



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES AMPEROMÉTRICOS  
PARA DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS CONTRA A PROTEÍNA  
NUCLEOCAPSÍDICA DE SARS-CoV-2**

**LUCIANA DE SOUZA FREIRE**

**Doutorado**

**MANAUS**

**2023**

**LUCIANA DE SOUZA FREIRE**

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES AMPEROMÉTRICOS  
PARA DETECÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS CONTRA A PROTEÍNA  
NUCLEOCAPSÍDICA DE SARS-CoV-2**

Tese apresentado ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química, com ênfase na linha de Materiais e Interfaces.

**Orientador: Prof. Dr. WALTER RICARDO BRITO**  
**Coorientador: Prof. Dr. PRITESH JAYCHAND LALWANI**

**MANAUS**  
**2023**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F866d Freire, Luciana de Souza  
Desenvolvimento de sensores amperométricos para detecção de imunoglobulinas contra proteína nucleocapsídica de SARS-CoV-2 / Luciana de Souza Freire . 2023  
95 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Walter Ricardo Brito  
Coorientador: Pritesh Jaychand Lalwani  
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.


1. Proteína N. 2. Covid-19. 3. Imunossensor Amperométrico. 4. SARS-CoV-2. 5. Grafeno Carboxilado. I. Brito, Walter Ricardo. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

# Desenvolvimento de Sensores Amperométricos para Detecção de Imunoglobulinas do SARS-CoV-2 da Proteína Nucleocapsídica

**LUCIANA DE SOUZA FREIRE**


Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química,  
do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como  
requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor (a) em Química.

Aprovada em, 16 de fevereiro de 2023.

 Documento assinado digitalmente  
WALTER RICARDO BRITO  
Data: 16/02/2023 20:07:12-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

---

WALTER RICARDO BRITO (PPGQ/UFAM)

 Documento assinado digitalmente  
RAIMUNDO RIBEIRO PASSOS  
Data: 16/02/2023 16:41:48-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

---

RAIMUNDO RIBEIRO PASSOS (PPGQ/UFAM)

Membro Interno



---

PAULO ROGÉRIO DA COSTA COUCEIRO (PPGQ/UFAM)


Membro Interno



---

DANIEL MATIAS GASTON REGIART (POSDOC/USP)

Membro Externo



---

LUIS ANDRE MORAIS MARIÚBA (FIOCRUZ-ILMD/AM)

Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas  
Manaus, 16 de fevereiro de 2023.

[...] A minha mãe, mulher guerreira e de fibra, agradeço por toda a dedicação e esforços pela minha educação. E a minha avó Dinair (*In memoriam*), que encerrou seu ciclo sendo uma das vítimas do coronavírus, a qual me ensinou a ser resiliente.

## AGRADECIMENTOS

Desejo exprimir os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta tese se concretizasse.

A Deus pela força, garra e coragem a mim concedidas para vencer essa etapa.

A minha mãe, Lucimar Freire, que nunca colocou objeção alguma aos meus anseios pessoais e profissionais, proporcionando-me uma maravilhosa formação.

Ao Prof. Dr. Walter Ricardo Brito pela orientação, credibilidade e apoio, além do espelho a ser seguido por mim como profissional.

Ao Dr. Pritesh Jaychand Lalwani pela ajuda em minha coorientação, disponibilidade de equipamentos e confiança, contribuindo imensamente para minha formação profissional.

Aos meus colegas de laboratório, LABEL, quero agradecer-lhes os momentos, por vezes, magníficos, que passámos. Agradeço o bom convívio, as boas discussões e, a alegria que por vezes se instalava: Ariamna, Taísa, Jéssica, Ivanildes, Moíses, Ronald, Camila e Denis.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunologia que me receberam com carinho e me incentivaram em todo trabalho: Barbara e Aguyda.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação que tornaram meus dias mais alegres, Robson, Vanuza e Ingridy.

Aos meus grandes amigos pessoas legais, Aimêe, Igor e Fabiano por toda a parceria, descontração e permanentes incentivos.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A SEDUC-AM pelo incentivo a qualificação profissional.

A CAPES pelo apoio financeiro.

” Como é que tá aí? De você faz tempo que não ouço nada. Fala um pouco sua voz tá tão calada. Sei que agora deve estar impressionando os anjos com sua risada”

*(Gustavo Miotto)*

## RESUMO

A situação pandêmica do início da década 20 provocada pela doença do novo coronavírus (COVID-19) constitui uma das principais infecções que afetou a população mundial e tornou-se um problema atual de saúde pública devido à alta taxa de transmissão. Nesta perspectiva, destaca-se a importância e a necessidade urgente de testes de diagnóstico simples, rápidos e precisos para a detecção e triagem da COVID-19. O presente trabalho tem como objetivo desenvolver imunossensores eletroquímicos baseados na metodologia de funcionalização de eletrodo para medições rápidas, de baixo custo e de alta sensibilidade das imunoglobulinas de SARS-CoV-2. Na fabricação dos imunossensores foi utilizado como suporte condutor eletrodos impressos de carbono (SPCE) modificado com grafeno carboxilado (GC). A metodologia de funcionalização do eletrodo foi através da imobilização da proteína nucleocapsídica viral (proteína N). As etapas de modificações dos eletrodos foram caracterizadas mediante técnicas eletroquímicas (voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)). As detecções das imunoglobulinas G e A (IgG e IgA) da proteína nucleocapsídica foram realizadas por método cronoamperométrico (CA), utilizando anticorpos marcados com a enzima peroxidase de rábano (anti-IgG-HRP e anti-IgA-HRP) e como substrato redox a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), para gerar mudanças de corrente proporcionais à concentração dos anticorpos alvos. Os resultados obtidos evidenciaram valores de correntes superiores nas amostras com presença dos IgG-SARS-Cov-2 e IgA-SARS-CoV-2 comparadas com amostras negativas, ressaltando que, a avaliação da capacidade deste imunossensores de diagnosticar a infecção pelo novo coronavírus foi testada em amostras clínicas de soro humano, o que revelou sua capacidade de distinguir pacientes positivos de indivíduos saudáveis (não infectados) para SARS-CoV-2 com base na presença de IgG e IgA no soro humano. O método desenvolvido apresenta boa sensibilidade (limites de detecção de 0,0202% e 0,0624% para IgG-SARS-CoV-2 e IgG-SARS-CoV-2, respectivamente), e mostrou ser seletivo e reprodutível.

**Palavras-chave:** Biossensores eletroquímicos, grafeno carboxilado, SARS-CoV-2, Proteína Nucleocapsídica, COVID-19.



## ABSTRACT

The pandemic situation of the early 20s caused by the new coronavirus disease (COVID-19) is one of the main infections that affected the world population and has become a current public health problem due to the high transmission rate. Thus, the importance and urgent need for simple, fast, and accurate diagnostic tests for the detection and screening of COVID-19 is highlighted. The present study aims to develop electrochemical immunosensors based on a methodology of electrode functionalization for fast, low cost and high sensitivity measurements of SARS-CoV-2 immunoglobulins. In the manufacture of immunosensors, screen-printed carbon electrodes (SPCE) were modified with carboxylated graphene (CG) and used as conducting support. The methodology of electrode functionalization was carried out through immobilization of the viral nucleocapsid protein (N-protein). The electrode modification stages were characterized by electrochemical techniques (cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS)). The detection step was performed by chronoamperometric method, using antibodies labeled with the horseradish peroxidase enzyme (anti-IgG-HRP e anti-IgA-HRP) and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as redox substrate to generate current changes proportional to the concentration of nucleocapsid SARS-CoV-2 immunoglobulins. The recorded results showed higher current values in Samples with the presence of IgG-SARS-Cov-2 and IgA-SARS-CoV-2 detected with negative reflection, the evaluation of the ability of these immunosensors to detect infection by the new coronavirus was test on clinical samples of human serum, which revealed its ability to pick up positive patients from healthy (uninfected) individuals for SARS-CoV-2 based on the presence of IgG and IgA in human serum samples. The developed method present good sensibility (limit of detection of 0,0202% and 0,0624% for IgG-SARS-CoV-2 and IgG-SARS-CoV-2, respectively), and showed be selective and reproducible.

**Keywords:** Electrochemical Biosensors, Carboxylated Graphene, SARS-CoV-2, Nucleocapsidic Protein, COVID-19.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mapa das áreas de ocorrência do coronavírus (JOHNS HOPKINS CORONAVIRUS RESOURCE CENTER, 2021).....	4
<b>Figura 2</b> - Estrutura de SARS-CoV-2 (ARTIKA et al., 2020). .....	6
<b>Figura 3</b> - Estrutura do SARS-CoV-2 que mostra as proteínas chaves e estrutura da proteína do nucleocapsídeo (AZONETWORK, 2021).....	7
<b>Figura 4</b> - Esquema das unidades básicas integradas que conformam um biossensor. [Adaptado de CHIU & CHRISTOPOULOS (2012)]. .....	12
<b>Figura 5</b> - Exemplo de antígeno multivalente (DB DIAGNÓSTICO, 2021). .....	14
<b>Figura 6</b> - Estrutura de imunoglobulina generalizada [Adaptado de CANSTOCKPHOTO, (2013)]. .....	15
<b>Figura 7</b> - Elementos básicos de um imunossensor eletroquímico. A: Detecção direta sem marcadores, e B: Detecção baseada em marcadores enzimáticos. [Adaptada de CHO e colaboradores(2018)]. .....	18
<b>Figura 8</b> - Métodos de imobilização de biomoléculas: A: adsorção; B: reticulação e C: ligação covalente. [Adaptado de FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, (2013)]. .....	19
<b>Figura 9</b> – Eletrodo de carbono tipo Screen-Printed usado para análises eletroquímicas (METROHM, 2021).....	20
<b>Figura 10</b> - Representação esquemática da funcionalização de grafeno através da adição de carboxilas [Adaptado de RAO; PRAMODA; KUMAR (2017)] .	22
<b>Figura 11</b> – A: Formação do carbocátion. B: Formação do intermediário O-acilisourea [Adaptado de MOJARRADI (2011)]. .....	23
<b>Figura 12</b> - Formatos de imunoensaio. Anticorpo (Y) imobilizado no SPCE: A: ensaio competitivo direto com antígeno marcado com enzima; B: ensaio em sanduíche usando detecção de anticorpo marcado com enzima; Antígeno (●) imobilizado no SPCE: C: ensaio competitivo direto usando anticorpo primário marcado com enzima; D: ensaio competitivo indireto usando um anticorpo secundário marcado com enzima [ Adaptado de RICCI e colaboradores (2007); WU e colaboradores(2009)] .....	25
<b>Figura 13</b> – Ensaio com TMB usado para determinar a atividade HRP.....	26
<b>Figura 14</b> – Sinal de excitação triangular em voltametria cíclica [Adaptado de SKOOG e colaboradores (2006)]. .....	27
<b>Figura 15</b> - Voltamogramas cíclicos para sistemas reversível e quase-reversível. ....	28
<b>Figura 16</b> - Representação das medidas de EIS. A: Gráfico de Nyquist, e B: Circuito equivalente de Randles (com controle de transferência de carga e controle cinético) [Adaptado de ROHOM e colaboradores (2018)]. .....	31

<b>Figura 17</b> - Salto de potencial em Cronoamperometria (FERREIRA & AVACA, 2008).....	32
<b>Figura 18</b> - A) Relação da corrente com o tempo. B) Relação da corrente com $t-1/2$ - Equação de Cottrell (FERREIRA & AVACA, 2008). ....	33
<b>Figura 19</b> - Síntese do Grafeno Carboxilado .....	37
<b>Figura 20</b> - Representação das etapas de fabricação do imunossensor e detecção dos anticorpos IgG e IgA específicos contra a proteína N de SARS-CoV-2. .	40
<b>Figura 21</b> – (A) Análise termogravimétrica e (B) Termogravimetria Derivada do grafeno e grafeno carboxilado. ....	43
<b>Figura 22</b> – Espectro de FTIR-ATR do grafeno e grafeno carboxilado. ....	44
<b>Figura 23</b> – Espectro de EDS para grafeno (A) e Grafeno Carboxilado (B). ....	45
<b>Figura 24</b> – Imagens de MEV para Grafeno (A-B) e Grafeno Carboxilado (C-D).....	46
<b>Figura 25</b> - (A) Voltamogramas cíclicos da deposição de camadas de grafeno carboxilado em 5mmol L <sup>-1</sup> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> + 0,1 mol L <sup>-1</sup> KCl. (B) Relação linear entre a corrente de pico do anódico e catódico e a raiz quadrada da velocidade de varredura (10 - 100 mV s <sup>-1</sup> ) para SPCE modificado com deposições de 3 GC. ....	48
<b>Figura 26</b> - SPCEs limpo e modificados com 1,2,3 camadas de grafeno carboxilado. ....	50
<b>Figura 27</b> - EIS para deposição de camadas de grafeno carboxilado em 5mmol L <sup>-1</sup> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> + 0,1 mol L <sup>-1</sup> KCl. (B) Circuito equivalente de Randles. RS, resistência da solução; CPE, elemento de fase constante; Rc, resistência à transferência de elétrons; ZW, elemento de Warburg devido à difusão do par redox ([Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>4-</sup> /[Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-</sup> ) para a interface da interface bulk do eletrólito.....	51
<b>Figura 28</b> - Voltametrias cíclicas e gráficos de Nyquist das etapas de fabricação do imunossensor (inserido o circuito equivalente utilizado). ....	53
<b>Figura 29</b> - Esquema da modificação do eletrodo SPCE com grafeno carboxilado seguido da formação do éster-NHS .....	54
<b>Figura 30</b> - Representação da etapa de imobilização do antígeno (proteína N) seguida de BSA. ....	55
<b>Figura 31</b> – Otimização de variáveis analíticas. A: Voltamogramas cíclicos a diferentes tempos de incubação da proteína-N, e B: Relação entre corrente de pico anódico e tempo de incubação.....	57
<b>Figura 32</b> -Estabilidade do imunossensor por voltametria cíclica em 5 mmol L <sup>-1</sup> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> + 0,1 mol L <sup>-1</sup> KCl. ....	58
<b>Figura 33</b> - Voltametria cíclica do substrato TMB (linha preta) e reação de TMB com HRP (linha vermelha) em um eletrodo do tipo SPCE. Os potenciais de redução estão destacados através das setas. ....	59
<b>Figura 34</b> - Voltametria cíclica do substrato TMB no eletrodo do tipo SPCE e SPCE modificado com grafeno carboxilado.....	61

<b>Figura 35</b> – Ilustração esquemática do imunossensor eletroquímico da estratégia de amplificação de sinal enzimático (HRP). .....	62
<b>Figura 36</b> – A: Cronoamperogramas gerados a partir de amostras de soro negativo e positivo para IgG-SARS-CoV-2 e ensaio branco. B: Desvio padrão (n=3) referente a corrente obtida em 20 s.....	64
<b>Figura 37</b> - Cronoamperograma para diferentes concentrações de soro humano positivo para IgG-SARS-CoV-2 da proteína N; (B) valores registrados de 10 a 50 s para diferentes concentrações de soro humano com IgG-SARS-CoV-2. ....	65
<b>Figura 38</b> - Curva de calibração para determinação de IgG-SARS-CoV-2 da proteína N pela técnica (A) CA e (B) ELISA. As barras de erro padrão correspondem às medições feitas em triplicata de cada concentração (n = 3). ....	67
<b>Figura 39</b> - A: Cronoamperogramas gerados a partir de amostras de soro negativo e positivo para IgA-SARS-CoV-2 e ensaio branco. B: Desvio padrão (n=3) referente a corrente obtida em 20 s.....	70
<b>Figura 40</b> - Cronoamperograma para diferentes concentrações de soro humano positivo para IgA-SARS-CoV-2 da proteína N; (B) valores registrados de 10 a 50 s para diferentes concentrações de soro humano com IgA-SARS-CoV-2. ....	71
<b>Figura 41</b> - Curva de calibração para determinação de IgA-SARS-CoV-2 da proteína N pela técnica (A) CA e (B) ELISA. As barras de erro padrão correspondem às medições feitas em triplicata de cada concentração (n = 3). ....	73

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Principais sistemas eletroquímicos em VC. ....	29
<b>Tabela 2</b> - Valores de $R_c$ calculados para as diferentes deposições usando o circuito equivalente de Randles .....	52
<b>Tabela 3</b> - Valores de $I_{pa}$ , $I_{pc}$ e $\Delta E$ para as etapas de fabricação do imunossensor. ....	53
<b>Tabela 4</b> - Comparação do ensaio ELISA e imunossensor para detecção de IgG-SARS-CoV-2. ....	68
<b>Tabela 5</b> – Detecção de IgG-SARS-CoV-2 em amostras de soro humano usando o imunossensor proposto e ensaio Elisa. ....	69
<b>Tabela 6</b> - Comparação do ensaio ELISA e imunossensor para detecção de IgA-SARS-CoV-2. ....	74
<b>Tabela 7</b> - Comparação dos diferentes métodos de biossensores previamente reportados para diagnóstico da COVID-19 .....	75

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	3
<b>2.1. Geral</b> .....	3
<b>2.2. Específicos</b> .....	3
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
<b>3.1. COVID-19</b> .....	3
3.1.1. Morfologia viral.....	5
3.1.2. Diagnósticos para COVID-19.....	8
<b>3.2. Biossensor Eletroquímico</b> .....	11
3.2.1. Imunologia: Antígeno e Anticorpo.....	13
3.2.2. Imunossensores Eletroquímicos .....	17
3.2.3. Etapas de imobilização em SPCE.....	20
<b>3.3. Técnicas Eletroquímicas</b> .....	26
3.3.1. Voltametria cíclica (VC).....	27
3.3.2. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) .....	29
3.3.3. Cronoamperometria .....	31
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
<b>4.1. Reagentes e Soluções</b> .....	34
<b>4.2. Material Biológico</b> .....	34
<b>4.3. Equipamentos utilizados em estudos de caracterização</b> .....	35
4.3.1. Caracterização eletroquímica.....	35
4.3.2. Caracterização química.....	35
4.3.3. Caracterização morfológica.....	35
<b>4.4. Eletrodos Impressos de Carbono “Screen Printed Carbon Electrodes” (SPCE)</b> .....	36
<b>4.5. Grafeno Carboxilado (GC)</b> .....	36
<b>4.6. Imunossensor para Detecção de IgG e IgA SARS-CoV-2 da Proteína N</b> .....	37
<b>4.7. Ensaio ELISA</b> .....	41
<b>5. RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....	42
<b>5.1. Grafeno Carboxilado (GC)</b> .....	42

5.1.1.	Caracterização química.....	42
5.1.2.	Caracterização morfológica.....	45
5.1.3.	Caracterização eletroquímica do GC.....	46
<b>5.2.</b>	<b>Caracterização eletroquímica das etapas do imunossensor .....</b>	<b>52</b>
5.2.1.	Etapas da construção do imunossensores .....	52
5.2.2.	Tempo de incubação da proteína nucleocapsídica.....	56
<b>5.3.</b>	<b>Caracterização de eletrodo e substrato redox .....</b>	<b>58</b>
<b>5.4.</b>	<b>Estudo de detecção amperométrica .....</b>	<b>61</b>
5.4.1.	Imunossensor para detecção de IgG-SARS-CoV-2 do nucleocapsídeo. 63	
5.4.2.	Imunossensor para detecção de IgA-SARS-CoV-2 do nucleocapsídeo. 69	
<b>5.5.</b>	<b>Comparação com imunossensores reportados na literatura....</b>	<b>74</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>.....</b>	<b>95</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
anti-IgG-HRP	Anticorpo IgG marcado com a Enzima Peroxidase de Rábano
anti-IgA-HRP	Anticorpo IgA marcado com a Enzima Peroxidase de Rábano
ATR	Refletância Total Atenuada
BSA	Albumina de Soro Bovino
CA	Cronoamperometria
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019
EDC	Cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X
EIS	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
FTIR	Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier.
GC	Grafeno Carboxilado
HRP	Enzima Peroxidase de Rábano
Ig	Imunoglobulina
LOD	Limite de detecção
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NHS	N-hidroxi-succinimida.
OMS	Organização Mundial da Saúde.
PBS	Solução Tampão fosfato-salino
Proteína N	Proteína do nucleocapsídeo
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus-2
SPCE	Eletrodos Impressos de Carbono
TGA	Análise Termogravimétrica
TMB	3,3',5,5 – tetrametilbenzidina
VC	Voltametria Cíclica



# 1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas têm um impacto profundo nos humanos, particularmente nas populações mais vulneráveis. A identificação do primeiro caso da síndrome respiratória aguda grave do coronavírus-2 (SARS-CoV-2) foi o em Wuhan, na China, no dia 31 de dezembro de 2019. A falta de tratamento eficaz e intervenções não farmacêuticas para conter a transmissão levaram a um aumento exponencial da doença do coronavírus 2019 (COVID-19), o que transformou esta infecção em uma pandemia.

Como a transmissão entre humanos aumentou rapidamente, a COVID-19 se espalhou globalmente e representa uma ameaça à saúde pública em mais de 187 países (JOHNS HOPKINS CORONAVIRUS RESOURCE CENTER, 2021). Em 24 de janeiro de 2023, 664,6 milhões de casos confirmados em todo o mundo, resultando em 6,7 milhões mortes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023). Somente no Brasil, mais de 36 milhões de casos de coronavírus foram relatados e as mortes chegam a aproximadamente 696 mil e esses números continuam aumentando, cerca de 550 casos diários são relatados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023). À vista disso, o diagnóstico precoce e preciso dos pacientes contaminados com o vírus é, sem dúvida, de vital importância para a contenção da COVID-19, pois facilita o controle das fontes de infecção e o monitoramento da progressão da doença, pois, a pessoa contaminada pode ser isolada e receber os devidos cuidados, evitando, assim, a propagação da doença e possibilitando o controle da contaminação.

Nos últimos 30 anos, diversos imunoenaios quantitativos tem sido explorado para fins analíticos no diagnostico (ZHANG, S. *et al.*, 2007). Os imunossensores são baseados na reação imunológica, sendo que o antígeno ou anticorpo é imobilizado na superfície de substratos condutores, com objetivo de detectar seletivamente o alvo de interesse (PANINI *et al.*, 2008). Os imunossensores, os quais se apresentam como candidatos promissores, se mostram eficientes, rápidos e de baixo custo para detecção de outros tipos de doenças. Á vista disso, o desenvolvimento de um imunossensor que detecte as biomoléculas de identificação da COVID-19 se mostra caráter urgente e de grande relevância no contexto mundial atual.

Nosso estudo foi desenvolver um biossensor baseado em um imunoensaio ELISA para monitorar anticorpos contra a proteína do nucleocapsídeo (proteína N) de SARS-CoV-2 em amostras de soro humano.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Desenvolver imunossensores eletroquímicos para detecção de anticorpos IgG e IgA contra a proteína N do vírus SARS-CoV-2 com a finalidade de aplicação em diagnóstico de pacientes infectados com COVID-19.

### **2.2. Específicos**

- Estudar os parâmetros dos eletrodos impressos de carbono (SPCE) modificado com grafeno carboxilado (GC) na estabilidade do imunossensor.
- Imobilizar a proteína N sobre a superfície de eletrodos SPCE modificado com grafeno carboxilado.
- Estudar parâmetros ideais para os eletrodos funcionalizado com a proteína N e com os anticorpos contra a proteína N.
- Aprimorar os parâmetros das metodologias empregadas, tais como: camadas de GC, concentração e tempo de imobilização da proteína N, concentração de anticorpos IgG, concentração de anti-IgG-HRP, entre outros.
- Estudar mediante técnicas de Cronoamperometria (CA) a detecção analítica da amostra alvo em soluções de diferentes concentrações (curvas analíticas e cálculo de limites de detecção).
- Executar estudos de validação dos métodos analíticos (comparar com testes ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima)).

## **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1. COVID-19**

COVID-19 é uma enfermidade causada por um agente que, de acordo com a análise do genoma, pertence ao subgênero *Betacoronavirus* da subfamília *Orthocoronavirinae* na família *Coronaviridae* da subordem *cornidovirineae* (LU & ZHAO *et al.*, 2020; ZHOU, Peng *et al.*, 2020), o Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda 2 (do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), mais conhecido

como SARS-CoV-2 ou novo coronavírus, o grande vilão da humanidade atual (LI, Qun *et al.*, 2020). COVID-19 significa COrona VIRUS Disease (Doença do Coronavírus), enquanto “19” se refere ao ano 2019, quando os primeiros casos em Wuhan, na província de Hubei, na China, foram divulgados publicamente pelo governo chinês no final de dezembro (WU, Fan *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2020).

Como a transmissão entre humanos aumentou rapidamente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou o surto de COVID-19 como uma pandemia em 12 de março de 2020 (OMS, 2020). O novo coronavírus se espalhou globalmente e representa uma ameaça à saúde pública em mais de 187 países (**Figura 1**) (JOHNS HOPKINS CORONAVIRUS RESOURCE CENTER, 2021). A pandemia da doença coronavírus é amplamente considerada uma das piores crises de saúde pública do século 21, com mais de 50 milhões de casos relatados e mais de 1 milhão de mortes em todo o mundo ocorrendo em 1 ano após o vírus ter sido identificado (JOHNS HOPKINS CORONAVIRUS RESOURCE CENTER, 2021). Somente no Brasil, mais de 36 milhões de casos de coronavírus foram relatados e as mortes chegam a aproximadamente 696 mil e esses números continuam aumentando, cerca de 550 casos diários são relatados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023).

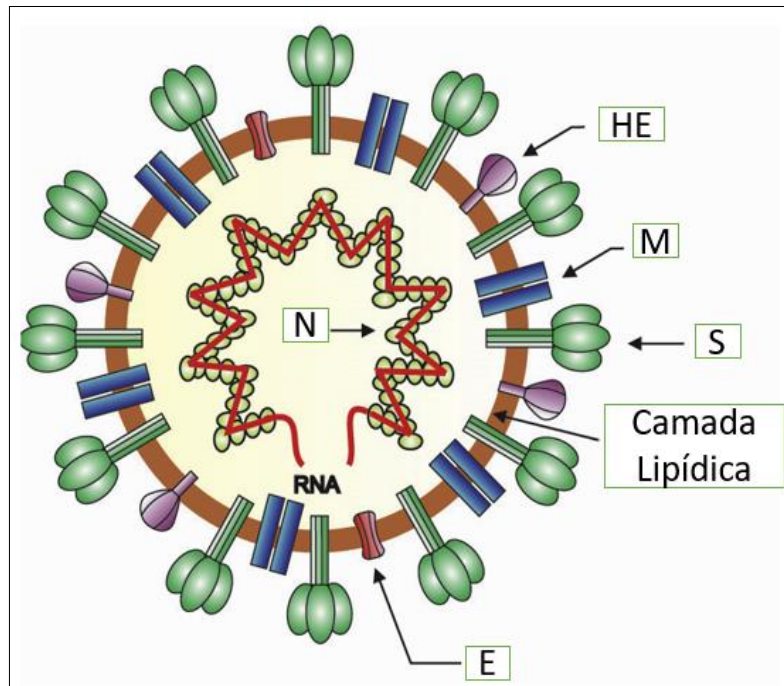


**Figura 1** - Mapa das áreas de ocorrência do coronavírus (JOHNS HOPKINS CORONAVIRUS RESOURCE CENTER, 2021).

A transmissão do vírus pode ocorrer através de gotículas respiratórias, aerossóis, contato com a superfícies e pela via fecal, uma vez que o vírus vivo foi detectado nas fezes (DOREMALEN *et al.*, 2020; WANG, Wenling *et al.*, 2020). Mais criticamente, já foi comprovado que as infecções e transmissões assintomáticas também ocorrem (HOEHL *et al.*, 2020; YU, Ping *et al.*, 2020). Como os coronavírus anteriores, o novo coronavírus causa doenças que afetam a saúde respiratória e os sintomas podem aparecer de 2 a 14 dias após a exposição (SHEIKHI *et al.*, 2020). Os principais sintomas da COVID-19 podem ser muito leves a graves e incluem febre, perda de paladar ou olfato, tosse e falta de ar. Muitas pessoas são assintomáticas, surgindo a necessidade de desenvolver ferramentas de diagnóstico sensíveis, precisas, rápidas e de baixo custo para rastrear indivíduos infectados, de modo que o isolamento e o tratamento adequados possam ser facilitados.

### **3.1.1. Morfologia viral**

A morfologia do coronavírus é predominantemente esférica, com diâmetro aproximado de 100 a 160nm, porém, são pleomórficos (capacidade de variar a sua forma de acordo com o período de vida) devido à existência de envelope constituído por dupla camada de lipídeos e proteínas estruturais (HOLMES, 1999). A família *Coronaviridae* possui essa denominação devido a presença de projeções ou espículas, que emergem do envelope e dão ao vírus um aspecto que lembra coroa (**Figura 2**).



**Figura 2** - Estrutura de SARS-CoV-2 (ARTIKA et al., 2020).

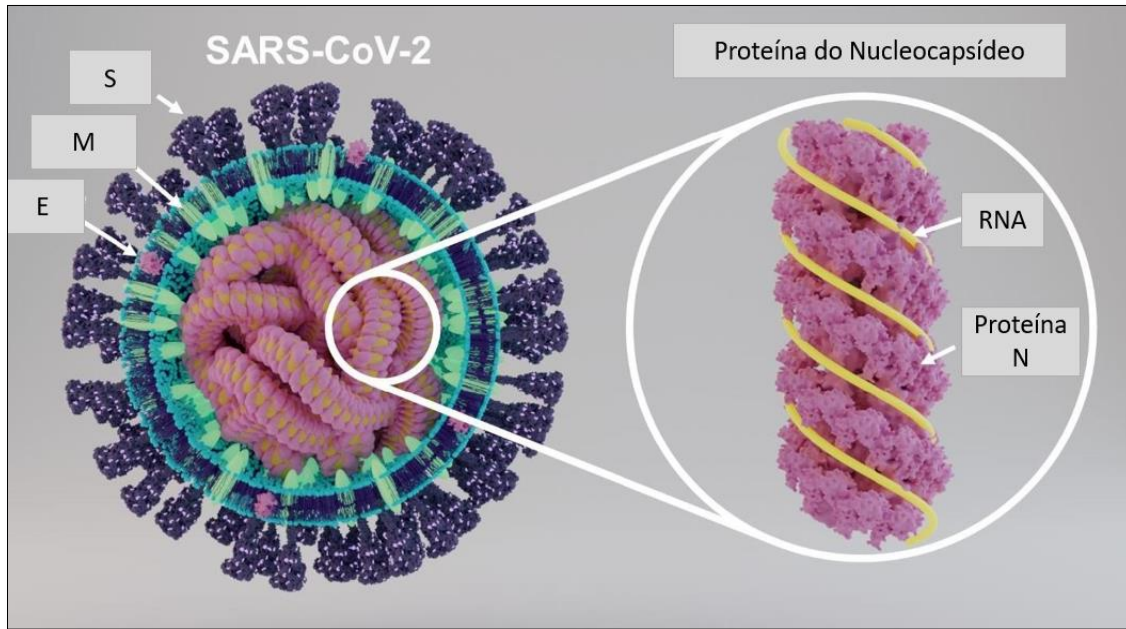
O SARS-CoV-2 é um vírus de ácido ribonucleico (RNA), no qual o material genético é representado por uma única molécula de RNA positivo (RNA+) (ZHOU, Peng *et al.*, 2020). Todo o seu genoma contém menos de 30.000 nucleotídeos, cada um deles formado por uma molécula de açúcar (ribose), um ácido fosfórico e uma base nitrogenada.

As principais proteínas estruturais componentes da partícula viral do coronavírus são: pico (S) (*Spike*), hemaglutinina-esterase (HE), envelope (E), matriz (M) (glicoproteína da membrana) e nucleocapsídeo (N) (que envolve o RNA viral) (LU & ZHAO *et al.*, 2020). Dentre elas, as mais relevantes são a glicoproteína de pico, reconhecida como proteína S, e a proteína N do nucleocapsídeo viral. A proteína S permite a entrada do vírus na célula hospedeira pela ligação ao receptor celular e à fusão da membrana. A proteína do nucleocapsídeo, por sua vez, regula o processo de replicação viral (UZUNIAN, 2020).

### 3.1.1.1. Proteína do Nucleocapsídeo (N)

A proteína N é uma das principais proteínas estruturais dos coronavírus. No interior da partícula viral está o seu material genético, associado às proteínas N, cuja

função é proteger o genoma viral (**Figura 3**) (RENHONG *et al.*, 2020). As proteínas N formam um capsídeo cilíndrico e oco, composto por capsômeros que circundam o material genético do vírus e atribuem à molécula um formato helicoidal (TORTORA *et al.*, 2017).



**Figura 3-** Estrutura do SARS-CoV-2 que mostra as proteínas chaves e estrutura da proteína do nucleocapsídeo (AZONETWORK, 2021).

As proteínas do nucleocapsídeo dos coronavírus têm recebido menos atenção do que as glicoproteínas de superfície e foram considerados de menor preocupação. Interesse nesta classe de proteínas foi estimulado nos últimos anos por desenvolvimentos diversos, como: o reconhecimento da importância das interações RNA-proteína e a evidência em vários sistemas virais que as proteínas internas do vírion podem ser importantes determinantes da resposta imune da célula (LAUDE & MASTERS, 1995).

A proteína N do coronavírus possui massa molecular variando de 40 a 63 kDa, dependendo do vírus e da cepa. A proteína do nucleocapsídeo parece ser o polipeptídeo viral mais abundante em células infectadas por coronavírus durante todos os estágios da infecção. É possível detectá-la cerca de 3 a 5 horas após a infecção e sua síntese é mantida ao longo do ciclo do vírus (LAUDE & MASTERS, 1995). Leung e colaboradores (2004) em seus estudos observaram que maioria dos pacientes que

desenvolveram SARS (89 % por ELISA) produziu anticorpos para esse antígeno. Portanto, o antígeno N de SARS-CoV se destaca como o antígeno diagnóstico mais importante do vírus, afinal, quando presentes, esses anticorpos também são os mais abundantes dos anticorpos produzidos contra o vírus. Em pacientes diagnosticado com SARS que obteve resposta positiva para anti-N, identifica-se predominância de anticorpos IgG sobre anticorpos IgM, mesmo no início (segunda semana) e durante o seguimento da doença (LEUNG *et al.*, 2004).

### **3.1.2. Diagnósticos para COVID-19**

#### **3.1.2.1. *Real-Time Reverse-Transcriptase Polymerase Chain (RT-PCR)***

RT-PCR, vem do inglês e significa "reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase", é considerado pelo Centro Chinês de Controle e Prevenção de Doenças como o "padrão ouro" para o diagnóstico de COVID-19 (XIE, 2020). A confirmação é obtida através da detecção do RNA viral do novo coronavírus na amostra analisada, preferencialmente obtida de raspado de nasofaringe, pois estudos demonstraram que o SARS-CoV-2 infecta principalmente o trato respiratório (HUANG, Chaolin *et al.*, 2020; ZHOU, Peng *et al.*, 2020). No entanto, este método frequentemente usado mostrou sensibilidade relativamente alta (cerca de 90 a 99%). O RT-PCR tem alta sensibilidade para detecção precoce de infecções e é um método mais flexível, bem estabelecido e comprovado. Para o diagnóstico de COVID-19, muitos kits de teste estão disponíveis com base em RT-PCR. (LU & WANG *et al.*, 2020).

