

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JEFERSON LUIZ GOGOLA

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES DE DOENÇAS ENDÊMICAS  
UTILIZANDO NANOMATERIAIS COMO PLATAFORMA DE ANCORAMENTO

CURITIBA

2022

JEFERSON LUIZ GOGOLA

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES DE DOENÇAS ENDÊMICAS  
UTILIZANDO NANOMATERIAIS COMO PLATAFORMA DE ANCORAMENTO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.

Admissão em fevereiro de 2018.

Orientador: Prof. Dr. Luiz H. Marcolino  
Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Márcio Fernando  
Bergamini

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Gogola, Jeferson Luiz.

Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para quantificação de biomarcadores de doenças endêmicas utilizando nanomateriais como plataforma de ancoramento. / Jeferson Luiz Gogola. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz H. Marcolino Júnior.

Coorientador: Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini.

1. Química. 2. Biossensores. 3. Biomarcadores. 4. Doenças. I. Marcolino Júnior, Luiz H. II. Bergamini, Márcio Fernando. III. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Bibliotecário: Nilson Carlos Vieira Junior CRB-9/1797



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -  
40001016026P2

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **JEFERSON LUIZ GOGOLA** intitulada: **Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para quantificação de biomarcadores de doenças endêmicas utilizando nanomateriais como plataforma de ancoramento**, sob orientação do Prof. Dr. LUIZ HUMBERTO MARCOLINO JUNIOR, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Julho de 2022.

Assinatura Eletrônica

01/08/2022 09:53:29.0

LUIZ HUMBERTO MARCOLINO JUNIOR

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

05/08/2022 14:01:14.0

LUCAS BLANES

Avaliador Externo (FIOCRUZ - PARANÁ - INSTITUTO CARLOS  
CHAGAS)

Assinatura Eletrônica

30/07/2022 14:55:10.0

GILBERTO ABATE

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

29/07/2022 19:17:39.0

FREDERICO LUIS FELIPE SOARES

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

01/08/2022 08:31:52.0

FABIO ROBERTO CAETANO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

---

CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-3006 - E-mail: cpgquim@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 210685

**Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 210685**

**Aos meus pais e meu irmão.**

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus orientadores Prof. Luiz Humberto Marcolino Jr e Prof. Márcio Fernando Bergamini pela orientação desde a iniciação científica e pela oportunidade de desenvolver este trabalho, que foi um desafio em conjunto que me fez evoluir tanto como pessoa quanto como pesquisador.

Aos professores Dênio Emanuel Pires Souto, Bruno Campos Janegitz e Paulo Raymundo Pereira pelas contribuições no exame de qualificação.

Aos professores Dr. Frederico Luis Felipe Soares e Dr. Gilberto Abate, ao Dr. Fabio Roberto Caetano e Dr. Lucas Blanes membros desta banca.

Ao Gustavo Martins, pela amizade e pela força imensa principalmente no ano final de Doutorado.

À CAPES e CNPq pela bolsa concedida.

À Universidade Federal do Paraná, por toda a estrutura e ambiente de desenvolvimento da ciência no Brasil.

A todos os amigos feitos em todos esses anos no LabSense e que eu vou levar para a vida, que todo esse caminho não teria a menor graça se não fosse pela companhia de todos.

À minha mãe por todo o suporte e estabilidade que ela sempre lutou para eu ter, e pelo caráter que ela ajudou a construir.

Obrigado.

## RESUMO

Biossensores se tornaram ferramentas importantes na química analítica, e as aplicações na determinação de biomarcadores de doenças tem chamado atenção pela importância da aplicação e compatibilidade com as técnicas eletroquímicas. Com o avanço do conhecimento sobre o sistema imune, caracterização e produção de biomoléculas, foram desenvolvidos proteínas recombinantes, peptídeos e aptâmeros, que são utilizados como substitutos de estruturas importantes para a construção de biossensores, como antígeno ou anticorpo. Esses materiais são mais acessíveis e facilitam a formação da camada seletiva em biossensores, principalmente quando aliados a nanopartículas. As nanopartículas apresentam diversas vantagens quando aplicados em sensores, como alta área superficial, funcionalização e versatilidade no desenvolvimento de métodos. Assim, o presente projeto explora a aplicabilidade de nanopartículas de ouro e de carbono no desenvolvimento de biossensores para quantificar biomarcadores do AIDS e Covid-19. A quantificação da p24 do HIV foi alcançada através do desenvolvimento de um eletrodo modificado com grafeno *quantum dots* e aptâmeros que tem afinidade pela proteína alvo. As nanopartículas foram eletrodepositadas no eletrodo e a camada seletiva formada através da ligação covalente entre o aptâmero e as nanopartículas. O eletrodo apresentou alta seletividade, uma região linear entre  $0,93 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $93 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , com uma sensibilidade de  $1,293 \text{ } \mu\text{A dec}^{-1}$  e limite de quantificação de  $930 \text{ pg mL}^{-1}$ . O aptassensor foi aplicado na diferenciação de amostras de soro negativas e fortificadas com a p24-HIV, mostrando aplicabilidade em condições reais de diagnóstico. Já a quantificação de anticorpos anti-proteína S do SARS-CoV-2 foi alcançada através da modificação de nanopartículas de ouro com peptídeos que simula um fragmento da proteína S. A modificação da nanopartícula melhorou a interação com o eletrodo e permitiu a adsorção das nanopartículas para a formação da camada seletiva. O eletrodo respondeu linearmente para concentrações de anticorpo entre  $15 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $75 \text{ ng mL}^{-1}$ , com uma sensibilidade de  $1,059 \text{ } \mu\text{A dec}^{-1}$  e limite de quantificação de  $75 \text{ ng mL}^{-1}$ . O sensor foi aplicado em amostras de soro negativas e fortificadas, apresentando um desvio do esperado em matrizes complexas, mas mostrando alta potencialidade através de um método de construção simples.

Palavras-chave: eletroquímica; biossensor; imunossensor; química analítica.

## ABSTRACT

Biosensors have become important tools in analytical chemistry, and applications in the determination of disease biomarkers have drawn attention due to the importance of application and compatibility with electrochemical techniques. With the advancement of knowledge about the immune system, characterization and production of biomolecules, recombinant proteins, peptides and aptamers were developed, which are used as substitutes of important structures for the construction of biosensors, such as antigen or antibody. These materials are more accessible and facilitate the formation of the selective layer in biosensors, especially when combined with nanoparticles. Nanoparticles have several advantages when applied to sensors, such as high surface area, functionalization and versatility in method development. Thus, the present project explores the applicability of gold and carbon nanoparticles in the development of biosensors to quantify biomarkers of AIDS and Covid-19. The quantification of HIV p24 was achieved through the development of an electrode modified with graphene quantum dots and aptamers that have affinity for the target protein. The nanoparticles were electrodeposited on the electrode and the selective layer formed through the covalent bond between the aptamer and the nanoparticles. The electrode showed high selectivity, a linear region between  $0.93 \text{ ng mL}^{-1}$  and  $93 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , with a sensitivity of  $1.293 \text{ } \mu\text{A dec}^{-1}$  and limit of quantification of  $930 \text{ pg mL}^{-1}$ . The aptasensor was applied in the differentiation of negative serum samples and fortified with p24-HIV, showing applicability in real diagnostic conditions. The quantification of antibodies anti-protein S of SARS-CoV-2 was achieved through the modification of gold nanoparticles with peptides that simulate a fragment of protein S. The modification of the nanoparticle improved the interaction with the electrode and allowed the adsorption of the nanoparticles for the formation of the selective layer. The electrode responded linearly to antibody concentrations between  $15 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $75 \text{ ng mL}^{-1}$ , with a sensitivity of  $1.059 \text{ } \mu\text{A dec}^{-1}$  and limit of quantification of  $75 \text{ ng mL}^{-1}$ . The sensor was applied to negative and fortified serum samples, showing a deviation from the expected in complex matrices, but showing high potential through a simple construction method.

Keywords: electrochemistry; biosensor; immunosensor; analytical chemistry.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESQUEMA REPRESENTATIVO DO FUNCIONAMENTO DOS SENSORES, QUE RECONHECEM UM EVENTO ESPECÍFICO EM UM SISTEMA E TRADUZEM NA FORMA DE UM SINAL ÚTIL.....	3
FIGURA 2: EXEMPLO DA CORRENTE ELÉTRICA REGISTRADA NA VARREDURA DE POTENCIAL QUE É EXECUTADA NA TÉCNICA DE VOLTAMETRIA CÍCLICA. OS PICOS DE CORRENTE POSITIVA OU NEGATIVA INDICAM A PRESENÇA DE UMA REAÇÃO ELETROQUÍMICA.....	6
FIGURA 3: TRANSPORTE DE MASSA CAUSADO PELA DIFUSÃO E PELO GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO APÓS A REAÇÃO ELETROQUÍMICA DE UMA ESPÉCIE NA SUPERFÍCIE DO ELETRODO, QUANDO OUTROS MÉTODOS DE TRANSPORTE NÃO ESTÃO PRESENTES. ....	7
FIGURA 4: A) ILUSTRAÇÃO DO DECAIMENTO DAS CORRENTES FARADÁICA E CAPACITIVA APÓS APLICAÇÃO DE UM POTENCIAL EM $t_0$ . A CORRENTE TOTAL OBSERVADA É UMA SOMA DOS DOIS TIPOS ILUSTRADOS. B) PERTURBAÇÃO DO POTENCIAL E COLETA DE CORRENTE ELÉTRICA EM UMA VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL. ....	8
FIGURA 5: ILUSTRAÇÃO SIMPLIFICADA DE COMO O TAMANHO REDUZIDO DAS PARTÍCULAS AFETA A ÁREA SUPERFICIAL DOS ELETRODOS. O MESMO VOLUME DE MATÉRIA DIVIDIDA EM PARTÍCULAS MENORES APRESENTA MAIOR EXTENSÃO EM CONTATO COM O EXTERIOR.....	10
FIGURA 6: EXEMPLO DE COMO A VARIAÇÃO DE TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO AFETA A ABSORÇÃO E EMISSÃO DE LUZ, LEVANDO À UMA MUDANÇA NA COLORAÇÃO DA SOLUÇÃO. ....	11
FIGURA 7: SIMPLIFICAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUE PODEM SOFRER TRANSFORMAÇÃO ATRAVÉS DE DOIS TIPOS DE SÍNTESES PARA A FORMAÇÃO DE NANOESTRUTURAS.....	15
FIGURA 8: A) EXEMPLO DA LIGAÇÃO COVALENTE FORMADA ENTRE AMINAS PELO USO DA REAÇÃO COM GLUTARALDEÍDO. B) REAÇÃO DE SUBSTITUIÇÃO COM EDC E NHS PARA A FORMAÇÃO DE UMA LIGAÇÃO COVALENTE ENTRE UM GRUPO CARBOXILA E UM GRUPO AMINO.....	19

FIGURA 9: ESQUEMA ILUSTRATIVO DA ALTERAÇÃO DO CÓDIGO GENÉTICO DE UM VETOR PARA EXPRESSAR A PROTEÍNA DESEJADA E REALIZAR A PRODUÇÃO EM MASSA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	20
FIGURA 10: CICLO DA TÉCNICA SELEX, QUE SELECIONA E MULTIPLICA OS FRAGMENTOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS QUE INTERAGEM ESPECIFICAMENTE COM A PROTEÍNA ALVO, FORMANDO APTÂMEROS SELETIVOS.....	22
FIGURA 11: DESENVOLVIMENTO DO LINFÓCITO B ATÉ A INTERAÇÃO COM O ANTÍGENO, E A FORMAÇÃO DA CÉLULA PLASMÁTICA QUE PRODUZ ANTICORPOS PARA COMBATER A INFECÇÃO EM CURSO. ....	25
FIGURA 12: ESTRUTURA SIMPLIFICADA E TRIDIMENSIONAL DA IMUNOGLOBULINA G, PRINCIPAL ANTICORPO FORMADO PARA COMBATER INFECÇÕES. ....	26
FIGURA 13: SEQUÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO UTILIZADA PARA VARIAÇÕES DO MÉTODO ELISA, ONDE BIOMOLÉCULAS INTERAGEM PARA GARANTIR A SELETIVIDADE DO MÉTODO. A ENZIMA CONJUGADA A UMA DAS BIOMOLÉCULAS É RESPONSÁVEL PELA CONVERSÃO DO SUBSTRATO QUE GERA A COR E PERMITINDO A QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DO ALVO POR ABSORBÂNCIA .....	28
FIGURA 14: ESQUEMA DO FUNCIONAMENTO DAS FITAS DE FLUXO LATERAL. ANTICORPOS MARCADOS E REGIÕES COM ANTICORPOS DE CAPTURA AJUDAM A IDENTIFICAR A PRESENÇA DO ANALITO NA AMOSTRA. ....	29
FIGURA 15: ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ESTRUTURA E PROTEÍNAS QUE COMPÕEM O VÍRUS SARS-CoV-2.....	31
FIGURA 16: CICLO DE REPLICAÇÃO DO HIV E ETAPAS QUE SÃO INIBIDAS POR REMÉDIOS DISPONÍVEIS (DESCRITAS NAS CAIXAS DE TEXTO). ....	33
FIGURA 17: ESQUEMA SIMPLIFICADO DAS ESTRUTURAS QUE FORMAM O HIV .....	34
FIGURA 18: ILUSTRAÇÃO DO ELETRODO IMPRESSO UTILIZADO (COMPONENTES PRINCIPAIS INDICADOS).....	39
FIGURA 19: ESQUEMA EXPERIMENTAL DA SÍNTESE DOS QUANTUM DOTS DE GRAFENO, QUE CONSISTE NO AQUECIMENTO DO ÁCIDO CÍTRICO E A TRANSFERÊNCIA DO SAL EM SUA FORMA LÍQUIDA A UMA SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO. ....	40

FIGURA 20: ETAPAS EXPERIMENTAIS (NÚMEROS INDICAM A SEQUÊNCIA EM QUE SÃO REALIZADAS) PARA A CONSTRUÇÃO DO APTASSENSOR E DETECÇÃO DE P24-HIV. A RESPOSTA FINAL É OBTIDA ATRAVÉS DA DIFERENÇA OBSERVADA NA ANÁLISE ELETROQUÍMICA DO SENSOR CONSTRUÍDO ANTES E DEPOIS DA ETAPA 4.....	42
FIGURA 21: ELETRODO IMPRESSO UTILIZADO NO PROJETO. INDICADOS ESTÃO O ELETRODO DE REFERÊNCIA (RE), CONTRA-ELETRODO (CE) E ELETRODO DE TRABALHO (WE). .....	44
FIGURA 22: ESQUEMA EXPERIMENTAL PARA A SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO. UMA SOLUÇÃO DE ÁCIDO CLOROÁURICO É AQUECIDA .....	45
FIGURA 23: ORDEM DE MODIFICAÇÃO DO ELETRODO PARA A CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR PARA QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPO ANTI-PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2. ....	46
FIGURA 24: ESQUEMA REPRESENTATIVO DA FORMAÇÃO DOS QUANTUM DOTS DE GRAFENO A PARTIR DO ÁCIDO CÍTRICO.....	49
FIGURA 25: A) ESPECTRO DE FTIR OBTIDO PARA O ÁCIDO CÍTRICO E GQD B) IMAGENS DA SOLUÇÃO CONTENDO GQD SOB RADIAÇÃO VISÍVEL (ESQUERDA) E ULTRAVIOLETA (DIREITA). ....	50
FIGURA 26: IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO PARA OS QUANTUM DOTS DE GRAFENO SINTETIZADOS. HISTOGRAMA DO TAMANHO MÉDIO DAS PARTÍCULAS INSERIDO.....	51
FIGURA 27: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS REFERENTE À ELETRODEPOSIÇÃO DO GQD NO SPE (NÚMERO DO CICLO INSERIDO). VELOCIDADE DE VARREDURA = 50 mV s <sup>-1</sup> .....	52
FIGURA 28: A) VOLTAMOGRAMA CÍCLICO E B) CORRENTE DE PICO ANÓDICA REFERENTE A CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO APTASSENSOR E DETECÇÃO DA PROTEÍNA p24-HIV; K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] 1,0 mmol L <sup>-1</sup> EM PBS pH 7,4, VELOCIDADE DE VARREDURA = 50 mV s <sup>-1</sup> . ....	54
FIGURA 29: DIMINUIÇÃO DA CORRENTE DE PICO ANÓDICO EM PORCENTAGEM APÓS IMOBILIZAÇÃO DO APTÂMERO EM ELETRODOS MODIFICADOS COM QUANTIDADE DIFERENTE DE CICLOS DE ELETRODEPOSIÇÃO. K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] 5,0 mmol L <sup>-1</sup> , TAMPÃO: PBS pH 7,4, VELOCIDADE DE VARREDURA = 50 mV s <sup>-1</sup> . ....	56

FIGURA 30: A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS REFERENTE À CADA ETAPA DA CONSTRUÇÃO DO APTASSENSOR PARA INTERAÇÃO ESPECÍFICA COM p24-HIV POR A) VOLTAMETRIA CÍCLICA E B) CORRENTES DE PICO ANÓDICAS. $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol L <sup>-1</sup> , TAMPÃO: PBS pH 7,4, VELOCIDADE DE VARREDURA = 50 mV s <sup>-1</sup> .....	58
FIGURA 31: DIAGRAMAS DE NYQUIST PARA A CONSTRUÇÃO DO APTASSENSOR. TAMPÃO: PBS pH 7,4 CONTENDO A) HIDROQUINONA 5,0 mmol L <sup>-1</sup> B) $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol L <sup>-1</sup> , FREQUÊNCIA: 10 <sup>6</sup> A 0,1 Hz. ....	59
FIGURA 32: REAÇÃO DE SUBSTITUIÇÃO ENVOLVENDO EDC E NHS QUE LEVA A FORMAÇÃO DE UMA LIGAÇÃO COVALENTE ENTRE A MOLÉCULA COM ÁCIDO CARBOXÍLICO (GQD) E A MOLÉCULA COM GRUPO AMINO (APTÂMERO).....	61
FIGURA 33: VARIAÇÃO NO SINAL DA Sonda ELETROQUÍMICA APÓS IMOBILIZAÇÃO DO APTÂMERO UTILIZANDO DIFERENTES TEMPOS DE REAÇÃO DO EDC/NHS. CONCENTRAÇÃO (APT): 1 ng mL <sup>-1</sup> ; TEMPO DE REAÇÃO (APT): 1 HORA. ....	62
FIGURA 34: VARIAÇÃO NO SINAL DA Sonda ELETROQUÍMICA APÓS IMOBILIZAÇÃO DO APTÂMERO UTILIZANDO DIFERENTES TEMPOS DE CONTATO COM A SOLUÇÃO CONTENDO O APTÂMERO. TEMPO DE REAÇÃO (EDC/NHS): 1 HORA; CONCENTRAÇÃO (APT): 1 ng mL <sup>-1</sup> .....	63
FIGURA 35: A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS ANTES E DEPOIS DO TESTE COM p24-HTLV. B) VARIAÇÃO OBSERVADA NA ALTURA DA CORRENTE DE PICO ANÓDICA PARA CADA PROTEÍNA TESTADA. C) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS ANTES E DEPOIS DO TESTE COM A p24-HIV.....	65
FIGURA 36: VARIAÇÃO NO SINAL DA Sonda ELETROQUÍMICA APÓS ARMAZENAMENTO SOB REFRIGERAÇÃO. ELETRODOS FORAM AVALIADOS ANTES E APÓS IMOBILIZAÇÃO COM 93 ng mL <sup>-1</sup> de p24-HIV EM CADA DIA AVALIADO, A FIM DE IDENTIFICAR EVENTOS DE LIXIVIAÇÃO E SENSIBILIDADE, RESPECTIVAMENTE. ....	66
FIGURA 37: A) REPRESENTAÇÃO DO PICO ANÓDICO DA VOLTAMETRIA CÍCLICA OBTIDA ANTES E APÓS REAÇÃO COM p24-HIV NAS CONCENTRAÇÕES ESPECIFICADAS; B) CURVA ANALÍTICA OBTIDA PARA O DISPOSITIVO PROPOSTO. 5 mmol L <sup>-1</sup> $K_3[Fe(CN)_6]$ EM PBS pH 7,4. VELOCIDADE DE VARREDURA: 100 mV s <sup>-1</sup> , n = 4.....	67

