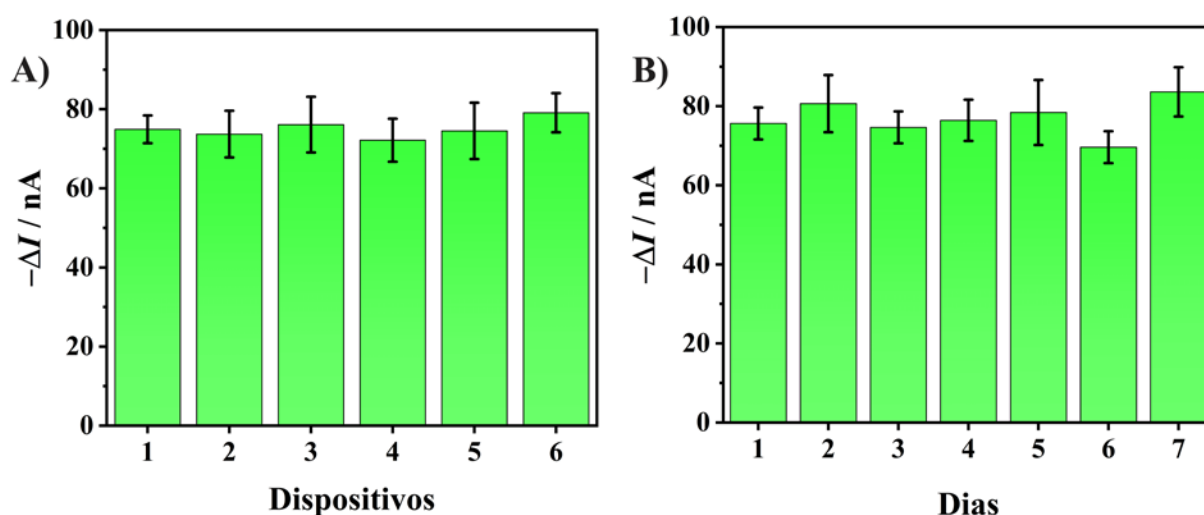


FIGURA 4.7 – Estudo da repetibilidade (A) análise intradia (mesmo dia) e (B) análise interdia (dias diferentes). Parâmetros utilizados: FIGURA 4.6.

Fonte: próprio autor.

4.2.5 Estabilidade do conjugado PMs/proteína N

Antes de continuar os estudos para aplicação do magneto-imunoensaio, foi avaliado a estabilidade do conjugado PMs/proteína N. Para esse estudo, um único lote de PMs foi modificado e utilizado ao longo de 28 dias, sendo que somente o magneto-imunoensaio para formação do bioconjugado PM/proteína N/anti-N IgG/anti-IgG/HRP foi realizado no dia da análise. Na

FIGURA 4.8 é apresentado o gráfico de barras para as medidas feitas em 28 dias, no qual as barras listradas (■) representam o branco e as barras em verde (■) representam o sinal de corrente obtido na presença de 100 fg mL^{-1} de anti-N IgG.

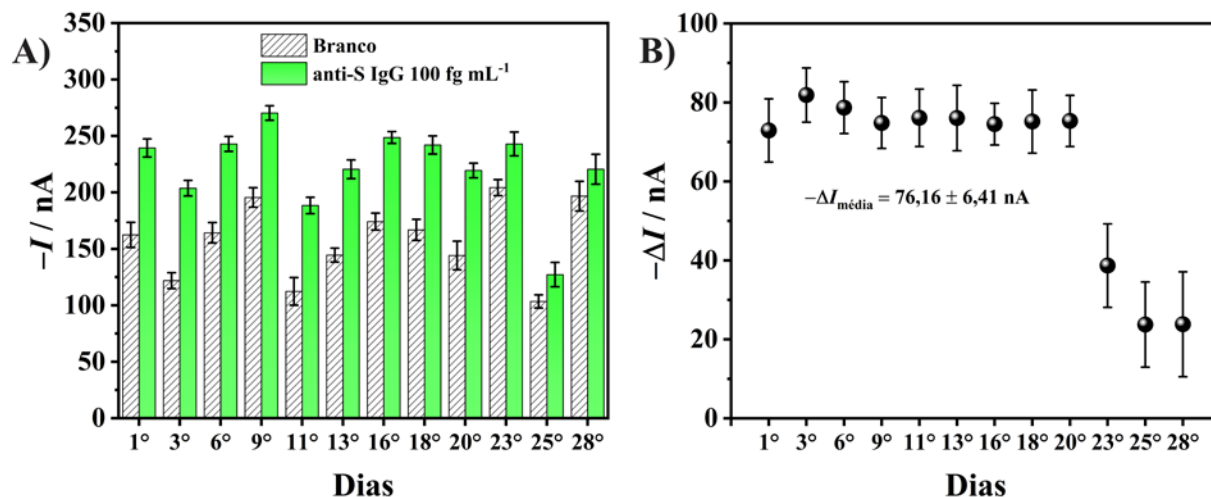


FIGURA 4.8 – A) Gráfico de barras representando as respostas de corrente para medidas realizadas na ausência (■) e presença de 100 fg mL^{-1} de anti-N IgG (■) dentro de 28 dias. B) Diferença de corrente obtidos para os 28 dias de análise. Parâmetros utilizados: FIGURA 4.6. Fonte: próprio autor.

Na FIGURA 4.8A, observa-se novamente a variação do sinal de corrente transiente do branco e do padrão para dias diferentes conforme observado e discutido na seção 3.2.1.2 do capítulo 3. No entanto, a amplitude da variação de sinal foi menor (de 100 a 270 nA) quando comparado com os dados obtidos no método empregando a proteína S na PMs (de 30 a 300 nA). Além disso, é possível observar que até o 20° dia houve uma diferença acentuada entre a resposta do branco (■) e do padrão (■). Contudo, do 23° ao 28° dia observa-se que as barras verdes estão mais próximas das barras listradas, no qual indicia que após o 23° dia as PMs modificadas não são mais eficazes para captura dos anticorpos específicos e realização do magneto-imunoneaio.

A FIGURA 4.8B apresenta as respostas de $-\Delta I$ para os experimentos realizados para a avaliação da estabilidade do conjugado PMs/proteína N. Nos primeiros 20 dias, foram obtidos sinais de corrente próximos com um $-\Delta I$ médio

de 76 ± 6 nA e um DPR de 8,42% o que indica que o conjugado PMs/proteína N pode ser usado para realização do magneto-imunoensaio em até 20 dias após a modificação das PMs. No entanto, entre o 23° e 28° dia, houve uma queda de 49 a 69% no sinal $-\Delta I$, indicando a perda da eficácia do conjugado PMs/proteína N em capturar os anticorpos alvos. Como descrito na seção 3.2.1.2, acredita-se que essa queda na eficácia do magneto-imunoensaio após o 20° dia está diretamente relacionada ao armazenamento prolongado do conjugado, levando à desnaturação, degradação e oxidação da proteína N.

4.2.6 Avaliação da reação cruzada

Antes de iniciar os testes com amostras de plasma humano, foi avaliada a seletividade do magneto-imunoensaio utilizando o conjugado PMs/proteína N. Esse estudo visou verificar a capacidade do conjugado em capturar os anticorpos anti-N IgG e a capacidade dos anticorpos anti-IgG/HRP de se ligarem aos anticorpos capturados pelas PMs. A FIGURA 4.9 ilustra o sinal de corrente obtido para os ensaios em três condições: após a incubação do conjugado PMs/proteína N com PBS pH 7,4 (■), após a incubação do conjugado com anticorpos anti-S IgG e IgM (■), e após a realização do imunoensaio com anticorpos anti-N IgG (■) na concentração de 100 fg mL^{-1} .

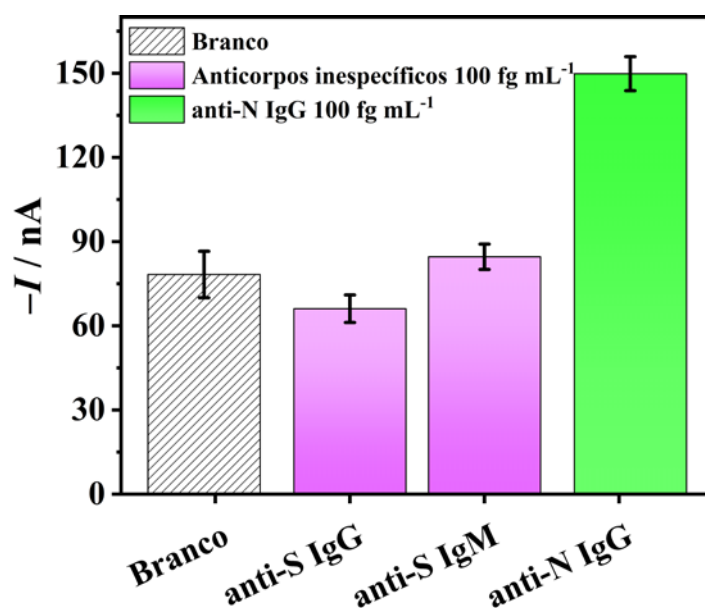


FIGURA 4.9 – Avaliação da reação cruzada de anticorpos anti-IgG/HRP frente a 100 fg mL^{-1} de anticorpos não específicos (■) e validação da interação específica PMs/proteína N/anti-N IgG/anti-IgG/HRP (■). Parâmetros utilizados: FIGURA 4.6.

Fonte: próprio autor.