#### **3.1.2.2. Métodos Sorológicos**

Os ensaios sorológicos são métodos precisos e eficientes para a triagem de muitos patógenos, uma vez que, os anticorpos específicos podem ser detectados em capacidade de processamento relativamente alta (BASTOS *et al.*, 2020)

O teste sorológico de anticorpos é importante para pacientes sintomáticos que apresentam resultados negativos nos ensaios RT-PCR. A detecção de IgM e IgA relacionada a COVID-19 tende a indicar uma exposição recente ao SARS-CoV-2,



enquanto a detecção de IgG relacionada a COVID-19 indica exposição ao vírus há algum tempo (AZKUR *et al.*, 2020).

No ELISA (do inglês “Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), a proteína N e a Proteína S de SARS-CoV-2 são utilizados para a detecção de COVID-19. Estudos revelaram que o ELISA baseado em S e N na detecção de anticorpos permitem o diagnóstico sorológico de SARS-CoV-2 e possuem sensibilidade de 92 - 98% (LALWANI *et al.*, 2021; LIU, Wanbing *et al.*, 2020; WECHSELBERGER *et al.*, 2020). Porém, estes testes requerem treinamento para serem realizados, dependem de laboratórios especializados para a análise, além do tempo para obtenção dos resultados.

O imunoensaio de fluxo lateral (do inglês, “*Lateral-flow immunoassay*” - LFIA) é uma tira de teste imunocromatográfica amplamente utilizada em papel, projetada para detectar um biomarcador alvo. O LFIA é adequado para testes de pronto atendimento devido à sua simplicidade, portabilidade, custo-benefício e detecção rápida, podendo detectar anticorpos IgM e IgG simultaneamente contra o vírus SARS-CoV-2 no sangue humano em 15 min. Um estudo conduzido por LI e colaboradores (2020), mostra que a sensibilidade geral do teste LFIA é de 88,66% e a especificidade é de 90,63% (LI, Zhengtu *et al.*, 2020). Este tipo de detecção é crítico para o diagnóstico da doença, pois podem levar a falsos positivos e negativos devido a sua baixa sensibilidade.

### **3.1.2.3. Imunossensores para detecção de SARS-CoV-2**

Embora a detecção de RNA por RT-PCR e a detecção de anticorpos por ELISA e LFIA tenham sido desenvolvidas, cada método possui certas limitações práticas. Os biossensores têm grande potencial de ser ferramentas alternativas, pois podem fornecer detecção precoce, rápida, precisa e sensível. Esses biossensores incluem biossensores eletroquímico, biossensores colorimétricos, ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR), espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS), microbalança de cristal de quartzo (QCM) e etc. Os biossensores eletroquímicos são os mais populares, pois possuem as vantagens de baixo custo, simplicidade e são mais facilmente transformados em miniaturas e fabricados em massa.

Há relatos sobre vários biossensores eletroquímicos que foram utilizados para o diagnóstico de infecções virais, como: SARS-CoV, MERS-CoV (Síndrome

Respiratória do Oriente Médio do Coronavírus) , Ebola, influenza, gripe suína e assim por diante (LAYQAH & EISSA, 2019; MAITY *et al.*, 2018; NIDZWORSKI *et al.*, 2017; RAVINA *et al.*, 2019).

Também, há relatos recentes sobre biossensores eletroquímicos para detectar biomoléculas associadas ao SARS-CoV-2. Recentemente, Vadlamani e colaboradores (2020) relataram um biossensor eletroquímico para o diagnóstico rápido da proteína S de SARS-CoV-2 em amostras de *swab* nasal e saliva. Eles sintetizaram nanotubos de TiO<sub>2</sub> funcionalizados com cobalto como substrato. A técnica amperométrica foi a técnica utilizada para detecção. A molécula alvo foi identificada com eficiência e com baixo LOD (limite de detecção) de 0,7 nmol L<sup>-1</sup> e detectado em 30 s (VADLAMANI *et al.*, 2020).

Mahari e colaboradores (2020) desenvolveram dois sensores eletroquímico para detecção de antígeno de SARS-Cov-2, o primeiro foi um sensor potenciométrico usando eletrodo de óxido de estanho dopado com flúor e nanopartículas de ouro (AuNPs) e imobilizado com anticorpo monoclonal nCOVID-19 (n COVID-19Ac) para medir a mudança na condutividade elétrica. De forma similar, o segundo, denominado eCovSens, foi usado para medir a mudança na condutividade elétrica por meio da imobilização do n COVID-19Ac em um eletrodo de carbono serigrafado (SPCE). Os dois exibiram alta sensibilidade para detecção de nCOVID-19Ag, variando de 1 fmol L<sup>-1</sup> a 1 μmol L<sup>-1</sup> (MAHARI *et al.*, 2020).

Alafeef e colaboradores (2020), desenvolveram um biossensor eletroquímico baseado em papel para o diagnóstico SARS-CoV-2 em amostras nasofaríngeas e nasais e amostras de saliva em 5 minutos. Eles construíram um eletrodo usando uma espessa camada de grafeno na superfície do papel com nanopartículas de ouro funcionalizado com ssDNA (do inglês, single - stranded DNA viroses) que se liga especificamente ao gene N de SARS-CoV-2. A sensibilidade e linearidade do biossensor foi de 231 cópias/μL e 585,4 a 5,854×10<sup>7</sup> cópias μL<sup>-1</sup>, respectivamente, com o LOD de 6,9 cópias μL<sup>-1</sup> em amostras clínicas (ALAFEEF *et al.*, 2020)

Recentemente, Mehmandoust *et al.* (2022) descreveu uma abordagem de biossensor eletroquímico como uma técnica de análise apropriada para a determinação da proteína spike SARS-CoV-2. Neste novo e seletivo método, um nanocompósito de SiO<sub>2</sub> foi sintetizado e utilizado para modificar a superfície dos SPCEs. Posteriormente, a superfície foi modificada com cisteamina e glutaraldeído, permitindo a imobilização de

anticorpos que interagem com a proteína S de SARS-CoV-2. A resposta impedimétrica revelou um comportamento linear em ampla faixa de concentração com LOD = 100 fg mL<sup>-1</sup>. O sensor fabricado sugere uma perspectiva apropriada no sistema de pronto atendimento, dentro de 5 minutos em amostras nasais com recuperação satisfatória (MEHMANDOUST *et al.*, 2022).

Somados, uma plataforma de imunossensor eletroquímico altamente sensível foi publicada por Sadique *et al.* (2022) para detecção dupla de antígeno SARS-CoV-2 e anticorpo SARS-CoV-2. Ele foi montado usando nanocompósitos de óxido de grafeno (GO) funcionalizados com nanopartículas de ouro (AuNPs) para modificação de eletrodos de carbono vítreo (GCE) para posterior imobilização de biomoléculas (anticorpo ou antígeno). O imunossensor com o Ag imobilizado registou uma resposta linear entre 1 fg mL<sup>-1</sup> e 1 ng mL<sup>-1</sup>, com LOD de 1 fg mL<sup>-1</sup> por voltametria de pulso diferencial (DPV), enquanto, o imunossensor com o Ac imobilizado registou de 10 ag mL<sup>-1</sup> a 50 ng mL<sup>-1</sup>, com um LOD de 3,99 ag mL<sup>-1</sup>. A validação dos imunossensores foi realizada em amostras de soro e *swab* de pacientes com COVID-19. Ambos os imunossensores fabricados mostraram uma detecção rápida, precisa, confiável e sensível do antígeno SARS-CoV-2, bem como do anticorpo SARS-CoV-2, sugerindo seu grande potencial para aplicações clínicas no local de atendimento (SADIQUE *et al.*, 2022)

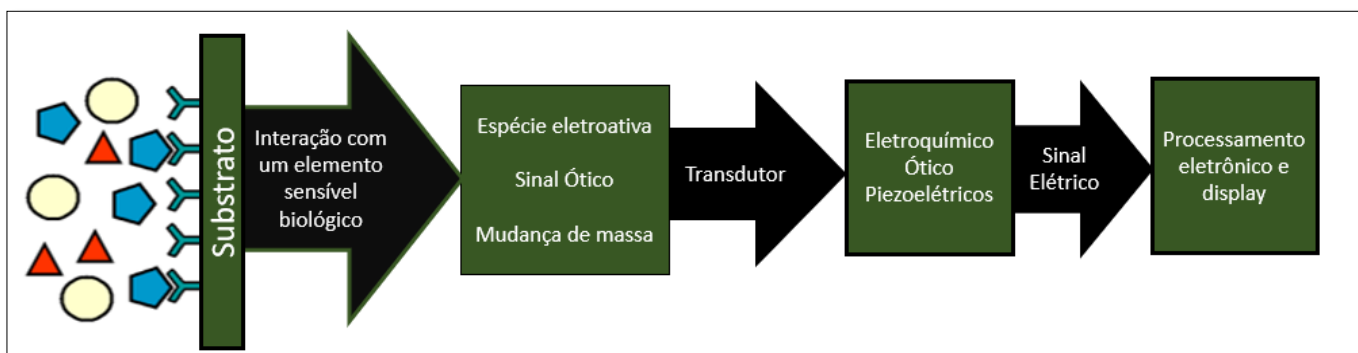
Foram relatados alguns estudos atuais para diagnóstico de COVID-19 através de sensores eletroquímicos. O desenvolvimento destes imunossensores tem como proposta cumprir os requisitos de teste em massa a um custo muito baixo, o que pode ajudar no diagnóstico precoce e na prevenção de pessoas não infectadas. Apesar das várias vantagens dos imunossensores eletroquímicos, eles ainda requerem mais pesquisas e melhorias em sua função, sensibilidade, especificidade e menor LOD.

### **3.2. Biossensor Eletroquímico**

A maioria dos testes químicos são realizados em laboratório empregando instrumentos específicos e gerenciado por profissionais especializados, assegurando, assim, a maior confiabilidade dos resultados. Todavia, nem sempre existem condições ideais para a realização das análises devido à falta de profissionais treinados ou equipamentos necessários. Nestes casos, os biossensores, que são dispositivos analíticos

para a detecção de marcadores específicos, podem ser uma opção para fazer um diagnóstico confiável (CHIU & CHRISTOPOULOS, 2012). Destacam-se nessa variedade devido à simplicidade de análise, sinais rápidos, sensíveis, reproduzíveis e confiáveis (MISTRY *et al.*, 2014; PARK, Byung Wook *et al.*, 2010).

O funcionamento de um sensor consiste em produzir um determinado sinal quando recebe um estímulo (**Figura 4**). Os sensores são classificados em óticos (luminescência, fluorescência e índice de refração), eletroquímicos (amperométricos, potenciométricos, impedimétricos e condutimétricos) e piezoelétricos.



**Figura 4** - Esquema das unidades básicas integradas que conformam um biossensor.

[Adaptado de CHIU & CHRISTOPOULOS (2012)].

Um sensor eletroquímico é um dispositivo que transforma informações eletroquímicas em um sinal analiticamente útil. Os sensores eletroquímicos são geralmente constituídos por um sistema de reconhecimento químico (molecular), que é a parte mais importante de um sensor, e um transdutor físico-químico, que é um dispositivo que converte a resposta química em um sinal que pode ser detectado por instrumentações elétricas modernas (FARIDBOD *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de um sensor eletroquímico envolve um conjunto formado por uma célula eletroquímica de três eletrodos (um eletrodo de trabalho, um contra-eletrodo e geralmente um eletrodo de referência), um composto ou substância química em análise denominada de analito e um dispositivo eletrônico de medição de sinais elétricos, denominado de potenciostato, responsável por realizar o controle sobre os sinais elétricos de uma célula eletroquímica (COOPER & CASS, 1991). Os sensores com essas características são classificados em amperométricos, potenciométricos, impedimétricos e condutimétricos (CHIU & CHRISTOPOULOS, 2012).

Os biossensores fazem parte de um grupo dos sensores químicos. Possuem essa classificação pois são capazes de proporcionar informação analítica quantitativa ou semiquantitativas, utilizando um elemento de reconhecimento biológico (como enzimas, anticorpos, proteínas ou microrganismos) em contato a transdutores (que podem ser ópticos, eletroquímicos, térmicos) que convertem o sinal da reação biológica ou bioquímica em um sinal elétrico passível de ser quantificado e amplificado (PEREIRA *et al.*, 2002).

No caso do sistema de classificação baseado no elemento biológico, o biossensor pode ser biocatalítico ou por bioafinidade. Os sensores biocatalíticos usam enzimas como mediador biológico para catalisar uma reação bioquímica de sinalização e os de bioafinidade tem como fundamento a afinidade biológica, no qual monitora os processos de ligação entre as moléculas constituintes (antígenos, anticorpos ou fragmentos de DNA) (LIM & AHMED, 2016; MEDEIROS *et al.*, 2012).

### **3.2.1. Imunologia: Antígeno e Anticorpo**

Imunologia é a ciência que estuda os mecanismos de defesa dos organismos vivos, em particular de humanos ou outros mamíferos. De uma maneira bem simples, o sistema imunológico responde ao antígeno produzindo anticorpos específicos. Os antígenos são capazes de estimular uma reação em cadeia, ativando os linfócitos (glóbulos brancos) e síntese de anticorpos específicos. Isto é, antígeno é uma substância que se liga especificamente com os produtos de uma resposta imune, ou melhor, a moléculas de antígeno reage com um anticorpo (GIL *et al.*, 1999).

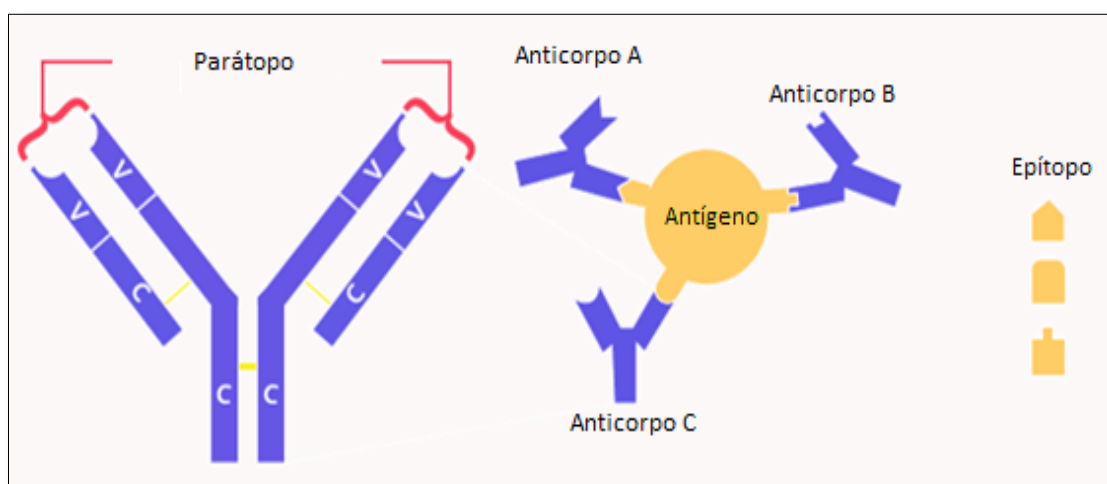
#### **3.2.1.1. Antígeno**

Os antígenos possuem certa complexidade química que os diferencia das substâncias reconhecidas pelo organismo e possui massa molecular de pelo menos 1 kDa (GIL *et al.*, 1999).

Os antígenos podem ser classificados em uni ou multideterminados, refere-se à possibilidade de se ter um ou mais tipos de epítopos (grupos funcionais determinantes

na interação Ag-Ac) , e uni ou multivalentes (**Figura 5**), no qual relacionam-se à repetição de cada tipo de epítopo (GIL *et al.*, 1999) .

O SARS-CoV-2 e suas proteínas estruturais possuem o tamanho variado das partículas, cerca de 50 a 200 nm. As principais proteínas são a glicoproteína de pico (S - Spike), proteína de envelope (E), proteína de matriz (M), proteína de nucleocapsídeo (N) e se prevê que o SARS-CoV-2 tenha 28 proteínas, que teoricamente podem ser usadas como antígenos para o diagnóstico de COVID-19 (CUI, Feiyun & ZHOU, 2020; WU, Fan *et al.*, 2020).



**Figura 5** - Exemplo de antígeno multivalente (DB DIAGNÓSTICO, 2021).

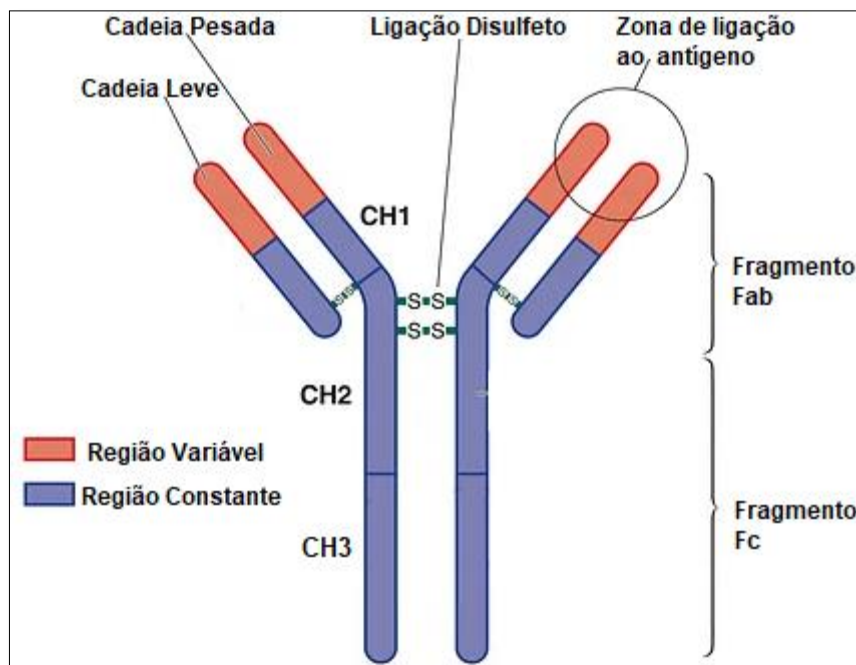
As proteínas S e N podem ser os biomarcadores de antígeno mais valiosos para o diagnóstico de COVID-19, pois muitos métodos de detecção foram relatados para o diagnóstico de SARS com base nas nestas proteínas (CHE *et al.*, 2004; WOO *et al.*, 2005).

### 3.2.1.2. Anticorpo

Os anticorpos são proteínas de estruturas tridimensional, com massa peso molecular (~150 kDa), produzidos por mamíferos como parte da resposta imunitária do hospedeiro ao microrganismo estranho como vírus, bactérias e parasitas.

Os anticorpos, também chamados de imunoglobulinas (Ig), possuem duas cadeias “leves” (25 kDa) e duas cadeias pesadas (50 kDa), as quais são ligadas entre si

por ligação de dissulfeto, formando estrutura simétrica em Y (**Figura 6**). As cadeias têm sua porção amino terminal próxima ao topo da estrutura em Y, onde se encontra o sítio determinante do anticorpo, denominado fragmento Fab (GOPINATH *et al.*, 2014). As sequências dos aminoácidos neste fragmento determinam a especificidade do anticorpo e o tipo de imunoglobulina, as quais são agrupadas em 5 classes principais: IgG, IgM; IgE; IgA e IgD, sendo mais abundantes no soro e comumente usadas as IgG.



**Figura 6** - Estrutura de imunoglobulina generalizada [Adaptado de CANSTOCKPHOTO, (2013)].

Os anticorpos podem ser identificados através de rotas bioquímicas e purificadas para aplicação na fabricação de imunossensores devido a criação de um padrão de reconhecimento exclusivo com alta especificidade e precisão para o bioanalito (CRIVIANU-GAITA & THOMPSON, 2016). Apesar dos anticorpos serem o elemento de reconhecimento fundamental no desenvolvimento de biossensores, suas limitações são amplamente conhecidas, como: processo de produção caro e demorado, requer experimentação com animais, além de processos de isolamento e purificação de alto custo e que precisam de instalações adequadas (MORALES & HALPERN, 2018).

A detecção de anticorpos específicos dirigidos ao SARS-CoV-2 no sangue do paciente é outra escolha para o diagnóstico de COVID-19. É amplamente aceito que a imunoglobulina M (IgM) forneça a primeira linha de defesa durante infecções virais,

antes da geração de respostas da imunoglobulina G (IgG) de alta afinidade, que são responsáveis pela memória imunológica e imunidade de longo prazo (TO, Kelvin Kai Wang *et al.*, 2020). Inicialmente, acreditava-se que os anticorpos IgM poderiam ser detectados mais cedo do que os IgG (GUO, Li *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2020), para infecções por SARS, o anticorpo IgM pode ser detectado no sangue dos pacientes após 3-6 dias, e IgG pode ser detectado após 8 dias (LEE, Hyun Kyoung *et al.*, 2010). Enquanto estudos posteriores mostraram que os anticorpos IgM e IgG poderiam ser detectados ao mesmo tempo, Zhang e colaboradores (2020) demonstraram que tanto IgM quanto IgG podem ser detectados após 5 dias do início da infecção causado por SARS-CoV-2 usando o método ELISA (ZHANG, Wei *et al.*, 2020). Quanto a diminuição da presença de anticorpo no soro, a resposta de anticorpos IgM diminui na terceira semana da doença, enquanto a resposta de anticorpos IgG persiste e é mantida em pacientes pós- COVID-19 (LIU, Xuemei *et al.*, 2020). Portanto, a estratégia baseada na identificação separada de IgM e IgG e na quantificação da relação IgM/IgG carece de sensibilidade e não é útil para definir a fase de uma infecção por SARS-CoV-2 (LONG *et al.*, 2020; TO, Kelvin Kai-Wang *et al.*, 2020).

Por outro lado, fisiologicamente, a resposta a uma infecção viral começa com a produção de imunoglobulinas específicas secretadas no local da infecção. Essas imunoglobulinas secretoras A (IgA) desempenham um papel importante na proteção e regulação homeostática do epitélio da mucosa respiratória, que separa o ambiente externo do interno do corpo, essa função primária é um processo que limita o acesso de microorganismos e antígenos às barreiras mucosas vulneráveis. Os métodos convencionais de ELISA mediram com precisão a IgA sérica, definindo seu comportamento durante a infecção por COVID-19. Esses estudos mostram que as IgA séricas são produzidas com cinética dependente do tempo e em quantidades maiores que as IgM (HEIDPRIEM *et al.*, 2021; YU, Hai-qiong *et al.*, 2020) sugerindo que a IgA pode ser útil na caracterização sorológica de indivíduos infectados por COVID-19 e como um biomarcador alternativo e mais confiável da infecção inicial por COVID-19 em comparação com a IgM. Além disso, a produção de IgA específica para SARS-CoV-2 foi relatada no soro de indivíduos logo na primeira semana após o início dos sintomas (HEIDPRIEM *et al.*, 2021) e foram encontrados em quantidade superior à IgG na fase inicial da infecção (HEIDPRIEM *et al.*, 2021).



Os casos graves de Covid-19, tendem uma resposta mais vigorosa em anticorpos IgG, IgM e IgA para doença Covid-19 (LALWANI *et al.*, 2021; LIU, Xuemei *et al.*, 2020). Porém, os níveis de IgA e IgG foram maiores em pacientes graves e críticos com COVID-19 do que em pacientes moderado, enquanto os níveis de IgM não foram diferentes entre os dois grupos. Isso sugere que os níveis de IgA e IgG estão associados à gravidade da COVID-19 (HUANG, Z *et al.*, 2020).

### 3.2.2. Imunossensores Eletroquímicos

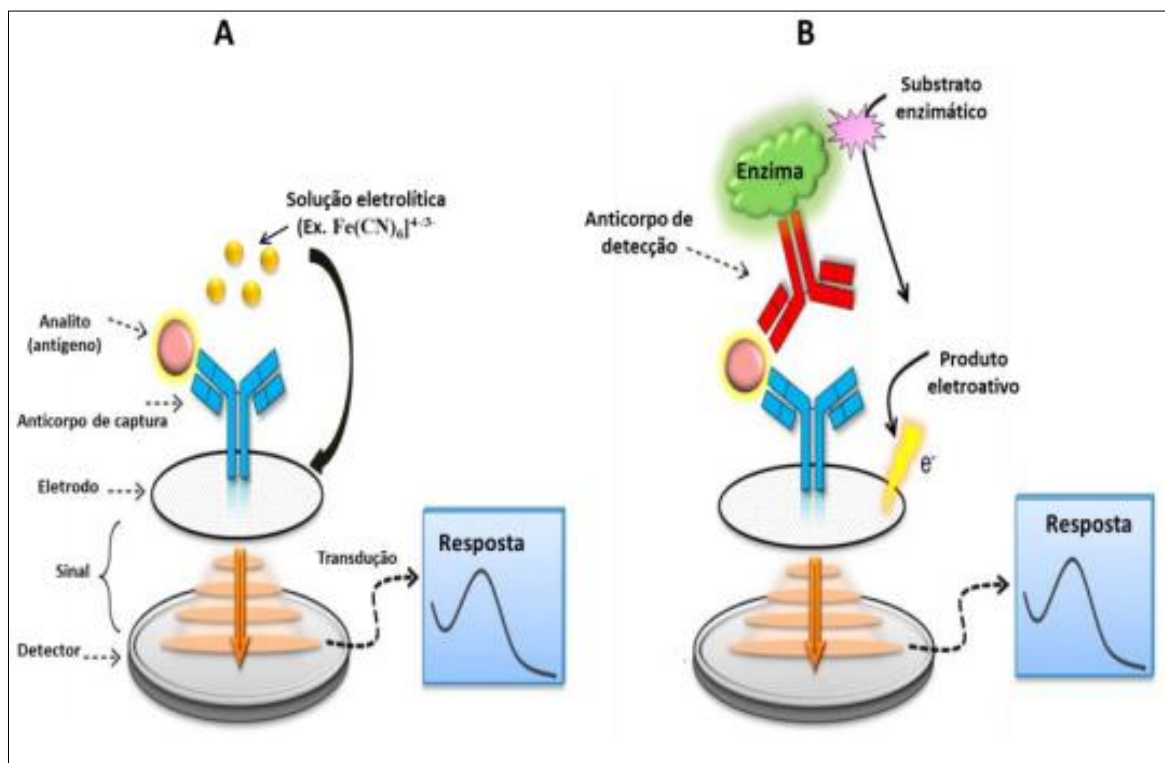
Os imunossensores são dispositivos analíticos que traduzem eventos baseados na reação imunológica, antígeno-anticorpo, em sinais elétricos, com grau elevado de especificidade e sensibilidade (RICCARDI *et al.*, 2002).

Normalmente, a fabricação dos imunossensores eletroquímicos consiste em imobilizar antígeno ou anticorpo na superfície do transdutor. Assim, diversos tipos de imunossensores podem ser construídos, de acordo com o tipo de transdutor empregado (potenciométrico, amperométrico e impedimétrico) (POHANKA & SKLÁDAL, 2008; RICCARDI *et al.*, 2002; SKLADAL, 1997).

As abordagens de detecção são divididas em detecção direta e indireta (**Figura 7**). Ensaio sem rótulos (detecção direta) são realizados medindo a presença de um analito diretamente através de reações bioquímicas em uma superfície transdutor, enquanto nos ensaios rotulados (detecção indireta) consistem em adicionar o antígeno e um segundo anticorpo geralmente marcado com uma enzima, acontecendo uma reação catalítica, onde um produto eletroativo pode ser detectado pelo eletrodo, permitindo assim uma detecção versátil e altamente sensível, que estará associada a presença do antígeno específico (MOLLARASOULI *et al.*, 2019).

Portanto, os métodos eletroquímicos tornam-se uma alternativa promissora, quando comparado com os métodos já existentes, pois além de permitem usar a eletrônica moderna para a detecção de baixas concentrações de amostra, os experimentos possuem volumes muito pequenos. Biossensores eletroquímicos são amplamente utilizados nas diferentes áreas como agricultura, alimentos, controle de qualidade, vigilância ambiental e industrial e com aplicações médicas, como exemplo a detecção de doenças. No tempo atual, muitas pesquisas são direcionadas ao desenvolvimento de estratégias de

amplificação de sinal, aumento dos limites de detecção e melhora da sensibilidade (LIM & AHMED, 2016; MOLLARASOULI *et al.*, 2019).



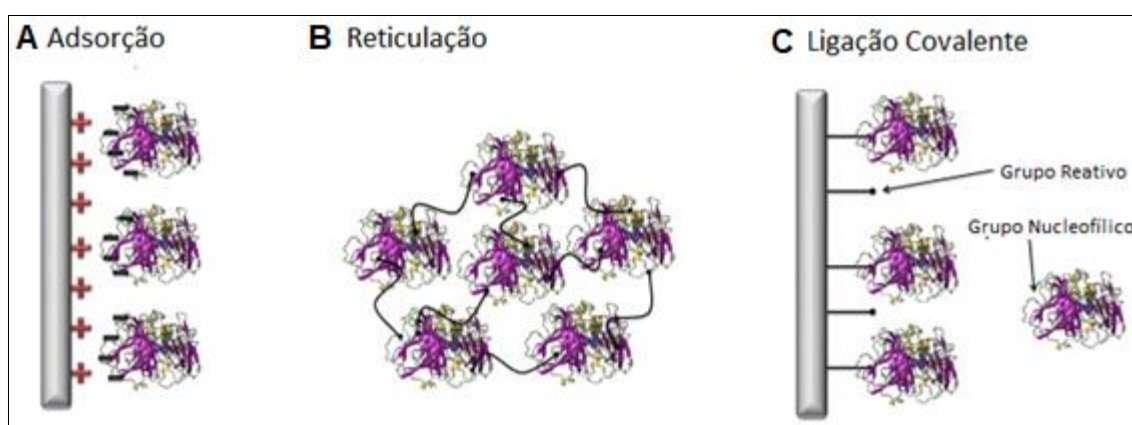
**Figura 7** - Elementos básicos de um imunossensor eletroquímico. A: Detecção direta sem marcadores, e B: Detecção baseada em marcadores enzimáticos. [Adaptada de CHO e colaboradores(2018)].

### 3.2.2.1. Imobilização de antígenos

Os procedimentos de imobilização de antígenos na superfície do eletrodo desempenham um fator chave na resposta. Embora a matriz (um componente físico) e o receptor (um componente biológico) desempenhem um papel importante no mecanismo de detecção, a ligação entre os dois é um fator que governa a transferência de carga e a estabilidade. A escolha de uma estratégia de imobilização apropriada e favorável é uma etapa importante para obter um imunossensor de alto desempenho. É fundamental que a molécula receptora imobilizada mantenha atividade biológica, forneça boa orientação em termos de locais de ligação expostos ao analito alvo, e adequada densidade (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Existem várias maneiras pelas quais a biomolécula receptora é imobilizada em uma matriz. Técnicas de imobilização tais como adsorção física, reticulação e ligação covalente (**Figura 8**) são bem relatadas na literatura (BASU *et al.*, 2007; DHAND *et al.*, 2008; KAUR *et al.*, 2016; KURBANOGLU *et al.*, 2018). Adsorção pertence a método físico, e a reticulação e a ligação covalente são colocadas sob métodos químicos de imobilização (MEHRVAR & ABDI, 2004).

De forma resumida, a adsorção física é baseada principalmente na interação eletrostática entre a biomolécula e a superfície da matriz devido à diferença em pontos isoelétricos. A reticulação é baseada no emprego de uma molécula de reticulação entre a matriz e a enzima. A ligação covalente utiliza o fenômeno da ligação química formado entre a molécula de detecção e o suporte sólido, neste caso, é necessário que o receptor possua alguns grupos funcionais como amino, carboxil, tiol, entre outros. (KAUR *et al.*, 2016). A reticulação e a ligação covalente dependem da imobilização por meio de uma terceira molécula que atua como uma ponte entre a matriz e o receptor. Vários fatores químicos devem ser considerados para uma exitosa ligação covalente, como funcionalidade do substrato, grupos funcionais na biomolécula e algumas condições físicas como pH e temperatura. Para imobilizar proteínas, o método de ligação covalente constitui um procedimento estável e possui melhor imobilização orientada (LIU, Yingshuai & YU, 2016; WELCH *et al.*, 2017).



**Figura 8** - Métodos de imobilização de biomoléculas: A: adsorção; B: reticulação e C: ligação covalente. [Adaptado de FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, (2013)].

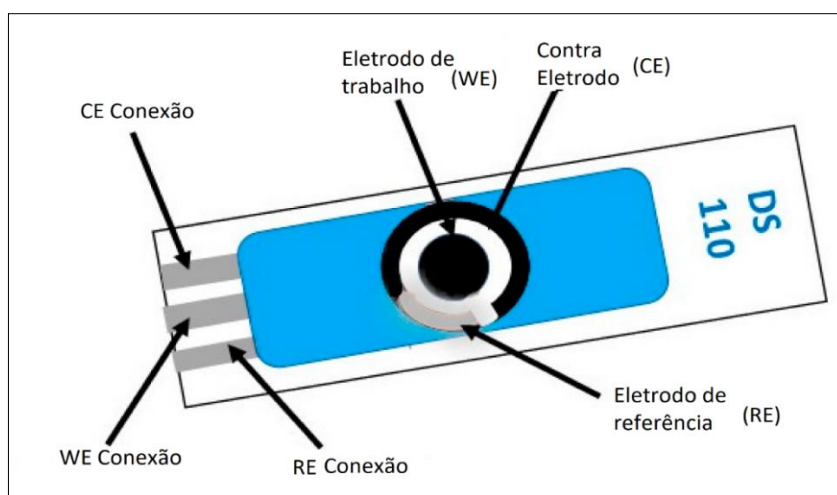
### 3.2.3. Etapas de imobilização em SPCE

Para o desenvolvimento e construção de biossensores, vários critérios importantes devem ser seguidos: sensibilidade, seletividade, facilidade de uso, acessibilidade, rapidez, simplicidade do equipamento e entrega ao usuário final.

#### 3.2.3.1. Eletrodo Impresso de Carbono (SPCE)

Os eletrodos serigrafados podem ser selecionados de acordo com o material do qual o eletrodo de trabalho é feito, por exemplo, carbono, ouro, platina ou outros metais, dependendo do estudo em andamento. SPCE é um eletrodo serigrafado à base de tintas de carbono para análises eletroquímicas (**Figura 9**). É um dispositivo descartável de baixo custo, fabricados para trabalhar com microvolumes de amostras. Ideal para fins de pesquisa e de controle de qualidade.

Eletrodos serigrafados são especialmente atraentes para este propósito, pois apresentam descartabilidade, robustez, estabilidade e baixo custo para produção em massa. Com a ampla expansão da ciência de materiais e produção de nanomateriais e compósitos, a modificação da superfície dos eletrodos impressos para aprimoramento de suas características são predominantemente usados no campo das ciências dos biossensores.