FIGURA 38: A) PICO ANÓDICO DA RESPOSTA OBTIDA POR VOLTAMETRIA CÍCLICA PARA A AMOSTRA DE SORO FORTIFICADO COM p24-HIV (9,3 ng mL <sup>-1</sup> ) B) VARIAÇÃO NO SINAL DA Sonda ELETROQUÍMICA OBTIDA PARA O SORO FORTIFICADO COM p24-HIV (BARRA VERMELHA) E SORO NEGATIVO (BARRA VERDE). C) PICO ANÓDICO DA RESPOSTA OBTIDA POR VOLTAMETRIA CÍCLICA PARA A AMOSTRA DE SORO SEM A PROTEÍNA ALVO. 5 mmol L <sup>-1</sup> K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] EM PBS pH 7,4; n = 4. ....	70
FIGURA 39: IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO SINTETIZADAS E A CONTAGEM DAS AuNPs DEPENDENTE DO TAMANHO REALIZADA ATRAVÉS DO SOFTWARE IMAGEJ. ....	72
FIGURA 40: IMAGEM DE MEV DO ELETRODO NÃO MODIFICADO (A = 20 kx) E MODIFICADO COM AS AuNPs SINTETIZADAS (B = 30 kx, C = 150 kx). ....	73
FIGURA 41: ESPECTRO DE ENERGIA DISPERSIVA OBTIDO PARA O ELETRODO MODIFICADO COM AS AuNPs, NA REGIÃO DESTACADA DA FIGURA 40B. ....	74
FIGURA 42: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO OBTIDO PARA AS NANOPARTÍCULAS DE OURO (PRETO) E PARA AS NANOPARTÍCULAS DE OURO LIGADAS AO PEPTÍDEO. ....	75
FIGURA 43: ESTRUTURA QUÍMICA DO CITRATO DE SÓDIO. ....	76
FIGURA 44: REPRESENTAÇÃO DA LIGAÇÃO PEPTÍDICA ENTRE AMINOÁCIDOS .....	76
FIGURA 45: IMAGENS DE MEV DA SUPERFÍCIE DO ELETRODO MODIFICADO COM O Pept-AuNP EM RESOLUÇÃO AUMENTADA EM A) 30kx E B) 100 kx. ....	77
FIGURA 46: A) MEDIDAS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA E B) VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL EM 0,1 mol L <sup>-1</sup> PBS pH 7,4 NA PRESENÇA DE 1 mmol L <sup>-1</sup> DE [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR. CV: v = 50 mV s <sup>-1</sup> , STEP = 7,5mV. DPV: STEP = 5 mV, AMPLITUDE: 0,15 V, MODULATION TIME: 0,5 s, INTERVAL TIME: 1s. ....	78
FIGURA 47: A) PERFIL OBTIDO PARA A ELETRODEPOSIÇÃO DO PEPT-AuNP NA SUPERFÍCIE DO ELETRODO DE TRABALHO, v = 100 mV s <sup>-1</sup> , STEP = 7,5 mV, C <sub>Pept-AuNP</sub> : 1:9. B) VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL EM 0,1 mol L <sup>-1</sup> PBS pH 7,4 NA PRESENÇA DE 1 mmol L <sup>-1</sup> DE [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR. ....	80

FIGURA 48: VARIAÇÃO DE SINAL OBSERVADO APÓS REAÇÃO COM O ANTICORPO SARS-CoV-2 PARA ELETRODOS MODIFICADOS COM DIFERENTES DILUIÇÕES DA SOLUÇÃO PEPT-AuNP (n = 3).....	82
FIGURA 49: A) PICO DE CORRENTE OBSERVADO PARA ELETRODOS BLOQUEADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BSA (n = 3). B) VARIAÇÃO DO SINAL OBSERVADO PARA A MESMA CONCENTRAÇÃO DE ANTICORPO PARA OS ELETRODOS BLOQUEADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BSA (n = 3).....	83
FIGURA 50: VOLTAMETRIAS CÍCLICAS OBTIDAS EM CONDIÇÃO INICIAL E APÓS CADA ENXAGUE. MEDIDAS EM 0,1 mol L <sup>-1</sup> PBS pH 7,4 NA PRESENÇA DE 1 mmol L <sup>-1</sup> DE [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> , v = 50 mV s <sup>-1</sup> , STEP = 7,5 mV.....	84
FIGURA 51: CURVA ANALÍTICA OBTIDA PARA O BIOSENSOR OTIMIZADO (n = 3).....	85
FIGURA 52: VOLTAMETRIAS DE PULSO DIFERENCIAL OBTIDAS DURANTE A CONSTRUÇÃO E TESTE DOS SENSORES CONSTRUÍDOS EM A) SORO NEGATIVO E B) SORO POSITIVO. C) VARIAÇÃO DE SINAL MÉDIO APÓS INTERAÇÃO DOS BIOSSENSORES COM AS AMOSTRAS DE SORO NEGATIVO E POSITIVO.....	87

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: APLICAÇÕES E PROPRIEDADES DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO EXPLORADOS EM LITERATURA. ADAPTADO DE YUANYUANG et al. [22] .....	13
TABELA 2: PARÂMETROS INICIAIS NÃO OTIMIZADOS PARA CONSTRUÇÃO DO APTASSENSOR PROPOSTO.....	53
TABELA 3: REGIÃO LINEAR E LIMITES DE DETEÇÃO PARA SENSORES PARA p24-HIV ENCONTRADOS NA LITERATURA. ....	68
TABELA 4: SENSORES ELETROQUÍMICOS RELATADOS EM LITERATURA QUE QUANTIFICAM ANTICORPOS ANTI-PROTEÍNA S DO SARS-CoV-2.....	86

## LISTA DE ABREVIATURA OU SIGLAS

CV	Voltametria cíclica
DPV	Voltametria de pulso diferencial
AuNP	Nanopartículas de ouro
DNA	ácido desoxirribonucleico
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
QD	Quantum dots
CQD	Carbon quantum dots
GQD	graphene quantum dots
ECL	Luminescência eletroquímica
BCR	Receptor da célula B
IgG	Imunoglobulina G
SARS	Síndrome respiratória aguda grave
CoV	Coronavírus
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
NHS	N-hidroxisuccinimida
GO	Óxido de grafeno
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
OMS	Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>3</b>
1.1	SENSORES E TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS	3
1.2	ELETRODOS MODIFICADOS E NANOPARTÍCULAS	9
1.3	BIOSSENSORES	16
1.4	DOENÇAS ENDÊMICAS E SISTEMA IMUNE	23
1.5	OBJETIVOS	36
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>38</b>
2.1	APTASSENSOR PARA QUANTIFICAÇÃO DE P24-HIV	38
2.1.1	Materiais	38
2.1.2	Métodos	40
2.1.3	Medidas	43
2.2	BIOSSENSOR PARA QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPO ANTI-S DE SARS-COV-2	44
2.2.1	Materiais	44
2.2.2	Métodos	45
2.2.3	Medidas	47
<b>3</b>	<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
3.1	APTASSENSOR PARA A QUANTIFICAÇÃO DE P24-HIV	49
3.1.1	Caracterização do GQD	49
3.1.2	Potencialidade do GQD para construção do aptassensor	52
3.1.3	Aptassensor – Otimização dos parâmetros envolvidos	55
3.1.4	Teste de seletividade	64
3.1.5	Estabilidade do aptassensor	65
3.1.6	Curva analítica	67
3.1.7	Determinação de p24-HIV em amostras reais fortificadas	69
3.1.8	CONCLUSÃO	70
3.2	BIOSSENSOR PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPO ANTI-S DE SARS-COV-2	72
3.2.1	Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro, e interação com o peptídeo	72
3.2.2	Potencialidade do sensor aplicando o Pept-AuNP	77
3.2.3	Avaliação do método de modificação do eletrodo	79

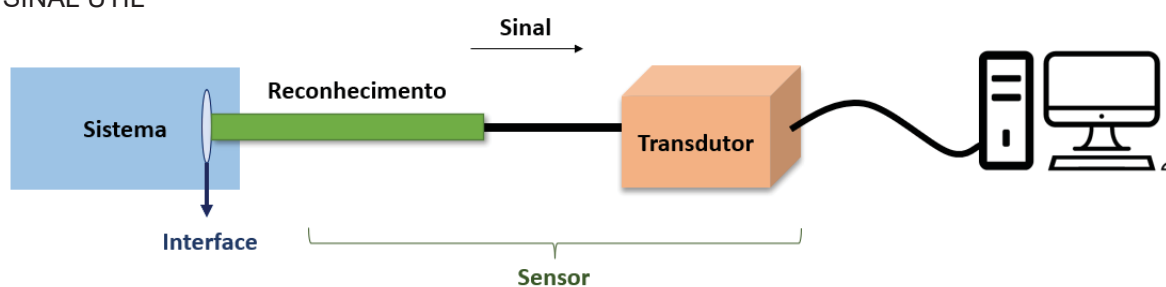
3.2.4	Otimização dos parâmetros para construção do biossensor para SARS-CoV-2	81
3.2.5	Curva Analítica .....	85
3.2.6	Amostra real fortificada.....	87
3.2.7	Conclusão.....	89
3.3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>
	<b>ANEXO A.....</b>	<b>99</b>
	<b>ANEXO B.....</b>	<b>100</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 SENSORES E TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

Estamos rodeados a todo momento por sensores simples, como os termostatos presentes na geladeira e ar-condicionado, sensores de movimento em portas automáticas, etc. Uma das classes de sensores que são constantemente foco de pesquisa e desenvolvimento de novos métodos são os sensores químicos, que podem ser empregados para se obter informações sobre um ou mais componentes presentes em uma amostra. Sensores são dispositivos que detectam mudanças ou eventos específicos em um sistema, frequentemente acoplado a processadores que permitem a leitura, manuseio e controle das informações coletadas. Esses dispositivos apresentam dois eventos essenciais: o reconhecimento e a transdução. O sistema de reconhecimento interage com o objeto de interesse no ambiente desejado promovendo ou observando uma alteração, já o transdutor traduz esse evento como um sinal analiticamente útil que permite detectar/quantificar aquilo que se deseja, como exemplificado na FIGURA 1.

FIGURA 1: ESQUEMA REPRESENTATIVO DO FUNCIONAMENTO DOS SENSORES, QUE RECONHECEM UM EVENTO ESPECÍFICO EM UM SISTEMA E TRADUZEM NA FORMA DE UM SINAL ÚTIL



Fonte: O autor.

A habilidade do sensor depende principalmente do sítio de reconhecimento que define a sensibilidade, seletividade e confiabilidade do que está sendo medido. A facilidade de customizar esses dispositivos incide em uma grande quantidade de artigos de pesquisa relacionada a sensores nas áreas de química, ciência de materiais e biologia molecular. Entre 2013 e 2022, mais de 190 mil artigos foram publicados usando sensor como palavra-chave, sendo aproximadamente 13 mil publicados no primeiro ano e 26 mil em 2021, ou seja, a quantidade de publicações por ano sobre o tema mais do que dobrou dentro da última década [1].

A pesquisa sobre sensores é abordada de diversas formas, estudando novos materiais, aplicações, melhoria de seletividade e sensibilidade, além de novos métodos de fabricação que permitam explorar aspectos associados à portabilidade, miniaturização e baixo custo, tornando esses sensores cada vez mais relevantes [2,3].

Os sensores precisam de um sistema para traduzir as interações que são reconhecidas pelo sensor em um sinal útil. Dentro dos tipos de transdutores destacam-se os sistemas eletroquímicos. A ampla gama de métodos eletroquímicos existentes permite o monitoramento de diversas grandezas elétricas e a retirada de uma grande quantidade de informações do sensor que está sendo avaliado [4]. Além disso, os equipamentos necessários estão disponíveis em tamanhos reduzidos e preços acessíveis, o que facilita a portabilidade e a propagação dos métodos eletroquímicos.

Eletroquímica é um campo da química que explora a relação entre os efeitos elétricos e químicos, em sua maioria, como a passagem de corrente elétrica pode afetar uma reação química ou como uma reação química é capaz de produzir energia elétrica [4]. Esses estudos começaram com a invenção da primeira bateria por Alessandro Volta em 1800, levando-o a estudar como metais e outras substâncias eram afetados pelos efeitos elétricos fornecidos pela bateria. Como resultado, uma das primeiras séries eletromotivas foi descrita, que se mostrou similar à tabela que estava sendo organizada por anos pelos químicos, com relatos de substâncias que reagiam e deslocavam outros compostos nas reações químicas. Sir Humphry Davy da Instituição Real de Londres aplicou a bateria para separar metais de amostras mais complexas, isolando pela primeira vez elementos como cálcio, magnésio, estrôncio e bário, e em 1806 propôs que a força que mantém os compostos unidos deve ser elétrica por natureza, pois a corrente elétrica fornecida pela bateria superou a força que mantinha os elementos juntos [5], sugerindo que a similaridade entre a série eletromotiva e a reatividade dos elementos não era somente uma coincidência.

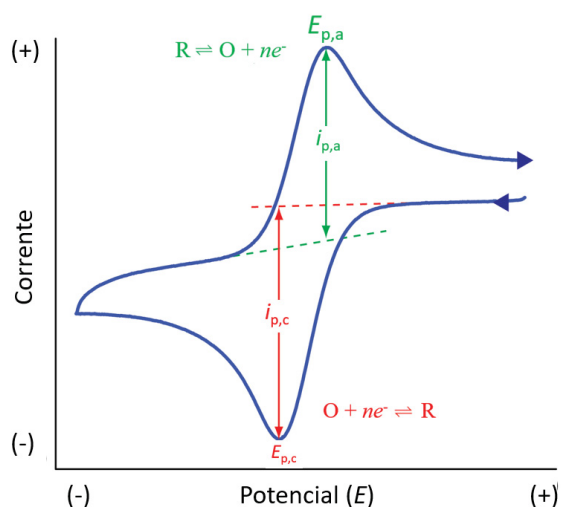
Muitas das definições experimentais como cátodo, ânodo e eletrólito se popularizaram com o trabalho de Michael Faraday sobre eletrólise em 1834, junto com duas leis que ajudaram a quantificar o rendimento da técnica. A eletrólise foi definida como uma técnica eletroquímica que emprega corrente elétrica para forçar uma reação química não espontânea a acontecer. Essa corrente elétrica é gerada por uma fonte que polariza o cátodo e o ânodo gerando um acúmulo de elétrons no cátodo (potencial); se a polarização for forte o suficiente, espécies próximas ao cátodo podem

ganhar um elétron sofrendo redução e, como o equilíbrio elétrico deve ser mantido, espécies próximas ao ânodo perdem elétrons. As leis de Faraday para a eletrólise diziam que a quantidade de reações químicas acontecendo na fronteira entre o eletrodo e o eletrólito era diretamente proporcional à quantidade de eletricidade usada, e que o peso de uma substância depositada no eletrodo por uma quantidade de eletricidade específica é proporcional ao seu peso equivalente (massa molar) [6]. As leis e os processos envolvidos permitiram um desenvolvimento tanto industrial para a produção de metais e outros produtos químicos, como também científico da eletroquímica como uma área de pesquisa.

O avanço tecnológico sustentou o desenvolvimento de técnicas com maior controle sobre as propriedades elétricas do sistema como a polarografia criada em 1921 por Heyrovský, que media a corrente elétrica em função do potencial aplicado (através do eletrodo gotejante de mercúrio) ao invés da variação na massa de mercúrio, facilitando a quantificação de espécies através formação de amálgamas e abrindo caminho para o desenvolvimento das técnicas voltamétricas [4].

A voltametria, baseada na variação da corrente elétrica dependente da aplicação de potencial vinda da polarografia, teve seu uso expandido em 1942 com o desenvolvimento do primeiro potenciostato por Archie Hickling: através da adição de um terceiro eletrodo, se tornou possível controlar precisamente o potencial aplicado no eletrodo de trabalho em função de um eletrodo com potencial fixo (chamado eletrodo de referência) [7]. Esse eletrodo de referência tem um potencial padrão próprio, por exemplo, o eletrodo de referência de prata / cloreto de prata ( $3,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) tem um potencial de 0,205 V em relação ao Eletrodo Padrão de Hidrogênio (EPH) a uma temperatura de 25 °C. O potencial que é varrido na voltametria é em relação ao eletrodo de referência utilizado, portanto, o potencial em 0V na voltametria não é o 0V padrão caso não se use o EPH como referência. Com o uso do sistema de três eletrodos, a corrente pode circular livremente pelo eletrodo de trabalho e contra eletrodo, sem que nenhuma reação aconteça no eletrodo de referência, o que auxilia na manutenção do potencial de referência fixo durante a medida. O gráfico gerado por essa técnica se chama voltamograma, e o sinal correspondente a uma reação acontecendo no eletrodo é observada como um pico, como ilustrado na FIGURA 2.

FIGURA 2: EXEMPLO DA CORRENTE ELÉTRICA REGISTRADA NA VARREDURA DE POTENCIAL QUE É EXECUTADA NA TÉCNICA DE VOLTAMETRIA CÍCLICA. OS PICOS DE CORRENTE POSITIVA OU NEGATIVA INDICAM A PRESENÇA DE UMA REAÇÃO ELETROQUÍMICA.

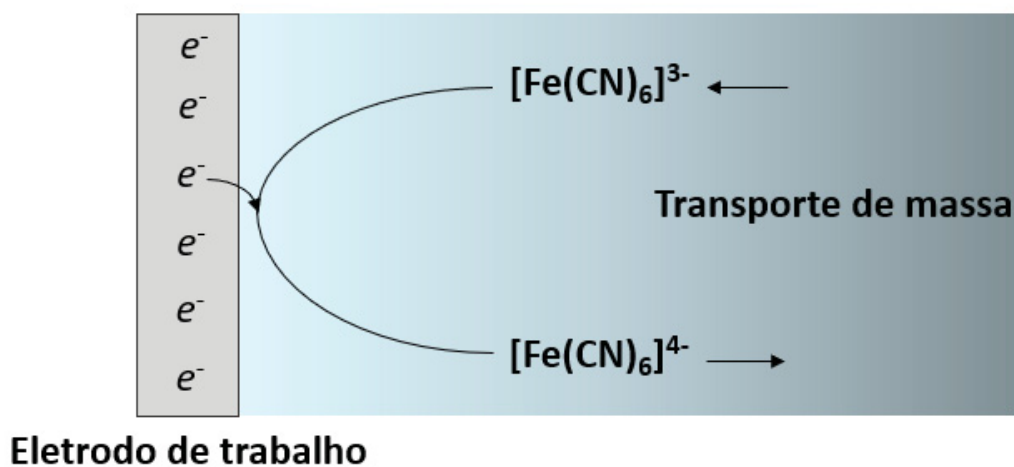


Fonte: Adaptado de David Harvey [8]

O potencial do pico observado está diretamente relacionado com a espécie sendo convertida, pois cada espécie apresenta um potencial de redução ou oxidação. Esses valores de potenciais padrão já são conhecidos e sempre tabelados em relação ao eletrodo de referência padrão de hidrogênio, que sofrem um deslocamento dependendo do eletrodo de referência sendo utilizado no experimento [4].