Conforme apresentado no gráfico de barras da FIGURA 4.9, os sinais de corrente foram de magnitude semelhante e menores que 90 nA para os ensaios na ausência de anticorpos e na presença de anticorpos anti-S. No entanto, na presença de anticorpos anti-N IgG, foi obtido um sinal de corrente aproximadamente 82% maior que o do branco e dos demais estudos. Essa observação permite concluir que o método proposto não apresentou reação cruzada entre os anticorpos anti-S e o conjugado adicionado (PMs/proteína N), nem com o anticorpo anti-IgG/HRP. Na presença de anticorpos anti-S IgG ou IgM, a resposta de corrente foi menor ou igual ao do branco, indicando a elevada seletividade do magneto-imunoensaio proposto.

Deste modo, esse estudo demonstrou que o método é capaz de detectar seletivamente os anticorpos anti-N IgG sem a interferência de outros componentes presentes nas amostras de plasma humano. A ausência de reação cruzada é um indicativo importante da seletividade do magneto-imunoensaio, reforçando sua eficácia para a detecção precisa de anticorpos anti-N IgG.

4.2.7 Estudo da diluição da amostra

Antes da aplicação de todas as amostras, foi realizado um estudo de diluição empregando uma amostra de plasma de um indivíduo diagnosticado com COVID-19. A amostra escolhida (PC1) foi testada com diluições variando de 1:10 (menos diluída) a 1:1.000.000 (mais diluída) e foi descontado o valor do branco para cada diluição estudada, conforme apresentado na FIGURA 4.10.

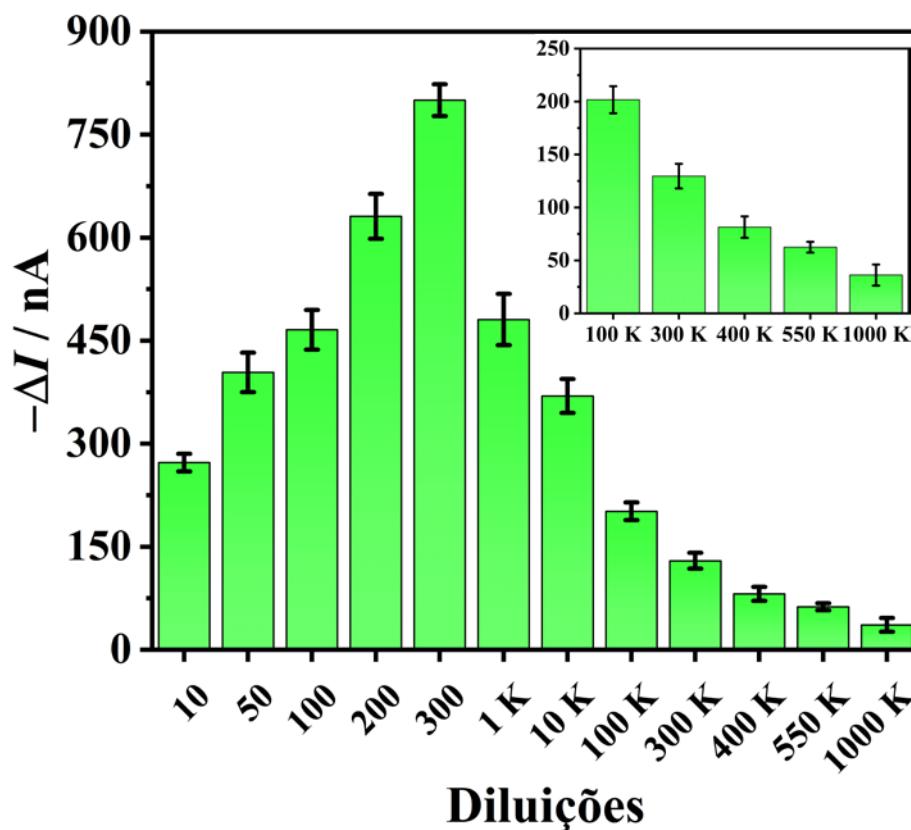


FIGURA 4.10 – Respostas de corrente transiente obtidas para diluições da amostra de plasma PC14 de 1:10 até 1:1.000.000. Parâmetros utilizados são os mesmos da FIGURA 4.6.

Fonte: próprio autor.

Conforme apresentado na FIGURA 4.10, na faixa de 1:10 até 1:300, observou-se um aumento de corrente à medida que a amostra PC1 foi diluída, obtendo-se o maior $-\Delta I$ em uma diluição de 1:300. Esse fenômeno pode ter ocorrido devido à diminuição do efeito matriz em diluições mais elevadas, o que

pode facilitar a captura de anticorpos pelas PMs e minimizar a interferência de materiais biológicos presentes na amostra. Contudo, os valores de $-\Delta I$ foram excessivamente altos quando comparados com a curva analítica. Portanto, novas diluições de 1:1.000 a 1:1.000.000 foram testadas para encontrar a diluição que proporcionasse um $-\Delta I$ próximo do último ponto da curva.

Na FIGURA 4.10, nota-se que a partir da diluição 1:100.000, os sinais resultantes ficaram abaixo de 200 nA, mas somente na diluição 1:300.000 foi obtida uma magnitude de corrente próxima do último ponto da curva analítica. Portanto, a diluição 1:300.000 foi escolhida para a análise das demais amostras, visando validar o magneto-imunoensaio proposto para o diagnóstico da COVID-19.

4.2.8 Avaliação do magneto-imunoensaio em amostras controle e de pacientes diagnosticados com COVID-19

Determinada a diluição ideal para a amostra PC1, as demais amostras CT e PC foram diluídas 300.000 vezes em PBS pH 7,4. A resposta de corrente para cada amostra foi subtraída da resposta de corrente do branco, e o valor de $-\Delta I$ foi utilizado na equação da curva analítica, $-\Delta I / \text{nA} = -239 - 12,9 \times \log C_{\text{anti-N IgG}} / \text{fg mL}^{-1}$. Assim, as concentrações de anticorpos anti-N IgG foram determinadas e são apresentadas na TABELA 4.6. Observa-se que grande parte das amostras de indivíduos contaminados com COVID-19 apresentaram concentrações de anticorpos anti-N IgG mais altas do que as amostras de indivíduos saudáveis, o que pode indicar uma melhor separação dos grupos de indivíduos.

TABELA 4.6 – Concentração de anticorpos anti-N IgG determinadas para amostras CT e PC. Parâmetros empregados: FIGURA 4.5.

CT	$C_{\text{anti-N IgG}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	PC	$C_{\text{anti-N IgG}}$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
CT1	0,646	PC1	105
CT2	6,46	PC2	75,8
CT3	0,000136	PC3	0,645
CT4	0,00269	PC4	13,4
CT5	0,331	PC5	0,675
CT6	0,0000896	PC6	54,4
CT7	0,000149	PC7	3,38
CT8	0,000965	PC8	2,81
CT9	0,000124	PC9	0,517
CT10	0,0000947	PC10	0,192
CT11	0,0688	PC11	61,9
CT12	0,212	PC12	11,4
CT13	0,00435	PC13	0,00354
CT14	0,0106	PC14	0,00149
CT15	0,00118	PC15	91,1
-	-	PC16	12,3
-	-	PC17	0,231
-	-	PC18	34,8
-	-	PC19	33,3
-	-	PC20	10,2
-	-	PC21	16,8

Para avaliar a capacidade do magneto-imunoensaio para o diagnóstico da COVID-19, os resultados apresentados na TABELA 4.6 foram

analisados utilizando a curva ROC. A curva ROC para o biomarcador anti-N IgG é mostrado na FIGURA 4.11. A partir dos resultados obtidos com as amostras CT e PC, a AUC foi de $0,927 \pm 0,005$ ($p < 0,001$), valor que indica uma excelente capacidade discriminatória entre amostras positivas e negativas para COVID-19. Para visualizar melhor a capacidade do magneto-imunoensaio em discriminar as amostras positivas das negativas, os dados foram representados por meio de um diagrama de pontos. Na FIGURA 4.12 é ilustrado o diagrama dos resultados obtidos, com os pontos distribuídos nos eixos verticais representando as concentrações de cada amostra, e o valor de corte indicado por uma linha horizontal.

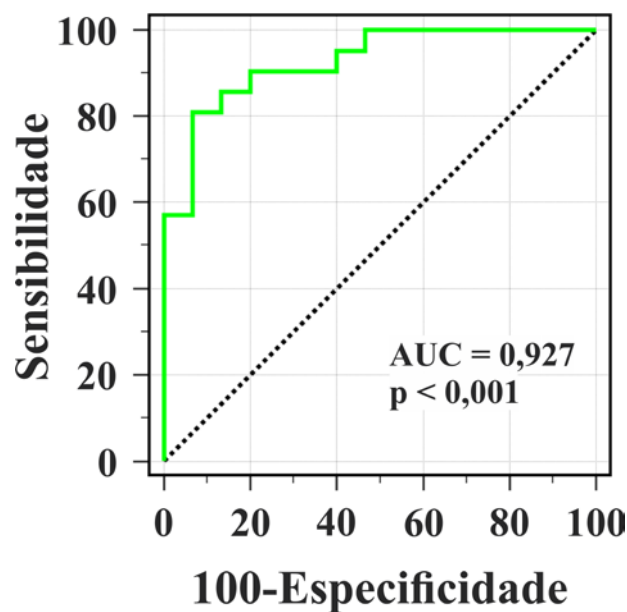


FIGURA 4.11 – Curva ROC para diagnóstico de COVID-19 por meio da detecção de anticorpos anti-N IgG. Resposta de indivíduos saudáveis vs. pacientes positivos para COVID-19. Parâmetros utilizados: FIGURA 4.6.