**Figura 9** – Eletrodo de carbono tipo Screen-Printed usado para análises eletroquímicas (METROHM, 2021).

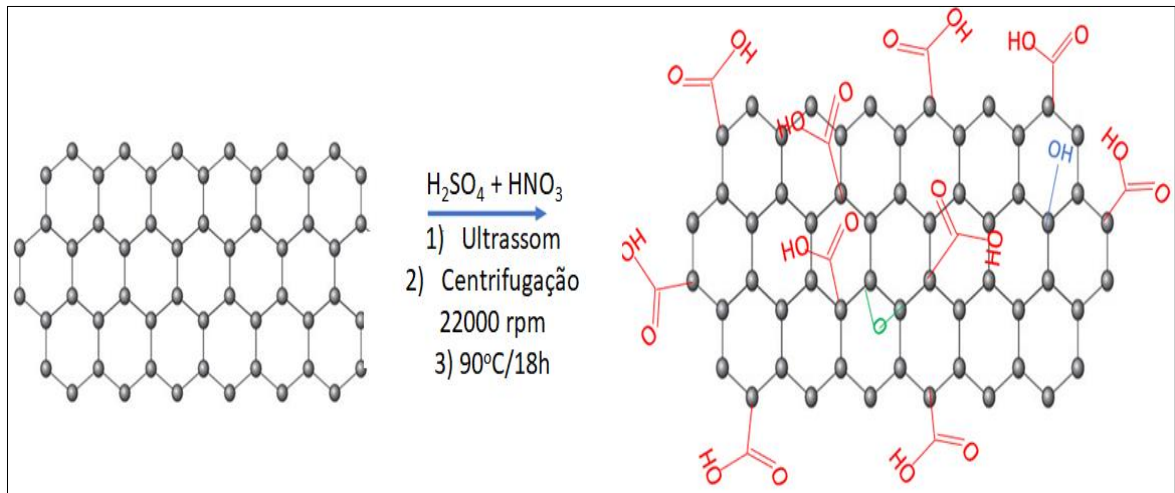
Eletródos de carbono impressos em tela tem sido a escolha de diversos pesquisadores quando se trata de desenvolver métodos rápidos e econômicos para detectar e/ou quantificar agentes de doenças. No entanto, a modificação desses eletrodos muitas das vezes se faz necessária para aumentar o sinal eletroquímico e / ou a superfície de imobilização (MINCU *et al.*, 2020).

### 3.2.3.2. Compósito de grafeno carboxilado

A ideia inicial foi a introdução de um material, o grafeno carboxilado, para modificação da superfície do eletrodo, tempo de funcionalização, número de reagentes químicos, melhorar a condutividade, aumento da área eletroativa e sensibilidade do sensor.

O grafeno é um alótropo do carbono, possui uma única camada de átomos de carbono em uma estrutura bidimensional em forma de favo de mel. Devido às excelentes propriedades elétricas, químicas, mecânicas e estruturais, o grafeno tem estimulado o interesse em aplicações de sensores (KUILA *et al.*, 2012; MUSZYNSKI *et al.*, 2008; STANKOVICH *et al.*, 2006). Porém, a estrutura desse nanomaterial o torna altamente hidrofóbico e de fácil aglomeração em solução aquosa (GU, Hui *et al.*, 2012). A funcionalização do grafeno é geralmente usada para evitar a aglomeração, tal como alquilamina de cadeia longa (NIYOGI *et al.*, 2006), derivado de pireno, 1-pirenobutirato (XU *et al.*, 2008), poli-L -lisina (SHAN *et al.*, 2009), entre outras. No entanto, esses métodos sempre precisam de reagentes químicos adicionais e sínteses complexas. Uma das formas de funcionalização e sendo a mais comum é através da adição de carboxilas na sua estrutura (**Figura 10**) (LIANG *et al.*, 2013; RAUF *et al.*, 2018).

Os grupos de ácido carboxílico podem reagir com proteínas ou carboidratos via ligações amida ou éster que resulta em maior atratividade deste material no desenvolvimento de novos biossensores. Desse modo, neste projeto, os SPCEs comerciais foram modificados com a deposição de compósito de grafeno carboxilado em sua superfície com a finalidade de funcionalizar com grupos carboxila.



**Figura 10** - Representação esquemática da funcionalização de grafeno através da adição de carboxilas [Adaptado de RAO; PRAMODA; KUMAR (2017)]

### 3.2.3.3. Imobilização por ligação covalente via Carbodiimidas

Carbodiimidas são utilizadas para mediar a formação de ligação amida com carboxilatos. Elas são o agente mais popular empregados em processo biotecnológicos, sendo bastante eficaz na formação de conjugado entre biomoléculas e um sistema inorgânico biocompatível (RODRIGUES, 2011)

Como visto no tópico anterior, na superfície do SPCE foi adicionado grafeno carboxilado, isso se deve ao fato de ser necessário a maior presença do grupo carboxila para que ocorra a imobilização do antígeno na superfície do eletrodo. O reagente EDC atua como ativador do ácido carboxílico, que promove a ligação direta de carboxilas com aminas primárias, sem fazer parte da ligação amida final (intermediário de “comprimento zero”).

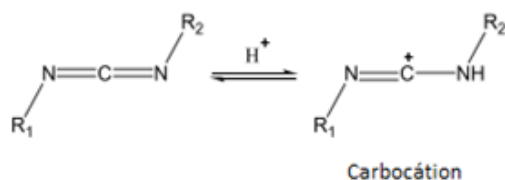
A carbodiimida mais comum é a 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC). Esta apresenta solubilidade em meio aquoso, o que permite que a reação ocorra em ausência de solventes orgânicos. O EDC é frequentemente usado em conjunto com n-hidroxisuccinimida (NHS) para a imobilização de grandes biomoléculas. O NHS promove o aumento da solubilidade e estabilidade ao intermediário reativo durante a reação (YUN *et al.*, 2005).

Como mostrado na **Figura 11 A**, a protonação do EDC ocorre dando origem a um carbocátion. Na presença de grupos de ácido carboxílico, o carbocátion é atacado

formando o grupo intermediário o-acilisourea **Figura 11 B** (GRABAREK & GERGELY, 1990; NAKAJIMA & IKADA, 1995; NGUNJIRI *et al.*, 2013).

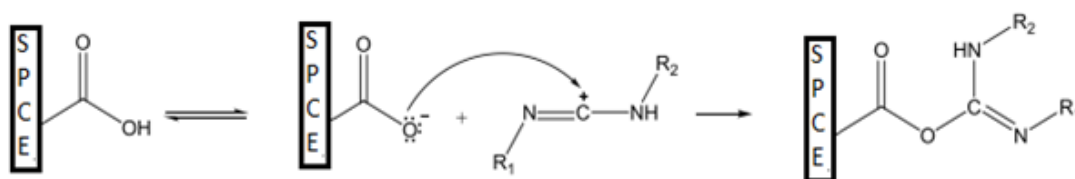
---

#### A Formação do carbocátion



---

#### B Formação do intermediário O-acilisourea



---

Figura 11 – A: Formação do carbocátion. B: Formação do intermediário O-acilisourea [Adaptado de MOJARRADI (2011)].

O intermediário O-acilisourea não é estável em solução. O uso de uma molécula secundária, NHS ou Sulfo-NHS, aumenta muito o tempo de vida do intermediário e, por este motivo, as reações de EDC são realizadas na presença de um derivado do NHS. Quando o NHS reage com O-acilisourea é formado um éster mais estável em relação a hidrólise (GRABAREK & GERGELY, 1990; NAKAJIMA & IKADA, 1995; NGUNJIRI *et al.*, 2013).

O mecanismo baseia-se nas seguintes etapas: o grupo hidroxila do NHS, ataca o intermediário O-acilisourea, produzindo o éster succinimida, que por sua vez pode ser atacado por uma amina primária, liberando um derivado de ureia solúvel como um subproduto. Uma ligação amida covalente é formada quando o agente de reticulação NHS-éster reage com uma amina primária (por exemplo, de uma proteína; liberando N- hidroxissuccinimida (DELAMARCHE *et al.*, 1996). Uma proteína imobilizada pode então servir como um receptor para o acoplamento a um anticorpo (DELAMARCHE *et al.*, 1996; NGUNJIRI *et al.*, 2013).

#### 3.2.3.4. Interações Antígeno-Anticorpo.

A interação Ag-Ac é relativamente fraca, envolvendo ligações não covalentes como *Van der Waals*, eletrostática, ligação de hidrogênio e ligações hidrofóbicas (GIL *et al.*, 1999). Estas interações ocorrem a curta distância, de modo que, só moléculas contendo determinante antigênico ligam-se ao sítio ligante do antígeno do respectivo anticorpo (JONES *et al.*, 1997).

No imunoensaio, o antígeno combina-se especificamente com o anticorpo, formando um complexo. Sob o ponto de vista analítico, a formação do complexo pode ser monitorada pelo método direto (sem qualquer marcador) ou indireto (com presença de marcador). Tanto o antígeno quanto o anticorpo podem ser marcados e, então, são denominados conjugados ou marcados. Neste trabalho, será realizada a detecção por método indireto, utilizando o anticorpo IgG marcado com HRP (IgG-HRP).

Os imunossensores indiretos podem ser divididos em dois outros tipos de formatos possíveis: formato competitivo (direto ou indireto) e formato não competitivo (sanduíche) (RICCARDI *et al.*, 2002).

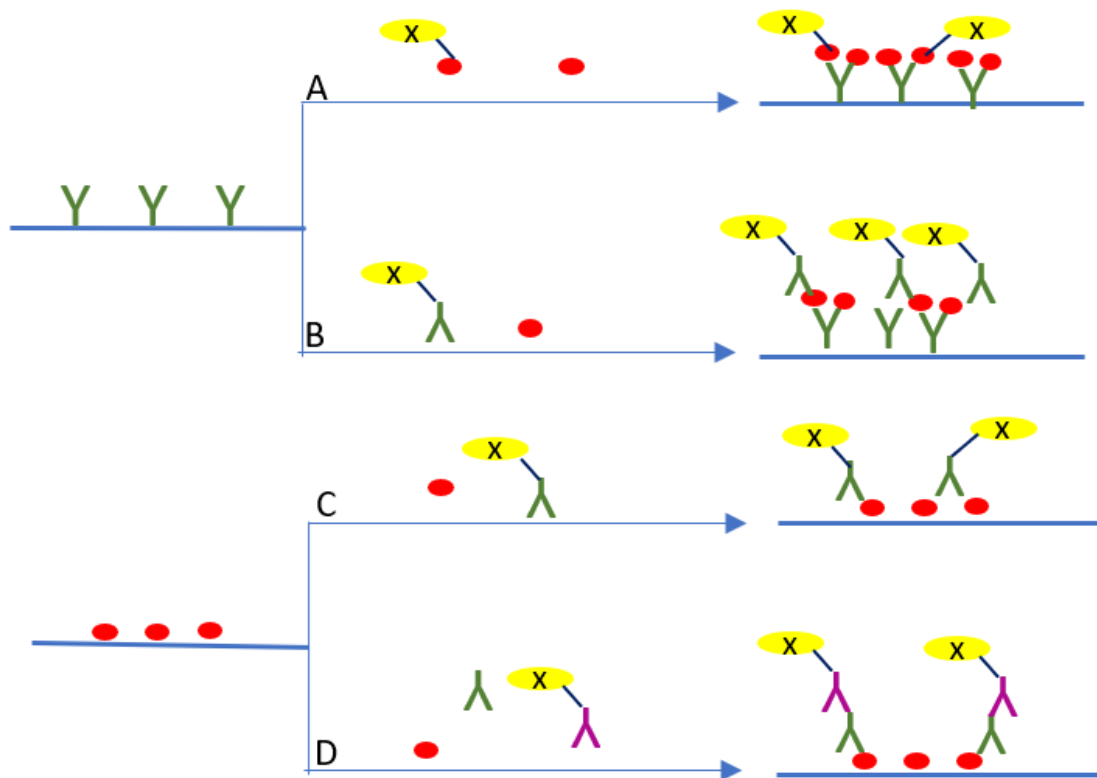
Dois abordagens podem ser seguidas para o desenvolvimento de imunossensores competitivos diretos: uma primeira, na qual os anticorpos imobilizados reagem com os antígenos livres em competição com os antígenos marcados (**Figura 12 A**) ou uma segunda, nas quais antígenos imobilizados competem com antígenos livres por anticorpos livres marcados (**Figura 12 C**). Para favorecer a imobilização e a interação com o anticorpo, os antígenos, principalmente os de baixo peso molecular, costumam ser conjugados a uma proteína (por exemplo, Ag – BSA (albumina de soro bovino), Ag – KLH (hemocianina de animais marinhos), Ag – OVA (ovalbumina de galinha) (BONWICK & SMITH, 2004).

O método indireto (método utilizado neste estudo) geralmente preferido. Nesse caso, uma enzima é usada como marcador do IgG anti-espécie (comumente chamada de anticorpo secundário). Este anticorpo secundário é usado formando uma ligação com o anticorpo primário (**Figura 12 D**).

Em um ensaio sanduíche, após a interação entre os anticorpos imobilizados e os antígenos livres, os anticorpos marcados, direcionados a um segundo sítio de ligação



do antígeno são adicionados; neste ponto, Ag é "ensanduichado" entre dois anticorpos (Ac e Ac marcado) (**Figura 12 B**) (BONWICK & SMITH, 2004; RICCI *et al.*, 2007) .



**Figura 12** - Formatos de imunoenensaio. Anticorpo (Y) imobilizado no SPCE: A: ensaio competitivo direto com antígeno marcado com enzima; B: ensaio em sanduíche usando detecção de anticorpo marcado com enzima; Antígeno (●) imobilizado no SPCE: C: ensaio competitivo direto usando anticorpo primário marcado com enzima; D: ensaio competitivo indireto usando um anticorpo secundário marcado com enzima [ Adaptado de RICCI e colaboradores (2007); WU e colaboradores(2009)] .

### 3.2.3.5. Enzima-Substrato.

Os métodos de marcação imunoenzimáticos utilizam reações do tipo enzima-substrato para obterem produtos coloridos a partir de cromogênios incolores. As enzimas mais utilizadas são: Peroxidase (Horseradish Peroxidase – HRP); Fosfatase Alcalina (Calf intestine Alkaline Phosphatase); Glucose Oxidase (*Aspergillus niger glucose oxidase*) (URBAN *et al.*, 2006).

A enzima mais utilizada é a Horseradish Peroxidase (HRP) obtida da raiz do rábano *Armoracia rusticana*. Esta molécula possui um peso molecular de 40 kDa e é bastante estável (CAWTHRAW *et al.*, 2002).

Em ensaios imunoenzimáticos, a HRP oxida indiretamente os cromogênicos ao reagir com o peróxido de hidrogênio. Os cromogênicos utilizados são substâncias que na sua forma oxidada são coloridas e estáveis, conferindo cor ao local da reação.

Para determinar a atividade de HRP, ensaio comum é usado para detectar a sua interação com 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). O TMB é uma pequena molécula cromogênica que muda de cor na solução na presença de HRP e peróxido de hidrogênio (Figura 13).

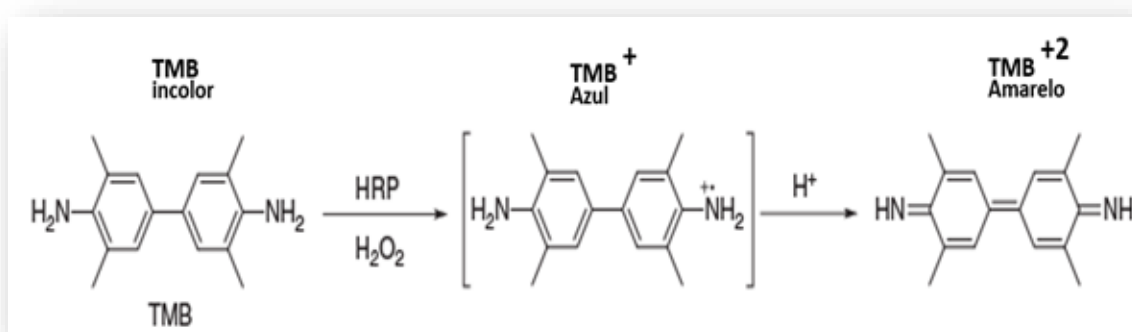


Figura 13 – Ensaio com TMB usado para determinar a atividade HRP

### 3.3. Técnicas Eletroquímicas

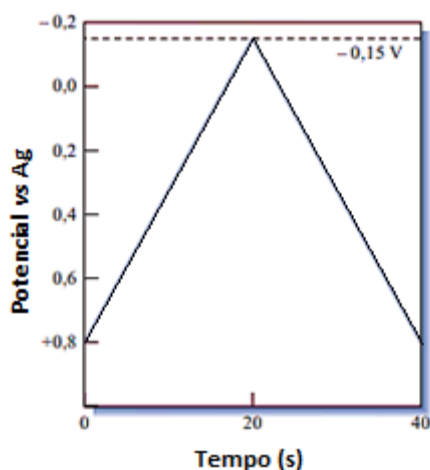
As técnicas eletroanalíticas vem sendo utilizadas a longo das últimas décadas para monitorar com precisão a resposta de dispositivos eletrônicos que quantificam processos biológicos ou bioquímicos. Os métodos são geralmente baseados em processos eletroquímicos que ocorrem na superfície de um eletrodo e a detecção é baseada no monitoramento das mudanças de um sinal elétrico devido a um processo eletroquímico que acontece como resultado da imposição de um potencial ou corrente. A voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica e cronoamperometria (CA) são algumas das técnicas eletroquímica utilizadas com maior frequência para detecção de moléculas alvo (analito) (GRIESHABER *et al.*, 2008).

### 3.3.1. Voltametria cíclica (VC)

A voltametria fundamenta-se na medição da corrente em uma célula eletroquímica sob condições de completa polarização de concentração, na qual a velocidade de oxidação ou redução do analito é limitada pela velocidade de transferência de massa do analito para a superfície do eletrodo (SKOOG *et al.*, 2006). Existem vários tipos de voltametria, que são classificados dependendo do tipo de sinal de excitação empregado (BRETT & BRETT, 1993; SKOOG; HOLLER; WEST, 2006).

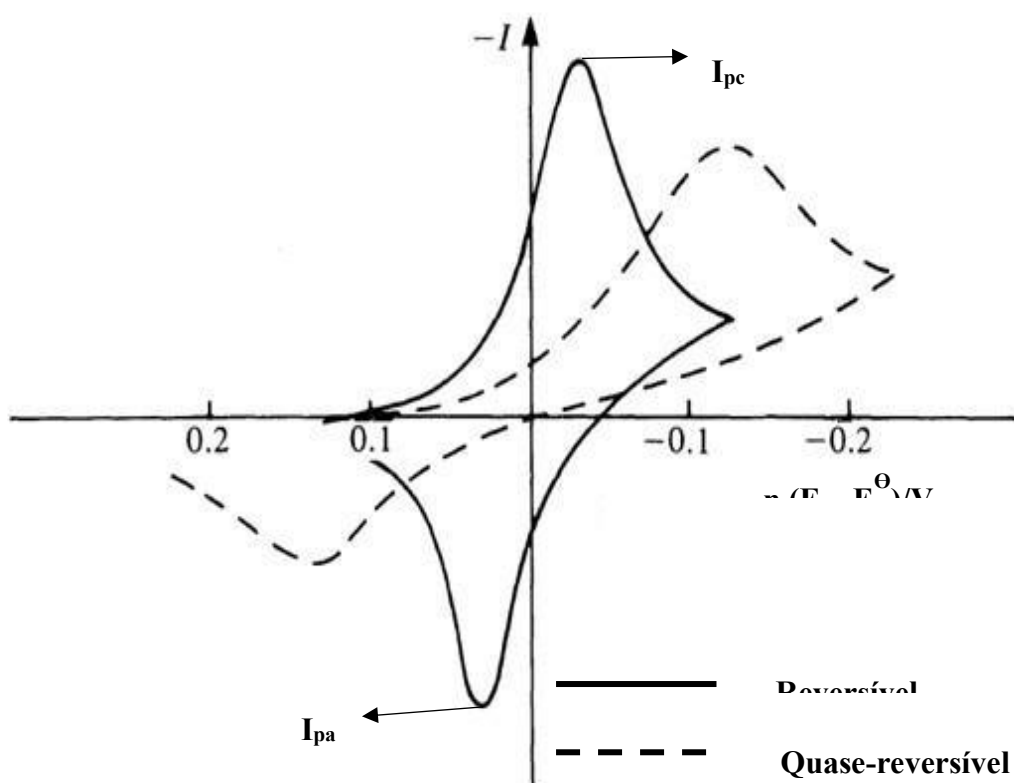
A VC é a técnica mais utilizada para obtenção qualitativa das informações sobre as reações eletroquímicas. O voltamograma é capaz de fornecer informações consideráveis como por exemplo a termodinâmica do processo redox. Esta técnica é muitas das vezes a primeira análise em estudos eletroanalíticos, pois oferece uma rápida obtenção de potenciais redox das espécies eletroativas e a avaliação sobre o processo oxirredução (SKOOG *et al.*, 2006).

Na VC a resposta de corrente é obtida em função de um sinal de excitação na forma triangular (**Figura 14**), onde inicialmente o potencial é varrido linearmente ao longo do tempo, resultando em uma espécie química que sofre oxidação ou redução na superfície do eletrodo gerando uma corrente elétrica. Ao variar a velocidade da varredura do potencial é possível controlar as diferenças na resposta de corrente e medir parâmetros cinéticos importantes (PACHECO *et al.*, 2013).



**Figura 14** – Sinal de excitação triangular em voltametria cíclica [Adaptado de SKOOG e colaboradores (2006)].

Nas reações de oxidação, ocorre a varredura do potencial do eletrodo em direção positiva, acontecendo a oxidação da espécie redox ativa resultado em uma corrente oxidativa (anódica). À medida que o potencial aumenta através do potencial de meia onda ( $E^{(p/2)}$ ) a oxidação se torna termodinamicamente favorável e a corrente atinge o valor máximo ( $I_{pa}$ ), até que o processo se torne limitado pela difusão das espécies para a superfície do eletrodo, resultando em uma cauda caracterizada por uma queda na corrente. Em seguida, ocorre a varredura de potencial na direção oposta até que o potencial inicial seja alcançado. Neste processo ocorre a redução das espécies geradas eletroquimicamente, registrando correntes de redução (catódica), atingindo um valor máximo ( $I_{pc}$ ) (Figura 15) (GRIESHABER *et al.*, 2008; PACHECO *et al.*, 2013; SKOOG *et al.*, 2006)



**Figura 15** - Voltamogramas cíclicos para sistemas reversível e quase-reversível.

As relações extraídas da VC, dependendo do tipo de voltamograma, geram informações qualitativas dos processos eletroquímicos sob diferentes condições, tais

como reversibilidade do sistema, elucidação de mecanismos de reação, detecção de reações acopladas, identificação de espécies presentes em solução, intermediários, e análise semiquantitativa das velocidades de reação ((SKOOG *et al.*, 2006)). As principais características dos diferentes sistemas redox em VC são brevemente descritas na Tabela 1 (COMPTON *et al.*, 2014).

**Tabela 1** - Principais sistemas eletroquímicos em VC.

<b>Sistema</b>	<b>Características</b>	<b>Parâmetros</b>
<b>Reversível</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A velocidade da reação de transferência de carga é elevada e a etapa de transferência de massa controla o processo;</li> <li>- Têm equilíbrio dinâmico na interface do eletrodo;</li> <li>- Segue a equação de Nernst</li> </ul>	$I_p \propto v^{1/2}$ ; $I_{pa}/I_{pc} = 1$ ; $E_p$ independente de $v$ ; $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 59/n$ (mV).
<b>Quase Reversível</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A corrente é controlada pela transferência de massa e carga;</li> <li>- A equação de Nernst é aproximadamente satisfeita.</li> </ul>	$I_p \propto v$ ; $I_{pa}/I_{pc} = 1$ ; se $\alpha = 1$ ; $E_p$ é dependente de $v$ e se desloca negativamente com aumento de $v$ ; $\Delta E_p > 59/n$ (mV)
<b>Irreversível</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A corrente é controlada somente pela transferência de carga, a qual é lenta;</li> <li>- Não segue a equação de Nernst.</li> </ul>	Ausência de pico reverso; $I_p \propto v^{1/2}$ ; $E_p$ depende de $v$ ; $ E_p - E_{p/2}  = (48/n\alpha)$ .

### 3.3.2. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

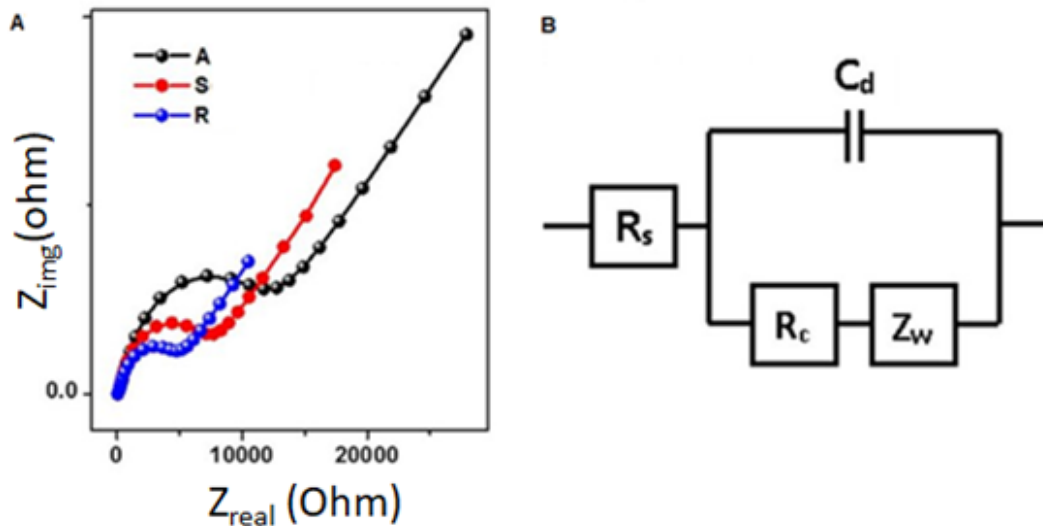
A espectroscopia de impedância eletroquímica é uma função de transferência entre o potencial e a corrente, que possuem uma perturbação geralmente de sinal senoidal (sistema de corrente alternada) (CHENGALROYEN & DABBS, 2013). A aplicação de uma pequena perturbação de potencial ou de corrente sobre o sistema, em diferentes

valores de frequência, onde uma variável é controlada e a diferença entre fase e amplitude da outra é registrada.

A EIS é uma técnica útil que possibilita analisar os processos do eletrodo em relação as contribuições da difusão, da cinética, da dupla camada, de reações homogêneas acopladas etc. Além do que, é a ferramenta que viabiliza o estudo das propriedades intrínsecas de materiais, que são usados como transdutor no desenvolvimento de biossensores (BRETT & BREET, 1993; GRIESHABER et al., 2008). A EIS é uma técnica não destrutiva, pois permite medidas sucessivas sobre um mesmo eletrodo, sem causar danos, além daquele inerente ao próprio sensor, em determinado meio no qual a medida está sendo realizada.

A impedância pode ser entendida de modo geral, como um tipo de resistência, sendo também medida em ohm ( $\Omega$ ). Pois, assim como a resistência ( $R$ ), a impedância ( $Z$ ) é uma medida da capacidade de um circuito de resistir ao fluxo de corrente elétrica, mas não é limitada pelas propriedades simplificadoras de um resistor ideal.

Os resultados das medições podem ser representados em gráficos de Nyquist (**Figura 16 A**). Os gráficos de Nyquist demonstra a relação entre a impedância imaginária vs impedância real, onde a frequência alcança o valor máximo ao final do semicírculo a esquerda, e na outra extremidade o valor mínimo. O circuito de Randles (**Figura 16 B**) é utilizado para fazer as transformações eletroquímicas que acontecem na interface eletrodo-solução, podendo utilizar componentes dos circuitos eletrônicos equivalentes que correspondem aos espectros de impedância experimentais. O circuito de Randles inclui a capacitância da dupla camada ( $C_d$ ), a resistência ôhmica da solução eletrolítica ( $R_s$ ), a resistência de transferência de elétrons ( $R_c$ ) e a impedância de Warburg ( $Z_w$ ) resultante da difusão de íons da solução para a superfície do eletrodo.



**Figura 16** - Representação das medidas de EIS. A: Gráfico de Nyquist, e B: Circuito equivalente de Randles (com controle de transferência de carga e controle cinético) [Adaptado de ROHOM e colaboradores (2018)].

### 3.3.3. Cronoamperometria

CA é uma técnica eletroquímica que determina a variação da resposta da corrente que flui através do eletrodo de trabalho com o tempo sob controle potencioestático (BRETT & BREET, 1993). Através da equação de Cottrell (**Equação 1**), pode-se relacionar o fluxo de corrente com o gradiente de concentração das espécies oxidadas na superfície do eletrodo de trabalho, além de ser possível explorar informações, ao aplicar um degrau de potencial, que permitem determinar o coeficiente de difusão e a área efetiva do eletrodo.

$$I_t = \frac{nFAC_0^o D_0^{\frac{1}{2}}}{\pi^{\frac{1}{2}} t^{\frac{1}{2}}}$$

**Equação 1** - Equação de Cottrell

Onde,

$I_t$  é a corrente a um tempo  $t$ (s);

$n$  é o número de elétrons ( $\text{eq mol}^{-1}$ );

$F$  é a constante de Faraday ( $96,485 \text{ C eq}^{-1}$ );

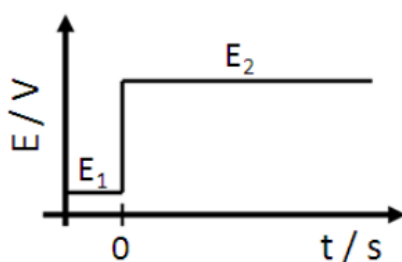
$A$  é a área geométrica do eletrodo ( $\text{cm}^2$ );

$C$  é a concentração das espécies oxidadas ( $\text{mol cm}^{-3}$ ) e

$D$  é o coeficiente de difusão das espécies oxidadas ( $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ).

Nesta técnica, a transferência de massa para o eletrodo de trabalho ocorrerá por difusão e a curva corrente-tempo resultante será uma curva de decaimento exponencial da corrente com o tempo.

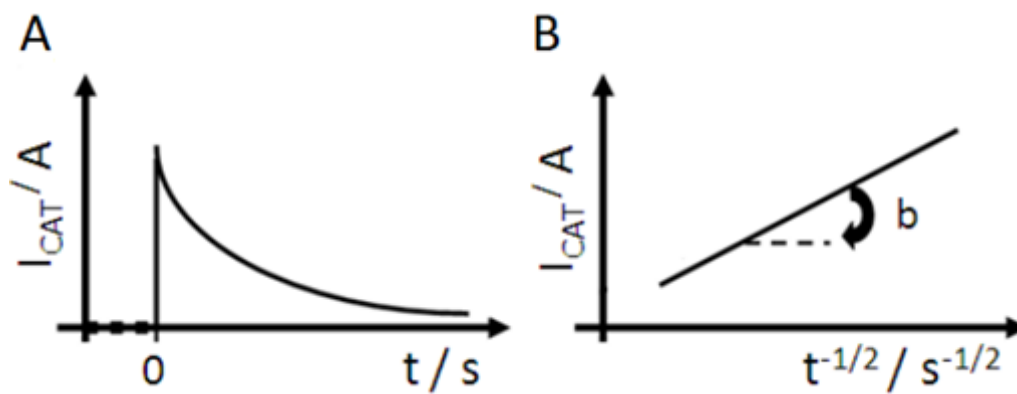
Na CA do tipo potencial-*step* são aplicados dois potenciais, como mostra a **Figura 17**. O primeiro potencial ( $E_1$ ) é aplicado em uma região onde não ocorre reação com as espécies eletroativas, ou seja, onde não ocorrem processos faradaicos e tem como função carregar a dupla camada elétrica na superfície do eletrodo. Já o segundo potencial ( $E_2$ ) aplicado é onde ocorre a redução (controladas por difusão) das espécies eletroativas.



**Figura 17** - Salto de potencial em Cronoamperometria (FERREIRA & AVACA, 2008).

Na **Figura 18 A** é apresentado o comportamento da corrente em relação ao tempo na região da aplicação de cada potencial. Na **Figura 18 B**, observa-se a correlação linear entre  $I$  e  $t^{-1/2}$  (**equação de Cottrel - Equação 1**), representada pelo coeficiente angular da reta que é diretamente proporcional à concentração das espécies oxidadas, afinal, os outros termos da equação de Cottrell ( $n$ ,  $F$ ,  $A$ ,  $D$  e  $\pi$ ) são valores constantes (FERREIRA & AVACA, 2008). Se a corrente observada fornecer uma relação linear com a concentração do analito, o eletrodo modificado pode ser usado como sensor amperométrico (LOWINSOHN & BERTOTTI, 2006).





**Figura 18** - A) Relação da corrente com o tempo. B) Relação da corrente com  $t^{-1/2}$  - Equação de Cottrell (FERREIRA & AVACA, 2008).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados foram de grau analítico,  $K_4[Fe(CN)_6]$  e  $H_2SO_4$  foram obtidos da Merck, Alemanha. Solução de tampão fosfato salino (PBS) 1X (NaCl: 137 mM,  $Na_2HPO_4$ : 10 mM,  $KH_2PO_4$ : 1,8 mM, KCl: 2,7 mM e pH 7.4),  $K_3[Fe(CN)_6]$ ,  $HNO_3$ , KCl, albumina de soro bovino (BSA), N-hidroxissuccinimida (NHS), cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida (EDC) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Estados Unidos de América. Nanoplacas de Grafeno (XG Sciences, Inc.), Solução de substrato *1-Step*<sup>TM</sup> Ultra TMB-ELISA (3,3,5,5-tetramethylbenzidine (TMB)), concentrações não fornecidas pelo fabricante - Thermo Scientific<sup>TM</sup> (Waltham, MA, USA).

Para o preparado das soluções aquosas foi usada água purificada, obtida de um sistema de ultra-purificação Milli-Q Plus (Millipore). Balança analítica Shimadzu, modelo AUW220D (Filipinas), para pesar os reagentes sólidos.

### 4.2. Material Biológico

A proteína N SARS-CoV-2 foi isolada pelo Laboratório de Imunologia e Doenças Infecciosas/PPGIBA da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e a concentração utilizada em todos os testes de imunossensores foi de  $382 \mu g mL^{-1}$ . A proteína N foi obtida pelo processo de preparação e síntese da expressão recombinante (resíduos 1–419, GenBank QHD43423.2) expresso em *Escherichia coli* e purificado por cromatografia de afinidade e exclusão de tamanho (LALWANI *et al.*, 2021) .

As amostras do soro humano contendo IgG e IgA SARS-CoV-2 da proteína N para realização desse estudo foram cedidas pelo Laboratório de Imunologia e Doenças Infecciosas/PPGIBA- UFAM. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CAAE: 34906920.4.0000.5020) de acordo com a legislação brasileira e a Declaração de Helsinki.

Anticorpos secundários de cabra anti-IgG humano (H + L) (Anti-IgG) e anti-IgA humano (H + L) (Anti-IgA) marcados com a enzima Peroxidase de Rábano (HRP)

(Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) foram diluídos na fração de 1:1000 e 1:300, respectivamente.