Como foi relatado nos experimentos com eletrólise, as reações na voltametria também ocorrem na interface eletrodo-solução. Diversos fatores devem ser levados em consideração quando uma reação está acontecendo na superfície do eletrodo, como transporte de massa, transferência de elétrons do eletrodo para a espécie na superfície, reações de interface (adsorção ou dessorção) e/ou reações intermediárias [9]. O transporte de massa é uma consequência do gradiente de concentração da espécie quando ela é consumida (oxidada por exemplo) enquanto não há outro tipo de transporte envolvido, e para que a reação continue acontecendo na superfície do eletrodo é necessário que as espécies que ainda não foram oxidadas no seio da solução difundam até a superfície do eletrodo (considerando que o sistema está estático, sem outros tipos de transporte de matéria envolvidos), como simplificado na FIGURA 3. Com isso, o aumento do potencial leva a um aumento de corrente elétrica registrada até um limite, onde o transporte de massa começa a ser um fator predominante e o fluxo de espécies que podem ser oxidadas na superfície do eletrodo diminui devido a expansão da camada difusional; no voltamograma isso se traduz na diminuição da corrente resultante, e assim o sinal na forma de um pico é gerado.

FIGURA 3: TRANSPORTE DE MASSA CAUSADO PELA DIFUSÃO E PELO GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO APÓS A REAÇÃO ELETROQUÍMICA DE UMA ESPÉCIE NA SUPERFÍCIE DO ELETRODO, QUANDO OUTROS MÉTODOS DE TRANSPORTE NÃO ESTÃO PRESENTES.

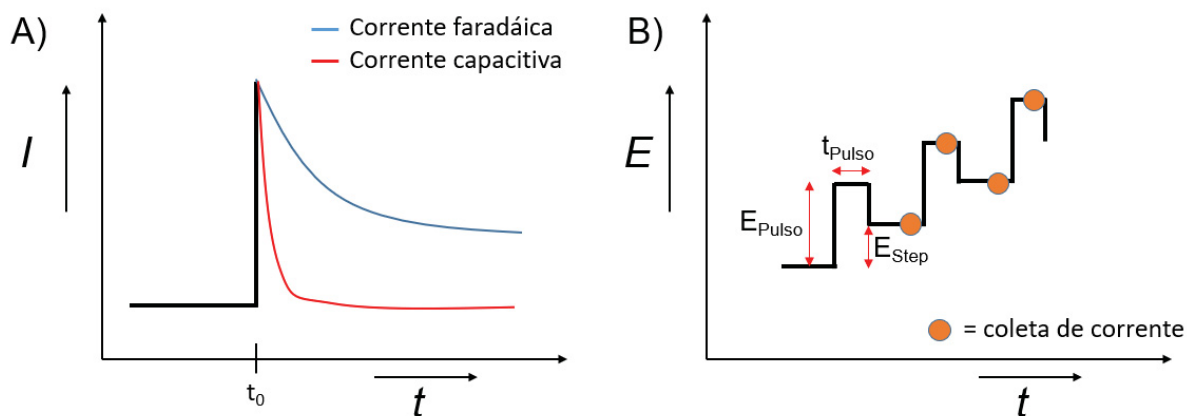


Fonte: O autor.

Outra modalidade de técnica eletroquímica utilizada são as técnicas pulsadas: voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada. As duas técnicas foram desenvolvidas como uma forma de sincronizar o potencial aplicado com a técnica de polarografia, de forma a coletar a corrente quando a gota está prestes a se desprender do eletrodo.

A perturbação de potencial aplicada na voltametria de pulso diferencial é baseada em um incremento de potencial em forma de degrau, onde um pulso é aplicado com um potencial fixo ( $E_{\text{Pulso}}$ ) durante um tempo escolhido ( $t_{\text{Pulso}}$ ). Pulsos sucessivos são realizados para formar uma rampa de potencial, caracterizando a varredura. A coleta de corrente é realizada antes e no final do pulso, e para calcular e considerar a contribuição capacitiva da corrente resultante é realizado a diferença entre as correntes coletadas, obtendo-se um sinal corrigido e atrelado aos processos redox observados na varredura [10].

FIGURA 4: A) ILUSTRAÇÃO DO DECAIMENTO DAS CORRENTES FARADÁICA E CAPACITIVA APÓS APLICAÇÃO DE UM POTENCIAL EM  $t_0$ . A CORRENTE TOTAL OBSERVADA É UMA SOMA DOS DOIS TIPOS ILUSTRADOS. B) PERTURBAÇÃO DO POTENCIAL E COLETA DE CORRENTE ELÉTRICA EM UMA VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL.



Fonte: O autor.

Como a corrente capacitiva (corrente gerada pela aplicação do potencial, mas não é proporcional ao analito nem segue a lei de Faraday) decai mais rapidamente do que a corrente faradáica (corrente útil que representa a conversão redox de uma espécie na superfície do eletrodo), como ilustrado na FIGURA 4A, as vantagens das técnicas pulsadas também se estendem para as voltametrias em outros eletrodos [4].

A utiliza o de técnicas pulsadas impacta diretamente nos limites de detec o e quantifica o do método, pois o sinal observado está relacionado diretamente com a conversão do analito, e o tratamento utilizado para descontar a corrente capacitiva diminui o ruído da medida, permitindo que sinais menores sejam diferenciados da corrente de fundo. Matematicamente, no cálculo de limites de detec o e quantifica o, os fatores são a inclina o da curva analítica do método ( $b$  = varia o de sinal por unidade de concentra o do analito) e o desvio padrão de medidas do branco (varia o de sinal em varreduras sem o analito, mas na mesma região de potencial em que o sinal do analito   observado), através das seguintes equa es:

$$\text{Limite de detec o (LD)} = 3 \times \frac{\text{Desvio padrão do branco}}{b} \quad (1)$$

$$\text{Limite de quantifica o (LQ)} = 10 \times \frac{\text{Desvio padrão do branco}}{b} \quad (2)$$

Assim, com uma linha base sem a contribuição da corrente capacitiva, os valores absolutos de corrente registrados são menores, e o desvio padrão obtido para as medidas do branco resulta em um valor menor, que impacta diretamente nos valores dos limites obtidos em técnicas pulsadas.

A otimização dos parâmetros das técnicas analíticas, como velocidade de varredura, parâmetros dos pulsos aplicados, ou etapas de pré-condicionamento podem melhorar consideravelmente aspectos gerais do método, como sensibilidade, mas há outras formas de buscar especificar e aperfeiçoar o método para uma aplicação específica, e uma forma amplamente explorada em literatura é a modificação do eletrodo de trabalho.

## 1.2 ELETRODOS MODIFICADOS E NANOPARTÍCULAS

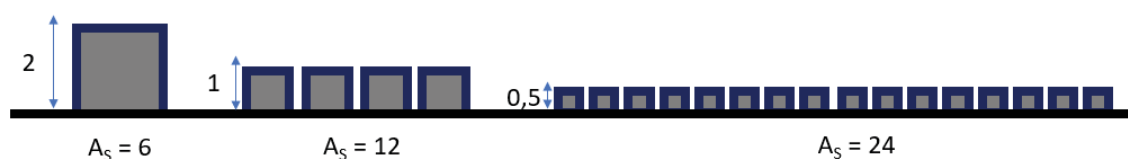
Eletrodos modificados se utilizam de tratamentos ou materiais adicionais para complementar ou aprimorar as propriedades do sistema, ou qualquer aspecto que torne o método proposto mais atrativo frente ao eletrodo não modificado. No caso do desenvolvimento de sensores eletroquímicos, o propósito é pesquisar fatores que resultem em um método analítico mais sensível, seletivo, rápido ou acessível. Devido à grande quantidade de tipos de eletrodos (Eletrodos impressos, carbono vítreo, pasta de carbono, eletrodos metálicos), modificadores (tratamentos, filmes, nanomateriais) e aplicações disponíveis, as possibilidades tornam a pesquisa de eletrodos modificados cada vez mais complexa e importante [11].

Uma classe de materiais amplamente empregada no desenvolvimento de sensores são os nanomateriais. Nanomateriais são partículas onde qualquer uma das dimensões de sua unidade está entre 1 e 100 nm [12]. As partículas com dimensões reduzidas começaram a ser relatadas por Faraday, que em experimentos nos anos 1850 descreveu a habilidade dos elementos ouro, prata, chumbo, zinco, platina, estanho, paládio, ferro, alumínio, ródio, mercúrio e irídio, de formarem soluções translúcidas em concentrações pequenas, formando filmes que interagem com a luz. Essas propriedades ópticas diferentes dos materiais no seu tamanho macro (bulk) levou à conclusão de que, para interagir com a luz, as partículas que formavam as soluções e filmes testados teriam suas dimensões na mesma ordem de grandeza que o comprimento de onda utilizado [13]. Essa conclusão só foi provada anos depois,

pois o conceito de nanômetro só foi proposto pelo prêmio Nobel de física de 1925, Richard Zsigmondy, que com o auxílio de um ultramicroscópio conseguiu medir pela primeira vez uma partícula nessa faixa de tamanho [14]. Isso permitiu confirmar que as partículas de ouro, por exemplo, produzidas através da rota proposta por Faraday tinham o diâmetro entre 3 e 30 nm [13].

As nanopartículas demonstraram propriedades dependentes do seu tamanho e composição, permitindo modular a sua elevada área superficial, propriedades ópticas e atividade catalítica dependendo da aplicação a qual a nanopartícula se destina. Na eletroquímica, nanomateriais foram utilizados como transdutores, catalisadores, materiais adsorventes, transportadores e reveladores de imunoenensaio. Como modificadores de eletrodos, a transição do macro para a escala nano melhorou as características dos sensores, levando a um aumento da atividade eletroquímica em comparação com o material bulk [15]. Uma das vantagens que as nanopartículas oferecem para a eletroquímica está ligado ao aumento da área superficial que ocorre com a deposição de nanopartículas na superfície do eletrodo. Esse efeito é um resultado das partículas de tamanho reduzido, que aumentam a área eletroativa do eletrodo conforme ilustrado na FIGURA 5.

FIGURA 5: ILUSTRAÇÃO SIMPLIFICADA DE COMO O TAMANHO REDUZIDO DAS PARTÍCULAS AFETA A ÁREA SUPERFICIAL DOS ELETRODOS. O MESMO VOLUME DE MATÉRIA DIVIDIDA EM PARTÍCULAS MENORES APRESENTA MAIOR EXTENSÃO EM CONTATO COM O EXTERIOR.



Fonte: O autor.

Como mostrado na FIGURA 5, a mesma massa de material dividido em partes menores leva a um aumento da área disponível para interação com o ambiente externo. Caso a nanopartícula seja feita de um material condutor, a polarização que ocorre no eletrodo durante uma varredura de voltametria por exemplo, também irá polarizar as nanopartículas, aumentando a área disponível para a transferência de elétrons. Outro ponto possível é uma variação no transporte de massa, que em condições específicas a difusão deixa de ser planar e passa a ser de forma radial, o

que também pode levar a uma mudança na sensibilidade do sensor [16]. No caso das nanopartículas, a natureza do material também tem um fator importante na melhora da resposta eletroquímica e catálise de algumas reações [17].

Devido ao seu histórico importante e crença de que uma forma solúvel do ouro poderia ter propriedades medicinais, ou até mesmo se aproximar a algo como o elixir da vida, métodos para a obtenção de formas menores do metal foram muito exploradas, levando ao estudo das estruturas que hoje são chamadas de ouro coloidal. As rotas utilizadas inicialmente são comuns de serem realizadas até hoje [18]: Faraday utilizou ácido cloro áurico ( $\text{H}(\text{AuCl}_4)$ ) como reagente inicial, e após neutralização com  $\text{K}_2\text{CO}_3$  atuando também como agente redutor, fósforo branco era adicionado aos outros reagentes em uma solução de éter dietílico. Essa rota impede que partículas maiores de ouro fossem produzidas, resultando em uma solução roxa, sendo relatado partículas de diâmetro entre 3 e 12 nm. Outra rota comum é a proposta por Turkevich nos anos 1950 [19], onde o agente redutor e estabilizante das nanopartículas de ouro produzidas é o citrato de sódio. Nesse procedimento, o citrato de sódio é adicionado a uma solução em fervura contendo o ácido cloro áurico, resultando em uma solução avermelhada. Partículas entre 12 e 147 nm podem ser sintetizadas através desse método ao se variar a concentração de citrato de sódio, e a facilidade de controlar o tamanho das partículas sintetizadas levou à comercialização de ouro coloidal com uma média de diâmetro conhecida, favorecendo a aplicação do produto em diversas áreas.

FIGURA 6: EXEMPLO DE COMO A VARIAÇÃO DE TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO AFETA A ABSORÇÃO E EMISSÃO DE LUZ, LEVANDO À UMA MUDANÇA NA COLORAÇÃO DA SOLUÇÃO.



Fonte: Adaptado de Nanocomposix [20].

As nanopartículas sintetizadas apresentam alta condutividade pela natureza metálica do elemento, que em conjunto com a elevada área superficial, tornam as

AuNPs interessantes para aplicações em eletroquímica. Além disso, a biocompatibilidade permite a aplicação em bioimagem, *drug delivery*, terapias anticâncer e biossensores, através do acoplamento e marcação de biomoléculas. A alta energia superficial torna possível catálise de reações, com aplicações em sensores e biossensores para diminuir a energia necessária para a visualização e quantificação de diversas interações. Nanopartículas de ouro são muito usadas como marcadores em fitas de fluxo lateral, onde as biomoléculas responsáveis pela resposta do teste são conjugadas a nanopartículas de ouro, e o acúmulo do conjugado nas regiões designadas da fita indicam colorimetricamente a presença ou não do analito alvo [21]. Um resumo das aplicações das AuNPs, propriedades exploradas e exemplos estão disponíveis na TABELA 1.

TABELA 1: APLICAÇÕES E PROPRIEDADES DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO EXPLORADOS EM LITERATURA. ADAPTADO DE YUANYUANG et al. [22]

<b>Tipo de biossensor</b>	<b>Princípio da detecção</b>	<b>Função da AuNP</b>	<b>Propriedades exploradas</b>	<b>Exemplos típicos</b>
Sensores ópticos	Mudanças nas propriedades ópticas	Aprimoramento da variação no índice de refração	Constante dielétrica, alta densidade, alta massa molecular	Sensor de DNA; melhora de 1000 vezes na sensibilidade ao se utilizar AuNPs [23]
		Melhora da transferência eletrônica	Condutividade, dimensão	Taxa de transferência eletrônica de 5000 por segundo [24]
Biossensor eletroquímico	Mudanças nas propriedades elétricas	Plataforma de imobilização	Biocompatibilidade, área superficial	Biossensor para glicose com limite de detecção de $0,18 \mu\text{mol L}^{-1}$ [25]
		Catálise de reações	Alta energia superficial, domínio das propriedades interfaciais	Sensor para NADH com diminuição de sobrepotencial de 780 mV sem mediadores redox [26]
Biossensor piezoelétrico	Mudança de massa	Imobilização de biomoléculas, melhora de sensibilidade	Biocompatibilidade, alta densidade, alta área superficial	Sensor de DNA usando AuNPs como marcadores e amplificadores de sinal [27]

Na eletroquímica, o uso das nanopartículas de ouro é bem mais variado [28], e uma das propriedades explorada na maioria das aplicações é a possibilidade de funcionalização das nanopartículas de ouro através de compostos com a presença de grupos contendo enxofre, que tem afinidade para se ligar ao ouro. Diversos compostos podem ser utilizados para realizar essa funcionalização, com cadeias de grupos funcionais carboxílicos, amino ou até mais complexos, permitindo uma versatilidade enorme para as nanopartículas. Assim, a nanopartícula pode ter suas propriedades direcionadas não só através da síntese, modulando o tamanho, mas também pela modificação de sua superfície, alterando a reatividade e composição de sua superfície. Por isso, as aplicações em catálise e em sensores são constantemente atualizadas e melhoradas através da pesquisa e desenvolvimento de novas espécies e técnicas de modificação das nanopartículas [21].

O uso de nanopartículas de ouro permitiu que as aplicações envolvendo o elemento diminuíssem consideravelmente o custo de desenvolvimento, uma vez que a partícula requer uma quantidade reduzida de material. Isso também melhorou a acessibilidade para a pesquisa de eletrodos descartáveis, principalmente para uso na área de biossensores. As aplicações envolvendo biossensores eletroquímicos fazem uso das nanopartículas como uma plataforma de construção da camada seletiva do eletrodo, que faz uso da biocompatibilidade e da elevada área superficial do material. Além disso, AuNPs melhorar a transferência eletrônica, o que frequentemente leva a uma melhora na sensibilidade dos dispositivos [22].

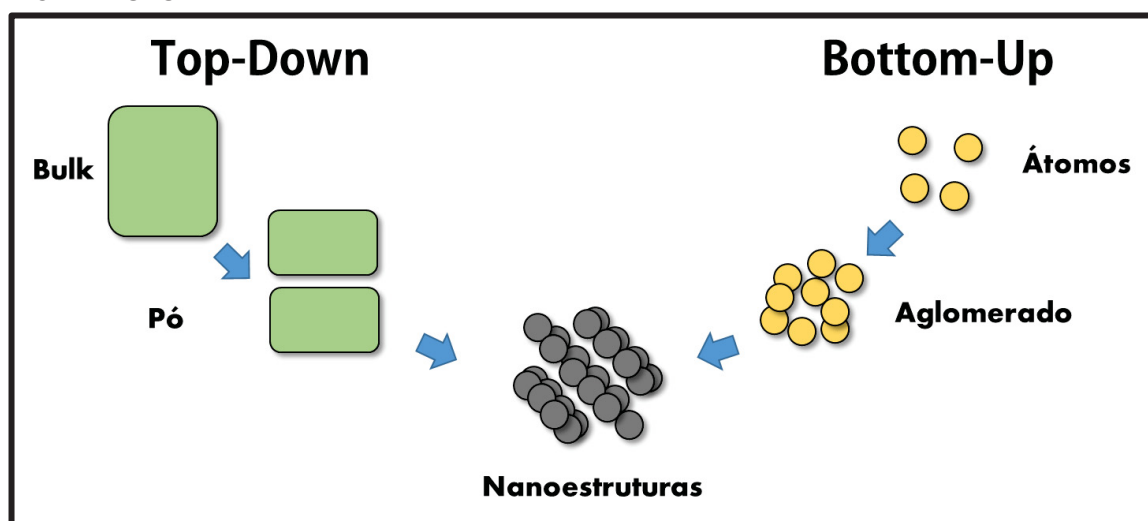
As nanopartículas metálicas são interessantes em diversos cenários na construção de sensores. Entretanto, os nanomateriais de carbono também contribuíram extensivamente para a pesquisa de novos sensores. Além das vantagens intrínsecas dos nanomateriais, os nanomateriais de carbono apresentam um relativo baixo custo e rotas mais acessíveis de funcionalização química que facilita ainda mais as aplicações desses materiais [29]. Os nanotubos de carbono, grafeno, e outros alótropos de carbono rapidamente encontraram um uso na eletroquímica devido, principalmente, às suas propriedades elétricas [30].

Os *quantum dots* (QD) ou pontos quânticos à base de carbono constituídos por *quantum dots* de grafeno (GQD) e *quantum dots* de carbono (CQD, C-dots ou CDs) são novas estruturas de nanomateriais de carbono com tamanho inferior a 10 nm. Esse tamanho reduzido faz com que o material apresente o fenômeno de confinamento quântico e efeitos de borda, que conferem propriedades de

quimioluminescência e luminescência eletroquímica (ECL), com potencial para ser aplicado em diversas áreas. Eles foram primeiro observados durante a purificação de nanotubos de carbono com parede simples, por Xu e colaboradores [31]. Os QDs baseados em carbono apresentam alta solubilidade em água, estabilidade química e facilidade de modificação, que aliados com a baixa toxicidade e boa biocompatibilidade tornam o material mais atraente para aplicações em bioimagem, biossensores e *drug delivery* do que os *quantum dots* semicondutores e corantes orgânicos [32,33].