Fonte: próprio autor.

Por meio da análise dos diagramas de pontos na FIGURA 4.12, o magneto-imunoensaio para detecção de anticorpos anti-N IgG alcançou 81,0% de sensibilidade e 93,3% de especificidade. Neste estudo, o ponto de corte foi de $> 0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$, maior que os obtidos na seção 3.2.6, onde foi obtido um valor de

Vale ressaltar que as amostras PC13 e PC14 também ficaram abaixo da linha de corte nos estudos para determinação de anti-S IgG, indicando uma certa semelhança nos dois métodos e que os indivíduos não possuíam anticorpos IgG contra as proteínas S nem N. Por outro lado, foram determinadas altas concentrações de anticorpos IgM contra a proteína S nas amostras PC13 e PC14, podendo-se afirmar que esses indivíduos estavam no estágio recente da infecção e, por isso, não apresentaram anticorpos IgG.

Além disso, a amostra PC17 também foi classificada como falsa negativa no estudo de determinação de anti-S IgM. No estudo com a proteína S, foi determinada uma concentração de $0,177 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-S IgG, o que condiz com a concentração determinada neste estudo com a proteína N, onde foi determinado $0,231 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-N IgG. Contudo, a amostra PC17 foi classificada como verdadeira positiva nos estudos para anti-S IgG e falsa negativa nos estudos para anti-N IgG. Essa diferença pode ser explicada pela linha de corte encontrada no gráfico de pontos da FIGURA 4.12, que mostra que o magneto-imunoensaio para determinação de anti-N IgG possui menor sensibilidade.

Foram determinadas concentrações semelhantes para a amostra PC10 nos estudos para anti-S IgG, anti-S IgM e anti-N IgG, sendo de $0,127$, $0,133$ e $0,129 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. No entanto, apenas nos estudos para determinação de anti-N IgG a amostra PC10 foi classificada como falsa negativa. Isso comprova que o magneto-imunoensaio empregando o conjugado PMs/proteína N apresentou menor sensibilidade quando comparado com os estudos com a proteína S. Tal afirmação é corroborada ao comparar a sensibilidade obtida na figura de pontos para os métodos estudados, com 85,7% para anti-S IgG, 90,5% para anti-S IgM e 81% para anti-N IgG.

Ademais, os resultados obtidos de sensibilidade e especificidade para a detecção de anticorpos IgG contra a proteína N do SARS-CoV-2 demonstram que o magneto-imunoensaio pode ser utilizado tanto para o diagnóstico de

COVID-19 quanto para a classificação dos casos positivos, contribuindo para o início e a orientação de um tratamento adequado para o paciente.

4.2.9 Aplicação do magneto-imunoensaio em amostras de plasma humano para detecção de anticorpos IgM

O magneto-imunoensaio empregando o conjugado PMs/proteína N foi aplicado em amostras de plasma CT e PC. Devido à falta de anticorpos padrão anti-N IgM, foi realizado apenas um estudo qualitativo para validação do método. As 36 amostras de plasma foram diluídas 300.000 vezes e os resultados de $-\Delta I$ foram analisados na curva ROC e no gráfico de pontos, conforme apresentado na FIGURA 4.13. Com base na FIGURA 4.13A, o valor de AUC foi de $0,994 \pm 0,002$ ($p < 0,001$), indicando uma excelente capacidade discriminatória entre amostras positivas e negativas para COVID-19. Além disso, pela análise dos diagramas de pontos na FIGURA 4.13B, o magneto-imunoensaio para detecção de anticorpos anti-N IgM alcançou 95,2% de sensibilidade e 100% de especificidade. Neste estudo, o ponto de corte foi > 24 nA.

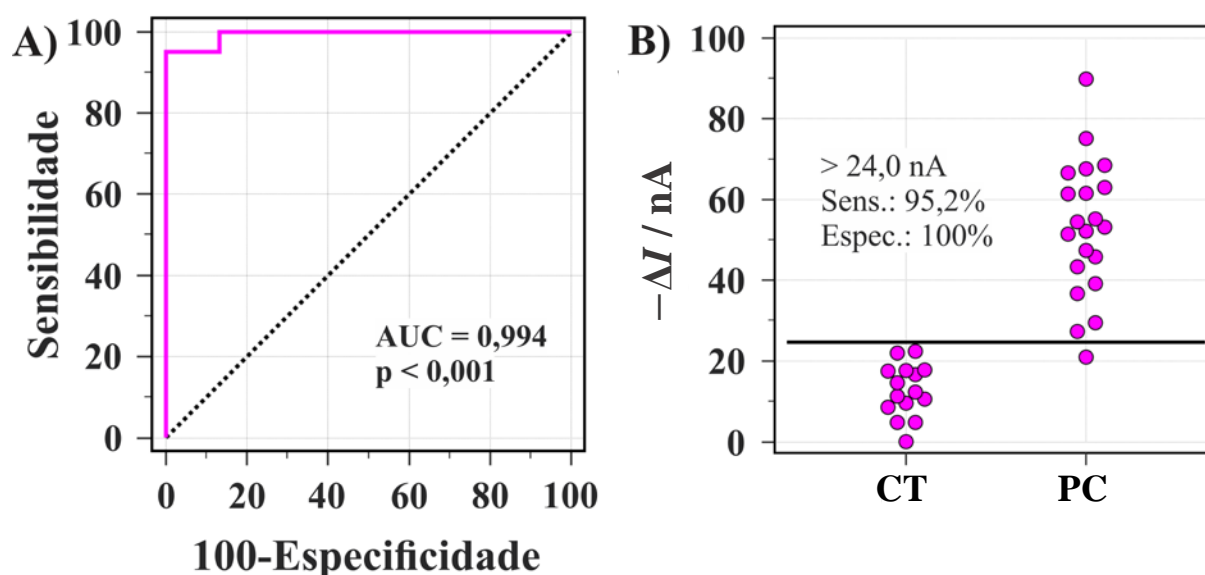


FIGURA 4.13 – Curva ROC (A) e diagrama de pontos (B) para detecção de anticorpos anti-N IgM nas amostras CT e PC. Parâmetros utilizados: FIGURA 4.6.

Fonte: próprio autor.

Esses resultados indicam que todas as amostras classificadas como negativas pela técnica de RT-PCR foram corretamente identificadas pelo magneto-imunoensaio para detecção de anticorpos anti-N IgM. Além disso, quase todas as amostras positivas foram devidamente classificadas. Como observado na FIGURA 4.13B, apenas uma amostra ficou abaixo da linha de corte, sendo a amostra PC7. Nos demais estudos, foram determinadas concentrações de $0,479 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-S IgG, $0,0632 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-S IgM e $3,38 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anti-N IgG. Portanto, conclui-se que o paciente PC7 estava na fase tardia pós-infecção pelo vírus SARS-CoV-2, pois apresentava baixos níveis de anticorpos IgM e altos níveis de anticorpos IgG.

Embora o magneto-imunoensaio tenha sido aplicado qualitativamente para detecção de anticorpos anti-N IgM, acredita-se que esse método é bastante útil para casos de infecção recente, apresentando melhor sensibilidade e especificidade que os demais testes avaliados.

4.3 Considerações parciais

Neste estudo, foi desenvolvido e validado um magneto-imunoensaio de alta sensibilidade e precisão para a detecção de anticorpos anti-N IgG visando o diagnóstico da COVID-19. Utilizou-se um dispositivo microfluídico descartável, capaz de realizar oito medidas simultâneas para a análise eletroquímica.

Um planejamento fatorial forneceu condições ótimas para a modificação das PMs (C_{PMs} e $C_{\text{proteína N}}$) e a realização do magneto-imunoensaio (tempos de incubação). O método demonstrou excelente linearidade na resposta analítica, com um r de 0,995 e uma sensibilidade analítica de $-12,9 \text{ nA mL fg}^{-1} \log \text{ C anti-N IgG}$. O limite de detecção alcançado foi de apenas 51 ag mL^{-1} , evidenciando a capacidade do método de detectar concentrações extremamente baixas de anticorpos.

A precisão do ensaio foi avaliada através de estudos de análises intradia e interdía, ambos apresentando DPR inferiores a 10%, comprovando a repetibilidade do método. Os resultados demonstram a viabilidade do magneto-imunoensaio como uma ferramenta confiável para o diagnóstico da COVID-19, com desempenho diferenciado na detecção dos anticorpos específicos.

Para anticorpos anti-N IgG, o método mostrou alta precisão e seletividade. Experimentos com diluições da amostra PC1 indicaram que na diluição 1:300.000 o método foi eficaz em discriminar amostras positivas e negativas. A análise das curvas ROC revelou uma AUC de 0,927, indicando excelente capacidade discriminatória. A sensibilidade alcançada foi de 81,0% e a especificidade de 93,3%, valores que corroboram a eficácia do método no diagnóstico da COVID-19. Algumas limitações foram observadas, como menor sensibilidade comparada aos métodos para detecção de anticorpos anti-S IgG e IgM. Ainda assim, a capacidade do magneto-imunoensaio de detectar concentrações elevadas de anticorpos em indivíduos contaminados destaca seu potencial diagnóstico.

Para anticorpos anti-N IgM, o estudo qualitativo em amostras de plasma diluídas apresentou resultados promissores. A análise ROC mostrou uma AUC de 0,994, indicando excelente capacidade discriminatória. A sensibilidade foi de 95,2% e a especificidade de 100%, demonstrando alta eficácia na detecção de anticorpos anti-N IgM.