### **4.3. Equipamentos utilizados em estudos de caracterização**

#### **4.3.1. Caracterização eletroquímica**

Os estudos eletroquímicos foram realizados usando o potenciostato PGSTAT204, Methrohm Autolab (Países Baixos), equipado com módulo de impedância eletroquímica e controlado por software Nova, versão 2.1.4. As análises foram realizadas em temperatura controlada ( $22 \pm 1$  °C).

#### **4.3.2. Caracterização química**

As análises termogravimétricas foram realizadas num analisador térmico DTG-60H made by the Shimadzu Company, Kyoto, Japão no Laboratório de pesquisa e ensaios de combustíveis-LAPEC/UFAM. Os parâmetros instrumentais foram: cadinho de alumínio, atmosfera de nitrogênio ( $100\text{mL min}^{-1}$ ), razão de aquecimento de  $5\text{K min}^{-1}$ ; intervalo de temperatura de 25 a 800 °C. As massas utilizadas foram 5,59828 mg e 7,31736 mg de grafeno e grafeno carboxilado, respectivamente.

A espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi realizada no Instituto Federal do Amazonas-IFAM. As análises foram realizadas num espectrômetro Agilent, modelo Cary 630 (E.U.A), acoplado com módulo de refletância total atenuada (ATR), operando no modo de transmissão, na faixa de varredura de 3000 a  $500\text{ cm}^{-1}$ , sendo definido como número de varredura 150 e resolução  $4\text{ cm}^{-1}$ .

#### **4.3.3. Caracterização morfológica**

Estudos morfológicos foram feitos no Instituto de Pesquisa do Amazonas-INPA, mediante a microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Tescan, modelo Vega3 (França)), acoplada a um sistema de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (do inglês Energy-dispersive X-ray spectroscopy, EDS) (INCA energy, Reino Unido).

Primeiramente, as amostras foram colocadas em suportes de alumínio com o auxílio de fita adesiva dupla face de carbono e levadas a um Sputtercoater (Balzers, modelo SCD 050, Suíça), onde foram recobertas com uma fina camada de ouro. Em seguida, as imagens foram coletadas usando tensões de feixe de 15 kV. A análise elementar da superfície através da EDS ocorreu sob aplicação de uma tensão do feixe de 30 kV a 5 mm de distância da amostra.

#### **4.4. Eletrodos Impressos de Carbono “Screen Printed Carbon Electrodes” (SPCE)**

Para a fabricação dos biossensores foram utilizados eletrodos comerciais *Metrohm DropSens Screen-Printed Carbon Electrodes* (ref. 110). O substrato de cerâmica com dimensões de 3,4 cm x 1,0 cm x 0,05 cm. Estes eletrodos possuem pseudo eletrodo de referência prata, eletrodo de trabalho (4 mm de diâmetro) e contra-eletrodo de carbono (METROHM, 2021).

A realização dos procedimentos de ativação dos eletrodos baseou-se em registros bibliográficos (CUI, G. *et al.*, 2001; HADDAOUI & RAOUAFI, 2015; HAYAT *et al.*, 2011; MAT ZAID *et al.*, 2017; NAWAZ *et al.*, 2018; OCAÑA *et al.*, 2015; RANA *et al.*, 2019; STANKOVIĆ *et al.*, 2020; WEI *et al.*, 2007) e nas experiências experimentais do grupo de pesquisa do Laboratório de Bioeletrônica e Eletroanalítica do Departamento de Química da Universidade Federal do Amazonas e são descritos:

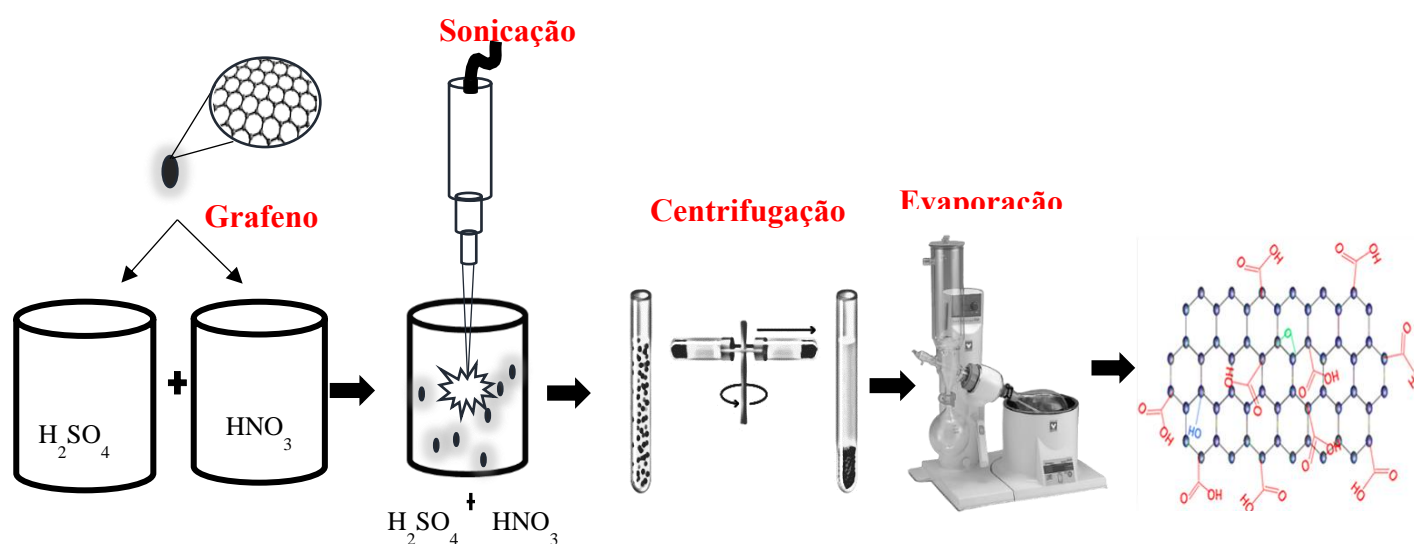
O SPCE foi ativado através de VC, utilizando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 mol  $\text{L}^{-1}$ , em diferentes faixas de potencial entre -1,5 e 1,5 V, por 5 ciclos e velocidade de varredura de 100  $\text{mV s}^{-1}$ . Em seguida, os eletrodos foram lavados com água milli-Q e secos a temperatura ambiente.

#### **4.5. Grafeno Carboxilado (GC)**

Primeiramente, preparamos o GC através de um método de carboxilação em meio ácido (**Figura 19**). Para isso, 7 mg de grafeno foram adicionados a 30 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{conc})}$ , e 3 mg foram adicionados a 10 mL de  $\text{HNO}_{3(\text{conc})}$ . Posteriormente, ambas as soluções foram misturadas e deixada à temperatura ambiente por 15 minutos. Após

repouso, a mistura foi sonicada por 1 h. Em seguida, foi feita uma centrifugação por 1 h a 12 000 rpm, a fim de separar o material oxidado do não oxidado (sobrenadante). Foram realizadas sucessivas lavagens do GC com água Milli-Q seguidas de centrifugação, com a finalidade de neutralizar (pH 7) a dispersão resultante, e, então, descartadas as partículas sobrenadantes, para se obter uma solução com maior concentração de GC (CHHABRA, Varun A *et al.*, 2012; CHHABRA, Varun *et al.*, 2015; FATHALI *et al.*, 2014; HAYAT *et al.*, 2011; JAISWAL *et al.*, 2018; STANKOVIĆ *et al.*, 2020; STANKOVICH *et al.*, 2006). O GC sintetizado foi então seco, usando um sistema de evaporação rotativa.

A dispersão de GC ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foi realizada em água Milli-Q através de banho ultrassônico por 30 s. Essa dispersão foi utilizada posteriormente na modificação do SPCE.



**Figura 19** - Síntese do Grafeno Carboxilado

#### 4.6. Imunossensor para Detecção de IgG e IgA SARS-CoV-2 da Proteína N

Para o desenvolvimento do imunossensor, os SPCE foram submetidos a ativação eletroquímica em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ). Após a ativação, foram realizadas 3 deposições de  $5\mu\text{L}$  de grafeno carboxilado ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) no eletrodo de trabalho, cada

deposição foi seca em estufa a temperatura de 60 °C por 25 min, após a última deposição, os eletrodos foram lavados com água milli-Q e secos a temperatura ambiente.

Após a funcionalização do eletrodo com grupo carboxila, foram adicionados 3,5 µL de EDC (200 mmol L<sup>-1</sup>) e 3,5 µL de NHS (100 mmol L<sup>-1</sup>) e incubado por 1 hora a temperatura ambiente e câmara úmida para formação do éster-sulfo-NHS (SPCE/GC/EDC-NHS) (NAKAJIMA & IKADA, 1995; NGUNJIRI et al., 2013; POUYANI & PRESTWICH, 1994; RODRIGUES, 2011). Para imobilização da proteína N na superfície do eletrodo ativada por EDC-NHS, 7 µL da proteína N (382 µg mL<sup>-1</sup>) foram depositados diretamente e a incubação ocorreu em câmara úmida à 4 °C (geladeira) durante 180 min. Posteriormente, com a finalidade de bloquear o excesso de grupos ativos e sítios de ligação não específicos na superfície do SPCE, foram adicionados 7 µL de BSA 1 % dissolvidos em tampão de PBS 1X por 30 minutos. Após cada etapa de modificação, os eletrodos foram lavados com água milli-Q e secos a temperatura ambiente.

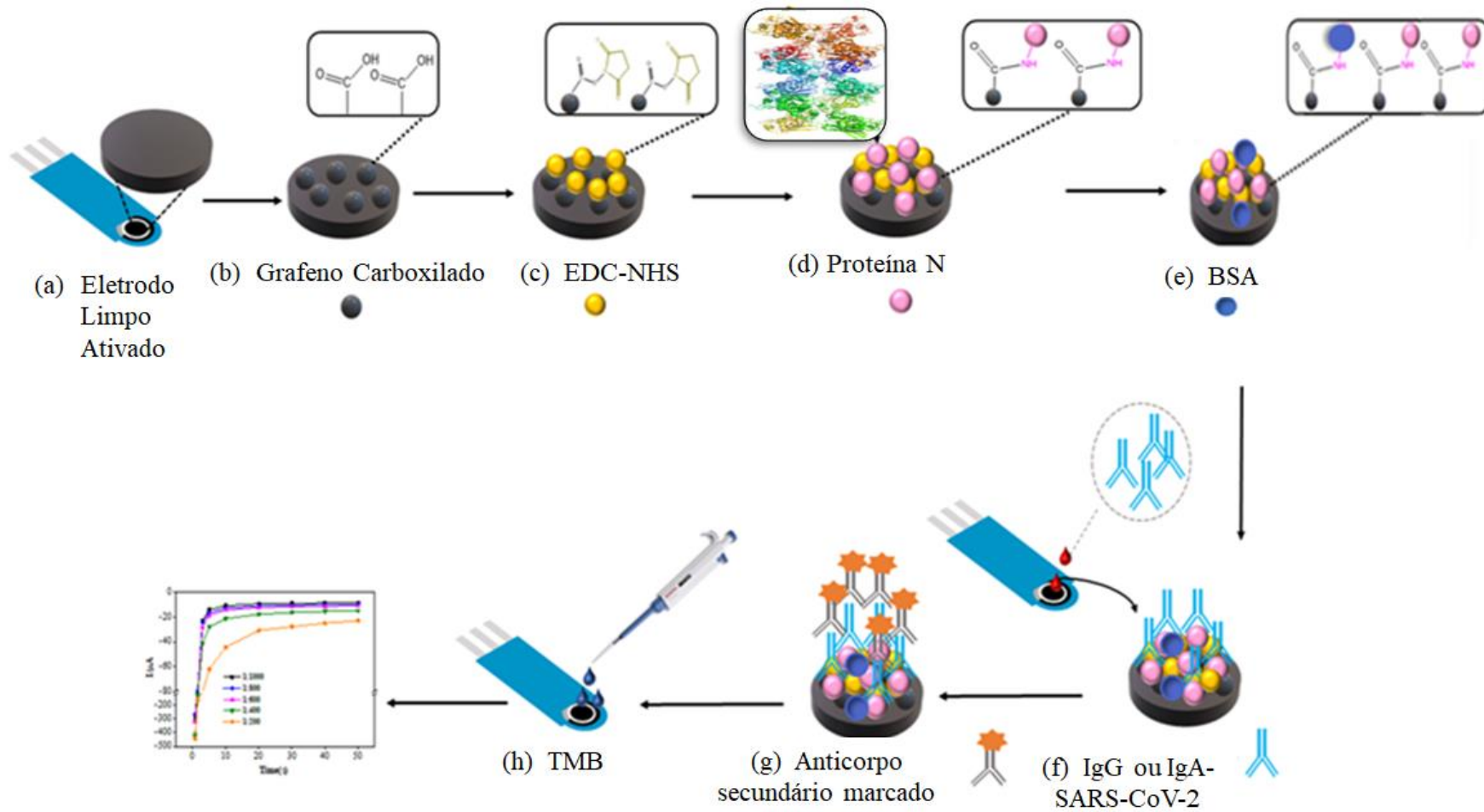
As etapas de desenvolvimento do imunossensor foram caracterizadas mediante VC e EIS. A VC realizada seguiu os seguintes parâmetros: faixa de potencial aplicado: -0,4 a 0,6 V com velocidade de varredura 50 mV s<sup>-1</sup>. Experimentos de EIS foram realizados a um potencial aplicado de 0,12 V (*vs* pseudo eletrodo de referência Ag), obtido a partir do potencial redox de equilíbrio de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-/3-</sup>, com uma faixa de frequência de 10000 Hz a 0,1 Hz, uma amplitude de 10 mV e uma taxa de amostragem de 10 pontos por década. (JO *et al.*, 2017; JONES *et al.*, 1997; RAUF *et al.*, 2018; RICCARDI *et al.*, 2002).

A detecção analítica foi realizada com amostras de soro humano, positivo e negativo para IgG e IgA-SARS-CoV-2 da proteína N e branco (PBS 1X). O soro contendo IgG ou IgA-SARS-CoV-2 foram diluídos na proporção de 1:200 v/v em PBS 1X e 7 µL foram depositados no eletrodo e incubados durante 30 minutos. Após a incubação, o eletrodo foi lavado suavemente com PBS 1X e água Milli-Q. Por último, 7 µL de anti-IgG-HRP (1:1000 v/v) ou anti-IgA-HRP (1:300 v/v) foram depositados e encubados por 20 min a temperatura ambiente (BALDRICH et al., 2009; EZENARRO et al., 2020; FANJUL-BOLADO et al., 2005). Para a detecção através da reação enzimática, foram adicionados 100 uL de TMB e mantidos no escuro por 1 min. A técnica CA foi escolhida para monitorar a corrente associada ao processo de redução de TMB oxidado

junto a enzima HRP, na qual seguiu o processo de redução aplicando um potencial constante de  $-0,19$  V por 50 s (BISCAY et al., 2014; PÉREZ-FERNÁNDEZ et al., 2020).

Para ensaios do soro negativo e do branco foram realizados os mesmos procedimentos adotados na metodologia do soro positivo para IgG e IgA-SARS-CoV-2.

O **Figura 20** representa todas as etapas para a fabricação do imunossensor para detecção de IgG e IgA-SARS-CoV-2 da Proteína N.



**Figura 20** - Representação das etapas de fabricação do imunossensor e detecção dos anticorpos IgG e IgA específicos contra a proteína N de SARS-CoV-2.



#### 4.7. Ensaaios ELISA

A proposta deste projeto foi desenvolver um imunossensor capaz de detectar a presença de anticorpos IgG e IgA seguindo as mesmas etapas de imobilização já estabelecidas em ensaios ELISA pelo grupo de pesquisa Laboratório de Imunologia e Doenças Infecciosas/PPGIBA- UFAM coordenada pelo Prof. Dr. Pritesh Lalwani.

LALWANI et *al.* (2021) reportaram a detecção do anticorpo IgG-SARS-CoV-2 através do método ELISA sanduíche usando a enzima HRP. Esse método consiste nas seguintes etapas:

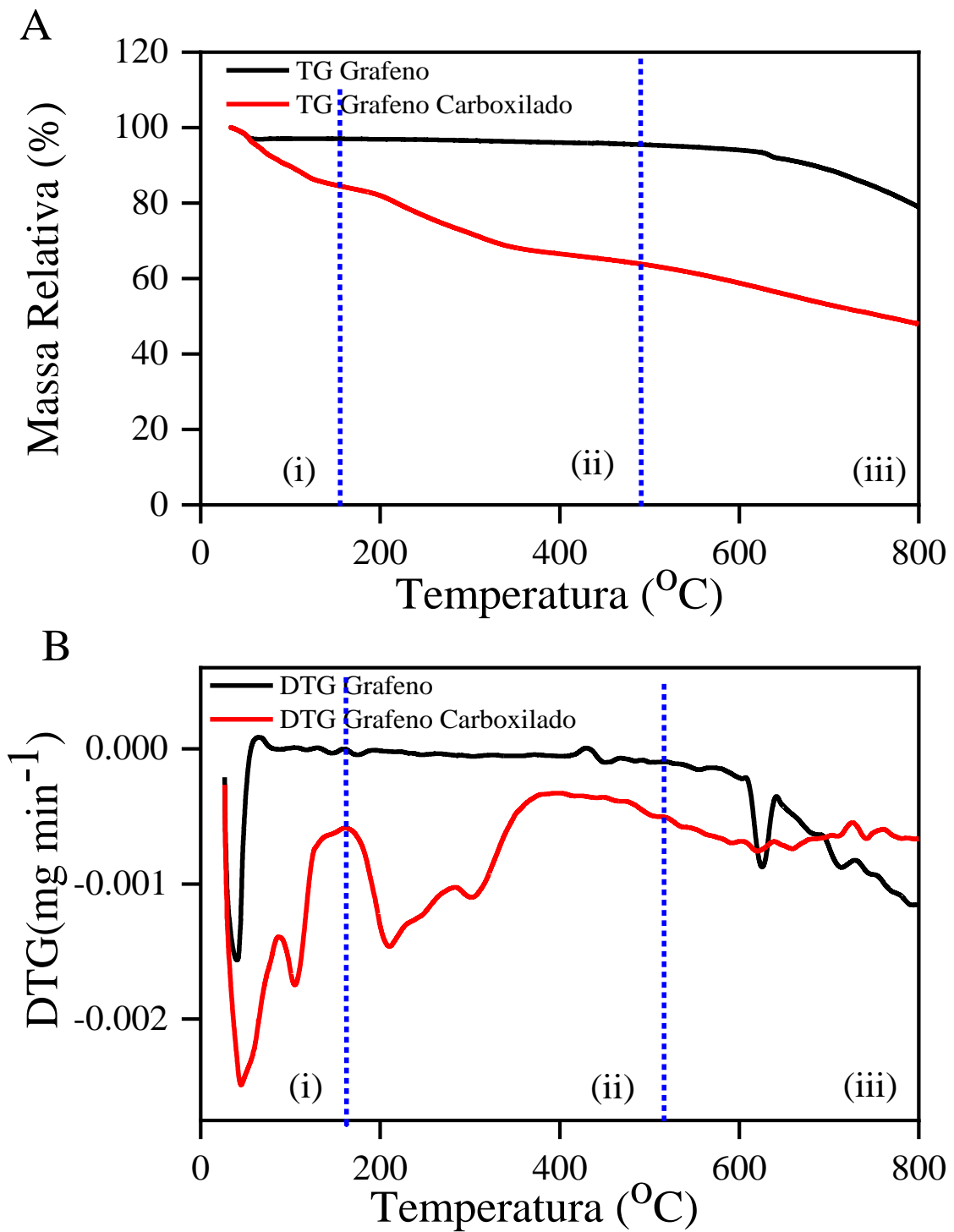
Inicialmente, as placas de ELISA de 96 poços (Immunoplate, SPL) foram revestidas com proteína N de SARS-CoV-2 (100 ng por poço) a 4 °C durante a noite, e as proteínas não ligadas foram removidas por lavagem com PBS 1X, seguida da etapa de bloqueio com 10% de leite em pó desnatado diluídos em PBS 1X. As amostras de soro humano (diluição 1:100) foram incubadas à temperatura ambiente por 1 h, seguidas de lavagem cinco vezes com PBS mais Tween 0,5%. O anti-IgG-HRP (diluição 1:10.000, KPL) foram adicionados a cada poço, incubado por 1 h à temperatura ambiente e lavado cinco vezes com PBS mais Tween 0,5%. Em seguida, o substrato TMB foi adicionado e a reação foi interrompida após 5 min com 2 mol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A absorbância foi medida a 450 nm.

## 5. RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1. Grafeno Carboxilado (GC)

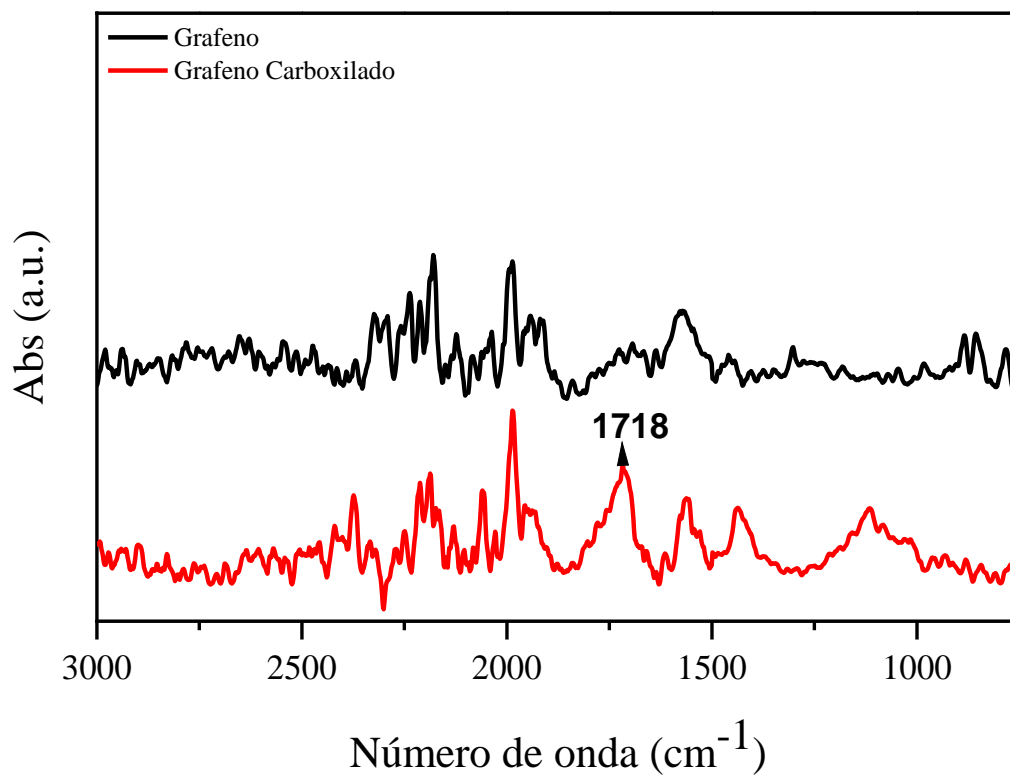
#### 5.1.1. Caracterização química

O material obtido após a síntese foi caracterizado através da análise termogravimétrica. A **Figura 21** mostra as curvas TGA e DTG para o grafeno e o GC que foram realizados em atmosfera de nitrogênio a uma taxa de aquecimento de  $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Claramente, existem três processos de perda de peso para o grafeno funcionalizado. (i) O grafeno apresenta uma ligeira perda de massa inicial a abaixo de  $180^{\circ}\text{C}$  que poderia ser atribuída à evaporação de moléculas de água adsorvidas. (ii) Com o aumento temperatura, uma queda relevante de massa dentro da faixa de temperatura de  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $500\text{ }^{\circ}\text{C}$  foi observada na curva TGA para GC, que pode ser conferido à remoção dos grupos funcionais de oxigênio. Por fim, (iii) o aumento adicional da temperatura leva a perdas de massa para ambos materiais, que são atribuídos à pirólise do carbono (CHHABRA, Varun A *et al.*, 2012; EIGLER *et al.*, 2012; KUILA *et al.*, 2012; NAEBE *et al.*, 2014).



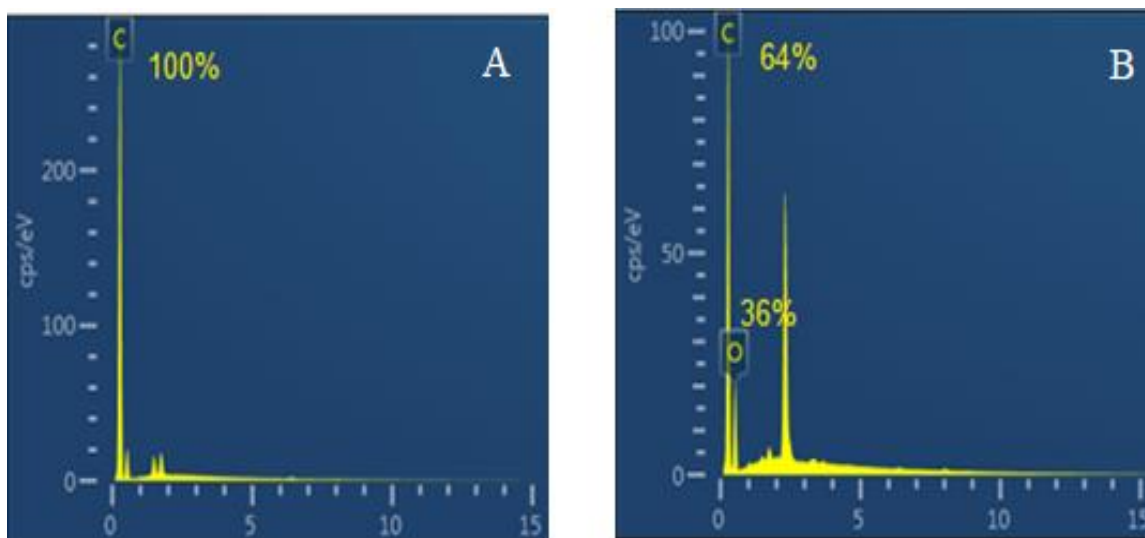
**Figura 21** – (A) Análise termogravimétrica e (B) Termogravimetria Derivada do grafeno e grafeno carboxilado.

A **Figura 22** mostra os espectros coletados pelo ATR-FTIR, onde o GC registrou uma banda em  $1718\text{ cm}^{-1}$ ,  $1437\text{ cm}^{-1}$  e  $1120\text{ cm}^{-1}$ , a banda característica em  $1718\text{ cm}^{-1}$  é atribuído a vibração de estiramento da carbonila C=O de grupos carboxílicos (NAEBE *et al.*, 2014; VASILE *et al.*, 2019).



**Figura 22** – Espectro de FTIR-ATR do grafeno e grafeno carboxilado.

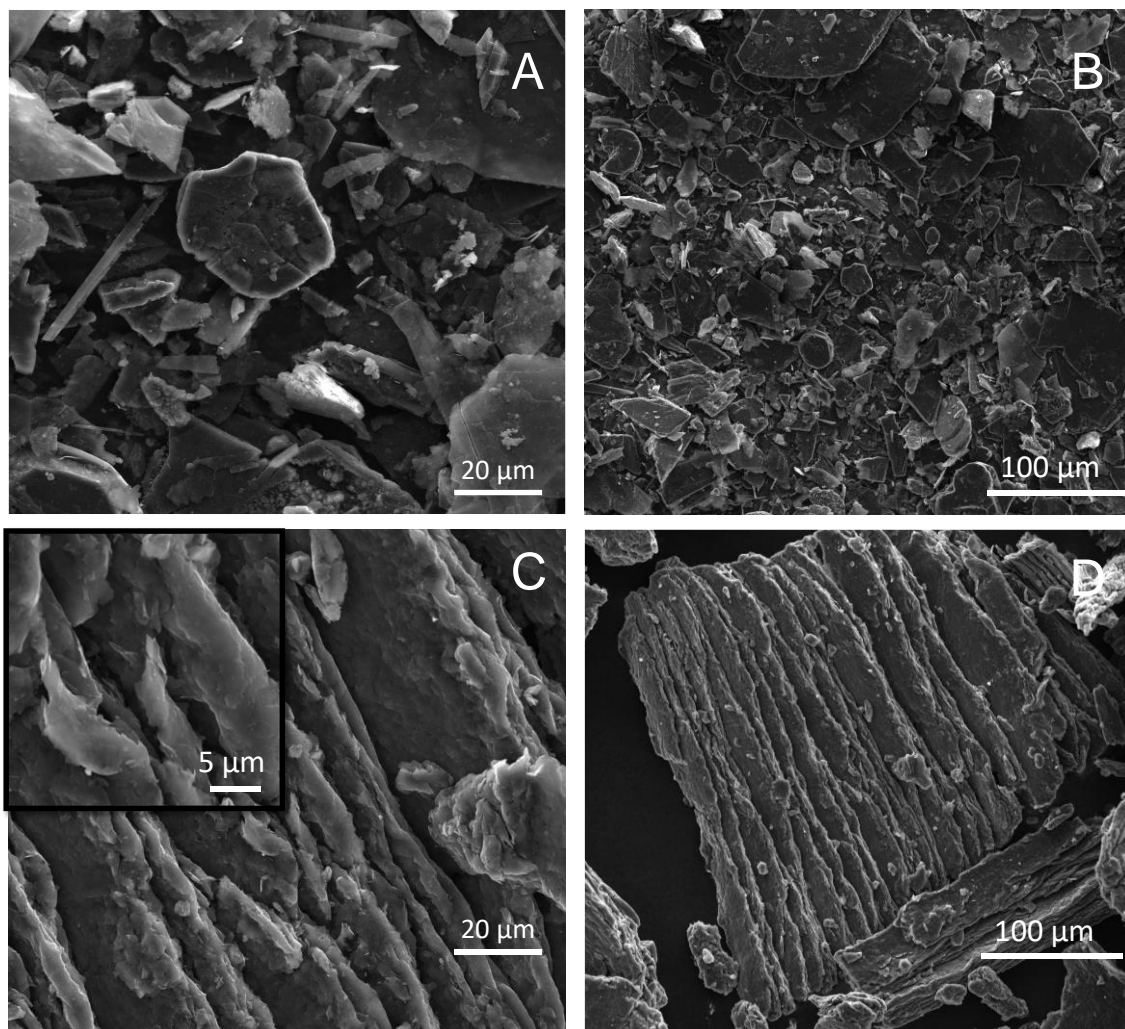
A **Figura 23** mostra o espectro do MEV-EDS. A presença do elemento C (100%) no espectro do grafeno, indicando alta pureza desta amostra (TAVAKOLI *et al.*, 2015). A composição elementar do GC (**Figura 23 B**) demonstrou que os principais elementos constituintes do material sintetizado são o C e O, 64% e 36%, respectivamente. (FAROOQ *et al.*, 2022; PARK, Kyeong Won & JUNG, 2012).



**Figura 23** – Espectro de EDS para grafeno (A) e Grafeno Carboxilado (B).

### 5.1.2. Caracterização morfológica

Imagens de MEV para o grafeno e GC são mostradas na **Figura 24**. As imagens da **Figura 24 A e B** revelam que o grafeno possui uma superfície levemente rugosa e estrutura de folhas de tamanho não uniforme e espaçadas. Ao contrário, o GC (**Figura 24 C e D**) apresenta morfologia uniforme em relação ao grafeno. Verifica-se que a superfície do GC apresenta uma estrutura com formato de folhas, com aspecto enrugado e amassado bastante evidente (GU, Yajun *et al.*, 2015; PARK, Kyeong Won & JUNG, 2012; SHAO *et al.*, 2019). Os resultados mostraram que o GC foi modificado com sucesso por reação em meio ácido.



**Figura 24** – Imagens de MEV para Grafeno (A-B) e Grafeno Carboxilado (C-D).

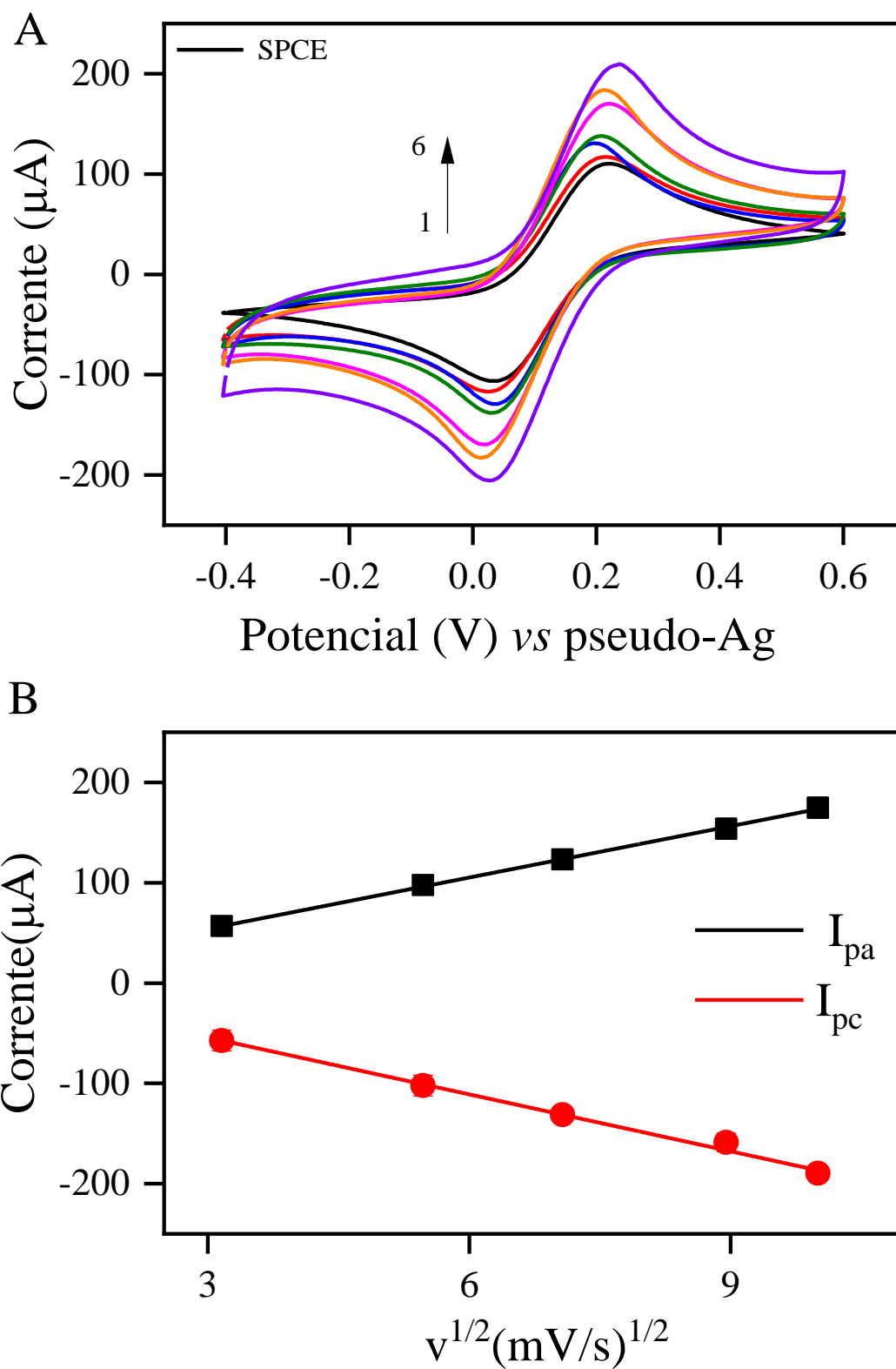
### 5.1.3. Caracterização eletroquímica do GC

Foi realizada a ativação do SPCE antes da deposição do GC na superfície do eletrodo de trabalho. Este pré-tratamento eletroquímico consiste na aplicação de faixas de potenciais variando de -1,5 a 1 V em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com duração de 5 ciclos (CUI, G. *et al.*, 2001; HADDAOUI & RAOUAFI, 2015; HAYAT *et al.*, 2011; MAT ZAID *et al.*, 2017; NAWAZ *et al.*, 2018; OCAÑA *et al.*, 2015; RANA *et al.*, 2019; STANKOVIĆ *et al.*, 2020; WEI *et al.*, 2007). A ativação tem a finalidade de remover possíveis compostos orgânicos constituintes ou contaminantes da superfície do eletrodo, além de aumentar a rugosidade da superfície e, conseqüentemente, melhorar o

desempenho nas respostas voltamétricas e na reprodutibilidade eletroquímica entre diferentes eletrodos.