O *quantum dots* de grafeno (GQD) unem as características dos QDs com as vantagens do grafeno. São folhas de grafeno 0D com a presença de ácidos carboxílicos nas bordas, conferindo além de solubilidade a possibilidade de explorar essa funcionalização do material [34,35]. A síntese dos GQDs pode ser feita através de dois processos distintos bem descritos na literatura: *top-down* e *bottom-up*. O primeiro envolve a fragmentação de materiais bulk, como nanotubos de carbono, fibras de carbono, grafite ou folhas de grafeno até nanoestruturas serem alcançadas, enquanto *bottom-up* agrupa métodos que tem materiais de partida menores e mais simples que as nanoestruturas para construir o GQD [33,35–37]. Ambos os processos estão ilustrados simplificadaamente na FIGURA 7.

FIGURA 7: SIMPLIFICAÇÃO DAS ESTRUTURAS QUE PODEM SOFRER TRANSFORMAÇÃO ATRAVÉS DE DOIS TIPOS DE SÍNTESES PARA A FORMAÇÃO DE NANOESTRUTURAS.



Fonte: O autor.

No geral, as abordagens *bottom-up* permitem o preparo de nanoestruturas com menos defeitos e composições mais homogêneas. Isso se deve às condições de síntese mais brandas e controláveis em comparação com as condições destrutivas necessárias para realizar uma rota *top-down*, como tempo, reagentes, matérias-primas, além de um custo menor envolvido [38]. Devido a suas propriedades, os GQD têm enorme potencial no desenvolvimento de sensores, pois, permitem explorar os grupamentos de ácidos carboxílicos presentes nas bordas para ancorar espécies tornando-o interessante para a construção de biossensores, por exemplo.

### 1.3 BIOSSENSORES

Por definição, biossensor é um dispositivo analítico que emprega organismos ou moléculas biológicas como interface para interagir, se ligar ou reconhecer um analito específico. A partir dessa definição, o primeiro biossensor foi proposto por Clark, onde ele usou o eletrodo de oxigênio que ele mesmo criou em 1962 [39] e imobilizou glicose oxidase na sonda. A reação da enzima com glicose consome parte do oxigênio, que pela diferença obtida através de um eletrodo sem a enzima permite a quantificação da glucose presente no sangue [40]. Dessa abordagem experimental nasceu o que hoje é classificado como sensores biocatalíticos. A aplicação de enzimas acopladas a sensores permitiu a quantificação de diversas estruturas que não são eletroativas naturalmente através de técnicas eletroquímicas, como uréia e álcool. A facilidade de customizar o dispositivo levou à pesquisa de sensores empregando biomoléculas mais complexas, como células, anticorpos e ácidos nucleicos, expandindo a aplicação dos biossensores com o passar dos anos [41].

Biossensores se tornaram ferramentas importantes na química analítica, sendo empregados em monitoramento ambiental, da qualidade da água, solo e alimentos que fazem o uso do dispositivo por algumas horas ou até dias [42]. Porém, boa parte das aplicações importantes de biossensores se encaixam em um modelo rápido em que somente uma análise é possível, onde plataformas de baixo custo e descartáveis se destacam. Essas aplicações estão mais ligadas à área da saúde na detecção de biomarcadores importantes para o monitoramento da saúde e para o diagnóstico de doenças.

A versatilidade dos métodos eletroquímicos faz com que os biossensores eletroquímicos possam ser direcionados para substituição do método ELISA em grandes laboratórios com recursos e profissionais especializados, pois a independência do tamanho do sistema para a obtenção da resposta facilita a miniaturização do sistema e diminui o volume de reagentes utilizados. A substituição das fitas de fluxo lateral também é possível, com diversas pesquisas focadas na diminuição do custo e acessibilidade dos métodos eletroquímicos, desde a impressão de eletrodos descartáveis ao desenvolvimento de dispositivos *point-of-care* [43]. Técnicas eletroquímicas conseguem detectar facilmente mudanças na condutividade e resistividade do sistema estudado, sendo possível acompanhar a modificação da superfície do eletrodo durante a construção do biossensor “etapa por etapa”. Isso permite a detecção das biomoléculas de interesse sem necessitar o uso de marcação enzimática, denominado *label-free*, pois a mudança nas propriedades do eletrodo de trabalho é suficiente para indicar a interação com o alvo. Isso diminui a quantidade de etapas necessárias para se obter o resultado, deixando o método mais rápido e barato [44,45].

Para realizar a análise em biossensores *label-free*, é necessário o uso de sondas eletroquímicas, que são espécies com resposta eletroquímica bem definida, e utilizada como um padrão de resposta para estudar possíveis alterações no sistema. Isso permite criar um padrão de resposta, onde um eletrodo imerso uma solução com concentração conhecida diluído em um pH definido, oferece uma resposta específica quando a técnica analítica escolhida é realizada. Ao se fixar todas as variáveis, modificar somente o eletrodo, e avaliar como essa resposta mudou, é possível obter respostas quanto às reações que ocorreram na superfície [9]. As espécies mais comuns de serem usadas são os íons ferricianeto e hexaminrutênio (III) e moléculas orgânicas, como a hidroquinona. O par ferro/ferricianeto de potássio ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ) é mais comum de ser relatado em biossensores pois além de ser inerte, apresenta um custo mais acessível do que outras alternativas.

Em biossensores, as etapas de construção do sensor afetam diretamente a resposta da sonda eletroquímica, pois a modificação do eletrodo através da formação da camada seletiva, e a interação final com espécies normalmente biológicas que não apresentam condutividade, incidem em um bloqueio do eletrodo. Esse bloqueio diminui a capacidade do eletrodo em transferir elétrons, afetando a conversão da sonda eletroquímica, e o padrão de resposta definido antes é alterado. A quantificação

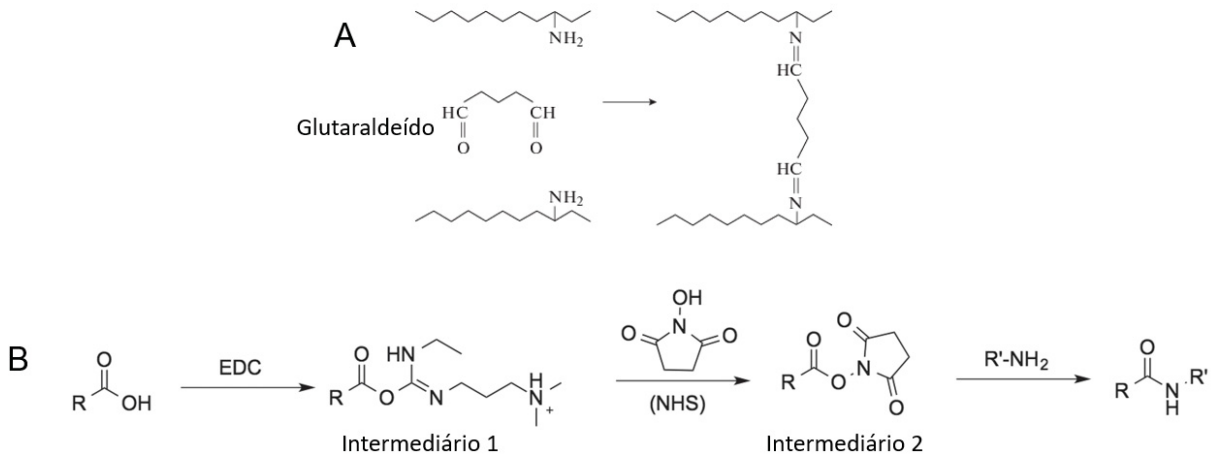
da mudança que ocorre no sinal da sonda eletroquímica após a interação do biossensor com o analito pode ser utilizada para verificar o funcionamento do dispositivo. Como todas as etapas, inclusive a detecção do analito, são analisadas sem a presença de enzimas (que são chamadas de *label* em alguns métodos bioquímicos) e substratos adicionais, o método passou a ser designado como *label-free*. O método é uma das principais vantagens dos sensores eletroquímicos, e já é bastante difundido em literatura [44–47].

A seletividade é um dos passos importantes na construção de um biossensor, e uma das decisões críticas na hora de desenvolver um dispositivo desse é a formação da camada seletiva. Há diversas técnicas de imobilização para se modificar um eletrodo com as espécies de interesse que variam em complexidade e eficiência, como adsorção, aprisionamento em matrizes ou a formação de ligação covalente através de agentes de ligação cruzada [48]. O uso de nanopartículas antes de qualquer biomolécula é muito utilizado pois melhora as propriedades eletroquímicas do eletrodo, e em alguns casos, é o que permite o uso de algumas técnicas de imobilização.

A técnica de imobilização mais simples é a adsorção, que parte do princípio de que algumas espécies tem afinidade a se adsorver na superfície do eletrodo. Isso pode ser melhorado através de nanopartículas que apresentem melhor afinidade pelos grupamentos da molécula a ser adsorvida, sendo mais comum observar essa técnica com moléculas grandes ou com grupamentos hidrofóbicos, com menor tendência a se dissolver e lixiviar da superfície. Essa técnica normalmente é feita por drop-casting, onde a solução contendo a biomolécula a ser adsorvida é pingada sobre a região a ser modificada, e a secagem da solução leva a uma maior interação entre os grupamentos hidrofóbicos, melhorando um pouco a robustez do método [49].

Por outro lado, técnicas mais complexas podem ser utilizadas para realizar uma ligação mais forte entre o eletrodo e a biomolécula. Entre elas se destacam o uso de glutaraldeído, que permite a formação de uma ponte entre dois grupos funcionais amino (FIGURA 8A), e a reação envolvendo os reagentes 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS), que formam uma ligação covalente entre um grupo funcional ácido carboxílico e um grupo funcional amino através de uma reação de substituição FIGURA 8B.

FIGURA 8: A) EXEMPLO DA LIGAÇÃO COVALENTE FORMADA ENTRE AMINAS PELO USO DA REAÇÃO COM GLUTARALDEÍDO. B) REAÇÃO DE SUBSTITUIÇÃO COM EDC E NHS PARA A FORMAÇÃO DE UMA LIGAÇÃO COVALENTE ENTRE UM GRUPO CARBOXILA E UM GRUPO AMINO.



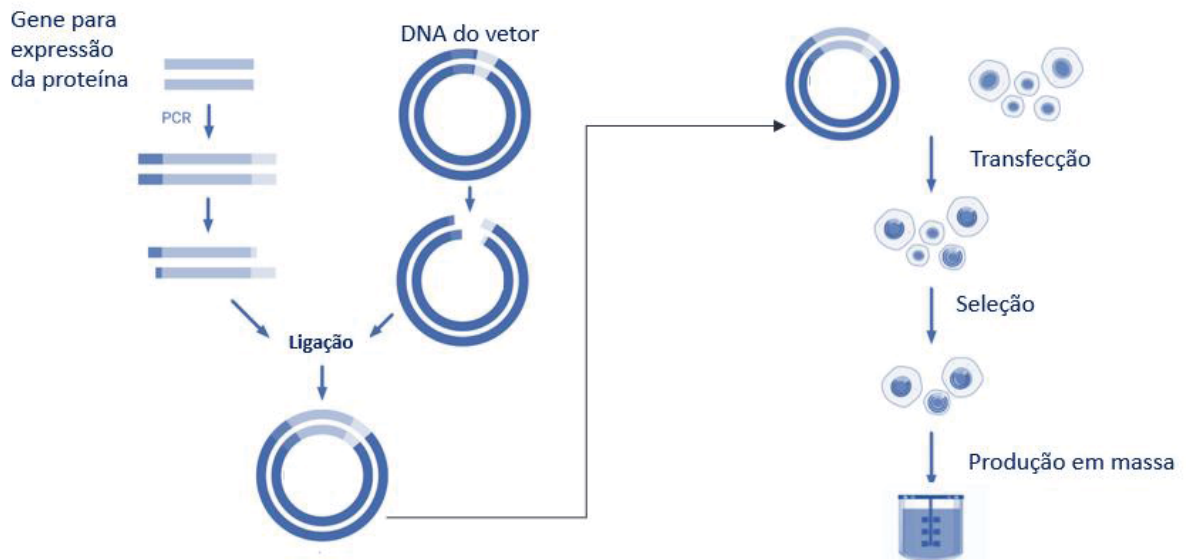
Fonte: O autor.

Esses métodos são muito úteis para biossensores, pois as biomoléculas utilizadas contêm uma alta quantidade de grupamentos amino passíveis de reagirem, e a eficiência da imobilização passa a depender da funcionalização na superfície do eletrodo. Como já abordado, as nanopartículas de ouro e de carbono oferecem muitas vantagens nesse sentido. A alta presença de grupos funcionais em nanopartículas de carbono e a facilidade de funcionalizar a superfície das nanopartículas de ouro permitem definir o experimental por diversos caminhos possíveis para que a modificação do eletrodo com a biomolécula de interesse seja realizada com a maior eficiência possível.

A ligação entre proteínas (anticorpo, antígeno, proteínas estruturais, etc.) acontece pela interação entre aminoácidos presentes nas estruturas, onde pontes de hidrogênio, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e forças eletrostáticas contribuem para melhorar a força e especificidade das interações entre proteínas. Assim, não só a sequência de aminoácidos das proteínas é importante, mas sua conformação estrutural tridimensional, que também é afetado pelo pH e composição do meio. Essas estruturas podem ser desvendadas e sintetizadas, permitindo a engenharia de proteínas recombinantes, onde geralmente uma bactéria como a *E. coli* tem seu código genético alterado para produzir a proteína desejada em grande escala, exibindo propriedades e especificidade próxima às proteínas originais. O esquema

simplificado de alteração do DNA de vetores e o processo para a produção em massa da proteína recombinante está ilustrado na FIGURA 9.

FIGURA 9: ESQUEMA ILUSTRATIVO DA ALTERAÇÃO DO CÓDIGO GENÉTICO DE UM VETOR PARA EXPRESSAR A PROTEÍNA DESEJADA E REALIZAR A PRODUÇÃO EM MASSA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.



Fonte: O autor

As estruturas das proteínas recombinantes podem ser diferentes o suficiente para impedir o uso em aplicações mais refinadas como vacinas, mas tem grande contribuição no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e produção em massa de testes, pois permite uma maior quantidade de proteína por um método mais simples e mais barato (após o desenvolvimento). Assim, a testagem e o controle de surtos de doenças endêmicas ficam mais acessíveis, contribuindo também para a pesquisa de novas metodologias para diagnóstico como os biossensores eletroquímicos [50].

Como exemplo, Kim et al. desenvolveu um biossensor para a detecção de bisfenol A através da modificação de eletrodos baseados em óxido de grafeno reduzido (rGO) com uma proteína recombinante com interação seletiva ao analito de interesse. A proteína recombinante foi imobilizada no rGO através de um peptídeo auxiliar, e a interação com o bisfenol A mensurada pela técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica. O sensor otimizado apresentou uma região linear entre  $100 \text{ fmol L}^{-1}$  e  $10 \text{ nmol L}^{-1}$ , com um limite de detecção de  $5 \text{ fmol L}^{-1}$ . O biossensor não sofreu interferência de espécies similares como bisfenol S e bisfenol F, mostrando uma alta especificidade que foi atrelada ao uso da proteína recombinante [51].

Além disso, o avanço na biotecnologia e o recorrente contato com nanomateriais levou ao desenvolvimento de peptídeos com afinidade à sólidos (Solid-Binding Peptides), que são fragmentos entre 7 e 12 unidades de aminoácidos que apresentam afinidade de se ligar em diferentes materiais sólidos, como ouro, platina, paládio, prata, titânio, óxidos de diversos metais, e materiais carbonáceos como grafeno e nanotubos de carbono [52]. Como os peptídeos têm poucas unidades de aminoácidos, é mais comum encontrar a sequência utilizada através de um código específico utilizado para peptídeos e proteínas, onde cada amino ácido é designado uma ou três letras, que ajudam a compartilhar o que foi utilizado nos estudos (por exemplo: Alanina é representada como A e {ALA}).

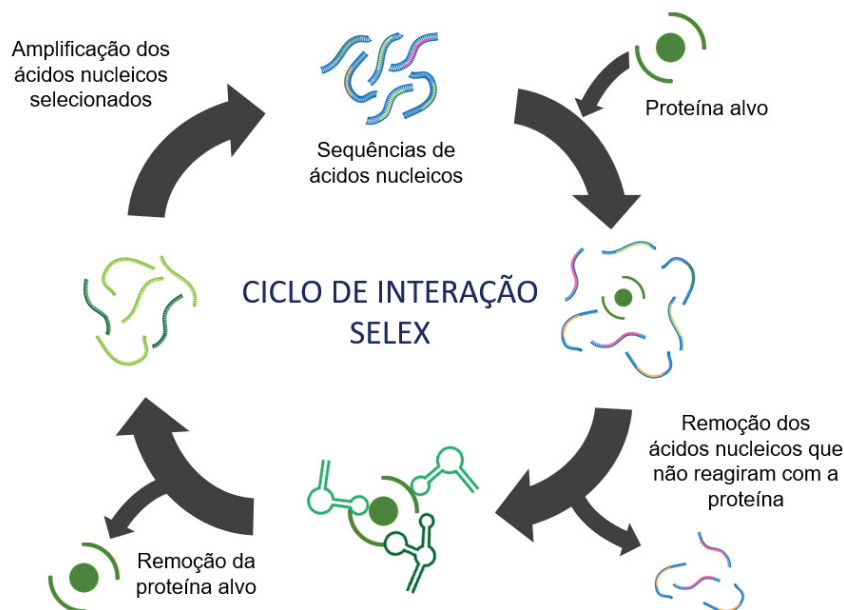
Os peptídeos têm diversas aplicações na nanobiotecnologia, como a síntese controlada de nanomateriais e nanoestruturas, formação de materiais híbridos, melhora da biocompatibilidade de alguns nanomateriais, e a imobilização de proteínas funcionais em superfícies de interesse [52]. A última é observada mais frequentemente na construção de biossensores, onde a proteína de interesse geralmente utilizada para formar a camada seletiva do dispositivo, já é desenhada com essa estrutura adicional de aminoácidos específica para interação com a plataforma de interesse. Assim, a proteína recombinante que simula o exterior de um vírus, por exemplo, é desenvolvida com aminoácidos adicionais que podem se ligar à superfície de interesse. É possível explorar essa propriedade, principalmente para biossensores eletroquímicos, pois permite a modificação de nanopartículas de ouro ou de carbono com uma proteína de interesse, sem necessitar de reações adicionais envolvendo mais reagentes e tempo de preparo do teste.

Puiu et al. fez a aplicação de um peptídeo suporte, com a sequência descrita como X-YAAAHAEAR-NH<sub>2</sub>, onde X se refere ao ácido  $\alpha$ -lipóico, um ácido graxo com a presença de dois átomos de enxofre ligados por uma ligação dissulfeto. A estrutura com enxofre é empregada para realizar a modificação de um eletrodo de ouro com esse peptídeo suporte através da afinidade da ligação tiol-ouro, formando uma base para o ancoramento de uma proteína de reconhecimento. Nessa pesquisa, a autora imobiliza a proteína de reconhecimento para ligar em anticorpos anti-gliadina deaminado, que é o produto da quebra do glúten que gera reações adversas em pessoas com doença celíaca. Através do sinal do azul de metileno por medidas de voltametria de onda quadrada, foi obtido uma resposta para a presença dos anticorpos

em concentrações variando de 0,033 até 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O sensor foi utilizado para diferenciar amostras e detectar a presença de anticorpos em amostras reais [53].