Em conclusão, o magneto-imunoensaio utilizando o conjugado PMs/proteína N mostrou-se uma ferramenta eficaz para o diagnóstico da COVID-19, com elevada especificidade e sensibilidade clínica para detecção de anticorpos anti-N IgG e IgM. Dessa forma, este método contribui significativamente para a identificação e monitoramento de indivíduos infectados, facilitando intervenções clínicas mais precisas e oportunas.

CONCLUSÕES

Capítulo 5

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram desenvolvidos e validados dois magneto-imunoensaios para diagnóstico da COVID-19. A captura dos anticorpos específicos foi realizada por meio das proteínas S e N do vírus SARS-CoV-2. Utilizou-se um dispositivo microfluídico descartável construído com materiais de baixo custo, composto por SPEs obtidos por serigrafia. O dispositivo permitiu realizar até oito medidas simultâneas, com resultados obtidos por amperometria.

Para o magneto-imunoensaio com a proteína S, avaliou-se o método de bloqueio das PMs e a durabilidade do conjugado PMs/proteína S. Otimizaram-se parâmetros do sistema microfluídico, como o volume da alça de amostragem, vazão da bomba de seringa e tempos de incubação para formação do bioconjugado final PMs/proteína S/anti-S Ig/anti-Ig/HRP. As curvas analíticas indicaram excelente linearidade entre $-\Delta I$ e concentração de anticorpos anti-S, com sensibilidades semelhantes para IgG e IgM. Os limites de detecção obtidos foram de $7,13 \text{ ag mL}^{-1}$ para IgG e $55,4 \text{ ag mL}^{-1}$ para IgM. A precisão dos ensaios, com DPR abaixo de 10%, indicou boa repetibilidade do método.

Pelo teste de reação cruzada foi verificado que os anticorpos anti-N não se ligaram à proteína S do conjugado PMs/proteína S. Além disso, foi avaliado que bioconjugados semelhantes ao PMs/proteína S/anti-S Ig/anti-Ig/HRP não foram formados com anticorpos não específicos o que exclui a possibilidade de reação cruzada. No teste de validação com as amostras, as concentrações de anticorpos mostraram diferenças acentuadas entre as amostras CT e PC diluídas 80.000 vezes. A curva ROC e os diagramas de pontos indicaram excelente capacidade discriminatória para o diagnóstico, com sensibilidade superior a 85% e especificidade de 93,3%. O ensaio também foi eficiente em classificar o estágio da doença, diferenciando infecções recentes e tardias pelo título de anticorpos por meio da detecção e quantificação dos anticorpos IgG e IgM, respectivamente.

Para o magneto-imunoensaio com a proteína N, um planejamento experimental forneceu condições ótimas para modificação das PMs e realização do imunoensaio. A curva analítica indicou excelente linearidade entre $-\Delta I$ e concentração de anticorpos anti-N IgG, com limite de detecção de 51 ag mL⁻¹. Além disso, com as análises repetibilidade intradia e interdia foi observado que os dispositivos microfluídicos descartáveis apresentaram excelente precisão com DPR abaixo de 10%.

A estabilidade do conjugado PMs/proteína do SARS-CoV-2 foi avaliada, com estabilidade de sinal de corrente para o conjugado PMs/proteína S por 15 dias e PMs/proteína N por 20 dias, indicando o prazo para as PMs poderem ser guardadas sob refrigeração para futuras aplicações. Ademais, pelo teste de reação cruzada foi verificado que os anticorpos anti-S não reagiram à proteína N indicando ausência de reatividade cruzada com anticorpos não específicos.

As concentrações de anticorpos IgG nas amostras mostraram diferenças significativas entre CT e PC, com diluições de 300.000 vezes. A curva ROC e os diagramas de pontos indicaram excelente capacidade discriminatória para o diagnóstico, com sensibilidade e especificidade superiores a 80%. Avaliou-se também a capacidade do ensaio em realizar detecção qualitativa de anticorpos IgM contra a proteína N, com sensibilidade e especificidade superiores a 95%. Embora o magneto-imunoensaio para detecção de anti-N IgG tenha menor sensibilidade em comparação aos anti-S, o método mostrou-se eficaz para discriminar amostras positivas e negativas para COVID-19.

Em suma, os magneto-imunoensaios desenvolvidos apresentaram excelente capacidade discriminatória entre amostras de pacientes contaminados e indivíduos saudáveis. Além disso, os métodos demonstraram utilidade na verificação de infecções recentes e tardias pela detecção de anticorpos IgG e IgM, respectivamente. Com isso, o magneto-imunoensaio utilizando os conjugados PMs/proteína S e PMs/proteína N mostrou-se uma ferramenta valiosa e confiável para o diagnóstico da COVID-19. Nesse sentido, os métodos apresentaram alta

sensibilidade e especificidade, detectando e quantificando anticorpos anti-S IgG, anti-S IgM e anti-N IgG de maneira eficaz.

A metodologia tem potencial para ser adaptada e ampliada para a detecção de outros biomarcadores, contribuindo significativamente para o avanço das técnicas de diagnóstico imunológico, especialmente em virologia. Isso é crucial para a identificação e monitoramento de indivíduos infectados, facilitando intervenções clínicas mais precisas e oportunas, além de oferecer uma plataforma para estudos epidemiológicos e monitoramento de respostas imunológicas em indivíduos vacinados ou infectados.

6 REFERÊNCIAS

1. Shereen, M. A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N. & Siddique, R. COVID-19 infection: emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res* 24, 91–98 (2020).
2. Lai, C. C., Shih, T. P., Ko, W. C., Tang, H. J. & Hsueh, P. R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): the epidemic and the challenges. *Int J Antimicrob Agents* 55, 105924 (2020).
3. Rehman, S. U., Shafique, L., Ihsan, A. & Liu, Q. Evolutionary trajectory for the emergence of novel coronavirus SARS-CoV-2. *Pathogens* 9, 240 (2020).
4. Hu, B., Guo, H., Zhou, P. & Shi, Z. L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* 19, 141–154 (2021).
5. Ciotti, M. et al. The COVID-19 pandemic. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 365–388 (2020).
6. COVID-19 cases | WHO COVID-19 dashboard.
<https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?m49=076&n=c>.
7. COVID-19 deaths | WHO COVID-19 dashboard.
<https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths?m49=076&n=c>.
8. Lotfi, H., Mazar, M. G., Ei, N. M. H., Fahim, M. & Yazdi, N. S. Vaccination is the most effective and best way to avoid the disease of COVID-19. *Immun Inflamm Dis* 11, e946 (2023).
9. Pordanjani, S. R. et al. A comprehensive review on various aspects of SARS-CoV-2 (COVID-19) vaccines. *Int J Prev Med* 13, 151 (2022).
10. Samara, A. A., Boutlas, S., Janho, M. B., Gourgoulianis, K. I. & Sotiriou, S. COVID-19 severity and mortality after vaccination against SARS-CoV-2 in central greece. *J Pers Med* 12, 1423 (2022).
11. Amanatidou, E. et al. Breakthrough infections after COVID-19 vaccination: insights, perspectives and challenges. *Metabol Open* 14, 100180 (2022).
12. Chakraborty, C., Bhattacharya, M. & Dhama, K. SARS-CoV-2 vaccines, vaccine development technologies, and significant efforts in vaccine development during the pandemic: the lessons learned might help to fight against the next pandemic. *Vaccines* 11, 682 (2023).
13. Huai Luo, C. et al. Infection with the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) delta bariant is associated with higher recovery of infectious virus compared to the alpha variant in both unvaccinated and vaccinated individuals. *Clinical Infectious Diseases* 75, e715–e725 (2022).

14. Boschiero, M. N., Palamim, C. V. C. & Marson, F. A. L. The hindrances to perform the COVID-19 vaccination in Brazil. *Hum Vaccin Immunother* 17, 3989–4004 (2021).
15. Xu, S. et al. Real-world effectiveness and factors associated with effectiveness of inactivated SARS-CoV-2 vaccines: a systematic review and meta-regression analysis. *BMC Med* 21, 1–14 (2023).
16. Verma, A. et al. Recurring SARS-CoV-2 variants: an update on post-pandemic, co-infections and immune response. *Nanotheranostics* 8, 247 (2024).
17. Demeke Teklemariam, A., Samaddar, M., Alharbi, M. G., Al-Hindi, R. R. & Bhunia, A. K. Biosensor and molecular-based methods for the detection of human coronaviruses: a review. *Mol Cell Probes* 54, 101662 (2020).
18. Kumar, S. et al. Morphology, genome organization, replication, and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). in *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and therapeutics*. Springer, Singapore, 23–31 (2020).
19. Belouzard, S., Millet, J. K., Licitra, B. N. & Whittaker, G. R. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* 4, 1011–1033 (2012).
20. Walls, A. C. et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell* 181, 281–292.e6 (2020).
21. Zhang, Z. et al. Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. *Nat Commun* 13, 1–12 (2022).
22. Cao, Y. et al. Characterization of the SARS-CoV-2 E protein: sequence, structure, viroporin, and inhibitors. *Protein Science* 30, 1114–1130 (2021).
23. Arya, R. et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *J Mol Biol* 433, 166725 (2021).
24. Savastano, A., Ibáñez de Opakua, A., Rankovic, M. & Zweckstetter, M. Nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 phase separates into RNA-rich polymerase-containing condensates. *Nat Commun* 11, 1–10 (2020).
25. Brant, A. C., Tian, W., Majerciak, V., Yang, W. & Zheng, Z. M. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell & Bioscience* 11, 1–17 (2021).
26. Sharma, R. K. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 and COVID-19 in cardiorenal diseases. *Clin Sci* 135, 1–17 (2021).
27. Essalmani, R. et al. Distinctive roles of furin and TMPRSS2 in SARS-CoV-2 infectivity. *J Virol* 96, (2022).
28. Hardenbrook, N. J. & Zhang, P. A structural view of the SARS-CoV-2 virus and its assembly. *Curr Opin Virol* 52, 123–134 (2022).