Eletrodos quimicamente modificados mostraram vantagens proeminentes sobre eletrodos limpos. É viável modificar eletrodos disponíveis comercialmente para fornecer uma distribuição homogênea a superfície do eletrodo, aumento do sinal eletroquímico e a superfície imobilizada. Para modificação dos SPCEs com GC foram testadas 6 deposições, cada uma com volume de 5 $\mu$ L da dispersão de GC (2 mg mL<sup>-1</sup>). O comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados com as camadas de GC foi investigado pela técnica de VC e EIS.

Conforme observado na **Figura 25**, o sinal eletroquímico aumenta a cada camada adicionada de GC. Com o aumento da corrente, observa-se que a presença de GC melhora significativamente as correntes de pico ( $I_{pa}$  e  $I_{pc}$ ) devido às propriedades desse material, especialmente sua alta condutividade elétrica e área de superfície eletroativa (BOONKAEW *et al.*, 2019; KARUWAN *et al.*, 2013; WANG, Li *et al.*, 2014).



**Figura 25** - (A) Voltamogramas cíclicos da deposição de camadas de grafeno carboxilado em 5mmol L-1  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  + 0,1 mol L-1 KCl. (B) Relação linear entre a corrente de pico do anódico e catódico e a raiz quadrada da velocidade de varredura (10 - 100  $\text{mV s}^{-1}$ ) para SPCE modificado com deposições de 3 GC.



No caso do SPCE nu, os picos redox exibiram aproximadamente 186 mV de separação. Após a aplicação das camadas de GC, os valores das correntes de pico do GC/SPCE aumentaram cerca de 6-95%. Além disso, os potenciais de pico anódico e catódico se aproximaram, apresentando uma diminuição na  $\Delta E_p$  entre de 160 mV e 200 mV, o que sugere que o desempenho eletroquímico do SPCE foi melhorado, pois, houve aumento na transferência de elétrons entre a sonda eletroquímica e a superfície do eletrodo modificado.

Ao modificar o eletrodo com GC, houve um aumento da corrente capacitiva diretamente relacionada ao aumento da área eletroativa e do fator de rugosidade. A corrente capacitiva é gerada devido à presença de um acúmulo de elétrons na superfície do eletrodo, aumentando a carga da dupla camada elétrica. O grafeno é um dos nanomateriais de carbono mais utilizados devido à sua alta condutividade elétrica e grande área superficial em comparação com nanotubos de carbono e grafite. Embora o grafeno possa ser usado para melhorar a condutividade elétrica de materiais, ele também causa correntes capacitivas muito altas. Para minimizar esses efeitos, um potencial deve ser fixado durante as medições eletroquímicas, e a contribuição da corrente capacitiva é minimizada (FANJUL-BOLADO *et al.*, 2007; HATALA *et al.*, 2021; KANSO *et al.*, 2018; PASAKON *et al.*, 2019).

O experimento usando diferentes taxas de varredura foi realizado com o objetivo de avaliar a reversibilidade e a natureza do transporte envolvido no eletrodo tipo SPCE modificado com GC. A VC permitiu caracterizar a superfície do SPCE modificado com três camadas de GC. O comportamento eletroquímico do eletrodo evidenciou um bom desempenho, e baixo aumento de  $\Delta E$  ao aumentar a velocidade de varredura, permitindo concluir que a reação é quase reversível. Como pode ser visto na **Figura 25-B**, com o aumento da taxa de varredura, as correntes de pico do anódico ( $I_{pa}$ ) aumentam linearmente de acordo com a seguinte equação:

$$I_{pa} (\mu A) = 17,0736 (v)^{1/2} (V/s)^{1/2} + 2,7400 (R^2 = 0,999) \quad \text{Equação 2}$$

Similarmente, com o aumento da taxa de varredura, as correntes de pico do catódico ( $I_{pc}$ ) decrescem linearmente de acordo com a seguinte equação:

$$I_{pc} (\mu A) = -18,9274 (v)^{1/2} (V/s)^{1/2} + 2,6001 (R^2 = 0,993) \quad \text{Equação 3}$$

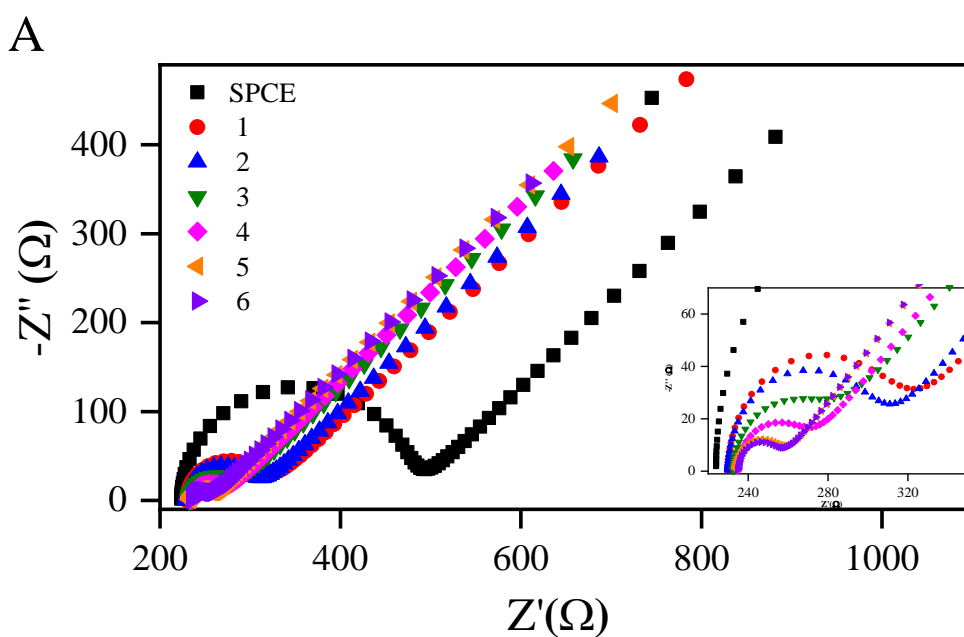
Para posteriores caracterizações eletroquímicas, foram depositadas três camadas de GC, o sinal eletroquímico nesta condição obteve um aumento cerca de 28% na  $I_{pa}$ , além da diminuição na  $\Delta E$  (10%) em comparação ao eletrodo não modificado. Além disso, essa quantidade foi escolhida devido o tempo de análise e visivelmente foi a quantidade suficiente para o preenchimento total do eletrodo (**Figura 26**)



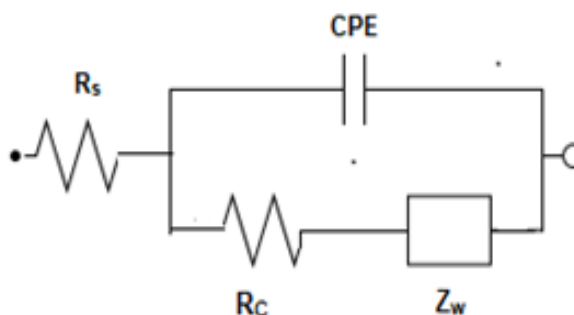
**Figura 26** - SPCEs limpo e modificados com 1,2,3 camadas de grafeno carboxilado.

A análise EIS (**Figura 27**) mostrou as mudanças na resistência de transferência de carga representada pelo gráfico de Nyquist. Os diagramas de Nyquist podem ser simulados com um circuito equivalente (**Figura 27 B**), onde  $R_s$  é a resistência da solução eletrolítica, CPE é o elemento de fase constante,  $R_c$  é a resistência de transferência de elétrons e  $Z_w$  é o elemento de Warburg. A porção do semicírculo de altas para médias frequências refere-se ao processo de cinética da transferência de carga, enquanto a linha reta em baixas frequências surge da barreira difusional em relação à transferência de massa do par redox (AHAMMAD, 2012). Os espectros EIS mostram

diferenças claras no sinal após a integração de cada camada na superfície SPCE começando com o SPCE nu ( $R_c = 240 \Omega$ ), que exibiu um semicírculo com um pequeno diâmetro em altas frequências representativas de alguma resistência à transferência de elétrons. Após a modificação com GC, houve uma diminuição gradual da resistência à transferência de elétrons, mostrada na **Tabela 2**, confirmada pela diminuição do semicírculo indicando um processo de difusão. Isso confirma o aumento da condutividade ao ser adicionada camadas de GC, melhorando a transferência de elétrons entre a solução e a superfície do eletrodo modificado.



B



**Figura 27** - EIS para deposição de camadas de grafeno carboxilado em  $5\text{mmol L}^{-1}$   $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-} + 0,1\text{ mol L}^{-1}$  KCl. (B) Circuito equivalente de Randles.  $R_s$ , resistência da solução; CPE, elemento de fase

constante;  $R_c$ , resistência à transferência de elétrons;  $ZW$ , elemento de Warburg devido à difusão do par redox ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ) para a interface da interface bulk do eletrólito.

**Tabela 2-** Valores de  $R_c$  calculados para as diferentes deposições usando o circuito equivalente de Randles

<i>Número de deposição</i>	<i><math>R_c</math> (<math>\Omega</math>)</i>
<b>SPCE Limpo</b>	240
1	81
2	71
3	44
4	33
5	22
6	19

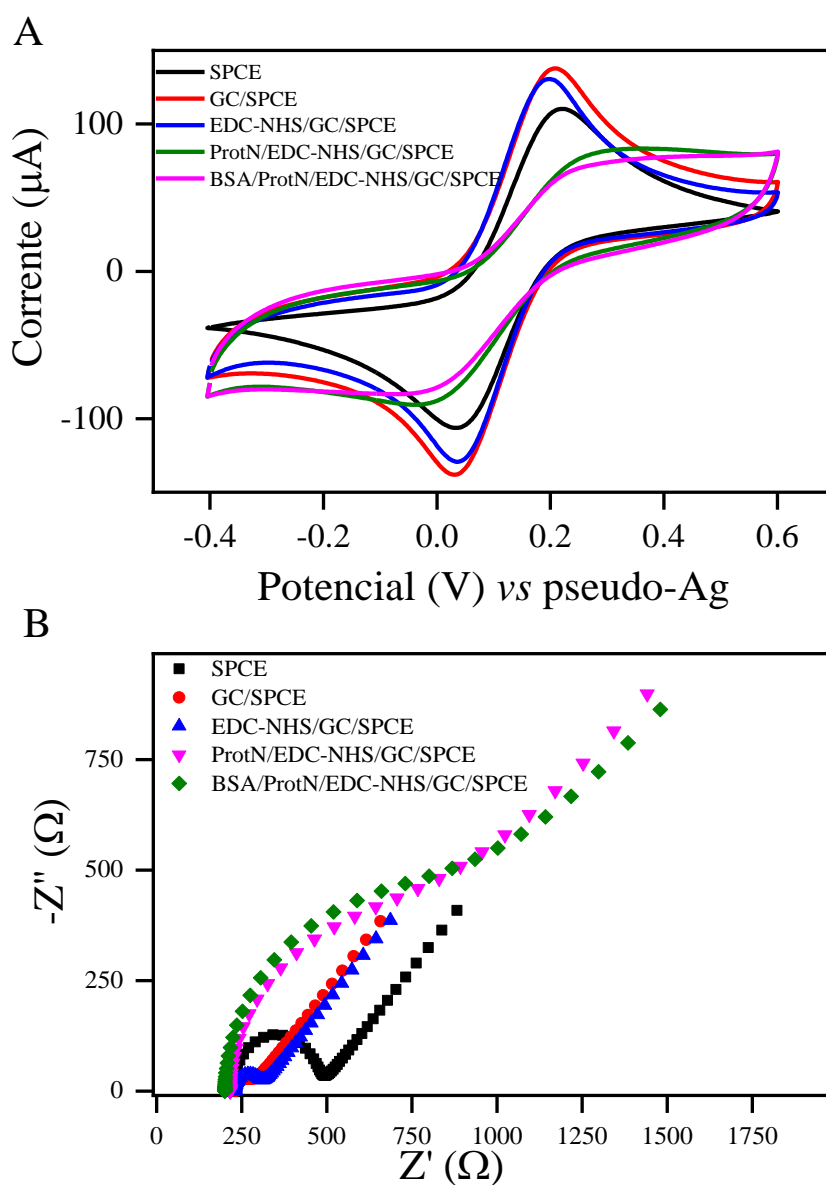
## 5.2. Caracterização eletroquímica das etapas do imunossensor

### 5.2.1. Etapas da construção do imunossensores

No eletrodo SPCE modificado com GC (GC/SPCE) foram adicionados os agentes de acoplamento EDC e NHS, seguido da imobilização do Antígeno (proteína N) e, por fim, a deposição do bloqueador de sítios ativos, BSA.

Com a otimização do tempo de imobilização da proteína N, as diferentes etapas envolvidas na preparação do imunossensor foram eletroquimicamente caracterizadas. (GARCIA-HERNANDEZ *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2019; ROCHA *et al.*, 2016). A VC e EIS são técnicas bem estabelecida para caracterização dos processos que ocorrem na interface eletrodo-solução, portanto, foram as técnicas utilizadas para monitorar as modificações na superfície do SPCE na construção do imunossensor (THUNKHAMRAK *et al.*, 2020), como mostra a **Figura 28**.

A **Figura 28-A** e **Tabela 3** mostram os dados da VC para as etapas de fabricação do imunossensor. A voltametria cíclica obtida para o SPCE limpo apresentou o perfil típico na presença do par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , com picos de corrente em 110 mV (pico anódico) e 106 mV (pico catódico), como esperado para um modelo de transferência de elétrons quase reversível ( $I_{pa}/I_{pc} \neq 1,0$  e  $\Delta E_p \neq 59$  mV) sendo controlada pelo transporte de difusão.

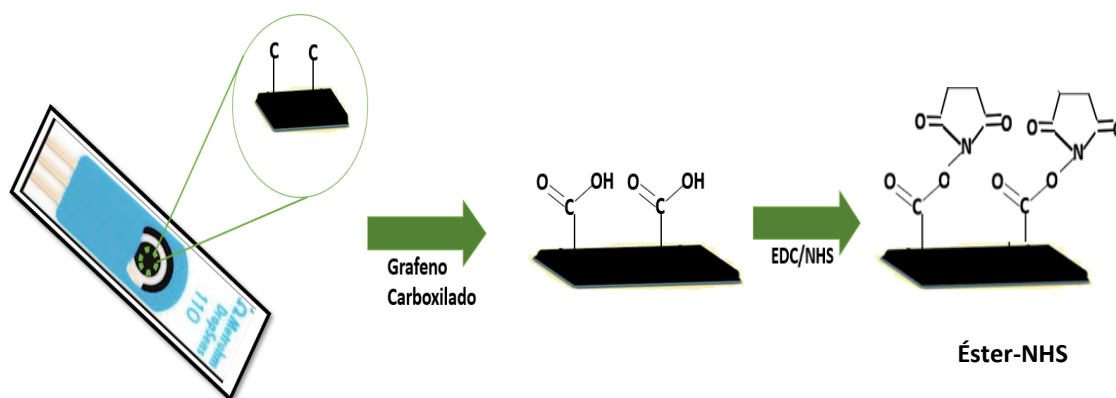


**Figura 28** - Voltametrias cíclicas e gráficos de Nyquist das etapas de fabricação do imunossensor (inserido o circuito equivalente utilizado).

**Tabela 3-** Valores de  $I_{pa}$ ,  $I_{pc}$  e  $\Delta E$  para as etapas de fabricação do imunossensor.

<i>Etapa</i>	$I_{pa}$ ( $\mu A$ )	$I_{pc}$ ( $\mu A$ )	$\Delta E$ (mV)
SPCE limpo	96	-93	186
GC	123	-131	178
EDC-NHS	118	-123	195
Proteína N	80	-82	330
BSA	73	-79	332

Após modificar a superfície do SPCE/GC com os agentes de acoplamento EDC/NHS (SPCE/GC/EDC-NHS), o pico de corrente diminuiu devido ao caráter isolante dessas moléculas (LAMARCA *et al.*, 2020; TSAI *et al.*, 2016), o que dificulta a capacidade da sonda redox acessar a superfície do eletrodo. O EDC é um agente de reticulação usado para acoplar grupos carboxila a amins primárias, através de um intermediário instável (o-acilisourea) formando o intermediário semi-estável (éster-NHS) reativo com amina (**Figura 29**) (VASHIST, 2012).

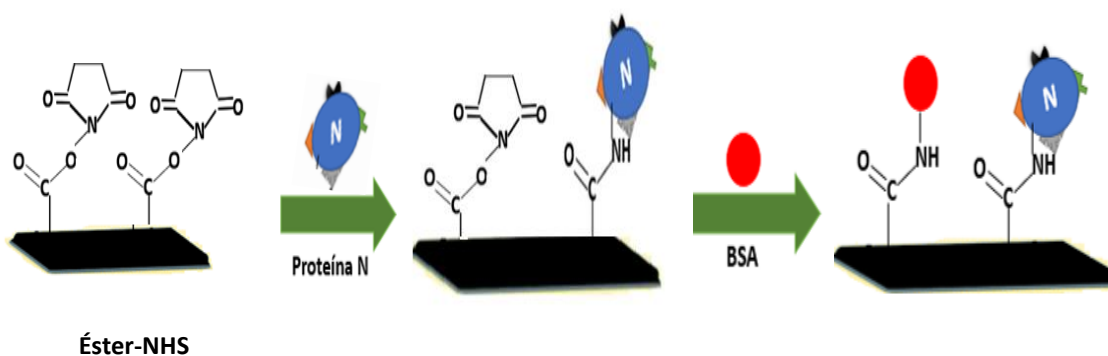


**Figura 29** - Esquema da modificação do eletrodo SPCE com grafeno carboxilado seguido da formação do éster-NHS

Mediante a técnica de VC foi confirmado a imobilização da proteína N (SPCE/GC/EDC-NHS/ProtN) na superfície do eletrodo de trabalho. A imobilização do Ag ao SPCE modificado com GC ativado por EDC/NHS ocorreu de forma aleatória por meio de grupos aminos livres que estavam presentes na molécula da proteína N (**Figura 30**). Esta imobilização ocorre através da ligação covalente entre os grupos amins presentes no antígeno e o grupo -COOH presente no GC. Após a incubação em solução do Ag, foi possível observar a diminuição nas intensidades das correntes de pico anódico e catódico e um aumento na  $\Delta E_p$  (330mV) quando comparada a  $\Delta E_p$  (195 mV) da etapa anterior (EDC-NHS) (**Tabela 3**), essas respostas indicam que a proteína N foi imobilizada na superfície do eletrodo e que a transferência de elétrons da sonda redox até o eletrodo é parcialmente bloqueada. Este fenômeno pode ser atribuído as características do material

biológico ligadas na superfície dos eletrodos. A proteína N possui grande massa e volume molecular (~43kDa), o que pode provocar impedimento estérico, além de apresentar comportamento resistivo.

Na etapa de bloqueio com BSA, houve uma pequena diminuição na corrente comparada a etapa anterior, o que poderia ser explicado pela fixação de mais espécies biológicas na superfície do eletrodo (**Figura 30**), o que impede a transferência de elétrons da sonda redox. Este resultado é o esperado, pois, a finalidade do BSA é bloquear os grupos ativos e evitar ligações inespecíficas dos anticorpos na etapa de detecção.



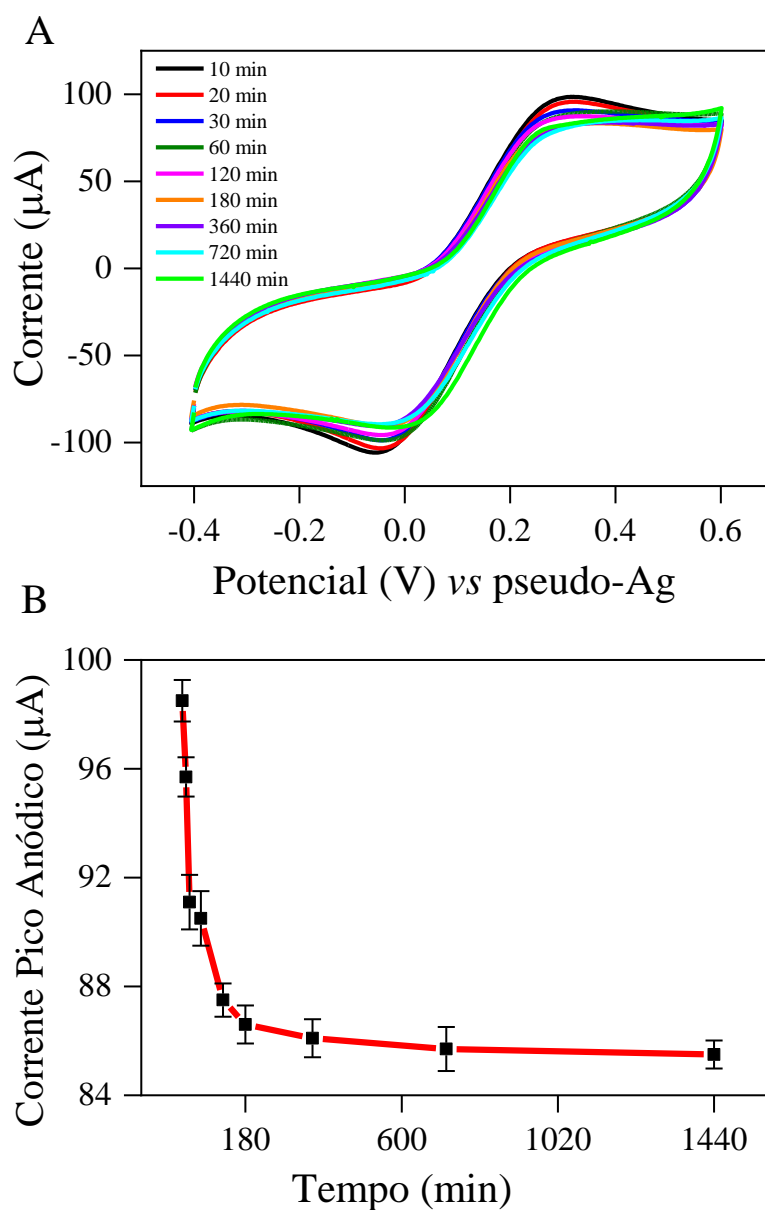
**Figura 30** - Representação da etapa de imobilização do antígeno (proteína N) seguida de BSA.

Os diagramas de Nyquist da **Figura 28-B** foram simulados com um circuito equivalente (**Figura 27-B**). Os resultados mostram um aumento sucessivo nos valores da resistência de transferência de carga ( $R_C$ ) de acordo com as etapas de modificação, refletidas pelos diâmetros do semicírculo. O valor de  $R_C$  para o SPCE/GC foi de 44  $\Omega$ , enquanto os valores de 538  $\Omega$  e 640  $\Omega$  foram obtidos para o SPCE com proteína N imobilizada e BSA, respectivamente. Esses resultados corroboram que as espécies foram fixadas na superfície do eletrodo com sucesso e que essas espécies, por sua vez, dificultaram progressivamente o processo de transferência de elétrons do par de elétrons da sonda redox.

### 5.2.2. Tempo de incubação da proteína nucleocapsídica

A otimização dos parâmetros na construção de um imunossensor é de extrema importância para se obter uma melhor resposta contra um analito alvo. Variáveis experimentais como o tempo de incubação do antígeno podem afetar significativamente o desempenho de um imunossensor (JO *et al.*, 2017; RAUF *et al.*, 2018; TSAI *et al.*, 2016; WU, Ying *et al.*, 2009). Desta forma, o tempo necessário para imobilização do antígeno foi determinado experimentalmente para que as moléculas de EDC/NHS se liguem covalentemente com a proteína N de forma eficaz. Com base na observação da **Figura 31**, as respostas eletroquímicas foram avaliadas por VC na presença de  $[(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{4-/3-}]$   $5 \text{ mmol L}^{-1}$  em  $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em diferentes tempos de incubação do antígeno (10, 20, 30, 60, 120, 180, 360, 720 e 1440 min). Verifica-se que com o aumento do tempo de incubação, a corrente diminui rapidamente e após 180 min a corrente atinge um estado estável ( **Figura 31 B**), sem diferenças relevantes a tempo maiores, portanto, o tempo de incubação mínimo encontrado para a imobilização do antígeno no desenvolvimento deste imunossensor é de 180 minutos para a concentração de  $382 \mu\text{g mL}^{-1}$  da proteína N.

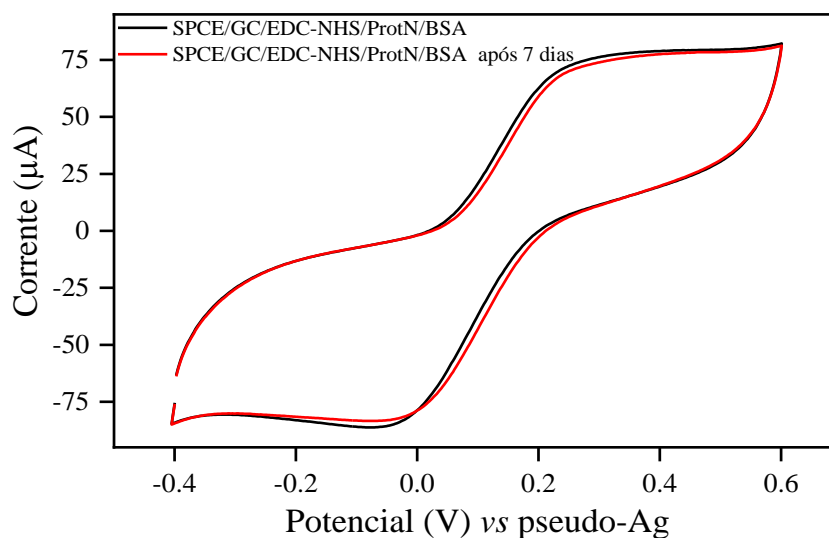




**Figura 31** – Otimização de variáveis analíticas. A: Voltamogramas cíclicos a diferentes tempos de incubação da proteína-N, e B: Relação entre corrente de pico anódico e tempo de incubação.

A estabilidade do imunossensor foi avaliada. O sensor desenvolvido SPCE/GC/EDC-NHS/ProtN/BSA foram armazenados durante 7 dias em refrigeração a 4 °C para a coleta de respostas eletroquímica usando VC. O imunossensor apresentou um perfil voltamétrico com uma pequena modificação nos potenciais de pico e com cerca de 95% de seus valores iniciais de corrente (**Figura 32**). Espera-se a estabilidade a longo

prazo devido à estabilidade do GC na superfície do eletrodo e do Ag imobilizado covalentemente na superfície do GC.



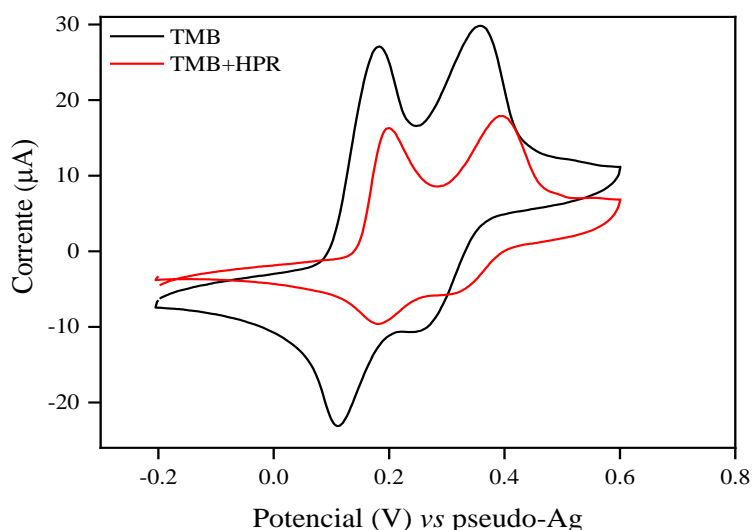
**Figura 32** -Estabilidade do imunossensor por voltametria cíclica em  $5 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-} + 0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ .

### 5.3. Caracterização de eletrodo e substrato redox

O mecanismo de oxidação do substrato TMB é bem conhecido (JOSEPHY *et al.*, 1982), tornando-o um dos substratos de peroxidase mais utilizados, sendo possível usá-lo para medições ópticas e eletroquímicas. Os SPCE foram analisados por VC utilizando TMB *1-Step* (3,3',5,5 – tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), e, posteriormente, utilizado no protocolo de detecção IgG-SARS-CoV-2 da proteína do nucleocapsídeo.

Inicialmente, foi realizada a caracterização eletroquímica do TMB e do TMB com anticorpo marcado, a voltametria cíclica em potenciais entre  $-200$  e  $+600 \text{ mV}$  a uma taxa de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  (**Figura 33**). Conforme relatado na literatura (AHAMMAD, 2012; BALDRICH *et al.*, 2009; CAWTHRAW *et al.*, 2002; EZENARRO *et al.*, 2020; FANJUL-BOLADO *et al.*, 2005; GUO, Longhua *et al.*, 2016; HU *et al.*, 2016; JOSEPHY *et al.*, 1982; KADIR & TOTHILL, 2008; LI, Jiran & LILLEHOJ, 2021; LIN *et al.*, 2007; MARQUEZ & DUNFORD, 1997; TALIB *et al.*, 2018; URBAN *et al.*,

2006; VOLPE *et al.*, 1998), o TMB sofre oxidação-redução de dois elétrons. No voltamograma do TMB foram observados os dois picos de oxidação e redução no SPCE. Os resultados mostraram os valores de corrente para  $I_{pa} = 22,4$  e  $26,2 \mu\text{A}$  e  $I_{pc} = -21,5 \mu\text{A}$  e  $-9,4 \mu\text{A}$ . A reação de TMB com anticorpo IgG marcado com a enzima HRP foi também caracterizada eletroquimicamente. Quando HRP estava envolvido na reação redox de TMB (voltamograma vermelho), foi observado na VC dois picos de oxidação (200 mV e 400 mV *vs.* Ag) e dois picos de redução (320 mV e 180 mV *vs.* Ag). No entanto, ao compararmos os dois voltamogramas, quando o HRP está envolvido na reação (voltamograma preto), as correntes de pico medidas foram menores na presença da enzima. Isso é atribuído à ação do substrato enzimático, o pico da corrente de redução do TMB é proporcional à sua concentração e ao adicionar o anticorpo marcado com HRP ao substrato, partes do substrato é consumido pela reação do TMB com HRP, consequentemente, a concentração do substrato diminui e, portanto, a corrente de redução do também diminui (LIN *et al.*, 2007).

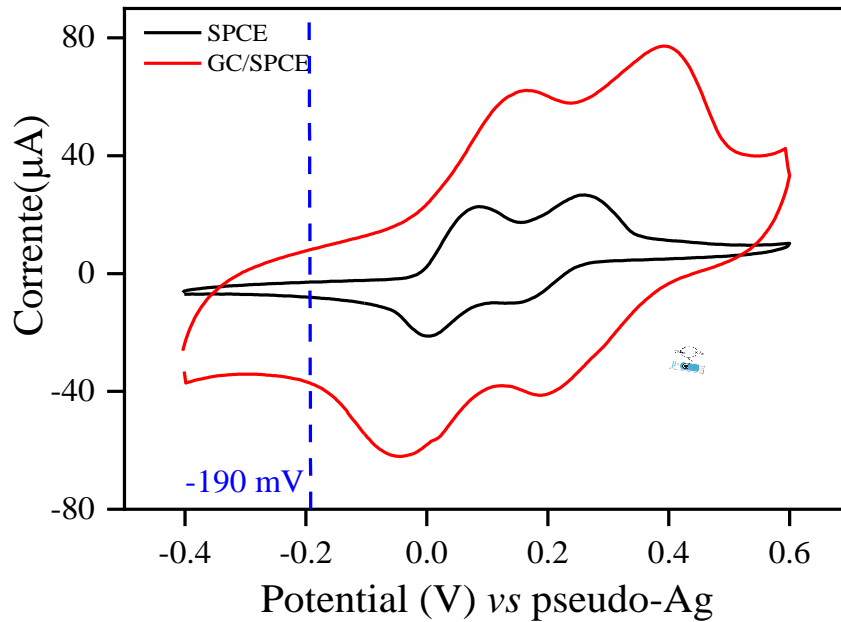


**Figura 33** - Voltametria cíclica do substrato TMB (linha preta) e reação de TMB com HRP (linha vermelha) em um eletrodo do tipo SPCE. Os potenciais de redução estão destacados através das setas.

Para a caracterização do TMB com o eletrodo modificado, 100  $\mu\text{L}$  de TMB foram depositados e a voltametria cíclica foi realizada em potenciais entre  $-400$  e  $+600$  mV a uma taxa de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

No voltamograma do TMB (**Figura 34**) foram observados os dois picos de oxidação e redução no eletrodo nu e modificado. Os resultados mostraram um aumento na corrente de pico em GC/SPCE ( $I_{pa} = 62,2$  e  $76,8 \mu\text{A}$ ;  $I_{pc} = -62,3$  e  $-41,4 \mu\text{A}$ ) em comparação com SPCE puro ( $I_{pa} = 22,4$  e  $26,2 \mu\text{A}$ ;  $I_{pc} = -21,5 \mu\text{A}$  e  $-9,4 \mu\text{A}$ ) devido à alta condutividade dos compósitos GC que contribuem para uma transferência de elétrons mais rápida no eletrodo modificado. Em nosso sistema modificado, os dois picos de oxidação ocorreram no potencial de 162 mV e 390 mV (*vs.* Ag) e dois picos de redução a 45 mV e 187 mV (*vs.* Ag). Esse experimento foi realizado em triplicata para testar a reprodutibilidade, a variação encontrada foi de 1,5% para intensidade de corrente e 5% para o potencial dos picos.