Outra biomolécula desenhada para que tem afinidade com o biomarcador alvo são os aptâmeros. Aptâmeros são oligonucleotídeos (sequências de vários ácidos nucleicos) que são desenvolvidos para se ligarem a moléculas específicas, através de interações semelhantes ao discutido para proteínas e anticorpos: interações de ligação de hidrogênio e outras mais fracas, mas que acontecem em conjunto na estrutura tridimensional, levando a uma interação mais forte e específica. Os aptâmeros são sintetizados *in vitro* a partir de uma síntese química por um método chamado Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX, do inglês: Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). Nessa técnica, diversas sequências pequenas de nucleotídeos são colocadas para interagirem com a biomolécula alvo. As sequências que têm afinidade com o alvo são selecionadas, multiplicadas e aumentadas até formarem fitas que em sua forma tridimensional interage bem o suficiente com o alvo para que a interação seja forte e seletiva [54]. As etapas para a síntese dos aptâmero estão simplificadas na FIGURA 10.

FIGURA 10: CICLO DA TÉCNICA SELEX, QUE SELECIONA E MULTIPLICA OS FRAGMENTOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS QUE INTERAGEM ESPECIFICAMENTE COM A PROTEÍNA ALVO, FORMANDO APTÂMEROS SELETIVOS.



Fonte: O autor.

Os aptâmeros vêm substituindo os anticorpos em alguns imunoenaios devido a algumas vantagens, como uma seletividade semelhante à dos anticorpos, podendo ter uma menor taxa de reação cruzada, além de ser produzido por um método que não utiliza animais de laboratório, o que leva a um tempo menor para o desenvolvimento da biomolécula nova (1 a 3 meses, comparados aos 4 a 6 necessários para a produção de anticorpos). Devido a síntese química, há pouca variação entre moléculas de lotes diferentes, além de serem mais estáveis e recuperarem sua estrutura facilmente em caso de desnaturação, resultando em um maior tempo de prateleira e menores restrições no procedimento experimental [55]. Assim, aptâmeros são uma alternativa relevante no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para diagnóstico, e a aplicação desse material na plataforma proposta torna o desenvolvimento do sensor menos restrito, o que pode facilitar tanto a construção como a detecção da molécula alvo.

Tao et al. desenvolveu um aptassensor para a detecção de Tau381, um biomarcador considerado crítico para o diagnóstico da doença de Alzheimer. O sensor foi construído através da imobilização do aptâmero sobre uma eletrodo modificado com carboxil grafeno/tionina/AuNPs. A tionina além de fazer a ponte entre o grafeno e as nanopartículas de ouro, apresenta um sinal eletroquímico que foi utilizado para quantificar o biomarcador. Após otimização o dispositivo apresentou uma região linear para a Tau381 entre 1,0 e 100 pmol L<sup>-1</sup>, com um limite de detecção de 0,7 pmol L<sup>-1</sup>. A confiabilidade fornecida pelo aptâmero se refletiu na excelente seletividade frente a espécies interferentes como ácido ascórbico, l-cisteína e Tau441, além de reprodutibilidade com desvio abaixo de 5% e diferenciação de amostras reais para pessoas com e sem doença de Alzheimer [56].

Assim, conjuntos de técnicas de modificação do eletrodo, de imobilização de espécies, e uma pluralidade de opções para a construção de biossensores, permitem o desenvolvimento de diversos métodos para quantificação de espécies de interesse para a sociedade, incluindo biomarcadores de doenças relevantes, ajudando no diagnóstico e tratamento de condições pertinentes à saúde humana.

#### 1.4 DOENÇAS ENDÊMICAS E SISTEMA IMUNE

Doenças endêmicas são doenças que tem recorrência em uma região, sem aumentos significativos no número de casos, mas com frequência de infecção e

prevalência da doença na população. Nesse cenário, a doença é tratada como permanente, pois as condições e características da doença levam a uma dificuldade enorme de erradicação, como doenças altamente infecciosas (Covid-19), agentes altamente mutáveis que conseguem infectar mais de uma vez a mesma população (Influenza) ou doenças não curáveis (AIDS). Caso as medidas para controle da doença sejam insuficientes, essas patologias podem causar surtos, aumentando significativamente o número de casos em um curto período. Dependendo da escala, doenças novas ou estabelecidas podem levar a um aumento de casos em várias regiões (epidemia) ou até em níveis globais (pandemia) [57].

Assim, a adoção de medidas sanitárias para conter a disseminação depende da quantidade de informações sobre os casos em ocorrência, em um caso ideal, do diagnóstico de todas as pessoas com sintomas e histórico de contato para isolamento caso a gravidade da doença seja relevante. Para desenvolver um teste para o diagnóstico dessas doenças é preciso entender como o corpo humano se defende dos invasores, e como diferentes biomarcadores podem ser escolhidos como alvo para esses métodos.

Biomarcador é um indicador da severidade ou da presença de algum estado biológico. Esse marcador biológico não é necessariamente uma biomolécula, a pressão arterial ou a glicemia podem ser considerados indicadores para risco de hipertensão ou para problemas com a produção de insulina. Por isso o biomarcador é utilizado como uma ferramenta para monitorar as condições do paciente e auxiliar no diagnóstico e tratamento de doenças [58].

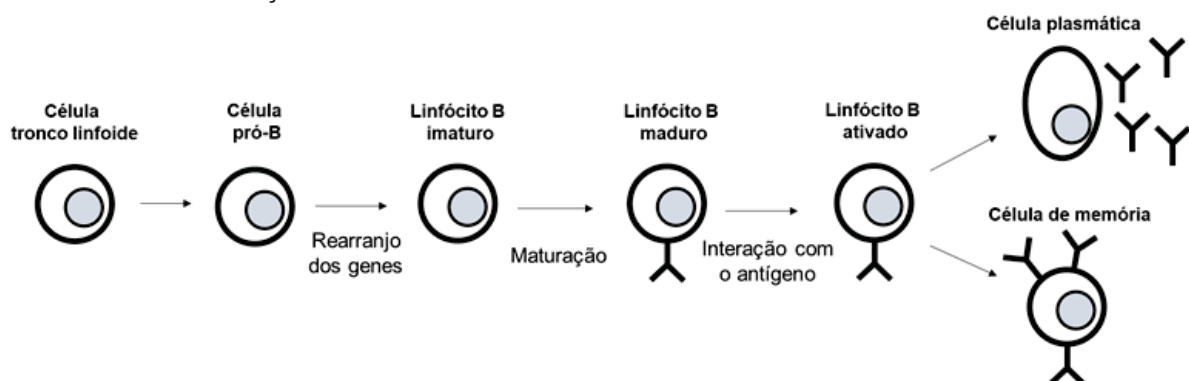
O diagnóstico de doenças evoluiu junto com a descoberta de diferentes biomarcadores e com o desenvolvimento de métodos de análise que identificam uma doença específica. Essa evolução está sustentada pelo estudo do sistema imune e a descoberta das funções das células que fazem parte do mecanismo de defesa do corpo humano, permitindo a aplicação dessas biomoléculas no desenvolvimento de técnicas como o ELISA e análise de fluxo lateral, que fazem extensivo uso de anticorpos [48,59].

Para entender a relevância dos anticorpos, é preciso entender como o sistema imune responde à uma infecção. O sistema imune é dividido em dois componentes devido as respostas diferentes que eles proporcionam. O sistema imune inato tem uma resposta não específica, sendo que a exposição a agentes estranhos (antígenos) que ultrapassam as primeiras barreiras físicas leva a uma resposta máxima e imediata

mediada principalmente por células como os leucócitos e células NK (natural killer). Algumas dessas células atuam por fagocitose, englobando e destruindo o invasor, de forma que fragmentos do invasor podem ser encontrados na corrente sanguínea durante a resposta inata à uma infecção. Isso acontece em grande quantidade mesmo quando o sistema imune inato não é suficiente para conter a infecção sozinho, mas é um elemento essencial também para o sucesso do sistema imune adaptativo, que é ativado em infecções mais graves [60].

A parte mais importante do sistema imune adaptativo são os linfócitos B, que são células desenvolvidas na medula óssea e cada célula expressa um único tipo de receptor (BCR) na sua parede celular. Esse receptor é gerado após uma recombinação do DNA, com  $3 \times 10^{11}$  combinações inicialmente possíveis, levando a uma quantidade um pouco inferior a estar presente no corpo humano a todo momento. Quando o receptor de um linfócito B se encontra com um fragmento do antígeno, isso desencadeia dois processos: multiplicação da célula, para aumentar a quantidade de células que tem o receptor específico que reagiu, e a maturação da célula, que passa a fazer várias cópias desses receptores e liberá-los para ajudar a eliminar o corpo estranho. Esses receptores liberados são chamados de anticorpos, e devido a todos os processos que são necessários para ativar um linfócito B e iniciar a produção dos anticorpos, a resposta que ele oferece pode demorar entre 5 e 8 dias para chegar em seu pico [60]. Um resumo dos passos envolvidos na maturação dos linfócitos B está presente na FIGURA 11.

FIGURA 11: DESENVOLVIMENTO DO LINFÓCITO B ATÉ A INTERAÇÃO COM O ANTÍGENO, E A FORMAÇÃO DA CÉLULA PLASMÁTICA QUE PRODUZ ANTICORPOS PARA COMBATER A INFECÇÃO EM CURSO.

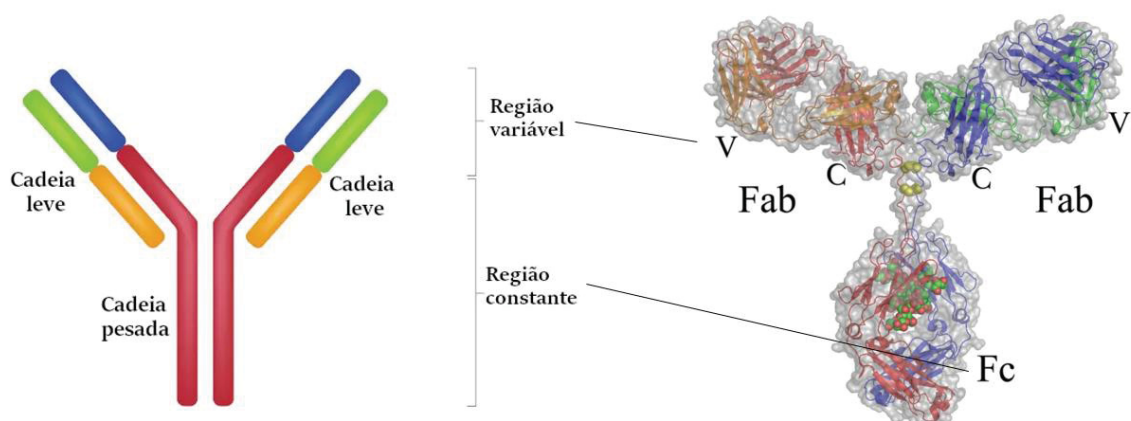


Fonte: O autor.

Os anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas (Ig), ao serem produzidos em grande quantidade e liberados por todo corpo humano, se ligam ao fragmento do antígeno que gerou a resposta no linfócito B inicialmente, levando a uma diminuição da interação desse corpo estranho com o hospedeiro e facilitando que outras células do sistema imune destruam a ameaça. Além disso, no processo da infecção alguns linfócitos T e B se tornam células de memória que desencadeiam uma resposta muito mais rápida a uma reinfecção pelo mesmo agente, mesmo após anos passados da primeira infecção [60].

Há vários tipos de anticorpos, mas o que é criado especificamente na resposta secundária do sistema imune são as imunoglobulinas G (IgG), que é composto por duas cadeias de glicoproteínas diferentes, formando uma estrutura na forma de um Y, como ilustrado na FIGURA 12. A região do anticorpo que se conecta com o antígeno (região variável, V) é definida pela recombinação de DNA do linfócito B que deu origem a esse anticorpo, por isso, a interação entre o anticorpo e o antígeno é altamente específica. A parte constante do anticorpo (C+Fc) é o que define a solubilidade e disponibilidade do anticorpo dentro do corpo humano, e no caso do IgG também auxilia na sinalização celular para que outros componentes do sistema imune atuem contra o corpo estranho [60].

FIGURA 12: ESTRUTURA SIMPLIFICADA E TRIDIMENSIONAL DA IMUNOGLOBULINA G, PRINCIPAL ANTICORPO FORMADO PARA COMBATER INFECÇÕES.



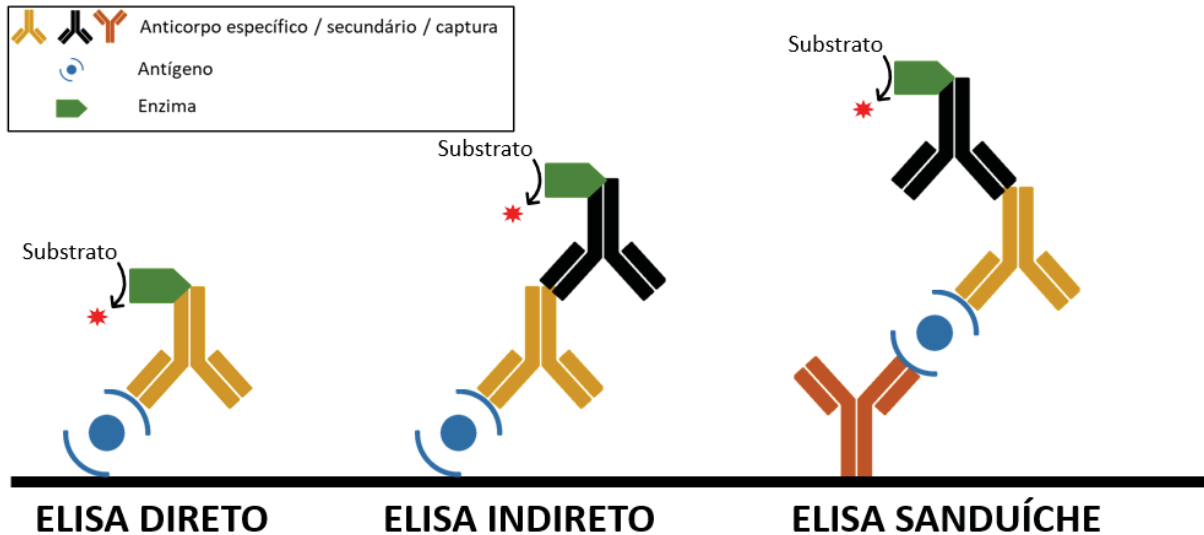
Fonte: Parte da imagem foi adaptada de Stingaciu et al. [61].

A descoberta dos anticorpos permitiu um avanço essencial para a medicina, pois qualquer teste que confirme a presença de um anticorpo específico comprova que o paciente entrou em contato com o fragmento do antígeno e está lutando contra

uma infecção específica. Isso contribuiu para que os diagnósticos evoluíssem da análise do conjunto de sintomas que o paciente apresenta para um diagnóstico que pode apontar a causa do quadro clínico [45]. Um exemplo que ajuda a ilustrar todo esse processo para a resposta imune é a infecção por SARS-CoV-2. Inicialmente o corpo reage contra o vírus através da resposta inata, destruindo parte dos invasores de forma que alguns fragmentos do vírus como a proteína N do nucleocapsídeo, a proteína S1 e S2 da espícula, possam entrar em contato com a grande variedade de linfócitos B disponíveis. Linfócitos B que reagem a esses fragmentos passam pelo processo de maturação e multiplicação, e resultam na fabricação de um anticorpo que reage especificamente com o fragmento inicial (proteína N, S1, S2 entre outros) para ajudar a combater a infecção.

Diversos métodos de diagnóstico foram desenvolvidos e estão em constante evolução, desde o método ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), os métodos de fluorescência e análises por fluxo lateral. Cada método traz vantagens e desvantagens que podem ser exploradas em casos específicos, portanto, não há um método perfeito para todas as situações [62–65]. O método padrão mais aplicado para o diagnóstico de doenças atualmente é o método ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), um ensaio que permite a detecção de anticorpos específicos através de um marcador enzimático e comumente utilizado como comparativo para outros métodos em desenvolvimento. O método consiste na interação específica entre uma molécula de reconhecimento previamente imobilizada na placa e a molécula a ser reconhecida na amostra. Com uma etapa adicional, se faz uso de uma molécula “marcada” com uma enzima, que irá se ligar à biomolécula alvo. Dessa forma, ao se adicionar um substrato específico, as enzimas da molécula marcada convertem o substrato e os poços da microplaca que a amostra continha a biomolécula alvo geram um sinal colorimétrico que é analisado por absorbância [62]. A ordem das imobilizações em alguns tipos de testes ELISA está ilustrada na FIGURA 13.

FIGURA 13: SEQUÊNCIA DE IMOBILIZAÇÃO UTILIZADA PARA VARIAÇÕES DO MÉTODO ELISA, ONDE BIOMOLÉCULAS INTERAGEM PARA GARANTIR A SELETIVIDADE DO MÉTODO. A ENZIMA CONJUGADA A UMA DAS BIOMOLÉCULAS É RESPONSÁVEL PELA CONVERSÃO DO SUBSTRATO QUE GERA A COR E PERMITINDO A QUANTIFICAÇÃO INDIRETA DO ALVO POR ABSORBÂNCIA



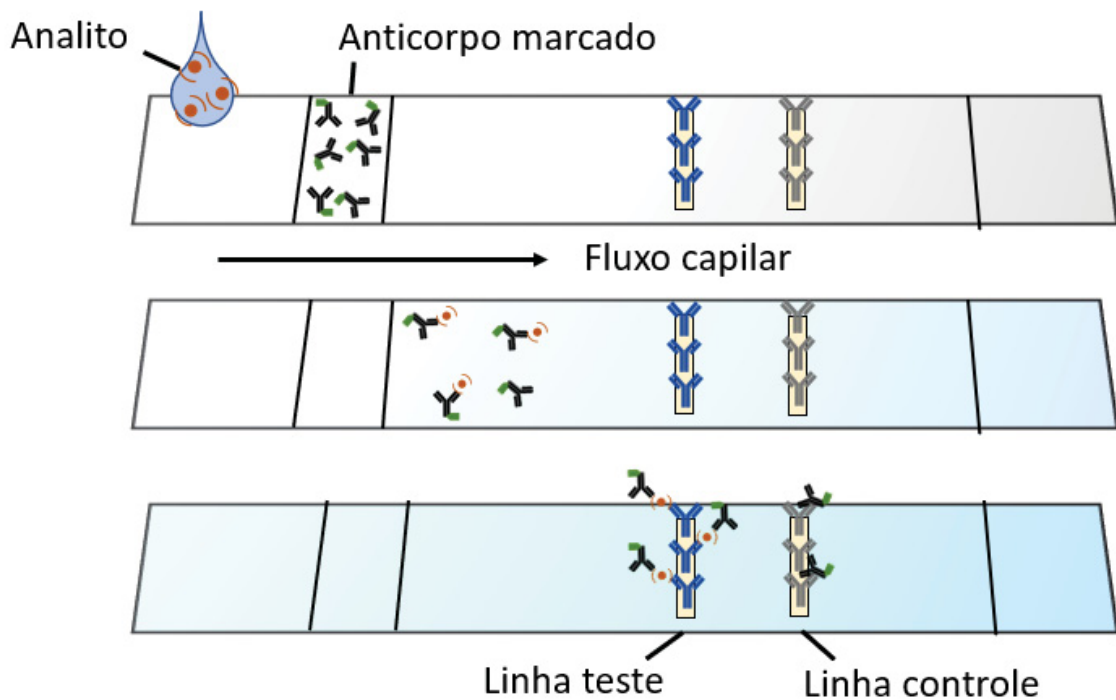
Fonte: O autor.