29. Raj, S., Chandel, V., Rathi, B. & Kumar, D. Understanding the molecular mechanism(s) of SARS-CoV2 infection and propagation in human to discover potential preventive and therapeutic approach. *Coronaviruses* 1, 73–81 (2020).
30. Khan, D. & Fox, P. L. Host-like RNA elements regulate virus translation. *Viruses* 16, 468 (2024).
31. Li, S. et al. SARS-CoV-2: mechanism of infection and emerging technologies for future prospects. *Rev Med Virol* 31, e2168 (2021).
32. Trougakos, I. P. et al. Insights to SARS-CoV-2 life cycle, pathophysiology, and rationalized treatments that target COVID-19 clinical complications. *J Biomed Sci* 28, 1–18 (2021).
33. Bakhshandeh, B. et al. Mutations in SARS-CoV-2; consequences in structure, function, and pathogenicity of the virus. *Microb Pathog* 154, 104831 (2021).
34. Tulimilli, S. R. V. et al. Variants of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and vaccine effectiveness. *Vaccines (Basel)* 10, 1751 (2022).
35. Dyson, L. et al. Possible future waves of SARS-CoV-2 infection generated by variants of concern with a range of characteristics. *Nat Commun* 12, 1–13 (2021).
36. Xavier, A. R. et al. COVID-19: clinical and laboratory manifestations in novel coronavirus infection. *J Bras Patol Med Lab* 56, e3232020 (2020).
37. Wu, Y. et al. Incubation period of COVID-19 caused by unique SARS-CoV-2 strains: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw Open* 5, e2228008–e2228008 (2022).
38. Quesada, J. A. et al. Incubation period of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Revista Clínica Española (English Edition)* 221, 109–117 (2021).
39. Raveendran, A. V., Jayadevan, R. & Sashidharan, S. Long COVID: an overview. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* 15, 869–875 (2021).
40. Campbell, R. G. SARS-CoV-2 and the nose: risks and implications for primary care. *Aust J Gen Pract* 49, 728–732 (2020).
41. Schroeder, H. W. & Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125, S41–S52 (2010).
42. Racine, R. & Winslow, G. M. IgM in microbial infections: taken for granted? *Immunol Lett* 125, 79–85 (2009).
43. Sun, B. et al. Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect* 9, 940–948 (2020).

44. Liu, X. et al. Patterns of IgG and IgM antibody response in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect* 9, 1269–1274 (2020).
45. Tarhini, H. et al. Long-term severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infectiousness among three immunocompromised patients: from prolonged viral shedding to SARS-CoV-2 superinfection. *J Infect Dis* 223, 1522–1527 (2021).
46. Nalbandian, A. et al. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med* 27, 601–615 (2021).
47. Sebők, S. & Gyires, K. Long COVID and possible preventive options. *Inflammopharmacology* 31, 2807–2817 (2023).
48. Pavli, A., Theodoridou, M. & Maltezou, H. C. Post-COVID syndrome: incidence, clinical Spectrum, and challenges for primary healthcare Professionals. *Arch Med Res* 52, 575–581 (2021).
49. Bowe, B., Xie, Y. & Al-Aly, Z. Acute and postacute sequelae associated with SARS-CoV-2 reinfection. *Nat Med* 28, 2398–2405 (2022).
50. Lai, C. C. et al. Long COVID: an inevitable sequela of SARS-CoV-2 infection. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 56, 1–9 (2023).
51. Davis, H. E. et al. Characterizing long COVID in an international cohort: 7 months of symptoms and their impact. *EClinicalMedicine* 38, (2021).
52. Fischer, A. et al. Long COVID symptomatology after 12 months and its impact on quality of life according to initial coronavirus disease 2019 disease severity. *Open Forum Infect Dis* 9, (2022).
53. Devi, M. J., Gaffar, S. & Hartati, Y. W. A review post-vaccination SARS-CoV-2 serological test: method and antibody titer response. *Anal Biochem* 658, 114902 (2022).
54. Dhamad, A. E. & Abdal Rhida, M. A. COVID-19: molecular and serological detection methods. *PeerJ* 8, e10180 (2020).
55. Guo, J., Ge, J. & Guo, Y. Recent advances in methods for the diagnosis of corona virus disease 2019. *J Clin Lab Anal* 36, (2022).
56. Cai, Q. et al. Simultaneous detection of the spike and nucleocapsid proteins from SARS-CoV-2 based on ultrasensitive single molecule assays. *Anal Bioanal Chem* 413, 4645–4654 (2021).
57. Wei, H., Zhang, C., Du, X. & Zhang, Z. Research progress of biosensors for detection of SARS-CoV-2 variants based on ACE2. *Talanta* 251, 123813 (2023).
58. Martín, J., Tena, N. & Asuero, A. G. Current state of diagnostic, screening and surveillance testing methods for COVID-19 from an analytical chemistry point of view. *Microchemical Journal* 167, 106305 (2021).
59. Teymouri, M. et al. Recent advances and challenges of RT-PCR tests for the diagnosis of COVID-19. *Pathol Res Pract* 221, 153443 (2021).

60. Bezier, C., Anthoine, G. & Charki, A. Reliability of real-time RT-PCR tests to detect SARS-Cov-2: a literature review. *International Journal of Metrology and Quality Engineering* 11, 13 (2020).
61. Loeffelholz, M. J. & Tang, Y. W. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections – the state of the art. *Emerg Microbes Infect* 9, 747–756 (2020).
62. Fernandes, L. L. et al. Saliva in the diagnosis of COVID-19: a review and new research directions. *J Dent Res* 99, 1435–1443 (2020).
63. Srivastava, M., Srivastava, N., Mishra, P. K. & Malhotra, B. D. Prospects of nanomaterials-enabled biosensors for COVID-19 detection. *Science of The Total Environment* 754, 142363 (2021).
64. Magno, L. et al. Challenges and proposals for scaling up COVID-19 testing and diagnosis in Brazil. *Cien Saude Colet* 25, 3355–3364 (2020).
65. Dramé, M. et al. Should RT-PCR be considered a gold standard in the diagnosis of COVID-19? *J Med Virol* 92, 2312–2313 (2020).
66. Tahamtan, A. & Ardebili, A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Rev Mol Diagn* 20, 453–454 (2020).
67. Pegoraro, M. et al. Evaluation of three immunochromatographic tests in COVID-19 serologic diagnosis and their clinical usefulness. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 40, 897–900 (2021).
68. Posthuma-Trumpie, G. A., Korf, J. & Van Amerongen, A. Lateral flow (immuno)assay: Its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem* 393, 569–582 (2009).
69. Kubina, R. & Dziedzic, A. Molecular and serological tests for COVID-19. A comparative review of SARS-CoV-2 coronavirus laboratory and point-of-care diagnostics. *Diagnostics* 10, 434 (2020).
70. Santiago, I. Trends and Innovations in Biosensors for COVID-19 Mass Testing. *ChemBioChem* 21, 2880–2889 (2020).
71. Koczula, K. M. & Gallotta, A. Lateral flow assays. *Essays Biochem* 60, 111–120 (2016).
72. Gan, S. D. & Patel, K. R. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology* 133, 1–3 (2013).
73. Paulie, S., Perlmann, P. & Perlmann, H. Enzyme-linked immunosorbent assay. In: *Cell biology: a laboratory handbook*. Academic Press, 533–538 (2006).
74. Mahshid, S. S., Flynn, S. E. & Mahshid, S. The potential application of electrochemical biosensors in the COVID-19 pandemic: A perspective on the rapid diagnostics of SARS-CoV-2. *Biosens Bioelectron* 176, 112905 (2021).

75. Huang, W. E. et al. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microb Biotechnol* 13, 950–961 (2020).
76. Dao Thi, V. L. et al. A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Sci Transl Med* 12, 7075 (2020).
77. Sun, Y. et al. One-tube SARS-CoV-2 detection platform based on RT-RPA and CRISPR/Cas12a. *J Transl Med* 19, 1–10 (2021).
78. Cherkaoui, D. et al. Clinical validation of a rapid variant-proof RT-RPA assay for the detection of SARS-CoV-2. *Diagnostics* 12, 1263 (2022).
79. Li, F. et al. A reverse transcription recombinase-aided amplification method for rapid and point-of-care detection of SARS-CoV-2, including variants. *Viruses* 13, 1875 (2021).
80. Soh, J. H. et al. CRISPR-based systems for sensitive and rapid on-site COVID-19 diagnostics. *Trends Biotechnol* 40, 1346–1360 (2022).
81. Johnston, M. et al. Multiplexed biosensor for point-of-care COVID-19 monitoring: CRISPR-powered unamplified RNA diagnostics and protein-based therapeutic drug management. *Materials Today* 61, 129–138 (2022).
82. Guo, L. et al. SARS-CoV-2 detection with CRISPR diagnostics. *Cell Discov* 6, 1–4 (2020).
83. Cardozo, K. H. M. et al. Establishing a mass spectrometry-based system for rapid detection of SARS-CoV-2 in large clinical sample cohorts. *Nat Commun* 11, 1–13 (2020).
84. Renuse, S. et al. A mass spectrometry-based targeted assay for detection of SARS-CoV-2 antigen from clinical specimens. *EBioMedicine* 69, (2021).
85. Ahsan, M. M. et al. Detecting SARS-CoV-2 from chest X-ray using artificial intelligence. *IEEE Access* 9, 35501–35513 (2021).
86. Xu, Y. H. et al. Clinical and computed tomographic imaging features of novel coronavirus pneumonia caused by SARS-CoV-2. *Journal of Infection* 80, 394–400 (2020).
87. Soares, E., Angelov, P., Biaso, S., Froes, M. H. & Abe, D. K. SARS-CoV-2 CT-scan dataset: a large dataset of real patients CT scans for SARS-CoV-2 identification. *medRxiv* 04, 24.20078584 (2020).
88. Bosso, G. et al. Lung ultrasound as diagnostic tool for SARS-CoV-2 infection. *Intern Emerg Med* 16, 471–476 (2021).
89. Brazaca, L. C. et al. Biosensing strategies for the electrochemical detection of viruses and viral diseases – a review. *Anal Chim Acta* 1159, 338384 (2021).
90. Suleman, S. et al. Point of care detection of COVID-19: advancement in biosensing and diagnostic methods. *Chemical Engineering Journal* 414, 128759 (2021).