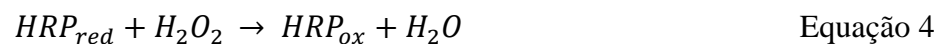
No formato do imunossensor, a detecção do anticorpo secundário marcado com HRP foi baseada na redução eletroquímica do TMB oxidado por reação enzimática. Com base nessas observações, a detecção cronoamperométrica, previamente descrita na literatura (BETTAZZI *et al.*, 2018; EZENARRO *et al.*, 2020; FANJUL-BOLADO *et al.*, 2005; HEURICH *et al.*, 2011; JOSEPHY *et al.*, 1982; LEE, Ga Yeon *et al.*, 2018), foi escolhida para o desenvolvimento desse imunossensor. O potencial aplicado de -0,19 V foi escolhido para os experimentos subsequentes, pois, com este potencial aplicado, o TMB eficientemente reduzido é apenas o TMB oxidado pelo HRP formado na superfície do eletrodo, evitando uma medição errônea que poderia ser causada se o potencial aplicado for de valores maiores, provocam a oxidação do TMB, no qual seria observado o aparecimento da cor azul ( $\text{TMB}^+$ ) em solução mesmo na ausência de HRP (BALDRICH *et al.*, 2009; EZENARRO *et al.*, 2020).



**Figura 34** - Voltametria cíclica do substrato TMB no eletrodo do tipo SPCE e SPCE modificado com grafeno carboxilado.

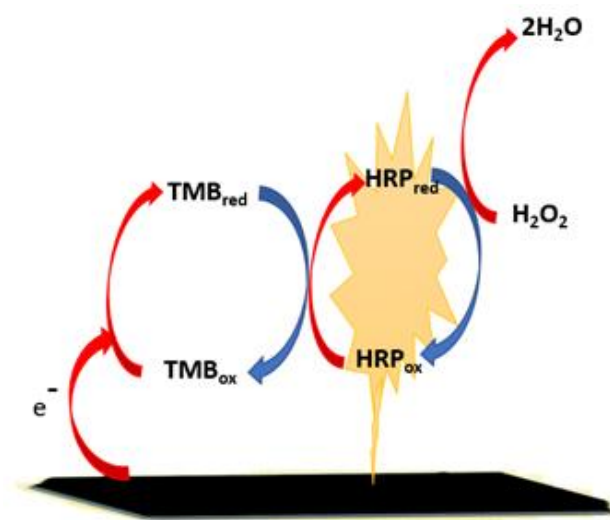
#### 5.4. Estudo de detecção amperométrica

A peroxidase de rábano é um marcador enzimático amplamente utilizado em imunoenaios. A atividade enzimática da HRP e do substrato TMB pode ser determinada medindo a absorvância na região visível, por fluorescência ou por eletroquímica (VOLPE *et al.*, 1998). Na presença do HRP, o peróxido de hidrogênio é reduzido mediante o uso de TMB e sinais de corrente eletroquímica podem ser gerados (HU *et al.*, 2016). A transferência de elétrons entre a enzima HRP e SPCE não é fácil e, por isso, é necessário o uso do mediador. O papel do TMB é promover elétrons de forma eficiente entre o eletrodo e a enzima de acordo com as reações:



Na cronoamperometria, à medida que o substrato TMB é adicionado e o potencial de polarização é aplicado, o HRP imobilizado catalisa a redução do  $H_2O_2$ . Em seguida, o HRP reduzido é regenerado com o auxílio do mediador, enquanto o mediador é oxidado na reação enzimática (AHAMMAD, 2012; HU *et al.*, 2016). E por fim, o TMB

oxidado é reduzido eletroquimicamente no eletrodo, levando a um aumento na corrente de redução (**Figura 35**). No ensaio competitivo indireto, a oxidação do TMB incolor (reduzido) em TMB<sup>+</sup> azul (oxidado) gera uma corrente amperométrica que é proporcional a concentração de anticorpo alvo na superfície do sensor (GUO, Longhua *et al.*, 2016; LI, Jiran & LILLEHOJ, 2021). Portanto, a detecção amperométrica é realizada pela corrente de redução gerada a partir do substrato oxidado, o que possibilita ser mensurada a atividade enzimática (TALIB *et al.*, 2018; VOLPE *et al.*, 1998) no anti-IgG-HRP ou Anti-IgA-HRP que está ligada ao IgG e IgA-SARS-CoV-2 da proteína N, respectivamente. Se a amostra não contém o IgG ou IgA-SARS-CoV-2, então, na etapa de lavagem o anticorpo marcado com a enzima HRP na superfície do sensor é removido e um sinal eletroquímico desprezível é gerado mediante a aplicação de um potencial de polarização (LI, Jiran & LILLEHOJ, 2021).



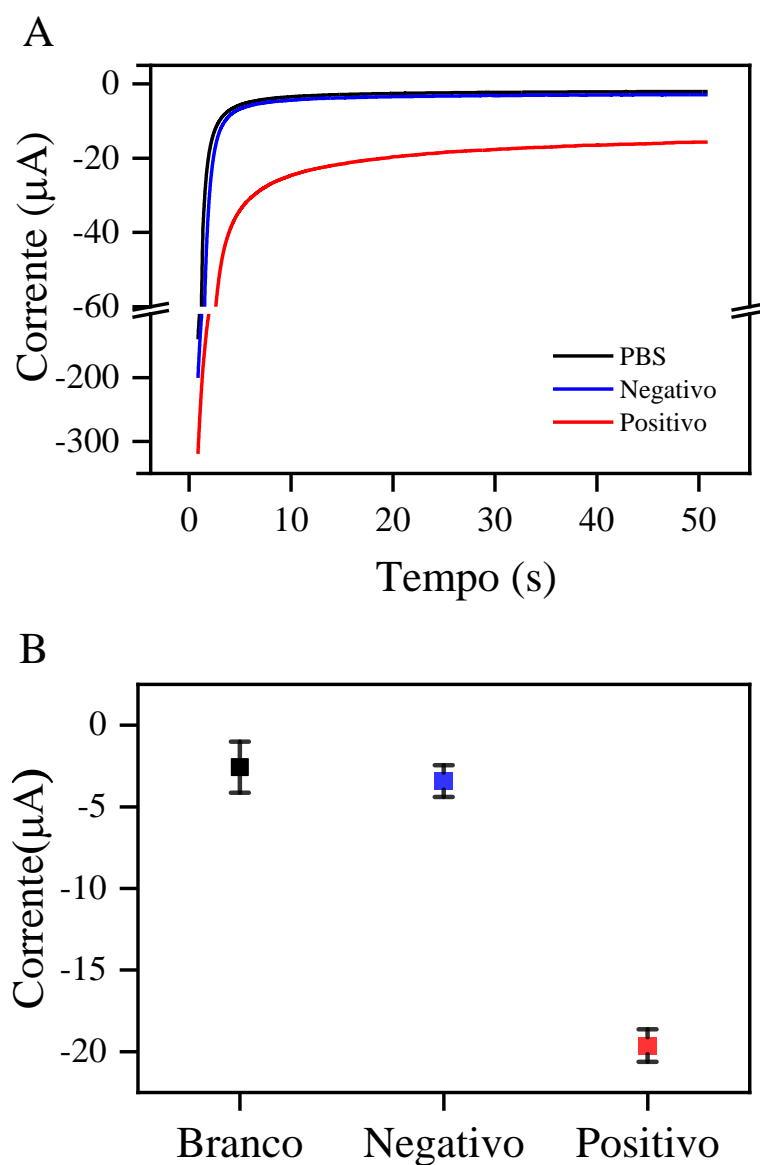
**Figura 35** – Ilustração esquemática do imunossensor eletroquímico da estratégia de amplificação de sinal enzimático (HRP).

O método eletroquímico mais adequado para monitorar a corrente de redução de TMB foi considerada a CA (KADIR & TOTHILL, 2008). O formato indireto não competitivo com ou sem HRP foi analisado por CA para observar o sinal. A presença do HRP foi registrada com um potencial aplicado de -190 mV, pois neste potencial não ocorre a reação de oxidação do TMB, sendo possível observar apenas a corrente de redução do TMB oxidado pela presença da enzima HRP, como mostra a linha azul na **Figura 34**.

#### 5.4.1. Imunossensor para detecção de IgG-SARS-CoV-2 do nucleocapsídeo.

O **Figura 36-A** exibe desempenho analítico do imunossensor e a relação entre a análise do branco (PBS 1X) e amostras diluídas de controle negativo (sem alvo) e positivo (com IgG-SARS-CoV-2 do nucleocapsídeo).

Em condições ideais, cada amostra foi incubada separadamente na superfície do dispositivo biossensor. Nesta etapa que envolve a deposição dos controles diluídos, foram depositados 7 $\mu$ L PBS para o controle do branco. Todos os testes foram feitos em triplicata (n=3). Para a detecção através da reação enzimática foram adicionados 100  $\mu$ L de TMB e mantidos no escuro por 1 min e em seguida foi feita a leitura por CA. O cronoamperogramas (**Figura 36-A**) discriminam qualitativamente a presença de IgG-SARS-CoV-2 no soro de referência positivo e negativa para testar a viabilidade do imunossensor.



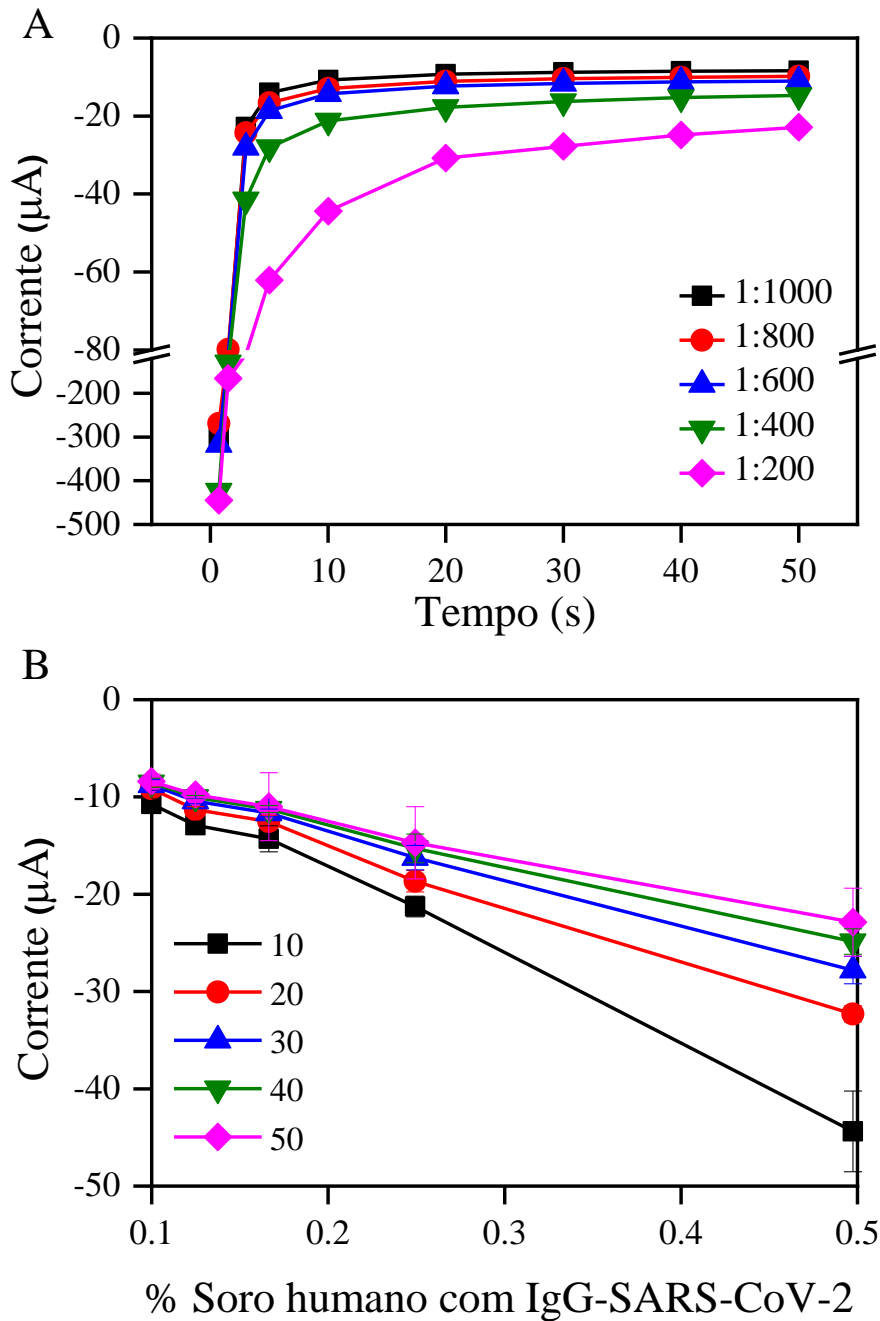
**Figura 36** – A: Cronoamperogramas gerados a partir de amostras de soro negativo e positivo para IgG-SARS-CoV-2 e ensaio branco. B: Desvio padrão (n=3) referente a corrente obtida em 20 s.

Conforme mostrado na curva I x T, o sinal de estado estacionário foi alcançado após 10 s. Quando IgG-SARS-CoV-2 estava presente, a corrente de estado estacionário foi de aproximadamente  $-19,64 \mu\text{A}$ , enquanto para o soro de referência negativo e PBS foi de apenas  $-3,43 \mu\text{A}$  e  $-2,58 \mu\text{A}$ , respectivamente ( **Figura 36-B**). A corrente do teste negativo apresentou valores bem próximos ao branco, o que indica que a amostra está sem o alvo detectável. A partir da relação P/N (relação de  $\sim 5,7$ ), pode-se



deduzir que abordagem proposta apresenta potencial para distinguir no soro humano a presença do IgG-SARS-CoV-2 do nucleocapsídeo.

Para testar a capacidade do sistema de detectar IgG-SARS-CoV-2 no soro humano, várias concentrações (1:200; 1:400; 1:600; 1:800 e 1:1000 v/v) foram testadas no imunossensor (**Figura 37**).



**Figura 37** - Cronoamperograma para diferentes concentrações de soro humano positivo para IgG-SARS-CoV-2 da proteína N; (B) valores registrados de 10 a 50 s para diferentes concentrações de soro humano com IgG-SARS-CoV-2.

A **Figura 37-A** mostra as medidas cronoamperométricas realizadas com potencial de redução fixo e -190 mV vs. pseudo-Ag por um total de 50 s. Uma rápida diminuição da corrente pode ser observada durante os primeiros 10 s causada pela polarização do eletrodo. Após 10 s, a reação no eletrodo se estabilizou e começou a atingir um estado de platô. Os cronoamperogramas exibidos mostram uma diminuição do valor absoluto da corrente catódica correspondente ao processo de redução de TMB para concentrações crescentes de IgG-SARS-CoV-2.

**Figura 37-B** mostra os valores plotados entre a corrente obtida e a % de soro humano com IgG-SARS-CoV-2 em diferentes tempos de reação. Os resultados mostram um comportamento linear entre a concentração de soro humano positivo para IgG-SARS-CoV-2 e a corrente obtida. O valor absoluto da corrente gerada em 20 s (tempo de resposta do sensor) foi escolhido como o tempo analítico usado para a curva de calibração, uma vez que a linearidade foi melhor neste tempo. Após 20 s de reação, observa-se um maior desvio padrão, principalmente, para as maiores concentrações, podendo ser explicado pelo efeito de passivação do eletrodo, que em altas concentrações de anticorpos marcados o TMB é oxidado mais rapidamente, portanto, quando o HRP oxida o TMB, o produto azul resultante é depositado na superfície do eletrodo, bloqueando-o e reduzindo a corrente obtida (BISCAY *et al.*, 2014; EZENARRO *et al.*, 2020; MAVRIKOU *et al.*, 2018)].

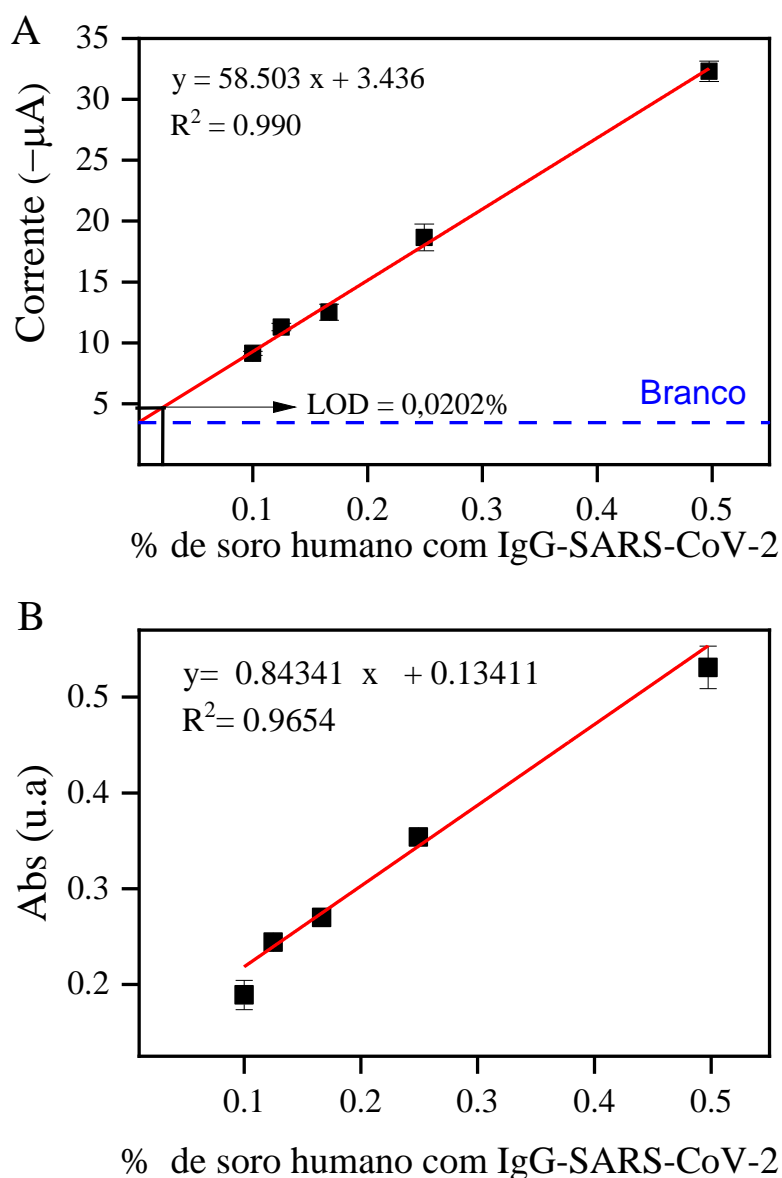
Ensaio indireto foram usados para estimar os níveis de anticorpos nas amostras de soro. O desempenho dos ensaios foi avaliado usando soro humano positivo para concentrações de IgG-SARS-CoV-2, incluindo 1:1000, 1:800, 1:600, 1:400 e 1:200 v/v. A **Figura 38** compara as curvas de calibração para os ensaios com imunossensor e ELISA, utilizando a proteína N do mesmo lote e o mesmo soro do paciente positivado para IgG-SARS-CoV-2.

Na **Figura 38-A**, as curvas de calibração foram plotadas usando valores absolutos de corrente estável registrados no tempo 20s ( $R^2=0,9908$ ) contra a concentração de IgG-SARS-CoV-2 presente nas amostras. Os valores médios de corrente resultantes ( $n = 3$ ) foram estabelecidos usando a equação de regressão:

$$y = 58,508 x + 3,43654 \quad \text{Equação 7}$$

De acordo com o método de Miller e Miller (PÉREZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2020), o limite de detecção foi determinado levando em consideração a variabilidade da

corrente cronamperométrica obtida em amostras branco (amostras sem molécula alvo). O LOD foi calculado para cada método, de acordo com as recomendações da IUPAC, onde  $LOD = 3DP/m$  (DP: desvio-padrão da medida do branco e m: coeficiente angular da curva analítica) (CURRIE, 1999). Esse limite foi estabelecido como um valor atual de  $4,61 \mu A$  correspondente a uma % de concentração de IgG-SARS-CoV-2 de 0,0202%, o que equivale a um fator de diluição de 1:4954 v/v. Conforme as análises de dados obtidos, o biossensor fabricado pode ser usado para a detecção de IgG-SARS-CoV-2 em amostra de soro humano real.



**Figura 38** - Curva de calibração para determinação de IgG-SARS-CoV-2 da proteína N pela técnica (A) CA e (B) ELISA. As barras de erro padrão correspondem às medições feitas em triplicata de cada concentração ( $n = 3$ ).

Para confirmar os resultados obtidos pelo CA para a detecção de IgG-SARS-CoV-2, foram realizados paralelamente experimentos pela técnica de ELISA, uma vez que essa técnica já é utilizada para obtenção de resultados positivo ou negativo para paciente com COVID-19. A curva de calibração para o ensaio ELISA (**Figura 38 B**) foi obtida plotando a absorbância versus % de soro humano com IgG-SARS-CoV-2. Os resultados obtidos mostram um comportamento linear na faixa de concentração de 1:1000 a 1:200, com um LOD calculado de 1:2023 (0,0494%). A equação de regressão com  $R^2 = 0,9654$  é definida como:

$$y = 0,84341 x + 0,13411 \quad \text{Equação 8}$$

A **Tabela 4** compara o limite de detecção, o tempo mínimo de teste, quantidade de proteína N imobilizada e o volume de amostras utilizados no ensaio com imunossensor e ELISA. O imunossensor amperométrico mostrou ter uma concordância com ELISA. O ensaio com biossensor é uma ferramenta promissora que pode ser utilizada no controle da COVID-19, seu limite de detecção foi 2,4 vezes maior, metade do tempo total para aplicação da metodologia, menor quantidade de proteína imobilizada e dos volumes de amostras biomoleculares quando comparados com o ensaio ELISA.

**Tabela 4** - Comparação do ensaio ELISA e imunossensor para detecção de IgG-SARS-CoV-2.

Ensaio	LOD (%)	LOD para diluição (v/v)	Tempo mínimo detecção (min)	Quantidade de Ag imobilizado (ng)	Volume de amostras das biomoléculas (µL)
<b>ELISA</b>	0,0494%	1:2023	125	100 ng	50
<b>Imunossensor</b>	0,0202%	1:4954	55	27 ng	7

Para a viabilidade do dispositivo biossensor na detecção de IgG-SARS-CoV-2 em amostras biológicas, também foram testadas 10 amostras clínicas para verificar a viabilidade do biossensor na detecção do anticorpo IgG-SARS-CoV-2 em amostras biológicas e os resultados obtidos estão resumidos na **Tabela 5** e comparados com o teste

ELISA. Os resultados mostram uma possível aplicação do biossensor para detectar IgG-SARS-CoV-2 em amostras de soro sanguíneo.

**Tabela 5** – Detecção de IgG-SARS-CoV-2 em amostras de soro humano usando o imunossensor proposto e ensaio Elisa.

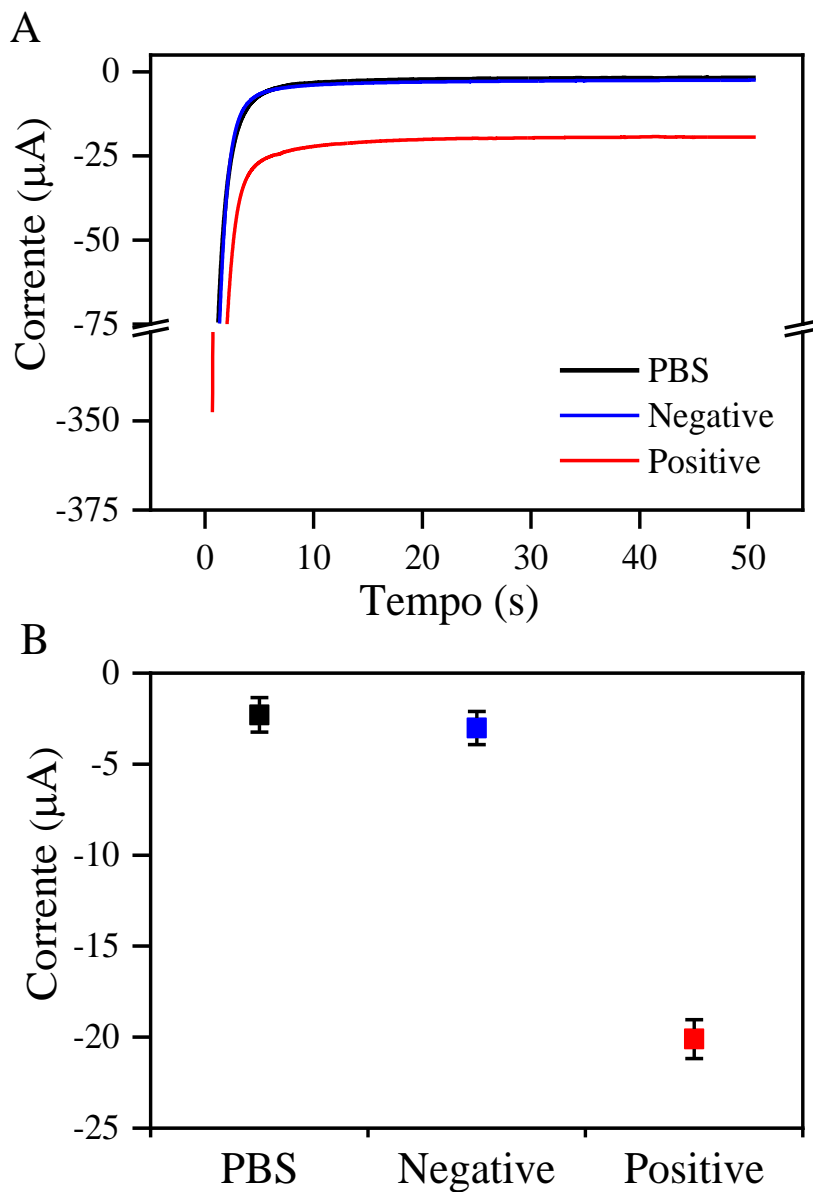
<b>Pacientes</b>	<b>Imunossensor</b>	<b>ELISA</b>
<b>1</b>	+	+
<b>2</b>	+	+
<b>3</b>	+	+
<b>4</b>	+	+
<b>5</b>	+	+
<b>6</b>	-	-
<b>7</b>	-	-
<b>8</b>	-	-
<b>9</b>	-	-
<b>10</b>	-	-

#### **5.4.2. Imunossensor para detecção de IgA-SARS-CoV-2 do nucleocapsídeo.**

Imunossensor para detecção de IgA-SARS-CoV-2 do nucleocapsídeo foi desenvolvido utilizando as etapas iniciais já descritas no tópico 5.2. 7 $\mu$ L da diluição do soro humano (1:400 v/v) contendo imunoglobulina A foi encubada durante 30 minutos. Após lavagem, 7  $\mu$ L anti-IgA-HRP (1:300 v/v) foi depositado e incubado por 20 minutos. Estas mesmas etapas foram realizadas para teste do branco (PBS 1X) e soro humano negativo pra IgA-SARS-CoV-2 do nucleocapsídeo. Para a detecção através da reação enzimática foram adicionados 100 uL de TMB e mantidos no escuro por 2 min e em seguida foi feita a leitura por CA.

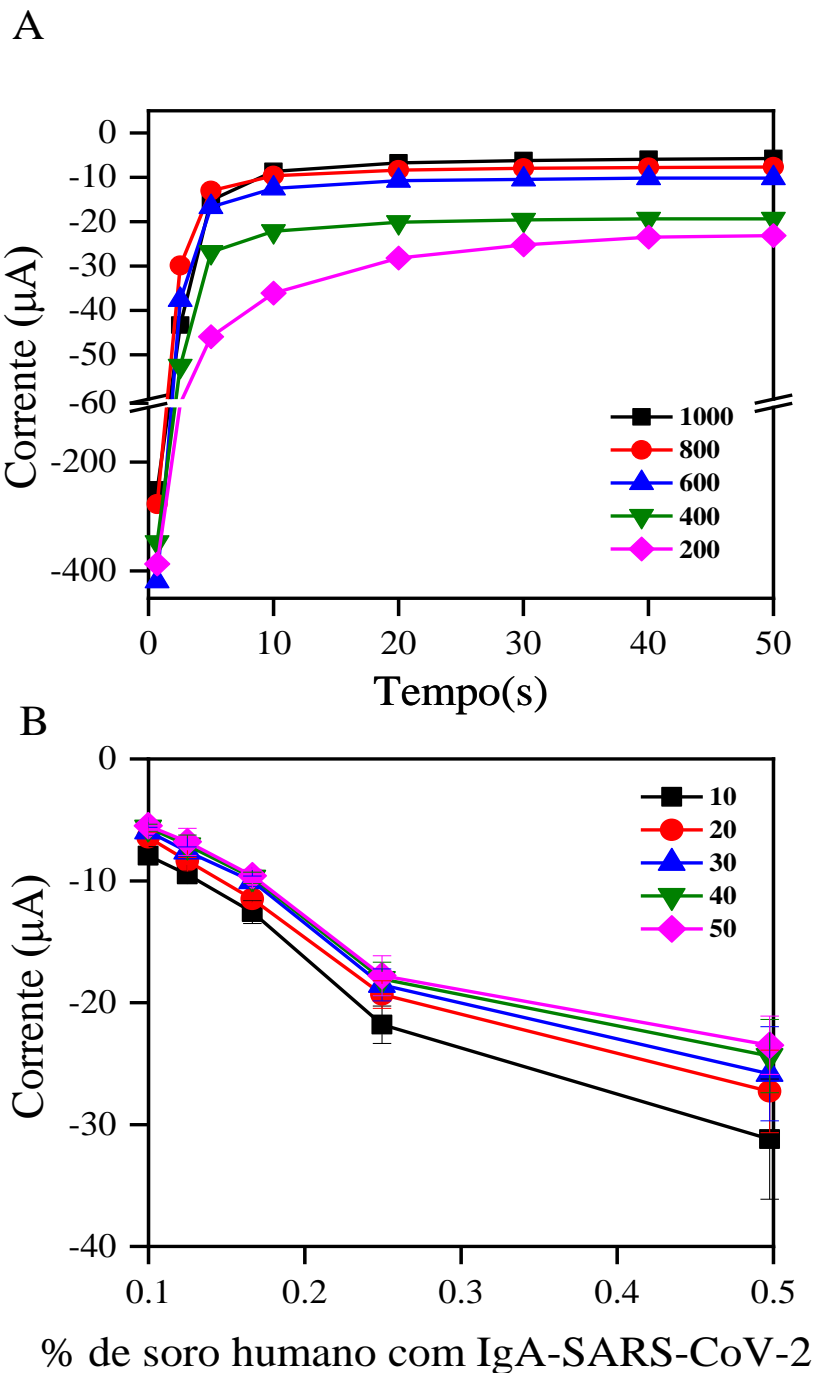
A **Figura 39** mostra o cronoamperograma do desempenho analítico e a relação entre a diluição do controle positivo (com IgG-SARS-CoV-2 do nucleocapsídeo), controle negativo (sem alvo) e a análise do branco (PBS 1X).

Os resultados da CA mostraram que os analitos de interesse, os anticorpos humanos, são efetivamente capturados pelo antígeno, uma vez que a corrente obtida no ensaio para uma amostra positiva é claramente diferente da corrente obtida com um eletrodo que foi incubado com soro negativo para IgA-SARS-CoV-2 e teste com PBS (**Figura 39-A**). A relação P/N obtida através do sinal analítico é cerca de 6,7 (**Figura 39 B**), pode-se concluir que a metodologia proposta apresenta também efetividade para distinguir soro humano saudável (sem alvo) do soro humano que apresenta a molécula alvo (IgA-SARS-CoV-2 do nucleocapsídeo).



**Figura 39** - A: Cronoamperogramas gerados a partir de amostras de soro negativo e positivo para IgA-SARS-CoV-2 e ensaio branco. B: Desvio padrão (n=3) referente a corrente obtida em 20 s.

Para testar a capacidade do sistema de detectar IgA-SARS-CoV-2 no soro humano as diluições 1:200; 1:400; 1:600; 1:800 e 1:1000 v/v foram testadas no imunossensor e os resultados são mostrados na **Figura 40**.



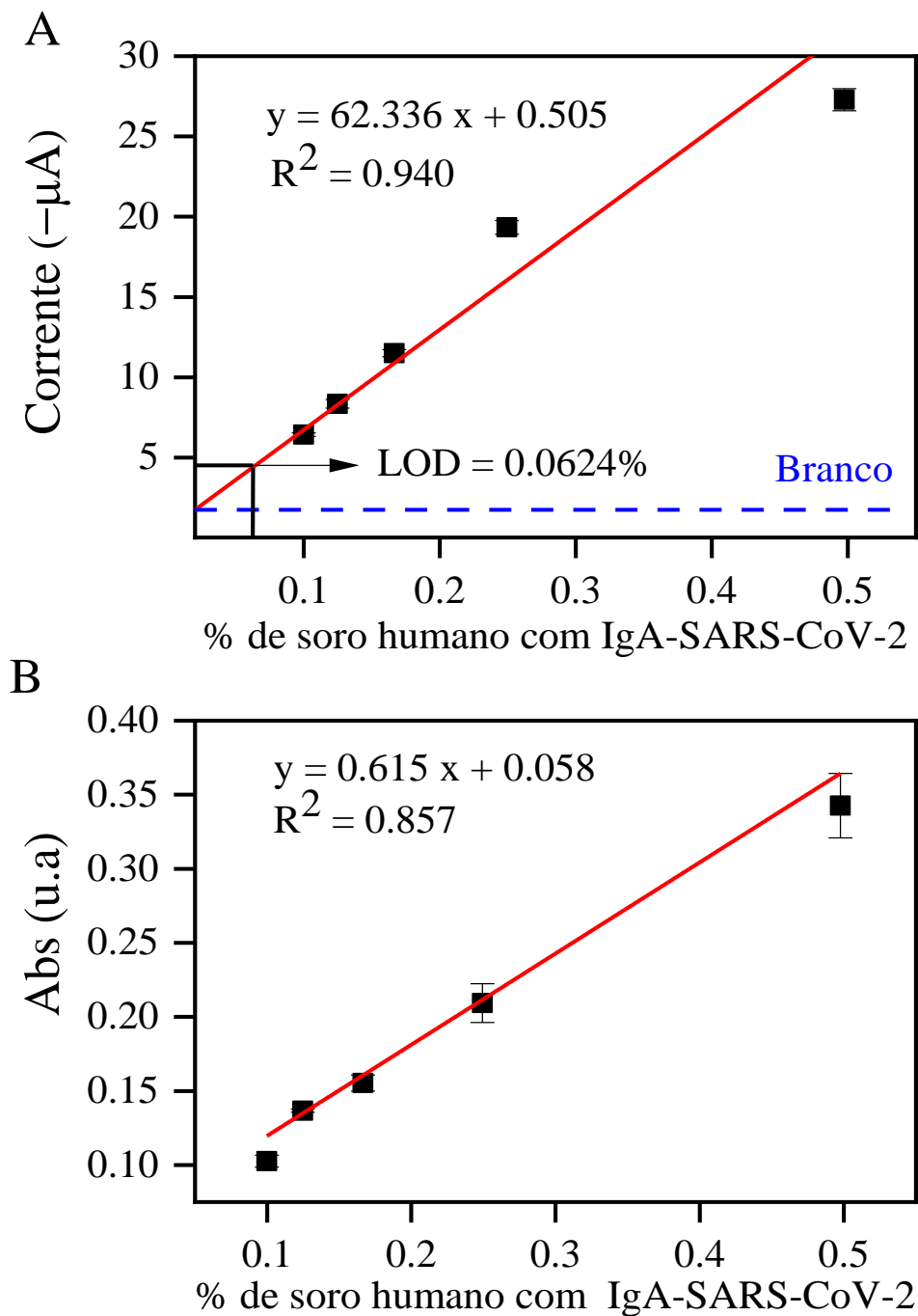
**Figura 40** - Cronoamperograma para diferentes concentrações de soro humano positivo para IgA-SARS-CoV-2 da proteína N; (B) valores registrados de 10 a 50 s para diferentes concentrações de soro humano com IgA-SARS-CoV-2.