As diferenças entre os tipos de teste ELISA podem variar em preço e confiabilidade, por exemplo, o ELISA direto depende da captura do antígeno alvo diretamente na placa, podendo levar a imobilização de outras espécies que acarreta na diminuição da sensibilidade ou da ocorrência de falsos positivos. Além disso, o teste direto necessita que o anticorpo específico para o teste seja marcado, diferente do teste indireto que utiliza um anticorpo anti-IgG, que pode ser utilizado em diferentes testes e diminui o preço do método. O teste ELISA sanduíche utiliza uma molécula de captura, que diminui a quantidade de interações inespecíficas que podem acontecer, o que aumenta a confiabilidade, mas também aumenta a quantidade de etapas e o tempo para a execução do método [62]. A alta quantidade de etapas e tempo envolvido tornam o método restritivo para quantidades pequenas de amostras a serem testadas, dificultando a descentralização do método dos laboratórios, limitando seu uso em regiões menores e menos desenvolvidas.

Por outro lado, o método de fitas de fluxo lateral cobre esse cenário, trazendo uma execução muito simples que permite um alcance maior do método e rapidez no diagnóstico de casos isolados. As fitas de fluxo lateral, também conhecidos como os “testes rápidos”, permitem a detecção de uma molécula alvo em uma amostra líquida sem a necessidade de profissionais especializados nem equipamentos de alto custo.

O material da fita é higroscópico e ao se adicionar uma amostra em uma das extremidades da fita, toda a amostra é direcionada para a outra extremidade através de um fluxo capilar, como mostrado na FIGURA 14 [64,65].

FIGURA 14: ESQUEMA DO FUNCIONAMENTO DAS FITAS DE FLUXO LATERAL. ANTICORPOS MARCADOS E REGIÕES COM ANTICORPOS DE CAPTURA AJUDAM A IDENTIFICAR A PRESENÇA DO ANALITO NA AMOSTRA.



Fonte: O autor.

Anticorpos marcados, semelhantes aos utilizados no método ELISA, são previamente depositados próximo à região onde a amostra é adicionada e são carregados juntos com o conteúdo da amostra até a outra extremidade da fita onde se encontram duas regiões. Nessas regiões estão imobilizados os anticorpos específicos para a biomolécula alvo (Linha teste) e anticorpos anti-IgG (Linha controle). Caso a amostra contenha a substância alvo (antígeno), ela irá reagir com os anticorpos marcados no início e com os anticorpos específicos imobilizados na região de detecção; isso gera uma mudança na coloração da fita nessa região, devido marcação no anticorpo, o que indica o resultado [64,65]. Uma parte dos anticorpos marcados será capturado pela linha controle. Assim, para o caso positivo, o dispositivo exibirá as duas linhas reveladas indicando a presença do antígeno. Na ausência do

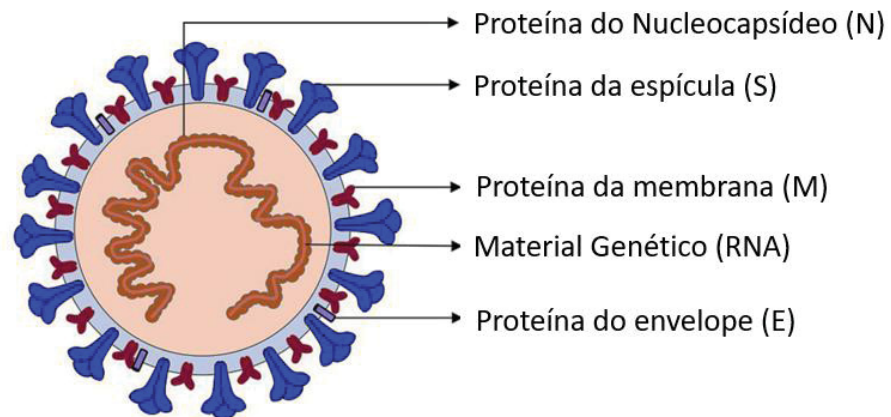
antígeno, há a interação dos anticorpos marcados apenas com a linha de controle o que leva a presença de um único traço. As limitações das fitas de fluxo lateral estão ligadas parte à simplicidade do método. As impurezas contidas em uma amostra que já é complexa por natureza podem ser carregadas junto com a biomolécula alvo, diferentemente do método ELISA onde há etapas de lavagem para retirar as impurezas após a reação com a amostra. Com isso, resultados falsos positivos são mais comuns de acontecer, com impurezas reagindo com os anticorpos e levando a um resultado positivo mesmo sem a presença da biomolécula alvo, o que diminui a confiabilidade do método apesar da facilidade de seu uso [64,65].

Os testes de diagnóstico e a mecânica de enfrentamento de doenças infecciosas acabaram se tornando conhecidos até por pessoas que não são especialistas na área, devido à pandemia de COVID-19 causado pelo vírus SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome). Em dezembro de 2019, a Organização Mundial da Saúde (OMS) foi alertada sobre casos de pneumonia em Wuhan, na China. No dia 7 de janeiro de 2020, as autoridades confirmaram que um novo tipo de coronavírus tinha sido identificado, e devido à alta taxa de infecção apresentada, em março de 2020 a COVID-19 já tinha sido caracterizada como uma pandemia [66,67]. Nesse momento já se discute a possibilidade de tratar a COVID-19 como uma doença endêmica, ou seja, a doença será tratada como permanente

A COVID-19 afeta principalmente o sistema respiratório, e pode se espalhar pelo ar através de partículas de aerossóis criadas quando uma pessoa infectada tosse, espirra, fala ou respira. A mortalidade da doença em nível mundial se aproxima de 1%, com 6,32 milhões de mortes registradas de 538 milhões de casos até junho de 2022, porém, essa taxa era superior antes dos desenvolvimentos das vacinas. A alta taxa de transmissão e o despreparo para um evento desse tamanho, que infectou 7 milhões e meio de brasileiros no primeiro ano, levou à superlotação de hospitais, a criação de hospitais de campanha, e adoção de medidas de mobilidade restritiva para tentar conter o espalhamento da doença.

O sequenciamento genômico e elucidação estrutural do SARS-CoV-2 revelaram um vírus baseado em RNA protegido por um nucleocapsídeo, que é envelopado por uma estrutura com três proteínas principais: Proteína E do envelope, proteína M de membrana, e proteína S que forma uma estrutura chamada de espícula [68]. A estrutura do vírus está representada na FIGURA 15.

FIGURA 15: ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ESTRUTURA E PROTEÍNAS QUE COMPÕEM O VÍRUS SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado de Zhang et al. [69].

A proteína S, que forma a espícula do coronavírus, se tornou foco de pesquisa pois é a estrutura que interage com a ACE2, enzima presente em diversas células do corpo humano (epitélio do sistema respiratório, coração, intestinos etc.), para que seja possível a entrada do vírus na célula [69]. Por se localizar na parte externa do vírus, a proteína S é o alvo mais importante para a produção dos anticorpos em uma pessoa infectada, pois a neutralização pelo anticorpo impede a entrada do vírus nas células por impossibilitar a interação da proteína S com a enzima, e como mecanismo natural facilita a destruição do invasor por fagócitos. Por isso, a quantidade de IgG específico para neutralização da proteína S é uma informação valiosa para relacionar com a imunidade dos infectados. Outro ponto que tornou a quantificação de anticorpos um fator importante durante a pandemia de COVID-19 foram as reinfecções, e a prevalência de anticorpos após a vacinação. Isso fez com que diversos estudos focassem na imunidade oferecida por anticorpos produzidos durante a doença e pela vacinação, assim como a duração da imunidade e necessidade de múltiplas doses de vacina. Dessa forma, testes para quantificação de anticorpos também se tornaram tão necessários quanto os testes PCR para a presença do RNA do vírus.

Um exemplo disso é o imunossensor desenvolvido por Liustrovaite et al., que utilizou a proteína recombinante da proteína S do coronavírus para criar a camada seletiva em um eletrodo de ouro [70]. O eletrodo foi inicialmente funcionalizado a partir de uma solução contendo ácido 11-mercaptoundecanóico e 6-mercapto-1-hexanol, formando uma camada auto-organizável na superfície do eletrodo. A proteína recombinante foi imobilizada na superfície através da reação de substituição a partir

dos reagentes 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS). Através da técnica de voltametria cíclica e o par ferro/ferricianeto de potássio como sonda eletroquímica, foi possível quantificar o bloqueio na superfície causado pela interação com o anticorpo anti-S, e o sensor alcançou um limite de detecção de  $2,53 \text{ nmol L}^{-1}$  para a quantificação da biomolécula.

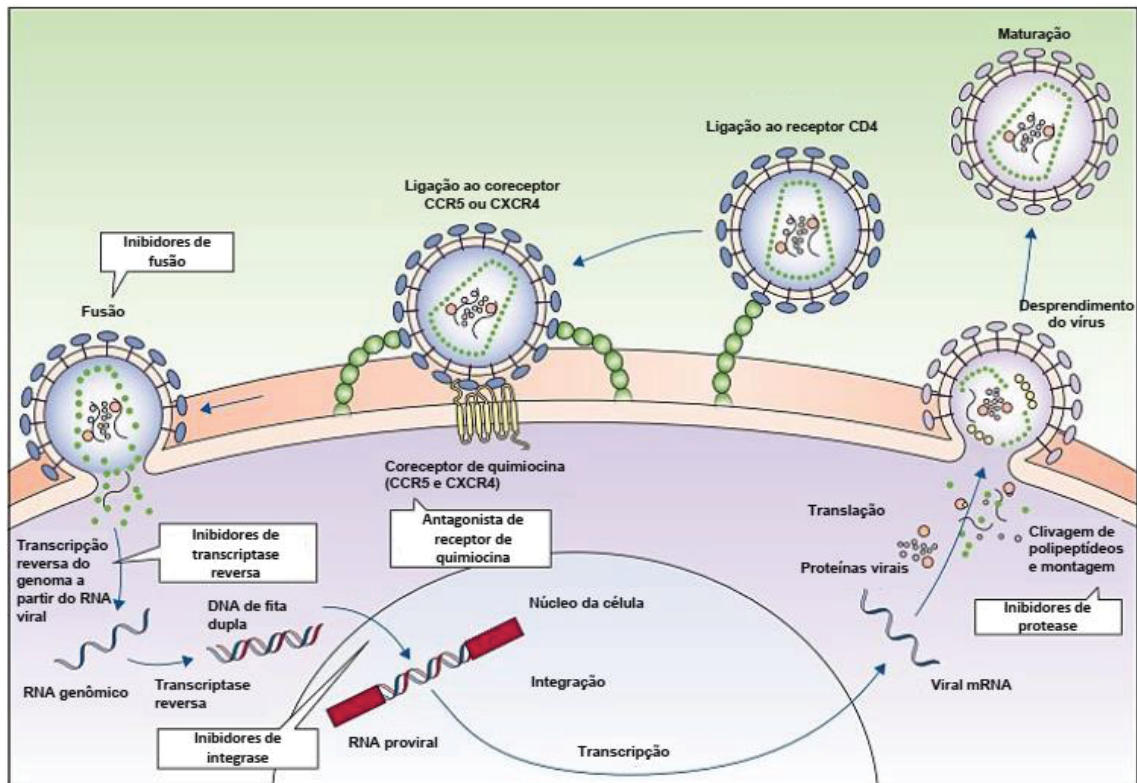
Outra doença que foi classificada como uma pandemia é a Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS, do inglês *Acquired Immune Deficiency Syndrome*) foi descrita como uma nova doença em 1981, quando diversas infecções oportunistas que geralmente ocorrem em momentos que o sistema imune está prejudicado foram relatados junto a tipos raros de câncer maligno [71]. Essas condições foram ligadas ao que hoje é conhecido como vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1, do inglês *Human immunodeficiency virus*), que causa uma das doenças infecciosas com consequências mais severas e até então impossível de se curar [72]. Essas consequências se devem ao fato de o vírus ter afinidade pelo receptor CD4 que fica na parede celular, presente principalmente em linfócitos T auxiliares (Th). Células Th ajudam a regular o sistema imune, e dois mecanismos cruciais são afetados com a infecção dessas células pelo HIV [73]:

- Células T citotóxicas (Tc) que são células responsáveis por destruir células que estejam infectadas, necessitam do estímulo das células Th para funcionarem apropriadamente. No estágio avançado da doença o sistema imune falha em destruir células infectadas, resultando em uma proliferação maior do vírus, além de tornar o indivíduo muito susceptível a outras infecções. Em consequência, o estágio avançado da doença foi denominado Síndrome da Imunodeficiência.
- A comutação de classe das imunoglobulinas é prejudicada, impossibilitando o sistema imune de aumentar a afinidade dos anticorpos. A diminuição de células Th que podem interagir com linfócitos B diminui drasticamente a quantidade de IgA e IgG produzidos, aumentando a susceptibilidade a infecções bacterianas agressivas, principalmente em áreas não acessíveis por IgM.

Devido a isso, o sistema imune gradativamente perde a habilidade de responder até as mais simples infecções, sendo comum o desenvolvimento de câncer,

que levam o óbito a ser causado por complicações relacionadas a AIDS, e não da doença em si. Apesar de não existir cura, a doença pode ser controlada usando a terapia antirretroviral. A terapia antirretroviral é baseada em remédios que bloqueiam a proliferação do HIV em diversos momentos do ciclo de replicação do vírus (FIGURA 16). Assim, a carga viral permanece controlada, e dependendo de em qual estado da doença é feito o diagnóstico, é possível recuperar os níveis de células T auxiliares para níveis normais tornando o sistema imune apto a combater as infecções normalmente, atrasando a condição da AIDS [73].

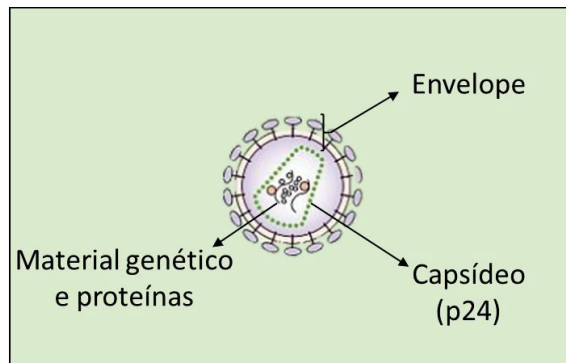
FIGURA 16: CICLO DE REPLICAÇÃO DO HIV E ETAPAS QUE SÃO INIBIDAS POR REMÉDIOS DISPONÍVEIS (DESCRITAS NAS CAIXAS DE TEXTO).



Fonte: adaptado de Maartens G. et al. [73]

Como a AIDS leva a uma diminuição da produção de anticorpos específicos, a quantidade de HIV aumenta gradualmente e a quantificação do vírus no sangue pode ser um biomarcador indicativo do avanço da doença, e auxiliar na decisão sobre a dosagem da terapia antirretroviral [74]. No caso do HIV, diferentes estruturas do vírus podem ser escolhidas como alvo para a construção do imunossensor (FIGURA 17).

FIGURA 17: ESQUEMA SIMPLIFICADO DAS ESTRUTURAS QUE FORMAM O HIV



Fonte: adaptado de Maartens G. et al. [73]

Uma das abordagens mais comuns é a quantificação da proteína p24 (capsídeo), que é a proteína básica da primeira estrutura que envolve o material genético do vírus, como ilustrado. Essa proteína está presente em maior quantidade nas primeiras semanas após a infecção, de forma que os imunossensores desenvolvidos para detectar a proteína p24 visam o diagnóstico da infecção por HIV em seu estado inicial [74–76]. O teste para o p24 começou a ser utilizado devido a menor janela de tempo entre a infecção e a resposta, que antes era realizada através de testes para a presença de anticorpos específicos contra o HIV. Isso por que quando o vírus estão se multiplicando, o sistema imune adaptativo ainda está preparando a produção de anticorpos, e o pico de concentração da proteína p24 ocorre antes do pico de concentração do anticorpo específico [73].

A detecção da proteína p24 é de grande importância para o diagnóstico de recém-nascidos de mães soro positivo, uma vez que os anticorpos da mãe estão presentes na criança até 18 meses após o nascimento. Assim, a presença do anticorpo não indica se o recém-nascido está infectado, e o teste para a presença da proteína p24 é recomendada [77] a fim de realizar o diagnóstico.

Pelo exposto,

Assim, os trabalhos desenvolvidos nesse doutorado focaram na construção de biossensores eletroquímicos. No primeiro, eletrodos impressos foram modificados com quantum dots de grafeno para melhorar a sensibilidade analítica e a funcionalização dos eletrodos, a fim de imobilizar aptâmeros com seletividade para interação com a p24-HIV e realizar testes para a presença da proteína em amostras. No segundo, eletrodos impressos foram modificados através de um método simples com nanopartículas de ouro conjugadas a peptídeos que simulam parte da estrutura

da proteína S do SARS-CoV-2, e empregados na quantificação de anticorpos específicos para a Covid-19.

## 1.5 OBJETIVOS

### Objetivo geral

- Desenvolver biossensores eletroquímicos modificados com nanopartículas para a quantificação de biomarcadores de doenças endêmicas.

### Objetivos específicos

- Projeto 1: Desenvolver um biossensor eletroquímico para a determinação da proteína p24-HIV utilizando *quantum dots* de grafeno como modificador do eletrodo e o aptâmero específico como molécula de reconhecimento.
  - Sintetizar os *quantum dots* de grafeno (GQD) e avaliar seu desempenho como modificador de eletrodos;
  - Empregar eletrodos impressos modificados com GQD na construção de um biossensor para HIV;
  - Usar o aptâmero específico como molécula de reconhecimento da proteína p24 do HIV;
  - Otimizar as etapas para a construção do biossensor e avaliar o seu desempenho na determinação da proteína p24 do HIV;
  - Comparar o biossensor desenvolvido com métodos que partilham o mesmo objetivo;
  - Avaliar amostras reais, tanto amostras positivas fortificadas como negativas.
- Projeto 2: Desenvolver um biossensor eletroquímico para a quantificação de anticorpo anti-proteína S do SARS-CoV-2 através de nanopartículas de ouro modificadas com peptídeos seletivos.
  - Sintetizar e caracterizar as nanopartículas de ouro (AuNP);
  - Realizar a modificação das nanopartículas de ouro com os peptídeos específicos para formar o composto Pept-AuNP;

- Empregar eletrodos modificados com Pept-AuNP para o reconhecimento de anticorpos anti-proteína S de SARS-CoV-2;
- Otimizar as etapas de construção do biossensor e avaliar o seu desempenho na quantificação de anticorpos para SARS-CoV-2;
- Comparar o biossensor desenvolvido com métodos que partilham o mesmo objetivo;
- Avaliar o desempenho do dispositivo em amostras reais fortificadas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 APTASSENSOR PARA QUANTIFICAÇÃO DE P24-HIV

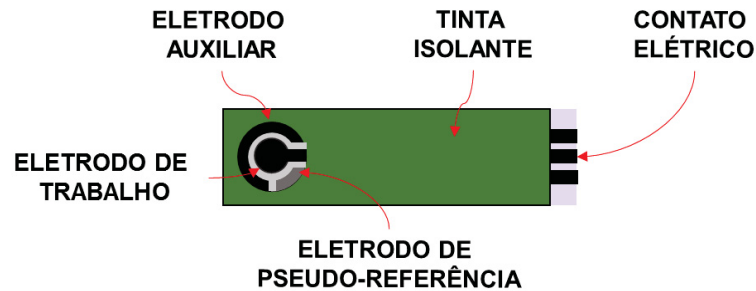
#### 2.1.1 Materiais

Utilizou-se produtos químicos de grau analítico ou de alta pureza. Cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), sal de sódio de N-hidroxisulfossuccinimida (NHS), ácido cítrico, albumina de soro bovino (BSA) e soro humano foram adquiridos da Sigma Aldrich. O ferrocianeto de potássio foi adquirido da Merck (Brasil). Tampão fosfato salino  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (PBS) pH 7,4 foi usado como eletrólito de suporte, preparado a partir de sais de fosfato de sódio monobásico e dibásico, cloreto de sódio e cloreto de potássio. O aptâmero de ssDNA para interação com a p24 com um grupo amina na extremidade, as proteínas p24-HIV e p24-HTLV foram fornecidos pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP)

##### 2.1.1.1 Eletrodo

Os eletrodos utilizados são eletrodos impressos produzidos no laboratório do Professor Dr. Craig Banks na Universidade Metropolitana de Manchester, que são a combinação dos eletrodos de trabalho, referência e contra-eletródo em uma única plataforma. Os eletrodos são feitos com uma tinta condutora de carbono grafite depositada sobre um suporte de poliéster maleável, sendo que o pseudoeletrodo de referência é gerado a partir de uma tinta de prata e cloreto de prata. Uma tinta dielétrica (Gwent, Liverpool, Reino Unido) é utilizada para delimitar a área ativa dos eletrodos, como ilustrado na FIGURA 18. A impressão foi feita utilizando as máscaras apropriadas e uma impressora MicroDEK 1670RS (Weymouth, Inglaterra).