91. Alsalameh, S. et al. Advances in biosensing technologies for diagnosis of COVID-19. *Biosensors (Basel)* 12, 898 (2022).
92. de Araujo, W. R., Lukas, H., Torres, M. D. T., Gao, W. & de la Fuente-Nunez, C. Low-cost biosensor technologies for rapid detection of COVID-19 and future pandemics. *ACS Nano* 18, 1757–1777 (2024).
93. Karunakaran, C., Rajkumar, R. & Bhargava, K. Introduction to biosensors. *Biosens Bioelectron*, 1–68 (2015).
94. Perumal, V. & Hashim, U. Advances in biosensors: principle, architecture and applications. *J Appl Biomed* 12, 1–15 (2014).
95. Torrinha, A., Freitas, M., Dibo, V. & Morais, S. Electrochemical immunosensors: application to surveillance of contaminants of emerging concern in aquatic ecosystems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 178, 117844 (2024).
96. Aydin, M., Aydin, E. B. & Sezgintürk, M. K. Advances in immunosensor technology. in *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier 102, 1–62 (2021).
97. Ronkainen, N. J., Halsall, H. B. & Heineman, W. R. Electrochemical biosensors. *Chem Soc Rev* 39, 1747–1763 (2010).
98. Califf, R. M. Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med* 243, 213–221 (2018).
99. Strimbu, K. & Tavel, J. A. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* 5, 463–466 (2010).
100. Liu, G. & Rusling, J. F. COVID-19 antibody tests and their limitations. *ACS Sens* 6, 593–612 (2021).
101. Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W. & Kim, H. L. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* 14, 1–10 (2018).
102. Murphy, K. & Weaver, C. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, Taylor & Francis Group, (2016).
103. Dkhar, D. S. et al. Antibody-receptor bioengineering and its implications in designing bioelectronic devices. *Int J Biol Macromol* 218, 225–242 (2022).
104. Beenhouwer, D. O. Molecular basis of diseases of immunity. in *Molecular Pathology: The Molecular Basis of Human Disease*. Academic Press, 329–345 (2018).
105. Moser, M. & Leo, O. Key concepts in immunology. *Vaccine* 28, C2–C13 (2010).
106. Felix, F. S. & Angnes, L. Electrochemical immunosensors – a powerful tool for analytical applications. *Biosens Bioelectron* 102, 470–478 (2018).
107. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A. & Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron* 16, 121–131 (2001).

108. Pollap, A. & Kochana, J. Electrochemical immunosensors for antibiotic detection. *Biosensors* 9, 61 (2019).
109. Burcu Bahadir, E. & Kemal Sezgintürk, M. Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics. *Talanta* 132, 162–174 (2015).
110. Amor-Gutiérrez, O. et al. Competitive electrochemical immunosensor for the detection of unfolded p53 protein in blood as biomarker for Alzheimer's disease. *Anal Chim Acta* 1093, 28–34 (2020).
111. Kämäräinen, S. et al. Disposable electrochemical immunosensor for cortisol determination in human saliva. *Talanta* 188, 50–57 (2018).
112. Zhao, S. et al. A highly sensitive label-free electrochemical immunosensor based on AuNPs-PtNPs-MOFs for nuclear matrix protein 22 analysis in urine sample. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 834, 33–42 (2019).
113. Shamsipur, M., Emami, M., Farzin, L. & Saber, R. A sandwich-type electrochemical immunosensor based on in situ silver deposition for determination of serum level of HER2 in breast cancer patients. *Biosens Bioelectron* 103, 54–61 (2018).
114. Razzino, C. A. et al. An electrochemical immunosensor using gold nanoparticles-PAMAM-nanostructured screen-printed carbon electrodes for tau protein determination in plasma and brain tissues from Alzheimer patients. *Biosens Bioelectron* 163, 112238 (2020).
115. Lee, H. B., Meesepong, M., Trung, T. Q., Kim, B. Y. & Lee, N. E. A wearable lab-on-a-patch platform with stretchable nanostructured biosensor for non-invasive immunodetection of biomarker in sweat. *Biosens Bioelectron* 156, 112133 (2020).
116. Jasim, S. A. et al. Applications of electrochemical and optical biosensing techniques based on nanomaterials for detection of SARS-COV-2 specific antibodies: an update review. *Analytical and Bioanalytical Electrochemistry* 14, 980–997 (2022).
117. Hosseini, M. et al. Development of sandwich electrochemiluminescence immunosensor for COVID-19 diagnosis by SARS-CoV-2 spike protein detection based on Au@BSA-luminol nanocomposites. *Bioelectrochemistry* 147, 108161 (2022).
118. Fan, Z. et al. Entropy-driven amplified electrochemiluminescence biosensor for RdRp gene of SARS-CoV-2 detection with self-assembled DNA tetrahedron scaffolds. *Biosens Bioelectron* 178, 113015 (2021).
119. Wang, B. et al. Ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein based on porphyrin-based metal-organic gels with highly efficient electrochemiluminescence at low potential. *Anal Chem* 96, 4479–4486 (2024).

120. Guerrero-Esteban, T. et al. Sensitive SARS-CoV-2 detection in wastewaters using a carbon nanodot-amplified electrochemiluminescence immunosensor. *Talanta* 247, 123543 (2022).
121. 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, 49754–49761 (2021).
122. Chen, Y. et al. Nanobody-based label-free photoelectrochemical immunoassay for highly sensitive detection of SARS-CoV-2 spike protein. *Anal Chim Acta* 1211, 339904 (2022).
123. Guo, A. et al. A photoelectrochemical immunosensor based on magnetic all-solid-state Z-scheme heterojunction for SARS-CoV-2 nucleocapsid protein detection. *Sens Actuators B Chem* 374, 132800 (2023).
124. 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* 20, 3121 (2020).
125. Lee, W. Il et al. Potentiometric biosensors based on molecular-imprinted self-assembled monolayer films for rapid detection of influenza A virus and SARS-CoV-2 spike protein. *ACS Appl Nano Mater* 5, 5045–5055 (2022).
126. Piccinini, E. et al. Biofunctionalization of graphene-based FET sensors through heterobifunctional nanoscaffolds: technology validation toward rapid COVID-19 diagnostics and monitoring. *Adv Mater Interfaces* 9, 2102526 (2022).
127. Seo, G. et al. Rapid detection of COVID-19 causative virus (SARS-CoV-2) in human nasopharyngeal swab specimens using field-effect transistor-based biosensor. *ACS Nano* 14, 5135–5142 (2020).
128. Lozano-Chamizo, L. et al. High enhancement of sensitivity and reproducibility in label-free SARS-CoV-2 detection with graphene field-effect transistor sensors through precise surface biofunctionalization control. *Biosens Bioelectron* 250, 116040 (2024).
129. de Lima, L. F., Ferreira, A. L., Torres, M. D. T., de Araujo, W. R. & de la Fuente-Nunez, C. Minute-scale detection of SARS-CoV-2 using a low-cost biosensor composed of pencil graphite electrodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118, e2106724118 (2021).
130. Nascimento, E. D. et al. COVID-19 diagnosis by SARS-CoV-2 spike protein detection in saliva using an ultrasensitive magneto-assay based on disposable electrochemical sensor. *Sens Actuators B Chem* 353, 131128 (2022).

131. Yakoh, A. et al. Paper-based electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen. *Biosens Bioelectron* 176, 112912 (2021).
132. 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, 123783 (2023).
133. 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, 154368–154377 (2021).
134. Beduk, T. et al. Rapid point-of-care COVID-19 diagnosis with a gold-nanoarchitecture-assisted laser-scribed graphene biosensor. *Anal Chem* 93, 8585–8594 (2021).
135. Hashemi, S. A. et al. Antibody mounting capability of 1D/2D carbonaceous nanomaterials toward rapid-specific detection of SARS-CoV-2. *Talanta* 239, 123113 (2022).
136. Mojsoska, B. et al. Rapid SARS-CoV-2 detection using electrochemical immunosensor. *Sensors* 21, 390 (2021).
137. Liv, L., Çoban, G., Nakiboğlu, N. & Kocagöz, T. A rapid, ultrasensitive voltammetric biosensor for determining SARS-CoV-2 spike protein in real samples. *Biosens Bioelectron* 192, 113497 (2021).
138. 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. *Microchimica Acta* 188, 1–10 (2021).
139. Karaman, C. et al. Sensitive sandwich-type electrochemical SARS-CoV-2 nucleocapsid protein immunosensor. *Microchimica Acta* 188, 1–13 (2021).
140. Zeng, R. et al. Smartphone-based electrochemical immunoassay for point-of-care detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Anal Chem* 94, 15155–15161 (2022).
141. Curti, F. et al. A folding-based electrochemical aptasensor for the single-step detection of the SARS-CoV-2 spike protein. *ACS Appl Mater Interfaces* 14, 19204–19211 (2022).
142. Sari, A. K. et al. 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. *Journal of Electrochemical Science and Engineering* 12, 219–235 (2022).
143. Xue, J. et al. Highly sensitive electrochemical aptasensor for SARS-CoV-2 antigen detection based on aptamer-binding induced multiple hairpin assembly signal amplification. *Talanta* 248, 123605 (2022).