A **Figura 40-A** mostra uma rápida diminuição da corrente que pode ser observada durante os primeiros 10 s, causada pela polarização do eletrodo. Após 10 s, a reação no eletrodo se estabilizou e começou a atingir um estado de platô. Observa-se que à medida que a % de soro humano contendo a molécula alvo aumenta, a corrente de redução aumenta proporcionalmente. Isso é confirmado na **Figura 40 B**, na qual os resultados mostram uma relação linear entre a % de soro humano com IgA-SARS-CoV-2 e a corrente obtida para todos os tempos. No entanto, a linearidade foi perdida na maior concentração de IgA-SARS-CoV-2, para todas as faixas de tempo, provavelmente como consequência da passivação dos eletrodos relacionada à precipitação de TMB. Em altas concentrações da imunoglobulina A, o TMB é oxidado mais rapidamente e, portanto, o efeito de passivação é observado. Devido a passivação do eletrodo, grandes desvios padrão também são notados em altas concentrações desse anticorpo. Portanto, os valores absolutos da corrente gerada em 20 s (tempo de resposta do sensor) foram escolhidos como o tempo analítico usado para a curva de calibração, uma vez que a linearidade foi melhor neste tempo.

Ensaio indireto foram usados para estimar os níveis de anticorpos nas amostras de soro positivo. O desempenho dos ensaios foi avaliado usando soro humano positivo para concentrações de IgA-SARS-CoV-2, incluindo as diluições de 1:1000, 1:800, 1:600, 1:400 e 1:200 v/v.

Com o objetivo de validar os métodos de detecção eletroquímica usados, os resultados entre CA e a ELISA foram correlacionados (**Figura 41**). A resposta amperométrica observada na **Figura 41-A**, demonstrou a eficiência do imunossensor produzindo um limite de detecção de 0,0624% (1:1601 v/v). A equação de regressão é definida como  $y = 62,336 x + 0,505$  com  $R^2 = 0,940$ . Para o ensaio ELISA a equação de regressão foi  $y = 0.615 x + 0.058$  com  $R^2 = 0,857$ . O LOD para ensaio ELISA é de 0,0771% que equivale a diluição do soro na proporção de 1:1296 v/v.





**Figura 41** - Curva de calibração para determinação de IgA-SARS-CoV-2 da proteína N pela técnica (A) CA e (B) ELISA. As barras de erro padrão correspondem às medições feitas em triplicata de cada concentração ( $n = 3$ ).

A **Tabela 7** compara os dados do ensaio com imunossensor e ELISA. O imunossensor amperométrico mostrou ter uma concordância com ELISA. O imunossensor apresentou seu limite de detecção de 1,2 vezes maior, metade do tempo

total para aplicação da metodologia, menor quantidade de proteína imobilizada e dos volumes de amostras biomoleculares quando comparados com o ensaio ELISA.

**Tabela 6** - Comparação do ensaio ELISA e imunossensor para detecção de IgA-SARS-CoV-2.

Ensaio	LOD (%)	LOD para diluição (v/v)	Tempo mínimo de ensaio (min)	Quantidade de Ag imobilizado (ng)	Volume de amostras das biomoléculas (µL)
<b>ELISA</b>	0,0771%	1:1296	125	100 ng	50
<b>Imunossensor</b>	0,0624%	1:1601	55	27 ng	7

### 5.5. Comparação com imunossensores reportados na literatura

Este tópico compara os imunossensores desenvolvidos neste trabalho com outros biossensores reportados na literatura para a determinação dos biomarcadores da COVID-19. Na **Tabela 7** são mencionadas diferentes metodologias descritas para a detecção de moléculas alvos de SARS-Cov-2.

Neste trabalho foram desenvolvidos dois imunossensores para determinação de imunoglobulinas G e A de SARS-CoV-2 do nucleocapsídeo (tópico 5.4.1 e 5.4.2, respectivamente) em amostras de soro humano. Ambas as metodologias propostas são simples, de fácil execução, com curto tempo de ensaio, pouco volume de reagentes, apresentaram maior sensibilidade comparados ao ensaio ELISA. Apesar dos biossensores referenciados serem promissores para o diagnóstico de COVID-19, eles são plataformas complexas, com maior número de etapas durante a fabricação e usam reagentes e materiais de maiores valores para melhorar o desempenho dos dispositivos até o presente momento, a literatura reporta poucos estudos utilizando a metodologia de imobilização da proteína N para a detecção de IgG e IgA-SARS-CoV-2. Geralmente, os estudos com imunossensores, são de ensaios direto (imobilização do Ac para detecção do Ag), além de serem realizados com biomoléculas purificadas.

**Tabela 7** - Comparação dos diferentes métodos de biossensores previamente reportados para diagnóstico da COVID-19

<b>Sistema</b>	<b>Princípio do Método</b>	<b>LOD</b>	<b>Referência</b>
Imunossensor	SPCEs modificados com nanopartículas de ouro e funcionalizados com anticorpos para detecção da proteína N de SARS-CoV-2.	0,4 pg mL <sup>-1</sup>	(EISSA <i>et al.</i> , 2021)
Imunossensor	Eletrodos de ouro impressos (SPGEs) funcionalizados com anticorpos para detecção da proteína N de SARS-CoV-2.	10 pg mL <sup>-1</sup>	(LI, Jiran & LILLEHOJ, 2021)
Imunossensor	SPCE modificado com uma membrana de nitrocelulose e funcionalizado com proteína N para detecção de IgG-SARS-CoV-2.	5 ng mL <sup>-1</sup>	(SAMPER <i>et al.</i> , 2021)
Imunossensor	Multicanais de SPCE funcionalizados com anticorpos para detecção da proteína S de SARS-CoV-2.	0,15 ng mL <sup>-1</sup>	(LI, Jianyong <i>et al.</i> , 2021)
Imunossensor	SPCEs modificados com CG e funcionalizados com Proteína N para detecção de IgG-SARS-CoV-2 em soro humano.	0,0202% (1:4954 v/v)	Este trabalho
Imunossensor	SPCEs modificados com CG e Proteína N para detecção de IgA-SARS-CoV-2 em soro humano.	0,0624% (1:1601 v/v)	Este trabalho

## 6. CONCLUSÃO

O monitoramento e vigilância eficazes da COVID-19 na atenção primária à saúde são essenciais para prevenir o surgimento de surtos. Neste trabalho, um imunossensor eletroquímico sensível para detecção da proteína do nucleocapsídeo IgG-SARS-CoV-2 foi desenvolvido com as mesmas etapas realizadas ao teste de ELISA.

Apresentamos uma maneira muito simples e barata de modificação do eletrodo SPCE com GC e. O GC/SPCE forneceu uma química na superfície altamente estável e condutora para possíveis imobilizações de enzimas, aptâmeros e anticorpos. Os SPCEs registraram melhoras nos sinais eletroquímicos quando depositados GC no eletrodo de trabalho, os resultados mostrados através das técnicas eletroquímicas comprovam que o GC acelera a cinética de transferência de elétrons na superfície do eletrodo comprovados com valores de  $I_{pa}$ ,  $I_{pc}$  e  $R_c$ . A quantidade de deposição foi estabelecida de acordo com o tempo de análise e preenchimento visível do eletrodo, sendo escolhida a quantidade de 3 deposições de 5 $\mu$ L a 2 mg mL<sup>-1</sup> de GC, no qual apresentou uma melhora na resposta eletroquímica de aproximadamente 25% comparado ao eletrodo não modificado. Mediante os estudos de caracterização química (TGA e FTIR) e morfológica (MEV) foi possível estudar as mudanças nas características do GC sintetizado.

Todas as etapas propostas nesta metodologia para o desenvolvimento do imunossensor foram caracterizadas por VC e EIS e apresentaram características que, quando comparado ao eletrodo limpo, confirmam a deposição dos materiais e imobilização das biomoléculas. O grupo EDC/NHS ativou o grupo carboxila permitindo a imobilização da proteína nucleocapsídica de SARS-CoV-2 no eletrodo de trabalho. Para a imobilização do antígeno, as respostas eletroquímicas foram avaliadas em diferentes tempos. Após 180 minutos a corrente atingiu um estado estável, sendo este o tempo de incubação ideal encontrado para uma concentração de proteína-N de 382  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.

Para o imunossensor capaz de detectar o IgG- e IgA-SARS-CoV-2, obteve-se o LOD baixo (0,02018% e 0,0624%, respectivamente) o qual permite detectar quantidades baixas IgG-SARS-CoV-2 em amostras reais. Além disso, as etapas de concentração e imunodeteção podem ser efetivamente integradas em um único suporte, permitindo um sistema mais direto e rápido que pode fornecer resultados em

aproximadamente 1 h. Assim, o sistema de detecção desenvolvido pode superar uma das desvantagens mais significativas do método ELISA que é o tempo de detecção.

Por fim, os métodos empregados para o desenvolvimento dos imunossensores apresentados neste trabalho são de fácil execução e utilizam reagentes mais baratos que outros materiais frequentemente empregados para modificação de eletrodos. Baseado nos resultados alcançados neste projeto, os dois imunossensores desenvolvidos mostraram ser capazes de detectar o analito alvo, portanto, atingimos nosso objetivo considerando que os dois dispositivos podem constituir uma alternativa para o monitoramento da COVID-19.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHAMMAD, A. J. S. Hydrogen Peroxide Biosensors Based on Horseradish Peroxidase and Hemoglobin. *Journal of Biosensors & Bioelectronics*, v. s9, p. 1–11, 2012. DOI: 10.4172/2155-6210.S9-001.

ALAFEEF, M.; DIGHE, K.; MOITRA, P.; PAN, D. Rapid, Ultrasensitive, and Quantitative Detection of SARS-CoV-2 Using Antisense Oligonucleotides Directed Electrochemical Biosensor Chip. *ACS Nano*, v. 14, n. 12, p. 17028–17045, 2020. DOI: 10.1021/acsnano.0c06392.

ARTIKA, I. M.; DEWANTARI, A. K.; WIYATNO, A. Molecular biology of coronaviruses: current knowledge. *Heliyon*, v. 6, n. 8, p. 291–298, 2020. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04743.

AZKUR, A. K.; AKDIS, M.; AZKUR, D.; SOKOLOWSKA, M.; VAN DE VEEN, W.; BRÜGGEN, M. C.; O'MAHONY, L.; GAO, Y.; NADEAU, K.; AKDIS, C. A. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 75, n. 7, p. 1564–1581, 2020. DOI: 10.1111/all.14364.

AZONETWORK. News Medical Life Sciences. Disponível em <<https://www.news-medical.net/life-sciences>>. Acessado em 14/9/2021.

BALDRICH, E.; DEL CAMPO, F. J.; MUÑOZ, F. X. Biosensing at disk microelectrode arrays. Inter-electrode functionalisation allows formatting into miniaturised sensing platforms of enhanced sensitivity. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 25, n. 4, p. 920–926, 2009. DOI: 10.1016/j.bios.2009.09.009.

BASTOS, M. L. .; TAVAZIVA, G.; ABIDI, S. K.; CAMPBELL, J. R. .; HARAOU, L. P.; JOHNSTON, J. C. .; LAN, Z.; LAW, S.; MACLEAN, E.; TRAJMAN, A.; MENZIES, D.; BENEDETTI, A.; KHAN, F. A. Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: Systematic review and meta-analysis. *The BMJ*, v. 370, p. 1–13, 2020. DOI: 10.1136/bmj.m2516.

BASU, A. K.; CHATTOPADHYAY, P.; ROYCHOUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. Development of cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on oxygen electrode for the determination of total cholesterol in food samples. *Bioelectrochemistry*, v. 70, n. 2, p. 375–379, 2007. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2006.05.006.

BETTAZZI, F.; NATALE, A. R.; TORRES, E.; PALCHETTI, I. Glyphosate determination by coupling an immuno-magnetic assay with electrochemical sensors. *Sensors (Switzerland)*, v. 18, n. 9, p. 1–12, 2018. DOI: 10.3390/s18092965.

BISCAY, J.; GARCÍA, M. B. G.; GARCÍA, A. C. Electrochemical biotin determination based on a screen printed carbon electrode array and magnetic beads. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 205, p. 426–432, 2014. DOI: 10.1016/j.snb.2014.08.042.

BONWICK, G. A.; SMITH, C. J. Immunoassays: Their history, development and current place in food science and technology. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 39, n. 8, p. 817–827, 2004. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2004.00855.x.

BOONKAEW, S.; CHAIYO, S.; JAMPASA, S.; RENGPIPAT, S.; SIANGPROH, W.; CHAILAPAKUL, O. An origami paper-based electrochemical immunoassay for the C-reactive protein using a screen-printed carbon electrode modified with graphene and gold nanoparticles. *Microchimica Acta*, v. 186, n. 3, p. 153 (1–10), 2019. DOI: 10.1007/s00604-019-3245-8.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*. 1a. New York, Oxford University Press, 1993, 418 p.

CANSTOCKPHOTO. Anatomia-Anticorpo. Disponível em <<https://www.canstockphoto.it/anatomia-anticorpo-14738837.html>>. Acessado em 21/9/2021.

CAWTHRAW, S. A.; FELDMAN, R. A.; SAYERS, A. R.; NEWELL, D. G. Long-term antibody responses following human infection with *Campylobacter jejuni*. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 130, n. 3, p. 101–106, 2002. DOI: 10.1046/j.1365-2249.2002.02043.x.

CHE, X. Y.; QIU, L. W.; PAN, Y. X.; WEN, K.; HAO, W.; ZHANG, L. Y.; WANG, Y. Di; LIAO, Z. Y.; HUA, X.; CHENG, V. C. C.; YUEN, K. Y. Sensitive and specific monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassay for detection of nucleocapsid antigen in sera from patients with severe acute respiratory syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 6, p. 2629–2635, 2004. DOI: 10.1128/JCM.42.6.2629-2635.2004.

CHENGALROYEN, M. D.; DABBS, E. R. The microbial degradation of azo dyes: Minireview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29, n. 3, p. 389–399, 2013. DOI: 10.1007/s11274-012-1198-8.

CHHABRA, V. A.; DEEP, A.; KAUR, R.; KUMAR, R. Functionalization of Graphene using Carboxylation Process. *International Journal for Science and Emerging Technologies with Latest Trends*, v. 4, n. 1, p. 13–19, 2012.

CHHABRA, V.; SINGH, M.; DEEP, A. Carboxylated Graphene-Indium Tin Oxide Hetrojunction for Bio-Sensing. *Nanotechnology: Novel Perspectives and Prospects*, v. 1, p. 414–410, 2015. DOI: 10.13140/RG.2.1.1998.6806.

CHIU, N. H. L. .; CHRISTOPOULOS, T. K. *Advances in Immunoassay Technology*. 1a. Croacia, InTech, 2012, 180 p.

CHO, I. H.; LEE, J.; KIM, J.; KANG, M. S.; PAIK, J. K.; KU, S.; CHO, H. M.; IRUDAYARAJ, J.; KIM, D. H. Current technologies of electrochemical immunosensors: Perspective on signal amplification. *Sensors*, v. 18, n. 1, p. 1–18, 2018. DOI: 10.3390/s18010207.

COMPTON, R. G.; LABORDA, E.; WARD, K. R. *Understanding Voltammetry*. 1a. Londres, Imperial College Press, 2014, 249 p.

COOPER, J.; CASS, T. *Biosensors: A practical approach*. 2. Oxford, Oxford University Press, 1991, 268 p.

CRIVIANU-GAITA, V.; THOMPSON, M. Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 85, p. 32–45, 2016. DOI: 10.1016/j.bios.2016.04.091.

CUI, F.; ZHOU, H. S. Diagnostic methods and potential portable biosensors for coronavirus disease 2019. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 165, p. 112349, 2020. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112349.

CUI, G.; JAE HYUN YOO; JOUNG SU LEE; YOO, J.; JUNG HEE UHM; GEUN SIG CHA; NAM, H. Effect of pre-treatment on the surface and electrochemical properties of screen-printed carbon paste electrodes. *Analyst*, v. 126, n. 8, p. 1399–1403, 2001. DOI: 10.1039/b102934g.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Analytica Chimica Acta*, v. 391, p. 105–126, 1999. DOI: 10.1016/S0003-2670(99)00104-X.

DB DIAGNÓSTICO. Lâmina Imuno-Histoquímica. Disponível em <<https://www.diagnosticodobrasil.com.br/material-tecnico/lamina-imuno-histoquimica>>. Acessado em 21/9/2021.

DELAMARCHE, E.; SUNDARABABU, G.; BIEBUYCK, H.; MICHEL, B.; GERBER, C.; SIGRIST, H.; WOLF, H.; RINGSDORF, H.; XANTHOPOULOS, N.; MATHIEU, H. J. Immobilization of antibodies on a photoactive self-assembled monolayer on gold. *Langmuir*, v. 12, n. 8, p. 1997–2006, 1996. DOI: 10.1021/la950836t.

DHAND, C.; ARYA, S. K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Polyaniline-carbon nanotube composite film for cholesterol biosensor. *Analytical Biochemistry*, v. 383, n. 2, p. 194–199, 2008. DOI: 10.1016/j.ab.2008.08.039.

DOREMALEN, N. van; BUSHMAKER, T.; MORRIS, D.; HOLBROOK, M.; GAMBLE, A.; WILLIAMSON, B.; TAMIN, A.; HARCOURT, J.; THORNBURG, N.; GERBER, S. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *The New England Journal of Medicine*, n. Correspondence, p. 0–4, 2020.

EIGLER, S.; DOTZER, C.; HIRSCH, A.; ENZELBERGER, M.; MÜLLER, P. Formation and decomposition of CO<sub>2</sub> intercalated graphene oxide. *Chemistry of Materials*, v. 24, n. 7, p. 1276–1282, 2012. DOI: 10.1021/cm203223z.

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*, v. 188, n. 6, p. 199, 2021. DOI: 10.1007/s00604-021-04867-1.

EZENARRO, J. J.; PÁRRAGA-NIÑO, N.; SABRIÀ, M.; DEL CAMPO, F. J.; MUÑOZ-PASCUAL, F. X.; MAS, J.; URÍA, N. Rapid detection of legionella pneumophila in



drinking water, based on filter immunoassay and chronoamperometric measurement. *Biosensors*, v. 10, n. 102, p. 1–11, 2020. DOI: 10.3390/bios10090102.

FANJUL-BOLADO, P.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M. B.; COSTA-GARCÍA, A. Amperometric detection in TMB/HRP-based assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 382, n. 2, p. 297–302, 2005. DOI: 10.1007/s00216-005-3084-9.

FANJUL-BOLADO, P.; QUEIPO, P.; LAMAS-ARDISANA, P. J.; COSTA-GARCÍA, A. Manufacture and evaluation of carbon nanotube modified screen-printed electrodes as electrochemical tools. *Talanta*, v. 74, n. 3, p. 427–433, 2007. DOI: 10.1016/j.talanta.2007.07.035.

FARIDBOD, F.; GUPTA, V. K.; ZAMANI, H. A. Electrochemical Sensors and Biosensors. *International Journal of Electrochemistry*, v. 2011, p. 1–2, 2011. DOI: 10.4061/2011/352546.

FAROOQ, S.; AZIZ, H.; ALI, S.; MURTAZA, G.; RIZWAN, M.; SALEEM, M. H.; MAHBOOB, S.; AL-GHANIM, K. A.; RIAZ, M. N.; MURTAZA, B. Synthesis of Functionalized Carboxylated Graphene Oxide for the Remediation of Pb and Cr Contaminated Water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 19, n. 17, 2022. DOI: 10.3390/ijerph191710610.

FATHALI, E.; RAHIMNEJAD, S.; YOUSEFI, M. Polyamide decorated graphene sheet as a potential antimicrobial agent: Synthesis, Characterization. *Advanced Materials Research*, v. 829, p. 461–465, 2014. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.829.461.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnology Advances*, v. 31, n. 8, p. 1808–1825, 2013. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.02.013.

FERREIRA, R. D. Q.; AVACA, L. A. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante de sucos de frutas industrializados usando o CRAC assay. *Quimica Nova*, v. 31, n. 8, p. 2169–2173, 2008. DOI: 10.1590/S0100-40422008000800044.

GARCIA-HERNANDEZ, C.; SALVO COMINO, C.; MARTÍN-PEDROSA, F.; RODRIGUEZ-MENDEZ, M. L.; GARCIA-CABEZON, C. Impedimetric electronic tongue based on nanocomposites for the analysis of red wines. Improving the variable selection method. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 277, p. 365–372, 2018. DOI: 10.1016/j.snb.2018.09.023.

GIL, E. D. S.; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica. *Quimica Nova*, v. 22, n. 6, p. 874–881, 1999. DOI: 10.1590/s0100-40421999000600015.

GOPINATH, S. C. B.; TANG, T. H.; CITARTAN, M.; CHEN, Y.; LAKSHMIPRIYA, T. Current aspects in immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 57, p. 292–302, 2014. DOI: 10.1016/j.bios.2014.02.029.

GRABAREK, Z.; GERGELY, J. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Analytical Biochemistry*, v. 185, n. 1, p. 131–135, 1990. DOI:

10.1016/0003-2697(90)90267-D.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical biosensors - Sensor principles and architectures. *Sensors*, v. 8, n. 3, p. 1400–1458, 2008. DOI: 10.3390/s8031400.

GU, H.; YU, Y.; LIU, X.; NI, B.; ZHOU, T.; SHI, G. Layer-by-layer self-assembly of functionalized graphene nanoplates for glucose sensing in vivo integrated with on-line microdialysis system. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 32, n. 1, p. 118–126, 2012. DOI: 10.1016/j.bios.2011.11.044.

GU, Y.; JU, C.; LI, Y.; SHANG, Z.; WU, Y.; JIA, Y.; NIU, Y. Detection of circulating tumor cells in prostate cancer based on carboxylated graphene oxide modified light addressable potentiometric sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 66, p. 24–31, 2015. DOI: 10.1016/j.bios.2014.10.070.

GUO, Li; REN, L.; YANG, S.; XIAO, M.; CHANG, D.; YANG, F.; DELA CRUZ, C. S.; WANG, Y.; WU, C.; XIAO, Y.; ZHANG, L.; HAN, L.; DANG, S.; XU, Y.; YANG, Q. W.; XU, S. Y.; ZHU, H. D.; XU, Y. C.; JIN, Q.; ... WANG, J. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). *Clinical Infectious Diseases*, v. 71, n. 15, p. 778–785, 2020. DOI: 10.1093/cid/ciaa310.

GUO, Longhua; XU, S.; MA, X.; QIU, B.; LIN, Z.; CHEN, G. Dual-color plasmonic enzyme-linked immunosorbent assay based on enzyme-mediated etching of Au nanoparticles. *Scientific Reports*, v. 6, p. 1–7, 2016. DOI: 10.1038/srep32755.

HADDAOUI, M.; RAOUAFI, N. Chlortoluron-induced enzymatic activity inhibition in tyrosinase/ZnO NPs/SPCE biosensor for the detection of ppb levels of herbicide. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 219, p. 171–178, 2015. DOI: 10.1016/j.snb.2015.05.023.

HATALA, M.; GEMEINER, P.; LORENCOVÁ, L.; MIKULA, M.; HVOJNIK, M.; PAVLIČKOVÁ, M.; HÁZ, A.; KOSNÁČ, D.; BERTÓK, T.; TKÁČ, J. Screen-printed conductive carbon layers for dye-sensitized solar cells and electrochemical detection of dopamine. *Chemical Papers*, v. 75, n. 8, p. 3817–3829, 2021. DOI: 10.1007/s11696-021-01601-2.

HAYAT, A.; BARTHELMEBS, L.; SASSOLAS, A.; MARTY, J. L. An electrochemical immunosensor based on covalent immobilization of okadaic acid onto screen printed carbon electrode via diazotization-coupling reaction. *Talanta*, v. 85, n. 1, p. 513–518, 2011. DOI: 10.1016/j.talanta.2011.04.034.

HEIDPRIEM, J.; DAHLKE, C.; KOBBE, R.; SANTER, R.; KOCH, T.; FATHI, A.; SECO, B.; LY, M.; SCHMIEDEL, S.; SCHWINGE, D.; SERNA, S.; SELLRIE, K.; REICHARDT, N.-C.; SEEBERGER, P.; ADDO, M.; LOEFFLER, F. Longitudinal Development of Antibody Responses in COVID-19 Patients of Different Severity with ELISA, Peptide, and Glycan Arrays: An Immunological Case Series. *Pathogens*, v. 10, n. 4, p. 438, 2021. DOI: 10.3390/pathogens10040438.

HEURICH, M.; KADIR, M. K. A.; TOTHILL, I. E. An electrochemical sensor based on carboxymethylated dextran modified gold surface for ochratoxin A analysis. *Sensors and*

Actuators, B: Chemical, v. 156, n. 1, p. 162–168, 2011. DOI: 10.1016/j.snb.2011.04.007.

HOEHL, S.; RABENAU, H.; BERGER, A.; KORTENBUSCH, M.; CINATL, J.; BOJKOVA, D.; BEHRENS, P.; BÖDDINGHAUS, B.; GÖTSCH, U.; NAUJOKS, F.; NEUMANN, P.; SCHORK, J.; TIARKS-JUNGK, P.; WALCZOK, A.; EICKMANN, M.; VEHRESCHILD, M. J. G. T.; KANN, G.; WOLF, T.; GOTTSCHALK, R.; CIESEK, S. Evidence of SARS-CoV-2 Infection in Returning Travelers from Wuhan, China. *New England Journal of Medicine*, v. 382, n. 13, p. 1278–1280, 2020. DOI: 10.1056/nejmc2001899.

HOLMES, K. V. CORONAVIRUSES (CORONAVIRIDAE). In: GRANOFF, A.; WEBSTER, R. G. (eds.). *Encyclopedia of Virology*. 2a ed. Denver, Elsevier Ltd. 2a ed. p. 291–298, 1999.

HU, T.; ZHANG, L.; WEN, W.; ZHANG, X.; WANG, S. Enzyme catalytic amplification of miRNA-155 detection with graphene quantum dot-based electrochemical biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 77, p. 451–456, 2016. DOI: 10.1016/j.bios.2015.09.068.

HUANG, C.; WANG, Y.; LI, X.; REN, L.; ZHAO, J.; HU, Y.; ZHANG, L.; FAN, G.; XU, J.; GU, X.; CHENG, Z.; YU, T.; XIA, J.; WEI, Y.; WU, W.; XIE, X.; YIN, W.; LI, H.; LIU, M.; ... CAO, B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.

HUANG, Z.; CHEN, H.; XUE, M.; HUANG, H.; ZHENG, P.; LUO, W.; LIANG, X.; SUN, B.; ZHONG, N. Characteristics and roles of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific antibodies in patients with different severities of coronavirus 19. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 202, n. 2, p. 210–219, 2020. DOI: 10.1111/cei.13500.

JAISWAL, N.; PANDEY, C. M.; SONI, A.; TIWARI, I.; ROSILLO-LOPEZ, M.; SALZMANN, C. G.; MALHOTRA, B. D.; SUMANA, G. Electrochemical genosensor based on carboxylated graphene for detection of water-borne pathogen. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 275, p. 312–321, 2018. DOI: 10.1016/j.snb.2018.07.055.

JO, H.; HER, J.; LEE, H.; SHIM, Y. B.; BAN, C. Highly sensitive amperometric detection of cardiac troponin I using sandwich aptamers and screen-printed carbon electrodes. *Talanta*, v. 165, p. 442–448, 2017. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.12.091.

JOHNS HOPKINS CORONAVIRUS RESOURCE CENTER. Covid-19 Map. Disponível em <<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>>. Acessado em 8/9/2021.

JONES, G.; WORTBERG, M.; ROCK, D. M.; HAMMOCK, B. D. Immunoassay of cross-reacting analytes. In: AGA, D. S.; THURMAN, E. M. (eds.). *Immunochemical Technology for Environmental Applications*. 1a ed. Washington, American Chemical Society. 1a ed. p. 331–342, 1997.

JOSEPHY, P. D.; ELING, T.; MASON, R. P. The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex

intermediates. *Journal of Biological Chemistry*, v. 257, n. 7, p. 3669–3675, 1982. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)34832-4.

KADIR, M. A.; TOTHILL, I. E. Immunosensor for Aflatoxin B1 Using Gold Working Electrode. *Cranfield Multi-Strand Conference: Creating Wealth Through Research and Innovation (CMC 2008)*. Reino Unido, Cranfield University. p. 440–446, 2008.

KANSO, H.; PANKRATOVA, G.; BOLLELLA, P.; LEECH, D.; HERNANDEZ, D.; GORTON, L. Sunlight photocurrent generation from thylakoid membranes on gold nanoparticle modified screen-printed electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 816, n. September 2017, p. 259–264, 2018. DOI: 10.1016/j.jelechem.2018.03.030.

KARUWAN, C.; WISITSORAAT, A.; PHOKHARATKUL, D.; SRIPRACHUABWONG, C.; LOMAS, T.; NACAPRICHA, D.; TUANTRANONT, A. A disposable screen printed graphene-carbon paste electrode and its application in electrochemical sensing. *RSC Advances*, v. 3, n. 48, p. 25792–25799, 2013. DOI: 10.1039/c3ra44187c.

KAUR, G.; SAHA, S.; TOMAR, M.; GUPTA, V. Influence of immobilization strategies on biosensing response characteristics: A comparative study. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 82, p. 144–150, 2016. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2015.09.008.

KUILA, T.; BOSE, S.; MISHRA, A. K.; KHANRA, P.; KIM, N. H.; LEE, J. H. Chemical functionalization of graphene and its applications. *Progress in Materials Science*, v. 57, n. 7, p. 1061–1105, 2012. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2012.03.002.

KURBANOGLU, S.; USLU, B.; OZKAN, S. A. Nanobiodevices for electrochemical biosensing of pharmaceuticals. In: GRUMEZESCU, A. M. (ed.). *Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs: From Design to Applications*. 1a ed. Cambridge, William Andrew. 1a ed. p. 291–330, 2018.

LALWANI, P.; SALGADO, B. B.; FILHO, I. V. P.; DA SILVA, D. S. S.; DE MORAIS, T. B. do N.; JORDÃO, M. F.; BARBOSA, A. R. C.; CORDEIRO, I. B.; NETO, J. N. de S.; DE ASSUNÇÃO, E. N.; DOS SANTOS, R. O.; CARVALHO, N. O.; SOBRINHO, W. B. S.; DA COSTA, C. F.; DE SOUZA, P. E.; DE ALBUQUERQUE, B. C.; GANOZA, C. A.; ARAUJO-CASTILLO, R. V.; FILHO, S. A.; LALWANI, J. D. B. SARS-CoV-2 seroprevalence and associated factors in Manaus, Brazil: baseline results from the DETECTCoV-19 cohort study. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 110, p. 141–150, 2021. DOI: 10.1016/j.ijid.2021.07.017.

LAMARCA, R. S.; FARIA, R. A. D. De; ZANONI, M. V. B.; NALIN, M.; LIMA GOMES, P. C. F. De; MESSADDEQ, Y. Simple, fast and environmentally friendly method to determine ciprofloxacin in wastewater samples based on an impedimetric immunosensor. *RSC Advances*, v. 10, n. 4, p. 1838–1847, 2020. DOI: 10.1039/c9ra09083e.

LAUDE, H. .; MASTERS, P. S. The Coronavirus Nucleocapsid Protein. In: SIDDELL, S. G. (ed.). *The Coronaviridae*. 1a ed. New York, Springer Science. 1a ed. vol. 418, p. 141–163, 1995.

LAYQAH, L. A.; EISSA, S. An electrochemical immunosensor for the corona virus associated with the Middle East respiratory syndrome using an array of gold nanoparticle-modified carbon electrodes. *Microchimica Acta*, v. 186, n. 4, 2019. DOI: 10.1007/s00604-019-3345-5.

LEE, G. Y.; PARK, J. H.; CHANG, Y. W.; CHO, S.; KANG, M. J.; PYUN, J. C. Chronoamperometry-Based Redox Cycling for Application to Immunoassays. *ACS Sensors*, v. 3, n. 1, p. 106–112, 2018. DOI: 10.1021/acssensors.7b00681.

LEE, H. K.; LEE, B. H.; SEOK, S. H.; BAEK, M. W.; LEE, H. Y.; KIM, D. J.; NA, Y. R.; NOH, K. J.; PARK, S. H.; KUMAR, D. N.; KARIWA, H.; NAKAUCHI, M.; HEO, S. J.; PARK, J. H. Production of specific antibodies against SARS-coronavirus nucleocapsid protein without cross reactivity with human coronaviruses 229E and OC43. *Journal of Veterinary Science*, v. 11, n. 1, p. 165–167, 2010. DOI: 10.4142/jvs.2010.11.2.165.

LEUNG, D. T. M.; TAM, F. C. H.; CHUN, H. M.; CHAN, P. K. S.; CHEUNG, J. L. K.; NIU, H.; TAM, J. S. L.; PAK, L. L. Antibody response of patients with Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) targets the viral nucleocapsid. *Journal of Infectious Diseases*, v. 190, n. 2, p. 379–386, 2004. DOI: 10.1086/422040.

LI, Jianyong; LIN, R.; YANG, Y.; ZHAO, R.; SONG, S.; ZHOU, Y.; SHI, J.; WANG, L.; SONG, H.; HAO, R. Multichannel Immunosensor Platform for the Rapid Detection of SARS-CoV-2 and Influenza A(H1N1) Virus. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 13, n. 19, p. 22262–22270, 2021. DOI: 10.1021/acscami.1c05770.

LI, Jiran; LILLEHOJ, P. B. Microfluidic Magneto Immunosensor for Rapid, High Sensitivity Measurements of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein in Serum. *ACS Sensors*, v. 6, n. 3, p. 1270–1278, 2021. DOI: 10.1021/acssensors.0c02561.

LI, L.; QIN, L.; XU, Z.; YIN, Y.; WANG, X.; KONG, B.; BAI, J.; LU, Y.; FANG, Z.; SONG, Q.; CAO, K.; LIU, D.; WANG, G.; XU, Q.; FANG, X.; ZHANG, S.; XIA, J.; XIA, J. Using Artificial Intelligence to Detect COVID-19 and Community-acquired Pneumonia Based on Pulmonary CT: Evaluation of the Diagnostic Accuracy. *Radiology*, v. 296, n. 2, p. E65–E71, 2020. DOI: 10.1148/radiol.2020200905.

LI, Q.; GUAN, X.; WU, P.; WANG, X.; ZHOU, L.; TONG, Y.; REN, R.; LEUNG, K. S. M.; LAU, E. H. Y.; WONG, J. Y.; XING, X.; XIANG, N.; WU, Y.; LI, C.; CHEN, Q.; LI, D.; LIU, T.; ZHAO, J.; LIU, M.; ... FENG, Z. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *New England Journal of Medicine*, v. 382, n. 13, p. 1199–1207, 2020. DOI: 10.1056/nejmoa2001316.