FIGURA 18: ILUSTRAÇÃO DO ELETRODO IMPRESSO UTILIZADO (COMPONENTES PRINCIPAIS INDICADOS).



Fonte: O autor.

### 2.1.1.2 Materiais utilizados na síntese dos *quantum dots* de grafeno

Para a síntese dos *quantum dots* de grafeno (GQDs) foi utilizado ácido cítrico e hidróxido de sódio. Após o final da síntese, ácido clorídrico foi utilizado para neutralizar a solução, que foi então armazenada em vidro âmbar. O GQD foi obtido através de metodologia já descrita na literatura por Gevaerd et. al. [78], e será detalhado posteriormente.

### 2.1.1.3 Materiais biológicos utilizados para a construção e avaliação do aptassensor para p24-HIV.

Os materiais para a construção dos biossensores foram cedidos através de uma parceria com o pesquisador Dr. Lucas Blanes do Instituto de Biologia Molecular do Paraná. Entre esses materiais estão a proteína p24 de HIV (concentração estoque de  $93 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), que faz parte do capsídeo do vírus e está presente em grande quantidade nas primeiras semanas após a infecção [73]. Além disso, foi cedido a proteína p-24 de HTLV (concentração estoque de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para estudos de seletividade do sensor. Para a interação com essa proteína, foi disponibilizado um aptâmero ligado a uma cadeia carbônica linear contendo um grupo amino na outra extremidade.

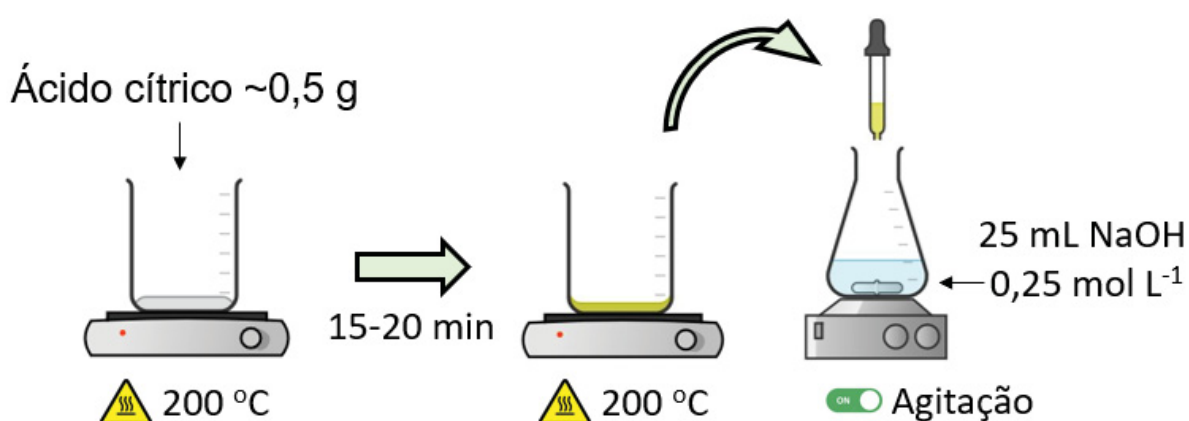
## 2.1.2 Métodos

### 2.1.2.1 Síntese dos *quantum dots* de grafeno

Os *quantum dots* de grafeno foram obtidos através de metodologia já descrita na literatura por Gevaerd et. al. [78].

A primeira etapa consiste no aquecimento do ácido cítrico (~0,5 g) a 200°C em uma chapa com controle de temperatura. Durante a síntese, o ácido cítrico sólido se torna um líquido incolor. Na sequência, o líquido se torna amarelo claro, e posteriormente alaranjado, indicando a formação do GQD. O tempo de reação total é de aproximadamente 20 minutos. Com a solução ainda sob aquecimento para que a solução não volte a se tornar sólida, mas de forma rápida para que o aquecimento não forme partículas maiores, o líquido laranja obtido foi imediatamente adicionado a um Erlenmeyer de 100 mL contendo 25 mL de uma solução de hidróxido de sódio 0,250 mol L<sup>-1</sup> previamente preparados. A adição foi feita gota a gota sob agitação vigorosa, obtendo-se assim a solução com os *quantum dots* de grafeno. A solução final foi neutralizada com uma solução de ácido clorídrico puro (33%) até chegar próximo ao pH 7,0 e armazenada em vidro âmbar.

FIGURA 19: ESQUEMA EXPERIMENTAL DA SÍNTESE DOS QUANTUM DOTS DE GRAFENO, QUE CONSISTE NO AQUECIMENTO DO ÁCIDO CÍTRICO E A TRANSFERÊNCIA DO SAL EM SUA FORMA LÍQUIDA A UMA SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO.



Fonte: O autor.

### 2.1.2.2 Modificação do eletrodo com grafeno *quantum dots*

Para realizar a imobilização do eletrodo de trabalho com o GQD, optou-se pelo método de eletrodeposição utilizando voltametria cíclica. O GQD é extremamente solúvel em água, então um procedimento para a redução do grafeno é realizado para a formação de um filme fino resultante da eletrodeposição do material na superfície do eletrodo.

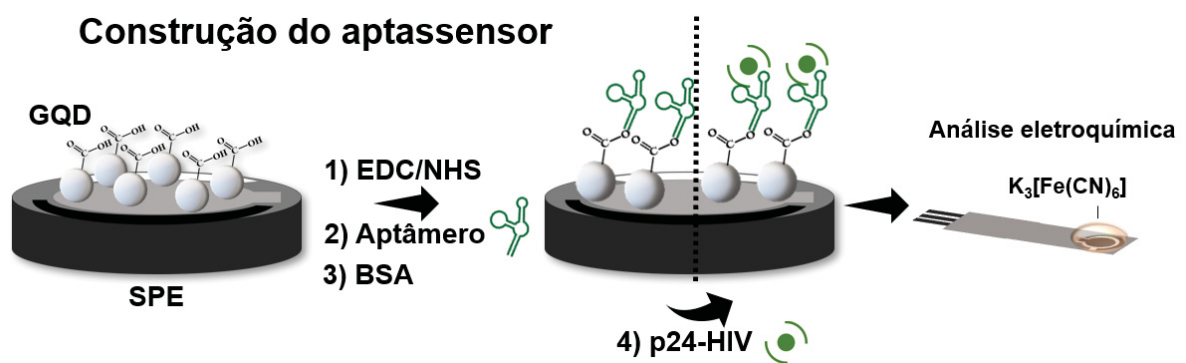
Para isso, o eletrodo base foi conectado ao potenciostato de forma que a face dos eletrodos ficou apontada para cima, e 70  $\mu\text{L}$  da solução de GQD depositada sobre a região dos três eletrodos, formando uma gota. A técnica de voltametria cíclica foi aplicada utilizando uma janela de potencial entre 0 e -1,5V, com uma velocidade de varredura de 50  $\text{mV s}^{-1}$ . Após a eletrodeposição, o eletrodo é enxaguado gentilmente com água destilada através de uma pisseta para retirar qualquer nanomaterial mal adsorvido.

### 2.1.2.3 Construção do aptassensor

Para a construção de um biossensor a fim de quantificar a proteína p24 de HIV, o eletrodo já modificado com GQD é exposto a uma solução contendo 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS). A solução foi preparada diluindo em água ultrapura a massa para alcançar uma concentração de 4  $\text{mmol L}^{-1}$  de EDC e 6  $\text{mmol L}^{-1}$  de NHS. 10  $\mu\text{L}$  da solução foram pipetadas sobre o eletrodo de trabalho modificado e esperado a reação acontecer por 1 hora. Posteriormente, 2  $\mu\text{L}$  da solução contendo o aptâmero na concentração necessária foi depositada sobre o eletrodo de trabalho, permanecendo em contato durante uma hora. Foi utilizado albumina para bloquear os sítios inespecíficos da superfície antes da última determinação, depositando 2  $\mu\text{L}$  da solução sobre o eletrodo de trabalho e deixado reagir durante 15 min. Os testes para a determinação do analito alvo foram feitos utilizando 2  $\mu\text{L}$  de uma solução da proteína p24, diluída em PBS a partir da solução estoque para a concentração necessária, com um tempo de 60 minutos para a interação entre a proteína e o aptassensor criado. Alguns desses parâmetros foram otimizados durante o desenvolvimento do método.

Após a realização de cada etapa, enxágues com água destilada foram realizados para remover excessos ou reagentes mal adsorvidos. Se necessário, o excesso de água foi retirado com a ajuda de um papel absorvente, sem encostar na região do eletrodo de trabalho. Se pertinente, foram realizadas as técnicas eletroquímicas antes de prosseguir para a etapa seguinte.

FIGURA 20: ETAPAS EXPERIMENTAIS (NÚMEROS INDICAM A SEQUÊNCIA EM QUE SÃO REALIZADAS) PARA A CONSTRUÇÃO DO APTASENSOR E DETEÇÃO DE P24-HIV. A RESPOSTA FINAL É OBTIDA ATRAVÉS DA DIFERENÇA OBSERVADA NA ANÁLISE ELETROQUÍMICA DO SENSOR CONSTRUÍDO ANTES E DEPOIS DA ETAPA 4.



Fonte: O autor.

#### 2.1.2.4 Teste de Seletividade

Para avaliar a seletividade do aptassensor proposto, a interação do sensor com a proteína p24-HTLV (vírus T-linfotrófico humano) foi avaliada e comparada com a interação com a proteína alvo, p24-HIV.

Para o teste, as proteínas p24-HIV e p24-HTLV foram diluídas para  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  em PBS.

#### 2.1.2.5 Diagnóstico de amostras fortificadas

Soro sanguíneo humano comercial da Sigma-Aldrich, tipo AB negativo, foi adquirido e utilizado como padrão de amostra. O soro foi fracionado e diluído 1:100 (v/v), adicionando a proteína p24-HIV na concentração necessária para os testes realizados com o aptassensor otimizado.

### 2.1.3 Medidas

#### 2.1.3.1 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT204 com módulo FRA32 de impedância, gerenciado pelo programa NOVA 2.1.4 para coleta de dados. A avaliação das etapas de construção do dispositivo foi realizada a partir de dados obtidos pela técnica de voltametria cíclica utilizando  $K_3[Fe(CN)_6]$  5,0 mmol L<sup>-1</sup> como sonda eletroquímica diluída em tampão fosfato salino pH 7,4, a uma velocidade de varredura de 50,0 mV s<sup>-1</sup>. Para isso, o sensor a ser avaliado foi conectado ao potenciostato de forma que sua face ficasse apontada para cima, permitindo colocar uma gota da solução suficiente para cobrir os três eletrodos, e a técnica eletroquímica aplicada. Todas as medidas foram realizadas no mínimo em triplicata. As medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizadas em solução de 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de  $K_3[Fe(CN)_6]$  em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 com frequência variando de 0,01 Hz a 100 kHz, e amplitude AC de 10 mV potencial de circuito aberto.

#### 2.1.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O GQD utilizado na construção dos eletrodos modificados foi submetido a medidas de FTIR a fim de caracterização estrutural. O carbonáceo foi homogeneizado com KBr, previamente seco, prensados para formar uma pastilha e as medidas foram realizadas empregando um espectrofotômetro BOMEN (ABB Ltda, Suíça), disponibilizado no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná. Foram feitos 64 scans de 4000 cm<sup>-1</sup> a 500 cm<sup>-1</sup>.

#### 2.1.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens obtidas da superfície dos eletrodos foram realizadas com Microscópio Eletrônico de Varredura de Alta Resolução FEI, modelo Quanta 450, com fonte de elétrons FEG (*field emission gun*), que possui resolução de 1,0 nm. Todas as imagens foram obtidas com uma aceleração de voltagem de 15 kV e com detectores de elétrons secundários (SE).

## 2.2 BIOSSENSOR PARA QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPO ANTI-S DE SARS-COV-2

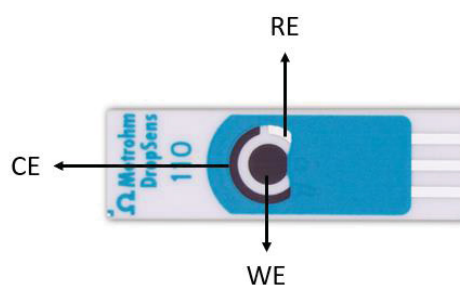
### 2.2.1 Materiais

Utilizou-se produtos químicos de grau analítico ou de alta pureza. Ácido cloroáurico, albumina de soro bovino (BSA) e soro humano foram adquiridos da Sigma Aldrich. O ferrocianeto de potássio foi adquirido da Merck (Brasil). Tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (TF) pH 7,4 foi usado como eletrólito de suporte, preparado a partir de sais de fosfato de sódio monobásico e dibásico. O peptídeo seletivo para a ligação com anticorpos anti-proteína S do SARS-CoV-2, e os anticorpos anti-proteína S do SARS-CoV-2 foram obtidos em parceria com o Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol (Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UFPR)

#### 2.2.1.1 Eletrodo

Os eletrodos utilizados nesse projeto foram adquiridos da Metrohm, modelo 110 que são a combinação dos eletrodos de trabalho, referência e contra-eletrodo em uma única plataforma. O eletrodo é de cerâmica, com eletrodo de trabalho e contra-eletrodo de carbono, e eletrodo de referência de prata, impressos como detalhado na FIGURA 21. A área geométrica do eletrodo de trabalho é de 0,11 cm<sup>2</sup>.

FIGURA 21: ELETRODO IMPRESSO UTILIZADO NO PROJETO. INDICADOS ESTÃO O ELETRODO DE REFERÊNCIA (RE), CONTRA-ELETRODO (CE) E ELETRODO DE TRABALHO (WE).

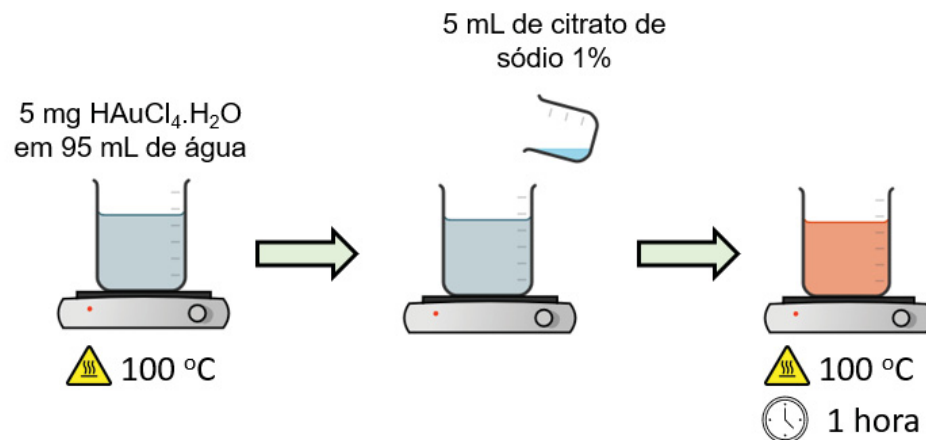


## 2.2.2 Métodos

### 2.2.2.1 Síntese das nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas pelo método descrito por Turkevich [19,79]. Nesse método, uma solução contendo ouro é preparada a partir da dissolução de 5 mg de ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) em 95 mL de água MilliQ dentro de um béquer. A solução foi levada a uma chapa de aquecimento definida para atingir  $100\text{ }^\circ\text{C}$ , e a solução aquecida até fervura. A partir desse momento, 5 mL de uma solução de citrato de sódio 1% foram adicionados à solução de ouro, transformando a solução cinza/azulada em um tom avermelhado. A fervura foi mantida por mais 1 hora, e após chegar em temperatura ambiente, medido o volume final de solução. O conteúdo foi colocado em um frasco âmbar e guardado em geladeira.

FIGURA 22: ESQUEMA EXPERIMENTAL PARA A SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO. UMA SOLUÇÃO DE ÁCIDO CLOROÁURICO É AQUECIDA



Fonte: O autor

### 2.2.2.2 Peptídeo e AuNPs

Para interação dos peptídeos com as nanopartículas de ouro e formação do modificador para o biossensor proposto, foram misturadas as soluções nas concentrações estoque disponíveis. O peptídeo fornecido estava na concentração de  $1,109\text{ mg mL}^{-1}$ , enquanto as nanopartículas de ouro têm uma concentração teórica de  $0,1\text{ mg mL}^{-1}$ . Foi realizado a mistura utilizando uma proporção de um volume da solução estoque do peptídeo para 9 volumes da solução estoque de AuNP, sendo

preparado 1 mL a cada vez. Após isso, a solução era mantida sob agitação dentro da geladeira por 1 hora para formar o compósito, dando origem ao modificador que foi denominado Pept-AuNP.

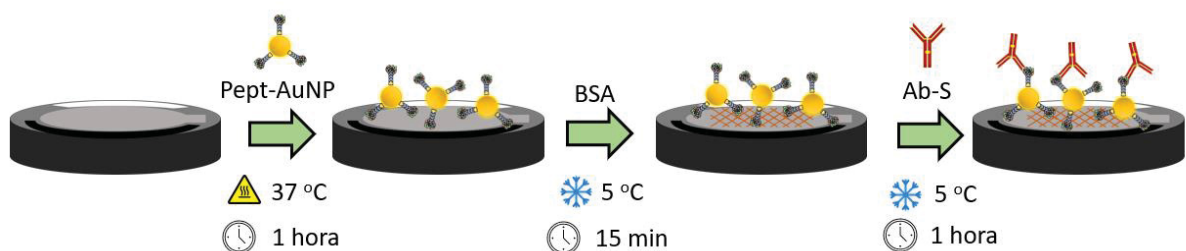
### 2.2.2.3 Construção do biossensor

A construção de biossensor foi realizada inicialmente através da técnica de drop-casting para a formação da camada seletiva do biossensor, onde 5  $\mu\text{L}$  da solução de Pept-AuNP na concentração necessária são depositados sobre o eletrodo de trabalho, e seco em estufa à 37 °C durante 1 hora. Após o tempo, o eletrodo é lavado com uma solução de tampão fosfato salino 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4.

Após a formação da camada seletiva, os sítios inespecíficos foram bloqueados com uma solução de albumina de soro bovino (BSA), com concentração a ser otimizada. Para isso, 5  $\mu\text{L}$  da solução foram adicionados sobre o eletrodo de trabalho, e incubados em geladeira por 15 minutos dentro de uma câmara de vidro com um pano úmido, criando uma atmosfera saturada em água para evitar evaporação da solução em cima do eletrodo. Após a incubação, o eletrodo é enxaguado com a solução de tampão fosfato salino 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4. Nesse ponto, o dispositivo está pronto para interação com o anticorpo anti-proteína S (Ab-S) do SARS-CoV-2.

Para a interação com o Ab-S, 5  $\mu\text{L}$  da solução da concentração necessária para o teste são depositados sobre o eletrodo de trabalho, e incubados em geladeira por 1 hora, semelhante ao descrito para a etapa anterior. Após a interação, o eletrodo é enxaguado e realizado a medida final. As etapas para a modificação do eletrodo e construção do biossensor estão ilustradas na FIGURA 23.