144. Yu, M. et al. An electrochemical aptasensor with N protein binding aptamer-complementary oligonucleotide as probe for ultra-sensitive detection of COVID-19. *Biosens Bioelectron* 213, 114436 (2022).
145. Tian, J. et al. An electrochemical dual-aptamer biosensor based on metal-organic frameworks MIL-53 decorated with Au@Pt nanoparticles and enzymes for detection of COVID-19 nucleocapsid protein. *Electrochim Acta* 387, 138553 (2021).
146. 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, 100336 (2022).
147. Farzin, L., Sadjadi, S., Sheini, A. & Mohaghehpour, 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. *Microchimica Acta* 188, 1–12 (2021).
148. Zhao, H. et al. Ultrasensitive supersandwich-type electrochemical sensor for SARS-CoV-2 from the infected COVID-19 patients using a smartphone. *Sens Actuators B Chem* 327, 128899 (2021).
149. Ayankojo, A. G., Boroznjak, R., Reut, J., Öpik, A. & Syritski, V. Molecularly imprinted polymer based electrochemical sensor for quantitative detection of SARS-CoV-2 spike protein. *Sens Actuators B Chem* 353, 131160 (2022).
150. Ratautaite, V. et al. Molecularly imprinted polypyrrole based sensor for the detection of SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Electrochim Acta* 403, 139581 (2022).
151. Torres, M. D. T., de Araujo, W. R., de Lima, L. F., Ferreira, A. L. & de la Fuente-Nunez, C. Low-cost biosensor for rapid detection of SARS-CoV-2 at the point of care. *Matter* 4, 2403–2416 (2021).
152. Moreira, G. et al. Development of a biosensor based on angiotensin-converting enzyme II for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 detection in human saliva. *Frontiers in Sensors* 3, 917380 (2022).
153. Cancino-Bernardi, J. et al. A SARS-CoV-2 impedimetric biosensor based on the immobilization of ACE-2 receptor-containing entire cell membranes as the biorecognition element. *Talanta* 253, 124008 (2023).
154. Vezza, V. J. et al. An electrochemical SARS-CoV-2 biosensor inspired by glucose test strip manufacturing processes. *Chemical Communications* 57, 3704–3707 (2021).
155. Białobrzaska, W. et al. 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, 114222 (2022).

156. Aydın, E. B., Aydın, M. & Sezgintürk, M. K. Label-free and reagent-less electrochemical detection of Nucleocapsid protein of SARS-CoV-2: an ultrasensitive and disposable biosensor. *New Journal of Chemistry* 46, 9172–9183 (2022).
157. 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).
158. 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, 1992 (2022).
159. Brazaca, L. C. et al. Electrochemical immunosensors using electrodeposited gold nanostructures for detecting the S proteins from SARS-CoV and SARS-CoV-2. *Anal Bioanal Chem* 414, 5507–5517 (2022).
160. Abrego-Martinez, J. C. et al. Aptamer-based electrochemical biosensor for rapid detection of SARS-CoV-2: nanoscale electrode-aptamer-SARS-CoV-2 imaging by photo-induced force microscopy. *Biosens Bioelectron* 195, 113595 (2022).
161. Tabrizi, M. A. & Acedo, P. An electrochemical impedance spectroscopy-based aptasensor for the determination of SARS-CoV-2-RBD using a carbon nanofiber–gold nanocomposite modified screen-printed electrode. *Biosensors* 12, 142 (2022).
162. Zhang, Z. et al. High-affinity dimeric aptamers enable the rapid electrochemical detection of wild-type and B.1.1.7 SARS-CoV-2 in unprocessed saliva. *Angewandte Chemie* 133, 24468–24476 (2021).
163. Cui, J. et al. Construction of bifunctional electrochemical biosensors for the sensitive detection of the SARS-CoV-2 N-gene based on porphyrin porous organic polymers. *Dalton Transactions* 51, 2094–2104 (2022).
164. 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, 339718 (2022).
165. 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, 123422 (2022).
166. Cajigas, S., Alzate, D., Fernández, M., Muskus, C. & Orozco, J. Electrochemical genosensor for the specific detection of SARS-CoV-2. *Talanta* 245, 123482 (2022).
167. Kudr, J., Michalek, P., Ilieva, L., Adam, V. & Zitka, O. COVID-19: a challenge for electrochemical biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 136, 116192 (2021).
168. Claro, F., Silva, D., Rodriguez, M., Rangel, H. R. & de Waard, J. H. Immunoglobulin G antibody response to the Sputnik V vaccine: previous

- SARS-CoV-2 seropositive individuals may need just one vaccine dose. *International Journal of Infectious Diseases* 111, 261–266 (2021).
169. Assis, R. et al. Distinct SARS-CoV-2 antibody reactivity patterns elicited by natural infection and mRNA vaccination. *npj Vaccines* 2021 6:1 6, 1–10 (2021).
 170. Ebinger, J. E. et al. Antibody responses to the BNT162b2 mRNA vaccine in individuals previously infected with SARS-CoV-2. *Nature Medicine* 2021 27:6 27, 981–984 (2021).
 171. Gobbi, F. et al. Antibody response to the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in subjects with prior SARS-CoV-2 Infection. *Viruses* 2021, Vol. 13, Page 422 13, 422 (2021).
 172. Saadat, S. et al. Binding and neutralization antibody titers after a single vaccine dose in health care workers previously infected with SARS-CoV-2. *JAMA* 325, 1467–1469 (2021).
 173. Hanson, K. E. et al. Infectious diseases society of america guidelines on the diagnosis of COVID-19 (june 2020). *Clinical Infectious Diseases* 78, e106–e132 (2024).
 174. Liv, L. & Kayabay, H. An electrochemical biosensing platform for the SARS-CoV-2 spike antibody detection based on the functionalised SARS-CoV-2 spike antigen modified electrode. *ChemistrySelect* 7, e202200256 (2022).
 175. Liv, L., Yener, M., Çoban, G. & Can, Ş. A. Electrochemical biosensing platform based on hydrogen bonding for detection of the SARS-CoV-2 spike antibody. *Anal Bioanal Chem* 414, 1313–1322 (2022).
 176. Liustrovaite, V. et al. Electrochemical biosensor for the evaluation of monoclonal antibodies targeting the N protein of SARS-CoV-2 virus. *Science of The Total Environment* 924, 171042 (2024).
 177. Sadique, M. A. et al. Highly sensitive electrochemical immunosensor platforms for dual detection of SARS-CoV-2 antigen and antibody based on gold nanoparticle functionalized graphene oxide nanocomposites. *ACS Appl Bio Mater* 5, 2421–2430 (2022).
 178. Drobysh, M. et al. Electrochemical biosensing based comparative study of monoclonal antibodies against SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Science of The Total Environment* 908, 168154 (2024).
 179. Drobysh, M. et al. Determination of rSpike protein by specific antibodies with screen-printed carbon electrode modified by electrodeposited gold nanostructures. *Biosensors* 12, 593 (2022).
 180. Braz, B. A. et al. Graphene-binding peptide in fusion with SARS-CoV-2 antigen for electrochemical immunosensor construction. *Biosensors* 12, 885 (2022).

181. Yadav, S., Sadique, M. A., Ranjan, P. & Khan, R. Synergistically functionalized molybdenum disulfide-reduced graphene oxide nanohybrid based ultrasensitive electrochemical immunosensor for real sample analysis of COVID-19. *Anal Chim Acta* 1265, 341326 (2023).
182. Sadique, M. A. et al. Functionalized titanium dioxide nanoparticle-based electrochemical immunosensor for detection of SARS-CoV-2 antibody. *Diagnostics* 12, 2612 (2022).
183. Hryniewicz, B. M. et al. Development of polypyrrole (nano)structures decorated with gold nanoparticles toward immunosensing for COVID-19 serological diagnosis. *Mater Today Chem* 24, 100817 (2022).
184. Lorenzen, A. L. et al. PEDOT-AuNPs-based impedimetric immunosensor for the detection of SARS-CoV-2 antibodies. *Electrochim Acta* 404, 139757 (2022).
185. Rashed, M. Z. et al. Rapid detection of SARS-CoV-2 antibodies using electrochemical impedance-based detector. *Biosens Bioelectron* 171, 112709 (2021).
186. Khaniani, Y. et al. A gold nanoparticle-protein G electrochemical affinity biosensor for the detection of SARS-CoV-2 antibodies: a surface modification approach. *Sci Rep* 12, 1–12 (2022).
187. Cardoso, A. R. et al. An ultra-sensitive electrochemical biosensor using the spike protein for capturing antibodies against SARS-CoV-2 in point-of-care. *Mater Today Bio* 16, 100354 (2022).
188. Ali, M. A. et al. Sensing of COVID-19 antibodies in seconds via aerosol Jet nanoprinted reduced-graphene-oxide-coated 3D electrodes. *Advanced Materials* 33, 2006647 (2021).
189. Li, X. et al. Enhancing the performance of paper-based electrochemical impedance spectroscopy nanobiosensors: an experimental approach. *Biosens Bioelectron* 177, 112672 (2021).
190. Peng, R. et al. SPEEDS: a portable serological testing platform for rapid electrochemical detection of SARS-CoV-2 antibodies. *Biosens Bioelectron* 197, 113762 (2022).
191. Samper, I. C. et al. Electrochemical capillary-flow immunoassay for detecting anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid protein antibodies at the point of care. *ACS Sens* 6, 4067–4075 (2021).
192. Rahmati, Z., Roushani, M., Hosseini, H. & Choobin, H. An electrochemical immunosensor using SARS-CoV-2 spike protein-nickel hydroxide nanoparticles bio-conjugate modified SPCE for ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 antibodies. *Microchemical Journal* 170, 106718 (2021).
193. Mittal, S., Kaur, H., Gautam, N. & Mantha, A. K. Biosensors for breast cancer diagnosis: a review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies. *Biosens Bioelectron* 88, 217–231 (2017).