LI, Y.; XIA, L. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Role of chest CT in diagnosis and management. *American Journal of Roentgenology*, v. 214, n. 6, p. 1280–1286, 2020. DOI: 10.2214/AJR.20.22954.

LI, Z.; YI, Y.; LUO, X.; XIONG, N.; LIU, Y.; LI, S.; SUN, R.; WANG, Y.; HU, B.; CHEN, W.; ZHANG, Y.; WANG, J.; HUANG, B.; LIN, Y.; YANG, J.; CAI, W.; WANG, X.; CHENG, J.; CHEN, Z.; ... YE, F. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *Journal of*

Medical Virology, v. 92, n. 9, p. 1518–1524, 2020. DOI: 10.1002/jmv.25727.

LIANG, B.; FANG, L.; YANG, G.; HU, Y.; GUO, X.; YE, X. Direct electron transfer glucose biosensor based on glucose oxidase self-assembled on electrochemically reduced carboxyl graphene. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 43, n. 1, p. 131–136, 2013. DOI: 10.1016/j.bios.2012.11.040.

LIM, S. A.; AHMED, M. U. Electrochemical immunosensors and their recent nanomaterial-based signal amplification strategies: A review. *RSC Advances*, v. 6, n. 30, p. 24995–25014, 2016. DOI: 10.1039/c6ra00333h.

LIMA, D.; INABA, J.; CLARINDO LOPES, L.; CALAÇA, G. N.; LOS WEINERT, P.; LENZI FOGAÇA, R.; FERREIRA DE MOURA, J.; MAGALHÃES ALVARENGA, L.; CAVALCANTE DE FIGUEIREDO, B.; WOHNATH, K.; ANDRADE PESSÔA, C. Label-free impedimetric immunosensor based on arginine-functionalized gold nanoparticles for detection of DHEAS, a biomarker of pediatric adrenocortical carcinoma. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 133, p. 86–93, 2019. DOI: 10.1016/j.bios.2019.02.063.

LIN, Y. Y.; LIU, G.; WAI, C. M.; LIN, Y. Magnetic beads-based bioelectrochemical immunoassay of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Electrochemistry Communications*, v. 9, n. 7, p. 1547–1552, 2007. DOI: 10.1016/j.elecom.2007.02.007.

LIU, W.; LIU, L.; KOU, G.; ZHENG, Y.; DING, Y.; NI, W.; WANG, Q.; TAN, L.; WU, W.; TANG, S.; XIONG, Z.; ZHENG, S. Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based enzyme-linked immunosorbent assays for detecting antibodies against SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 58, n. 6, 2020. DOI: 10.1128/JCM.00461-20.

LIU, X.; WANG, J.; XU, X.; LIAO, G.; CHEN, Y.; HU, C. H. Patterns of IgG and IgM antibody response in COVID-19 patients. *Emerging Microbes and Infections*, v. 9, n. 1, p. 1269–1274, 2020. DOI: 10.1080/22221751.2020.1773324.

LIU, Y.; YU, J. Oriented immobilization of proteins on solid supports for use in biosensors and biochips: a review. *Microchimica Acta*, v. 183, n. 1, p. 1–19, 2016. DOI: 10.1007/s00604-015-1623-4.

LONG, Q.-X.; LIU, B.-Z.; DENG, H.-J.; WU, G.-C.; DENG, K.; CHEN, Y.-K.; LIAO, P.; QIU, J.-F.; LIN, Y.; CAI, X.-F.; WANG, D.-Q.; HU, Y.; REN, J.-H.; TANG, N.; XU, Y.-Y.; YU, L.-H.; MO, Z.; GONG, F.; ZHANG, X.-L.; ... HUANG, A.-L. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nature Medicine*, v. 26, n. 6, p. 845–848, 2020. DOI: 10.1038/s41591-020-0897-1.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Electrochemical sensors: Fundamentals and applications in microenvironments. *Quimica Nova*, v. 29, n. 6, p. 1318–1325, 2006. DOI: 10.1590/s0100-40422006000600029.

LU, R.; WANG, J.; LI, M.; WANG, Y.; DONG, J.; CAI, W. SARS-CoV-2 detection using digital PCR for COVID-19 diagnosis, treatment monitoring and criteria for discharge. medRxiv, 2020. DOI: 10.1101/2020.03.24.20042689.

LU, R.; ZHAO, X.; LI, J.; NIU, P.; YANG, B.; WU, H.; WANG, W.; SONG, H.; HUANG, B.; ZHU, N.; BI, Y.; MA, X.; ZHAN, F.; WANG, L.; HU, T.; ZHOU, H.; HU, Z.; ZHOU, W.; ZHAO, L.; ... TAN, W. G. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, v. 395, n. 10224, p. 565–574, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.

MAHARI, S.; ROBERTS, A.; SHAHDEO, D.; GANDHI, S. Ecovsens-ultrasensitive novel in-house built printed circuit board based electrochemical device for rapid detection of nCovid-19 antigen, a spike protein domain 1 of SARS-CoV-2. *bioRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.04.24.059204.

MAITY, A.; SUI, X.; JIN, B.; PU, H.; BOTTUM, K. J.; HUANG, X.; CHANG, J.; ZHOU, G.; LU, G.; CHEN, J. Resonance-Frequency Modulation for Rapid, Point-of-Care Ebola-Glycoprotein Diagnosis with a Graphene-Based Field-Effect Biotransistor. *Analytical Chemistry*, v. 90, n. 24, p. 14230–14238, 2018. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b03226.

MARQUEZ, L. A.; DUNFORD, H. B. Mechanism of the oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine by myeloperoxidase determined by transient- and steady-state kinetics. *Biochemistry*, v. 36, n. 31, p. 9349–9355, 1997. DOI: 10.1021/bi970595j.

MAT ZAID, M. H.; ABDULLAH, J.; YUSOF, N. A.; SULAIMAN, Y.; WASOH, H.; MD NOH, M. F.; ISSA, R. PNA biosensor based on reduced graphene oxide/water soluble quantum dots for the detection of Mycobacterium tuberculosis. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 241, p. 1024–1034, 2017. DOI: 10.1016/j.snb.2016.10.045.

MAVRIKOU, S.; MOSCHOPOULOU, G.; ZAFEIRAKIS, A.; KALOGEROPOULOU, K.; GIANNAKOS, G.; SKEVIS, A.; KINTZIOS, S. An ultra-rapid biosensory point-of-care (POC) assay for prostate-specific antigen (PSA) detection in human serum. *Sensors (Switzerland)*, v. 18, n. 11, p. 1–14, 2018. DOI: 10.3390/s18113834.

MEDEIROS, E.; OLIVEIRA, J.; CONSOLIN-FILHO, N.; PATERNO, L. Uso de Polímeros Condutores em Sensores. Parte 3: Biosensores. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 7, n. 3, p. 144–158, 2012.

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*, v. 240, p. 123211, 2022. DOI: 10.1016/j.talanta.2022.123211.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. *Analytical Sciences*, v. 20, n. 8, p. 1113–1126, 2004. DOI: 10.2116/analsci.20.1113.

METROHM. Metrohm Dropsens. Disponível em <[https://www.dropsens.com/en/screen\\_printed\\_electrodes\\_pag.html](https://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html)>. Acessado em 2/8/2021.

MINCU, N. B.; LAZAR, V.; STAN, D.; MIHAILESCU, C. M.; IOSUB, R.; MATEESCU, A. L. Screen-Printed Electrodes (SPE) for in vitro diagnostic purpose. *Diagnostics*, v. 10, n. 8, p. 1–21, 2020. DOI: 10.3390/diagnostics10080517.

MISTRY, K. K.; LAYEK, K.; MAHAPATRA, A.; ROYCHAUDHURI, C.; SAHA, H. A review on amperometric-type immunosensors based on screen-printed electrodes. *Analyst*, v. 139, n. 10, p. 2289–2311, 2014. DOI: 10.1039/c3an02050a.

MOJARRADI, H. Coupling of substances containing a primary amine to hyaluronan via carbodiimide-mediated amidation. 1a. Uppsala, Uppsala University Publications, 2011, 49 p.

MOLLARASOULI, F.; KURBANOGLU, S.; OZKAN, S. A. The role of electrochemical immunosensors in clinical analysis. *Biosensors*, v. 9, n. 3, p. 1–19, 2019. DOI: 10.3390/bios9030086.

MORALES, M. A.; HALPERN, J. M. Guide to Selecting a Biorecognition Element for Biosensors. *Bioconjugate Chemistry*, v. 29, n. 10, p. 3231–3239, 2018. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00592.

MUSZYNSKI, R.; SEGER, B.; KAMAT, P. V. Decorating graphene sheets with gold nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 112, n. 14, p. 5263–5266, 2008. DOI: 10.1021/jp800977b.

NAEBE, M.; WANG, J.; AMINI, A.; KHAYYAM, H.; HAMEED, N.; LI, L. H.; CHEN, Y.; FOX, B. Mechanical Property and Structure of Covalent Functionalised Graphene/Epoxy Nanocomposites. *Scientific Reports*, v. 4, p. 1–7, 2014. DOI: 10.1038/srep04375.

NAKAJIMA, N.; IKADA, Y. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. *Bioconjugate Chemistry*, v. 6, n. 1, p. 123–130, 1995. DOI: 10.1021/bc00031a015.

NAWAZ, M. H.; HAYAT, A.; CATANANTE, G.; LATIF, U.; MARTY, J. L. Development of a portable and disposable NS1 based electrochemical immunosensor for early diagnosis of dengue virus. *Analytica Chimica Acta*, v. 1026, p. 1–7, 2018. DOI: 10.1016/j.aca.2018.04.032.

NGUNJIRI, J. N.; STARK, D. J.; TIAN, T.; BRIGGMAN, K. A.; GARNO, J. C. Immobilization of proteins on carboxylic acid functionalized nanopatterns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 405, n. 6, p. 1985–1993, 2013. DOI: 10.1007/s00216-012-6621-3.

NIDZWORSKI, D.; SIUZDAK, K.; NIEDZIAŁKOWSKI, P.; BOGDANOWICZ, R.; SOBASZEK, M.; RYL, J.; WEIHER, P.; SAWCZAK, M.; WNUK, E.; GODDARD, W. A.; JARAMILLO-BOTERO, A.; OSSOWSKI, T. A rapid-response ultrasensitive biosensor for influenza virus detection using antibody modified boron-doped diamond. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-15806-7.

NIYOGI, S.; BEKYAROVA, E.; ITKIS, M. E.; MCWILLIAMS, J. L.; HAMON, M. A.; HADDON, R. C. Solution properties of graphite and graphene. *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 24, p. 7720–7721, 2006. DOI: 10.1021/ja060680r.

OCAÑA, C.; HAYAT, A.; MISHRA, R. K.; VASILESCU, A.; DEL VALLE, M.;



MARTY, J. L. Label free aptasensor for Lysozyme detection: A comparison of the analytical performance of two aptamers. *Bioelectrochemistry*, v. 105, p. 72–77, 2015. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2015.05.009.

OMS. Archived: WHO Timeline - COVID-19. Disponível em <<https://www.who.int/news/item/27-04-2020-who-timeline---covid-19>>. Acessado em 4/11/2021.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K. De; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias : Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos Abstract : The present work presents a simple and didactic approach regarding some Voltametrias : Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. *Revista Virtual de Química*, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PANINI, N. V.; MESSINA, G. A.; SALINAS, E.; FERNÁNDEZ, H.; RABA, J. Integrated microfluidic systems with an immunosensor modified with carbon nanotubes for detection of prostate specific antigen (PSA) in human serum samples. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 23, n. 7, p. 1145–1151, 2008. DOI: 10.1016/j.bios.2007.11.003.

PARK, B. W.; YOON, D. Y.; KIM, D. S. Recent progress in bio-sensing techniques with encapsulated enzymes. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 26, n. 1, p. 1–10, 2010. DOI: 10.1016/j.bios.2010.04.033.

PARK, K. W.; JUNG, J. H. Spectroscopic and electrochemical characteristics of a carboxylated graphene-ZnO composites. *Journal of Power Sources*, v. 199, p. 379–385, 2012. DOI: 10.1016/j.jpowsour.2011.10.016.

PASAKON, P.; MENSING, J. P.; PHOKARATKUL, D.; KARUWAN, C.; LOMAS, T.; WISITSORAAT, A.; TUANTRANONT, A. A high-performance, disposable screen-printed carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes/graphene for ultratrace level electrochemical sensors. *Journal of Applied Electrochemistry*, v. 49, n. 2, p. 217–227, 2019. DOI: 10.1007/s10800-018-1268-1.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. D. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova*, v. 25, n. 6 A, p. 1012–1021, 2002. DOI: 10.1590/s0100-40422002000600019.

PÉREZ-FERNÁNDEZ, B.; MERCADER, J. V.; ABAD-FUENTES, A.; CHECA-ORREGO, B. I.; COSTA-GARCÍA, A.; ESCOSURA-MUÑIZ, A. de la. Direct competitive immunosensor for Imidacloprid pesticide detection on gold nanoparticle-modified electrodes. *Talanta*, v. 209, n. 120465, p. 120465, 2020. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.120465.

POHANKA, M.; SKLÁDAL, P. Electrochemical biosensors - Principles and applications. *Journal of Applied Biomedicine*, v. 6, n. 2, p. 57–64, 2008. DOI: 10.32725/jab.2008.008.

POUYANI, T.; PRESTWICH, G. D. Functionalized Derivatives of Hyaluronic Acid Oligosaccharides: Drug Carriers and Novel Biomaterials. *Bioconjugate Chemistry*, v. 5, n. 4, p. 339–347, 1994. DOI: 10.1021/bc00028a010.

RAMANA, A.; BAIG, N.; SALEH, T. A. Electrochemically pretreated carbon electrodes and their electroanalytical applications – A review. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 833, p. 313–332, 2019. DOI: 10.1016/j.jelechem.2018.12.019.

RAO, C. N. R.; PRAMODA, K.; KUMAR, R. Covalent cross-linking as a strategy to generate novel materials based on layered (2D) and other low D structures. *Chemical Communications*, v. 53, n. 73, p. 10093–10107, 2017. DOI: 10.1039/c7cc05390h.

RAUF, S.; MISHRA, G. K.; AZHAR, J.; MISHRA, R. K.; GOUD, K. Y.; NAWAZ, M. A. H.; MARTY, J. L.; HAYAT, A. Carboxylic group riched graphene oxide based disposable electrochemical immunosensor for cancer biomarker detection. *Analytical Biochemistry*, v. 545, p. 13–19, 2018. DOI: 10.1016/j.ab.2018.01.007.

RAVINA; MOHAN, H.; GILL, P. S.; KUMAR, A. Hemagglutinin gene based biosensor for early detection of swine flu (H1N1) infection in human. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 130, p. 720–726, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.149.

RENHONG, Y.; YUANYUAN, Z.; YANING, L.; LU, X.; YINGYING, G.; QIANG, Z. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, v. 367, n. 6485, p. 1444–1448, 2020.

RICCARDI, C. S.; DA COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Amperometric immunosensor. *Quimica Nova*, v. 25, n. 2, p. 316–320, 2002. DOI: 10.1590/s0100-40422002000200020.

RICCI, F.; VOLPE, G.; MICHELI, L.; PALLESCHI, G. A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Analytica Chimica Acta*, v. 605, n. 2, p. 111–129, 2007. DOI: 10.1016/j.aca.2007.10.046.

ROCHA, C. G.; FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Label-free impedimetric immunosensor for detection of the textile azo dye Disperse Red 1 in treated water. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 236, p. 52–59, 2016. DOI: 10.1016/j.snb.2016.05.040.

RODRIGUES, L. P. Desenvolvimento, caracterização e aplicação da matriz FTO/Poli(3-Aminofenol) na detecção de marcador de lesão cardíaca por fotoluminescência de quantum dots. *Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação do Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil. 2011.*

ROHOM, A. B.; LONDHE, P. U.; CHAURE, N. B. Rapid Thermal Processed CuInSe 2 Layers Prepared by Electrochemical Route for Photovoltaic Applications. *Journal of The Electrochemical Society*, v. 165, n. 4, p. H3051–H3060, 2018. DOI: 10.1149/2.0081804jes.

SADIQUE, M. A.; YADAV, S.; RANJAN, P.; KHAN, R.; KHAN, F.; KUMAR, A.; BISWAS, D. Highly Sensitive Electrochemical Immunosensor Platforms for Dual Detection of SARS-CoV-2 Antigen and Antibody based on Gold Nanoparticle Functionalized Graphene Oxide Nanocomposites. *ACS Applied Bio Materials*, v. 5, n. 5, p. 2421–2430, 2022. DOI: 10.1021/acsabm.2c00301.

SAMPER, I. C.; ANA, S.; KHAMCHAROEN, W.; JANG, I.; SIANGPROH, W.;

BALDRICH, E.; GEISS, B. J.; DANDY, D. S.; HENRY, C. S. Electrochemical Capillary-Flow Immunoassay for Detecting Anti- SARS-CoV - 2 Nucleocapsid Protein Antibodies at the Point of Care. 2021. DOI: 10.1021/acssensors.1c01527.

SHAN, C.; YANG, H.; HAN, D.; ZHANG, Q.; IVASKA, A.; NIU, L. Water-soluble graphene covalently functionalized by biocompatible poly-L-lysine. *Langmuir*, v. 25, n. 20, p. 12030–12033, 2009. DOI: 10.1021/la903265p.

SHAO, G.; LIU, P.; ZHANG, K.; LI, W.; CHEN, X.; MA, F. Mechanical properties of graphene nanoplates reinforced copper matrix composites prepared by electrostatic self-assembly and spark plasma sintering. *Materials Science and Engineering A*, v. 739, n. October 2018, p. 329–334, 2019. DOI: 10.1016/j.msea.2018.10.067.

SHEIKHI, K.; SHIRZADFAR, H.; SHEIKHI, M. A Review on Novel Coronavirus ( Covid-19 ): Symptoms , Transmission and Diagnosis Tests Research in Infectious Diseases and Tropical Medicine A Review on Novel Coronavirus ( Covid-19 ): Symptoms , Transmission and Diagnosis Tests. *Research in Infectious Diseases and Tropical Medicine*, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2020.

SKLADAL, P. Advances in Electrochemical Immunosensors. *Electroanalysis*, v. 9, n. 10, p. 737–745, 1997. DOI: 10.1002/ELAN.1140091002.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; WEST, D. *Fundamentos de Química Analítica*. 1a ed. (8ª ed americana), São Paulo, Thomson Learning Ltda., 2006

STANKOVIĆ, V.; ĐURĐIĆ, S.; OGNJANOVIĆ, M.; ANTIĆ, B.; KALCHER, K.; MUTIĆ, J.; STANKOVIĆ, D. M. Anti-human albumin monoclonal antibody immobilized on EDC-NHS functionalized carboxylic graphene/AuNPs composite as promising electrochemical HSA immunosensor. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 860, p. 1–7, 2020. DOI: 10.1016/j.jelechem.2020.113928.

STANKOVICH, S.; DIKIN, D. A.; DOMMETT, G. H. B.; KOHLHAAS, K. M.; ZIMNEY, E. J.; STACH, E. A.; PINER, R. D.; NGUYEN, S. B. T.; RUOFF, R. S. Graphene-based composite materials. *Nature*, v. 442, n. 7100, p. 282–286, 2006. DOI: 10.1038/nature04969.

TALIB, N. A. A.; SALAM, F.; SULAIMAN, Y. Development of highly sensitive immunosensor for clenbuterol detection by using poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/graphene oxide modified screen-printed carbon electrode. *Sensors (Switzerland)*, v. 18, n. 4324, p. 1–13, 2018. DOI: 10.3390/s18124324.

TAVAKOLI, F.; SALAVATI-NIASARI, M.; BADIEI, A.; MOHANDÉS, F. Green synthesis and characterization of graphene nanosheets. *Materials Research Bulletin*, v. 63, p. 51–57, 2015. DOI: 10.1016/j.materresbull.2014.11.045.

THUNKHAMRAK, C.; CHUNTIB, P.; OUNNUNKAD, K.; BANET, P.; AUBERT, P. H.; SAIANAND, G.; GOPALAN, A. I.; JAKMUNEE, J. Highly sensitive voltammetric immunosensor for the detection of prostate specific antigen based on silver nanoprobe assisted graphene oxide modified screen printed carbon electrode. *Talanta*, v. 208, n. 120389, p. 1–9, 2020. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.120389.

TO, K. K.-W.; TSANG, O. T.-Y.; LEUNG, W.-S.; TAM, A. R.; WU, T.-C.; LUNG, D. C.; YIP, C. C.-Y.; CAI, J.-P.; CHAN, J. M.-C.; CHIK, T. S.-H.; LAU, D. P.-L.; CHOI, C. Y.-C.; CHEN, L.-L.; CHAN, W.-M.; CHAN, K.-H.; IP, J. D.; NG, A. C.-K.; POON, R. W.-S.; LUO, C.-T.; ... YUEN, K.-Y. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 20, n. 5, p. 565–574, 2020. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1.

TO, K. K. W.; TSANG, O. T. Y.; LEUNG, W. S.; TAM, A. R.; WU, T. C.; LUNG, D. C.; YIP, C. C. Y.; CAI, J. P.; CHAN, J. M. C.; CHIK, T. S. H.; LAU, D. P. L.; CHOI, C. Y. C.; CHEN, L. L.; CHAN, W. M.; CHAN, K. H.; IP, J. D.; NG, A. C. K.; POON, R. W. S.; LUO, C. T.; ... YUEN, K. Y. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 20, n. 5, p. 565–574, 2020. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. *MicroBiologia*. 12a ed. Porto Alegre, artmed, 2017, 935 p.

TSAI, J. Z.; CHEN, C. J.; SETTU, K.; LIN, Y. F.; CHEN, C. L.; LIU, J. T. Screen-printed carbon electrode-based electrochemical immunosensor for rapid detection of microalbuminuria. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 77, p. 1175–1182, 2016. DOI: 10.1016/j.bios.2015.11.002.

URBAN, P. L.; GOODALL, D. M.; BRUCE, N. C. Enzymatic microreactors in chemical analysis and kinetic studies. *Biotechnology Advances*, v. 24, n. 1, p. 42–57, 2006. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2005.06.001.

UZUNIAN, A. Coronavirus SARS-CoV-2 and Covid-19. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 56, p. 1–4, 2020. DOI: 10.5935/1676-2444.20200053.

VADLAMANI, B. S.; UPPAL, T.; VERMA, S. C.; MISRA, M. Functionalized TiO<sub>2</sub> nanotube-based electrochemical biosensor for rapid detection of SARS-CoV-2. *Sensors*, v. 20, n. 5871, p. 1–10, 2020. DOI: 10.1101/2020.09.07.20190173.

VASHIST, S. K. Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Based Strategies to Crosslink Antibodies on Amine-Functionalized Platforms for Immunodiagnostic Applications. *Diagnostics*, v. 2, n. 3, p. 23–33, 2012. DOI: 10.3390/diagnostics2030023.

VASILE, E.; PANDELE, A. M.; ANDRONESCU, C.; SELARU, A.; DINESCU, S.; COSTACHE, M.; HANGANU, A.; RAICOPOL, M. D.; TEODORESCU, M. Hema-Functionalized Graphene Oxide: a Versatile Nanofiller for Poly(Propylene Fumarate)-Based Hybrid Materials. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 18685, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-55081-2.

VOLPE, G.; COMPAGNONE, D.; DRAISCI, R.; PALLESCHI, G. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as electrochemical substrate for horseradish peroxidase based enzyme immunoassays. A comparative study. *Analyst*, v. 123, n. 6, p. 1303–1307, 1998. DOI: 10.1039/a800255j.

WANG, L.; HUA, E.; LIANG, M.; MA, C.; LIU, Z.; SHENG, S.; LIU, M.; XIE, G.; FENG, W. Graphene sheets, polyaniline and AuNPs based DNA sensor for electrochemical determination of BCR/ABL fusion gene with functional hairpin probe. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 51, p. 201–207, 2014. DOI: 10.1016/j.bios.2013.07.049.

WANG, W.; XU, Y.; GAO, R.; LU, R.; KAI, H.; WU, G.; TAN, W. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, v. 323, n. 11, p. 1061–1069, 2020. DOI: 10.1001/jama.2020.1585.

WECHSELBERGER, C.; SÜSSNER, S.; DOPPLER, S.; BERNHARD, D. Performance evaluation of serological assays to determine the immunoglobulin status in SARS-CoV-2 infected patients. *Journal of Clinical Virology*, v. 131, n. 104589, p. 1–5, 2020. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104589.

WEI, H.; SUN, J. J.; XIE, Y.; LIN, C. G.; WANG, Y. M.; YIN, W. H.; CHEN, G. N. Enhanced electrochemical performance at screen-printed carbon electrodes by a new pretreating procedure. *Analytica Chimica Acta*, v. 588, n. 2, p. 297–303, 2007. DOI: 10.1016/j.aca.2007.02.006.

WELCH, N. G.; SCOBLE, J. A.; MUIR, B. W.; PIGRAM, P. J. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review). *Biointerphases*, v. 12, n. 2, p. 02D301, 2017. DOI: 10.1116/1.4978435.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; WONG, B. H. L.; TSOI, H. W.; FUNG, A. M. Y.; KAO, R. Y. T.; CHAN, K. H.; PEIRIS, J. S. M.; YUEN, K. Y. Differential sensitivities of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus spike polypeptide enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and SARS coronavirus nucleocapsid protein ELISA for serodiagnosis of SARS coronavirus pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 7, p. 3054–3058, 2005. DOI: 10.1128/JCM.43.7.3054-3058.2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Disponível em <<https://covid19.who.int/>>. Acessado em 24/1/2023.

WU, F.; ZHAO, S.; YU, B.; CHEN, Y. M.; WANG, W.; SONG, Z. G.; HU, Y.; TAO, Z. W.; TIAN, J. H.; PEI, Y. Y.; YUAN, M. L.; ZHANG, Y. L.; DAI, F. H.; LIU, Y.; WANG, Q. M.; ZHENG, J. J.; XU, L.; HOLMES, E. C.; ZHANG, Y. Z. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2008-3.

WU, Y.; ZHENG, J.; LI, Z.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y. A novel reagentless amperometric immunosensor based on gold nanoparticles/TMB/Nafion-modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 5, p. 1389–1393, 2009. DOI: 10.1016/j.bios.2008.07.075.

XIE, L. X. Interpretation of the 7th edition of the “diagnosis and treatment guidelines of coronavirus disease 2019 in China”: Progress and challenges. *Chronic Diseases and Translational Medicine*, v. 6, n. 2, p. 75–78, 2020. DOI: 10.1016/j.cdtm.2020.04.001.

XU, Y.; BAI, H.; LU, G.; LI, C.; SHI, G. Flexible graphene films via the filtration of water-soluble noncovalent functionalized graphene sheets. *Journal of the American*

Chemical Society, v. 130, n. 18, p. 5856–5857, 2008. DOI: 10.1021/ja800745y.

YU, H.; SUN, B.; FANG, Z.; ZHAO, J.; LIU, X.; LI, Y.; SUN, X.; LIANG, H.; ZHONG, B.; HUANG, Z.; ZHENG, P.; TIAN, L.; QU, H.-Q.; LIU, D.; WANG, E.; XIAO, X.; LI, S.; YE, F.; GUAN, L.; ... ZHONG, N. Distinct features of SARS-CoV-2-specific IgA response in COVID-19 patients. *European Respiratory Journal*, v. 56, n. 2, p. 2001526, 2020. DOI: 10.1183/13993003.01526-2020.

YU, P.; ZHU, J.; ZHANG, Z.; HAN, Y. A familial cluster of infection associated with the 2019 novel coronavirus indicating possible person-to-person transmission during the incubation period. *Journal of Infectious Diseases*, v. 221, n. 11, p. 1757–1761, 2020. DOI: 10.1093/infdis/jiaa077.

YUN, D. H.; SONG, M. J.; HONG, S. I.; KANG, M. S.; MIN, N. K. Highly sensitive and renewable amperometric urea sensor based on self-assembled monolayer using porous silicon substrate. *Journal of the Korean Physical Society*, v. 47, p. 445–449, 2005.

ZHANG, S.; DU, P.; LI, F. Detection of prostate specific antigen with 3,4-diaminobenzoic acid (DBA)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HRP voltammetric enzyme-linked immunoassay system. *Talanta*, v. 72, n. 4, p. 1487–1493, 2007. DOI: 10.1016/j.talanta.2007.01.063.

ZHANG, W.; DU, R. H.; LI, B.; ZHENG, X. S.; YANG, X. Lou; HU, B.; WANG, Y. Y.; XIAO, G. F.; YAN, B.; SHI, Z. L.; ZHOU, P. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerging Microbes and Infections*, v. 9, n. 1, p. 386–389, 2020. DOI: 10.1080/22221751.2020.1729071.

ZHAO, J.; YUAN, Q.; WANG, H.; LIU, W.; LIAO, X.; SU, Y.; WANG, X.; YUAN, J.; LI, T.; LI, J.; QIAN, S.; HONG, C.; WANG, F.; LIU, Y.; WANG, Z.; HE, Q.; LI, Z.; HE, B.; ZHANG, T.; ... ZHANG, Z. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients with Novel Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*, v. 71, n. 16, p. 2027–2034, 2020. DOI: 10.1093/cid/ciaa344.

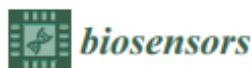
ZHOU, P.; YANG, X. L.; WANG, X. G.; HU, B.; ZHANG, L.; ZHANG, W.; SI, H. R.; ZHU, Y.; LI, B.; HUANG, C. L.; CHEN, H. D.; CHEN, J.; LUO, Y.; GUO, H.; JIANG, R. Di; LIU, M. Q.; CHEN, Y.; SHEN, X. R.; WANG, X.; ... SHI, Z. L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.

ZHOU, S.; WANG, Y.; ZHU, T.; XIA, L. CT features of coronavirus disease 2019 (COVID-19) pneumonia in 62 patients in Wuhan, China. *American Journal of Roentgenology*, v. 214, n. 6, p. 1287–1294, 2020. DOI: 10.2214/AJR.20.22975.

ZHU, N.; ZHANG, D.; WANG, W.; LI, X.; YANG, B.; SONG, J.; ZHAO, X.; HUANG, B.; SHI, W.; LU, R.; NIU, P.; ZHAN, F.; MA, X.; WANG, D.; XU, W.; WU, G.; GAO, G. F.; TAN, W. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, v. 382, n. 8, p. 727–733, 2020. DOI: 10.1056/nejmoa2001017.

# ANEXOS

## Anexo 1. An Electrochemical Immunosensor Based on Carboxylated Graphene/SPCE for IgG-SARS-CoV-2 Nucleocapsid Determination



Article

### An Electrochemical Immunosensor Based on Carboxylated Graphene/SPCE for IgG-SARS-CoV-2 Nucleocapsid Determination

Luciana de Souza Freire <sup>1,†</sup>, Camila Macena Ruzo <sup>1,†</sup>, Bárbara Batista Salgado <sup>2</sup>, Ariamna María Dip Gandarilla <sup>1</sup>, Yonny Romaguera-Barcelay <sup>1,3</sup>, Ana P. M. Tavares <sup>3</sup>, Maria Goreti Ferreira Sales <sup>3</sup>, Isabelle Cordeiro <sup>4</sup>, Jaila Dias Borges Lalwani <sup>5</sup>, Robert Matos <sup>6</sup>, Henrique Fonseca Filho <sup>7</sup>, Spartaco Astolfi-Filho <sup>1,8</sup>, Ștefan Țălu <sup>9</sup>, Pritesh Lalwani <sup>2</sup> and Walter Ricardo Brito <sup>1,8,\*</sup>

- <sup>1</sup> Department of Chemistry, Institute of Exact Sciences, Federal University of Amazonas, Manaus 69067-005, AM, Brazil
- <sup>2</sup> Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fiocruz Amazônia, Manaus 69067-005, AM, Brazil
- <sup>3</sup> BioMark@UC, Department of Chemical Engineering, Faculty of Sciences and Technology, University of Coimbra, 3030-790 Coimbra, Portugal
- <sup>4</sup> Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, Federal University of Amazonas, Manaus 69067-005, AM, Brazil
- <sup>5</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Amazonas, Manaus 69067-005, AM, Brazil
- <sup>6</sup> Amazonian Materials Group, Federal University of Amapá (UNIFAP), Macapá 49100-000, AP, Brazil
- <sup>7</sup> Laboratory of Nanomaterials Synthesis and Nanoscopy (LSNN), Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus 69067-005, AM, Brazil
- <sup>8</sup> PPGBIOTEC, Federal University of Amazonas, Manaus 69067-005, AM, Brazil
- <sup>9</sup> The Directorate of Research, Development and Innovation Management (DMCDE), The Technical University of Cluj-Napoca, Constantin Daicoviciu Street, No. 15, 400020 Cluj-Napoca, Romania
- \* Correspondence: wbrito@ufam.edu.br; Tel.: +55-92981379920
- † These authors contributed equally to this work.



**Citation:** de Souza Freire, L.; Ruzo, C.M.; Salgado, B.B.; Gandarilla, A.M.D.; Romaguera-Barcelay, Y.; Tavares, A.P.M.; Sales, M.G.F.; Condeiro, I.; Lalwani, J.D.B.; Matos, R.; et al. An Electrochemical Immunosensor Based on Carboxylated Graphene/SPCE for IgG-SARS-CoV-2 Nucleocapsid Determination. *Biosensors* **2022**, *12*, 1161. <https://doi.org/10.3390/bios12121161>

Received: 24 October 2022  
Accepted: 4 December 2022  
Published: 13 December 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The COVID-19 pandemic has emphasized the importance and urgent need for rapid and accurate diagnostic tests for detecting and screening this infection. Our proposal was to develop a biosensor based on an ELISA immunoassay for monitoring antibodies against SARS-CoV-2 in human serum samples. The nucleocapsid protein (N protein) from SARS-CoV-2 was employed as a specific receptor for the detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid immunoglobulin G. N protein was immobilized on the surface of a screen-printed carbon electrode (SPCE) modified with carboxylated graphene (CG). The percentage of IgG-SARS-CoV-2 nucleocapsid present was quantified using a secondary antibody labeled with horseradish peroxidase (HRP) (anti-IgG-HRP) catalyzed using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) mediator by chronoamperometry. A linear response was obtained in the range of 1:1000–1:200 v/v in phosphate buffer solution (PBS), and the detection limit calculated was 1:4947 v/v. The chronoamperometric method showed electrical signals directly proportional to antibody concentrations due to antigen-antibody (Ag-Ab) specific and stable binding reaction.

**Keywords:** immunosensor; SARS-CoV-2; N protein

#### 1. Introduction

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) began in late 2019, and it has affected billions of people worldwide [1]. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is the third species of betacoronavirus to cause outbreaks in recent decades and the first species to generate a high number of infections and deaths resulting from the effects of the disease worldwide [2].

SARS-CoV-2 has spike (S), membrane (M), envelope (E), and nucleocapsid (N) proteins in its structure. The N protein is the most abundant protein in the coronavirus. It is a highly