194. Xu, Y. & Wang, E. Electrochemical biosensors based on magnetic micro/nano particles. *Electrochim Acta* 84, 62–73 (2012).
195. Centi, S., Laschi, S. & Mascini, M. Improvement of analytical performances of a disposable electrochemical immunosensor by using magnetic beads. *Talanta* 73, 394–399 (2007).
196. Kuramitz, H. Magnetic microbead-based electrochemical immunoassays. *Anal Bioanal Chem* 394, 61–69 (2009).
197. Hasanzadeh, M., Shadjou, N. & de la Guardia, M. Iron and iron-oxide magnetic nanoparticles as signal-amplification elements in electrochemical biosensing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 72, 1–9 (2015).
198. Mani, V., Wasalathanthri, D. P., Joshi, A. A., Kumar, C. V. & Rusling, J. F. Highly efficient binding of paramagnetic beads bioconjugated with 100-000 or more antibodies to protein-coated surfaces. *Anal Chem* 84, 10485–10491 (2012).
199. Moral-Vico, J. et al. Dual chronoamperometric detection of enzymatic biomarkers using magnetic beads and a low-cost flow cell. *Biosens Bioelectron* 69, 328–336 (2015).
200. Barallat, J. et al. Chronoamperometric magneto immunosensor for myeloperoxidase detection in human plasma based on a magnetic switch produced by 3D laser sintering. *Anal Chem* 85, 9049–9056 (2013).
201. Pastucha, M., Farka, Z., Lacina, K., Mikušová, Z. & Skládal, P. Magnetic nanoparticles for smart electrochemical immunoassays: a review on recent developments. *Microchimica Acta* 186, 1–26 (2019).
202. Yáñez-Sedeño, P., Campuzano, S. & Pingarrón, J. M. Magnetic particles coupled to disposable screen-printed transducers for electrochemical biosensing. *Sensors* 16, 1585 (2016).
203. Almeida, S. V. de. Desenvolvimento de um magneto-imunoensaio microfluídico com detecção eletroquímica para diagnóstico de hanseníase. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2023. Tese de Doutorado, 145 p.
204. De Oliveira, T. R. et al. Early diagnosis of Alzheimer's disease in blood using a disposable electrochemical microfluidic platform. *ACS Sens* 5, 1010–1019 (2020).
205. Castro, K. R. et al. Electrochemical magneto-immunoassay for detection of Zika virus antibody in human serum. *Talanta* 256, 124277 (2023).
206. Fonseca, W. T. et al. Ultrasensitive magnetogenoassay for detection of microRNA for diagnosis of metastatic lymph nodes in head and neck cancer using disposable electrodes. *Sens Actuators B Chem* 352, 131040 (2022).
207. Fabiani, L. et al. 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).
208. Santos, D. J. A. dos et al. An electrochemical genomagnetic assay for detection of SARS-CoV-2 and Influenza A viruses in saliva. *Biosens Bioelectron* 255, 116210 (2024).
209. Torrente-Rodríguez, R. M. et al. Towards control and oversight of SARS-CoV-2 diagnosis and monitoring through multiplexed quantitative electroanalytical immune response biosensors. *Angewandte Chemie* 134, e202203662 (2022).
210. Janegitz, B. C., Cancino, J. & Zucolotto, V. Disposable biosensors for clinical diagnosis. *J Nanosci Nanotechnol* 14, 378–389 (2014).
211. Nascimento, V. B. & Angnes, L. Eletrodos fabricados por ‘silk-screen’. *Quim Nova* 21, 614–629 (1998).
212. Costa-Rama, E. & Fernández-Abedul, M. T. Paper-based screen-printed electrodes: a new generation of low-cost electroanalytical platforms. *Biosensors* 11, 51 (2021).
213. Beitollahi, H., Mohammadi, S. Z., Safaei, M. & Tajik, S. Applications of electrochemical sensors and biosensors based on modified screen-printed electrodes: a review. *Analytical Methods* 12, 1547–1560 (2020).
214. Sher, M., Faheem, A., Asghar, W. & Cinti, S. Nano-engineered screen-printed electrodes: a dynamic tool for detection of viruses. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 143, 116374 (2021).
215. 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, 381–387 (2016).
216. Taleat, Z., Khoshroo, A. & Mazloum-Ardakani, M. Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008-2013). *Microchimica Acta* 181, 865–891 (2014).
217. de Oliveira, T. R., Martucci, D. H. & Faria, R. C. Simple disposable microfluidic device for *Salmonella typhimurium* detection by magneto-immunoassay. *Sens Actuators B Chem* 255, 684–691 (2018).
218. Arduini, F. et al. Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: recent applications in clinical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 79, 114–126 (2016).
219. García-Miranda Ferrari, A., Rowley-Neale, S. J. & Banks, C. E. Screen-printed electrodes: transitioning the laboratory in-to-the field. *Talanta Open* 3, 100032 (2021).
220. Wang, X. et al. Applications of electrochemical biosensors based on functional antibody-modified screen-printed electrodes: a review. *Analytical Methods* 14, 7–16 (2021).

221. Stroock, A. D. Microfluidics. in *Optical Biosensors: Today and Tomorrow*. Elsevier, 659–681 (2008).
222. Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442, 368–373 (2006).
223. Kudr, J., Zitka, O., Klimanek, M., Vrba, R. & Adam, V. Microfluidic electrochemical devices for pollution analysis – a review. *Sens Actuators B Chem* 246, 578–590 (2017).
224. Lei, K. F. Microfluidic systems for diagnostic applications: a review. *J Lab Autom* 17, 330–347 (2012).
225. Mohan, J. M., Amreen, K., Javed, A., Dubey, S. K. & Goel, S. Emerging trends in miniaturized and microfluidic electrochemical sensing platforms. *Curr Opin Electrochem* 33, 100930 (2022).
226. Li, T., Díaz-Real, J. A. & Holm, T. Design of electrochemical microfluidic detectors: a review. *Adv Mater Technol* 6, 2100569 (2021).
227. Alvim, R. G. F. et al. 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 Electronic Journal* (2020).
228. Freitas, T. A. et al. Ultrasensitive immunoassay for detection of Citrus tristeza virus in citrus sample using disposable microfluidic electrochemical device. *Talanta* 205, 120110 (2019).
229. Huang, J., Huang, W. & Wang, T. Catalytic and inhibitory kinetic behavior of horseradish peroxidase on the electrode surface. *Sensors* 12, 14556–14569 (2012).
230. Krause, C. E. et al. Ultrasensitive microfluidic array for serum pro-inflammatory cytokines and C-reactive protein to assess oral mucositis risk in cancer patients. *Anal Bioanal Chem* 407, 7239–7243 (2015).
231. Ahammad, A. J. S. Hydrogen peroxide biosensors based on horseradish peroxidase and hemoglobin. *J Biosens Bioelectron* 9, (2012).
232. Brenier-Pinchart, M. P., Fricker-Hidalgo, H., Dard, C. & Pelloux, H. Impact of heat-inactivation on anti-toxoplasma IgM antibody levels. *Clin Chem Lab Med* 55, e291–e293 (2017).
233. Al-Muzairai, I. A. et al. Heat inactivation can differentiate between IgG and IgM antibodies in the pretransplant cross match. *Transplant Proc* 40, 2198–2199 (2008).
234. Krzanowski, W. J. & Hand, D. J. *ROC Curves for Continuous Data*. Chapman and Hall/CRC, (2009).
235. Metz, C. E. ROC analysis in medical imaging: a tutorial review of the literature. *Radiol Phys Technol* 1, 2–12 (2008).
236. Mandrekar, J. N. Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *Journal of Thoracic Oncology* 5, 1315–1316 (2010).

237. Jahanban-Esfahlan, A. et al. Recent developments in the detection of bovine serum albumin. *Int J Biol Macromol* 138, 602–617 (2019).
238. Vashist, S. K. & Luong, J. H. T. Bioanalytical requirements and regulatory guidelines for immunoassays. In: *Handbook of immunoassay technologies: approaches, performances, and applications*. Academic Press, 81–95 (2018).
239. Arakawa, T., Prestrelski, S. J., Kenney, W. C. & Carpenter, J. F. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 46, 307–326 (2001).
240. 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).
241. Pereira, F. M. V. & Pereira-Filho, E. R. Aplicação de programa computacional livre em planejamento de experimentos: um tutorial. *Quim Nova* 41, 1061–1071 (2018).