FIGURA 23: ORDEM DE MODIFICAÇÃO DO ELETRODO PARA A CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR PARA QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPO ANTI-PROTEÍNA S DE SARS-CoV-2.



#### 2.2.2.4 Amostra real fortificada

Para o teste em amostras foi utilizado soro humano real comercial (Sigma-Aldrich) diluído 10000 vezes, e fortificado para uma concentração final de  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  do anticorpo anti-proteína S do SARS-CoV-2 (Ab-S). Para comparação, diferentes biossensores foram incubados com o soro real não fortificado com a biomolécula alvo.

#### 2.2.3 Medidas

##### 2.2.3.1 Medidas eletroquímicas

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT204, gerenciado pelo programa NOVA 2.1.4 para coleta de dados. A avaliação das etapas de construção do dispositivo foi realizada a partir de dados obtidos pela técnica de voltametria cíclica utilizando  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$   $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  como sonda eletroquímica diluída em tampão fosfato salino pH 7,4, a uma velocidade de varredura de  $50,0 \text{ mV s}^{-1}$ . Todas as medidas foram realizadas no mínimo em triplicata. As medidas de voltametria de pulso diferencial foram realizadas na sequência utilizando a mesma solução, utilizando um step de 5 mV, amplitude de 0,15 V e tempo de modulação de 0,5 s.

##### 2.2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

As imagens obtidas da superfície dos eletrodos foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR, com Microscópio Eletrônico de Varredura de Alta Resolução FEI modelo Quanta 450 (ThermoFisher, EUA), com fonte de elétrons FEG (field emission gun) e resolução de 1,0 nm. Todas as imagens foram obtidas com uma aceleração de voltagem de 10 kV e com detectores de elétrons secundários (SE).

Para realizar as imagens, eletrodos foram modificados com as nanopartículas de ouro e com o compósito Pept-AuNP por adsorção.

### 2.2.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As nanopartículas de ouro sintetizadas foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) na UFPR, pelo microscópio JEOL, modelo JEM 1200.

### 2.2.3.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As AuNPs e o peptídeo utilizado na construção dos biossensores foram submetidos a medidas de FTIR para caracterização estrutural. As nanopartículas, assim como o Pept-AuNP, foram homogeneizadas com KBr, secos em estufa a aproximadamente 40°C, prensados para formar uma pastilha e as medidas foram realizadas empregando um espectrofotômetro BOMEN (ABB Ltda., Suíça), disponibilizado no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná. Foram feitos 64 scans de 4000  $\text{cm}^{-1}$  a 500  $\text{cm}^{-1}$ .

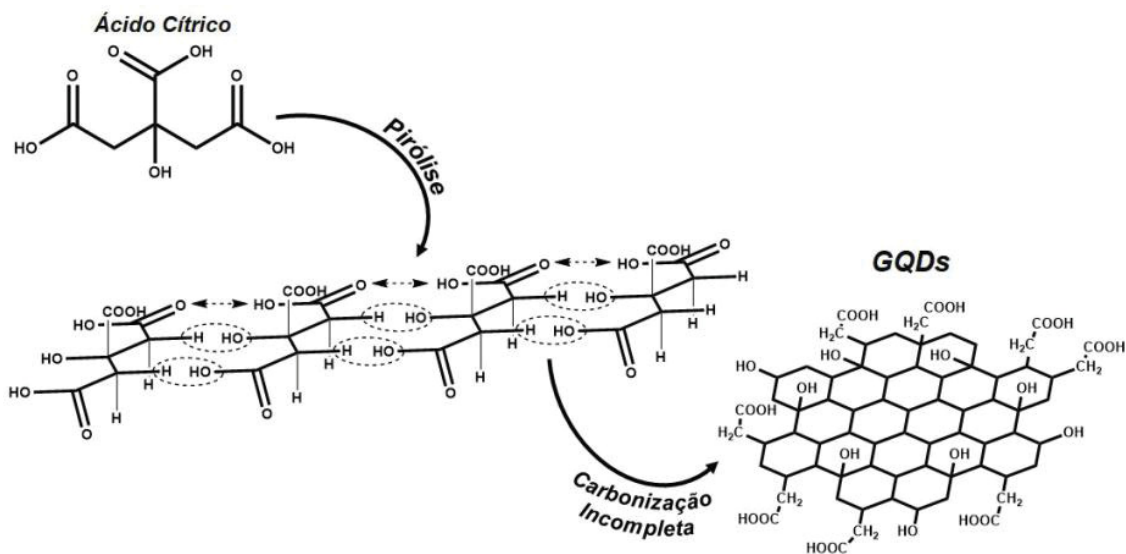
### 3 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 APTASSENSOR PARA A QUANTIFICAÇÃO DE P24-HIV

##### 3.1.1 Caracterização do GQD

O processo adotado de síntese dos *quantum dots* de grafeno foi adaptado por Gevaerd e colaboradores [78] a partir de uma rota *bottom-up* descrita por Dong e colaboradores [80]. A síntese consiste na carbonização incompleta do ácido cítrico, conforme a FIGURA 24, e é baseada na reação entre moléculas mais simples para a formação da estrutura desejada.

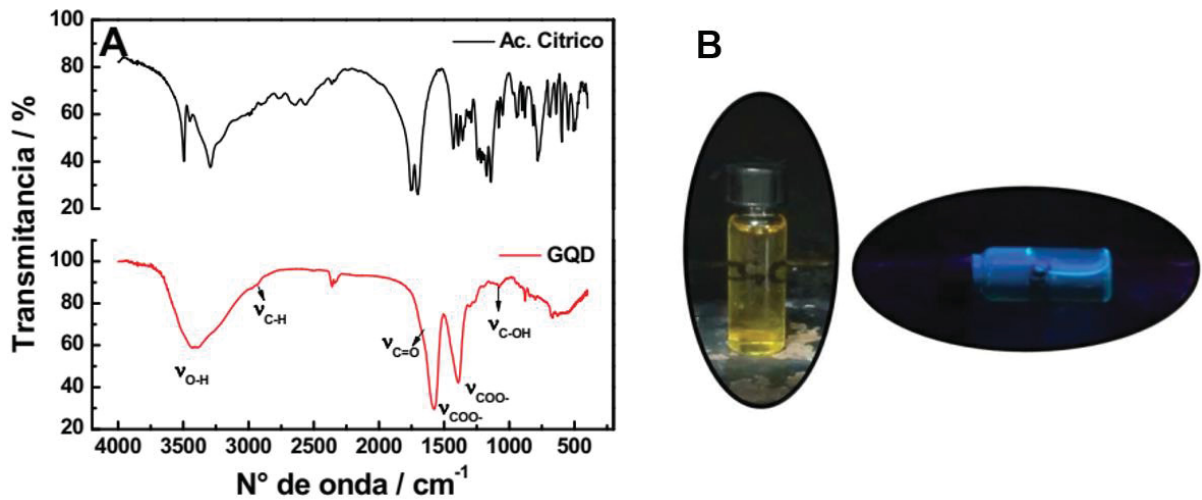
FIGURA 24: ESQUEMA REPRESENTATIVO DA FORMAÇÃO DOS QUANTUM DOTS DE GRAFENO A PARTIR DO ÁCIDO CÍTRICO.



Fonte: Adaptado de Gevaerd [81].

Segundo os autores [78,80], os GQDs são uma única camada de grafite com grupos funcionais oxigenados superficiais, que são reflexo da carbonização incompleta do ácido cítrico. Quanto maior a carbonização, uma estrutura mais próxima a uma folha de grafite é esperada, com uma grande quantidade de carbono sp<sup>2</sup> e poucos grupos funcionais presentes, além de aumentar o tamanho das estruturas formadas. Para confirmar a presença dos grupos oxigenados, que são essenciais para o uso do GQD como uma plataforma para modificações posteriores, medidas de FTIR foram realizadas e estão representadas na FIGURA 25A.

FIGURA 25: A) ESPECTRO DE FTIR OBTIDO PARA O ÁCIDO CÍTRICO E GQD B) IMAGENS DA SOLUÇÃO CONTENDO GQD SOB RADIAÇÃO VISÍVEL (ESQUERDA) E ULTRAVIOLETA (DIREITA).



Fonte: O autor.

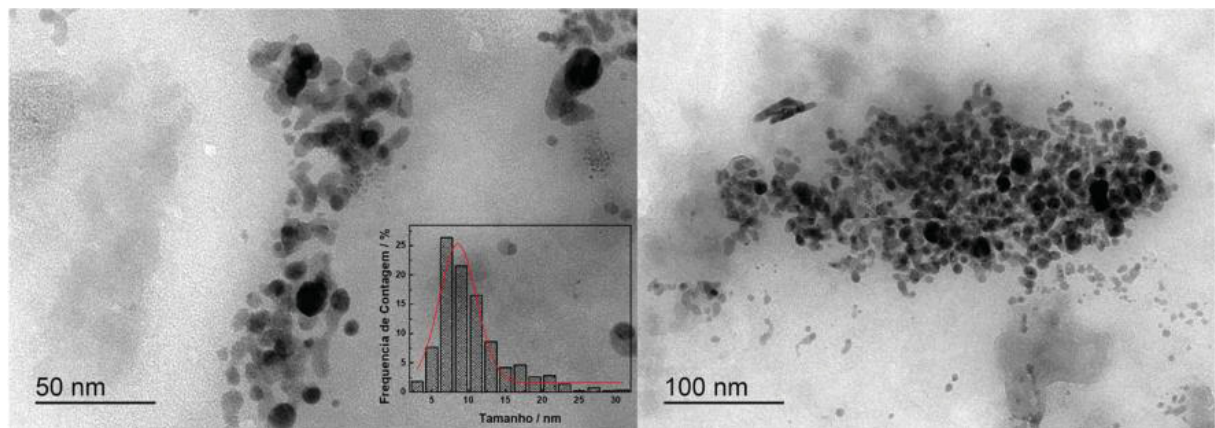
Os espectros obtidos são bastante coerentes com os encontrados na literatura [80,82], indicando a presença de estiramentos de grupos carboxílicos e hidroxílicos referentes aos grupos oxigenados contidos no material. O ácido cítrico apresenta uma banda fraca e larga entre  $3600\text{ cm}^{-1}$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento O-H, além de bandas em  $2950\text{ cm}^{-1}$  (C-H),  $1700\text{ cm}^{-1}$  (C=O),  $1400\text{ cm}^{-1}$  (COO-). O GQD apresenta menos bandas, e os estiramentos referentes aos grupos carboxílicos (O-H, C=O e COO-) continuam presentes, indicando grupos funcionais remanescentes do material de partida, provavelmente presentes nas bordas das folhas gráficas.

Apesar dos relatos na literatura já confirmarem uma melhora na resposta eletroquímica ao se utilizar o nanomaterial como modificador de eletrodos [78,80], os grupos funcionais presentes no material abrem a possibilidade de utilizá-lo como uma plataforma para o ancoramento de outras espécies. Dentro do contexto do projeto, isso indica que há a possibilidade de utilizar os grupos funcionais no eletrodo modificado com GQD para imobilizar o aptâmero específico para p24-HIV, e criar a camada seletiva do biossensor. Além disso, a solução apresentou luminescência quando excitada com luz UV, uma das características dos *quantum dots*, indicando assim a presença das estruturas após a síntese. Os materiais sintetizados por Dong e colaboradores também apresentaram emissão azul quando excitados em  $365\text{ nm}$  [80]. FIGURA 25B traz as imagens dos materiais sintetizados, sob radiação visível e sob luz ultravioleta de  $375\text{ nm}$ . A luminescência observada está estritamente

relacionada com o tamanho das partículas presentes, associada com os grupos funcionais presentes e aos efeitos de borda. Caso a pirólise fosse completa, esperava-se uma diminuição considerável da luminescência devido a formação de óxido de grafeno em maior extensão, com tamanhos de partículas elevadas e diferentes propriedades do material produzido aqui.

Para avaliar o tamanho das partículas e a estrutura obtida, foram realizadas medidas de microscopia eletrônica de transmissão. As imagens estão apresentadas na FIGURA 26.

FIGURA 26: IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO PARA OS QUANTUM DOTS DE GRAFENO SINTETIZADOS. HISTOGRAMA DO TAMANHO MÉDIO DAS PARTÍCULAS INSERIDO.



Fonte: O autor.

As imagens de microscopia indicam nanopartículas de um formato esferoide, com uma distribuição de tamanho uniforme, que pode ser observada pelo histograma obtido pela contagem individual dos objetos (Inserido na FIGURA 26), com tamanho médio das partículas de  $7 \pm 2$  nm, e uma distribuição assimétrica. Esta distribuição indica a formação de um material homogêneo, sem a formação paralela de grandes partículas de óxido de grafeno ou a pirólise completa do ácido cítrico e a formação de um macromaterial carbonáceo. As dimensões das folhas de grafeno são concordantes com as relatadas na literatura para os *quantum dots* de grafeno [80]

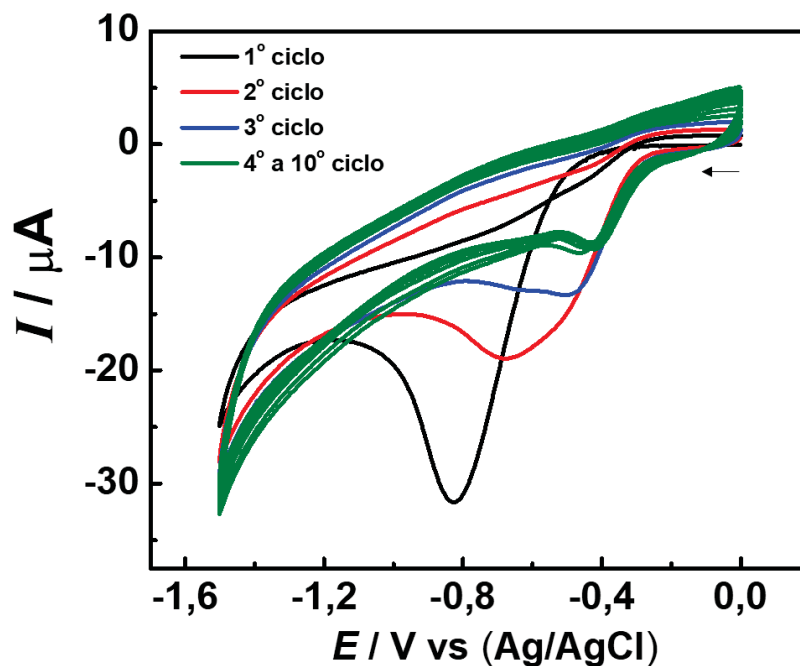
O agrupamento das nanopartículas observado na FIGURA 26 indica que as partículas tem interações entre si, provavelmente explicado pelos grupos funcionais oxigenados na superfície do material, como visto por FTIR, que através de interação por ligação de hidrogênio gera uma afinidade e o acúmulo do nanomaterial de forma agregada nas imagens.

Resumidamente, as partículas sintetizadas de tamanho reduzido apontam para um nanomaterial, que junto com a comprovação da presença de grupos funcionais no material, permite confirmar que a síntese através da pirólise incompleta rendeu um material com as características desejadas para a aplicação na construção de biossensores eletroquímicos. Assim, é possível testar a potencialidade do GQD para modificar o eletrodo base e confirmar a validade do método proposto.

### 3.1.2 Potencialidade do GQD para construção do aptassensor

A modificação do eletrodo impresso (SPE) por eletrodeposição vêm sendo aplicada em diversos trabalhos com nanomateriais de carbono, como abordado por recente revisão [83]. A eletrodeposição foi realizada por voltametria cíclica entre 0,0 e -1,5 V com uma velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , em que  $70 \mu\text{L}$  da dispersão de GQD sintetizada é posta sobre a superfície do SPE recobrindo o conjunto de 3 eletrodos, e realizada a técnica. O resultado está apresentado na FIGURA 27. Após a eletrodeposição por voltametria cíclica obtém-se o sensor modificado com o GQD.

FIGURA 27: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS REFERENTE À ELETRODEPOSIÇÃO DO GQD NO SPE (NÚMERO DO CICLO INSERIDO). VELOCIDADE DE VARREDURA =  $50 \text{ mV s}^{-1}$



Fonte: O autor.

O perfil obtido na FIGURA 27 já foi observado para diversos materiais a base de grafeno, sendo que o pico próximo a  $-0,8\text{ V}$  (vs Ag/AgCl) é referente à redução dos grupamentos oxigenados presentes no modificador [84–86]. A redução desses grupos resulta na diminuição da quantidade de grupos funcionais polares, incidindo na diminuição da solubilidade do material e resultando formação de um filme na superfície do eletrodo. O deslocamento observado nos potenciais para valores menos negativos conforme os ciclos evoluem indica uma melhora nas propriedades eletroquímicas do eletrodo, diminuindo a energia necessária para que a eletrodeposição ocorra. Conjuntamente, a altura do pico observado para a redução dos grupos diminui conforme os ciclos, indicando que a eficiência da eletrodeposição diminui, praticamente se estabilizando no quinto ciclo. Diversos trabalhos citam uma quantidade elevada de ciclos para a eletrodeposição de nanomateriais, de forma que a estabilidade e os grupos funcionais remanescentes para a imobilização da biomolécula de interesse utilizando essa quantidade de ciclos proposta necessitam de avaliação mais profunda [49].

A imobilização do GQD na superfície do eletrodo é interessante pois permite posterior modificação do eletrodo, nesse caso, a imobilização do aptâmero para formação do aptassensor. Inicialmente, para avaliar a potencialidade do modificador como suporte para a construção do aptassensor, as etapas foram executadas condições não otimizadas para a imobilização do aptâmero, bloqueio dos sítios inespecíficos com albumina e detecção final da proteína p24 de HIV (TABELA 2).

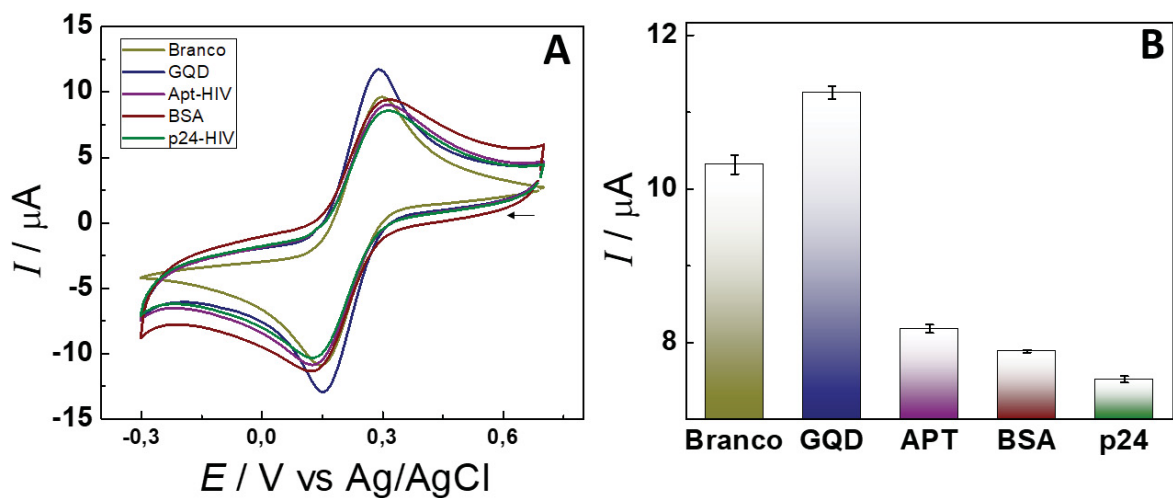
TABELA 2: PARÂMETROS INICIAIS NÃO OTIMIZADOS PARA CONSTRUÇÃO DO APTASSENSOR PROPOSTO.

	<b>Parâmetro</b>	<b>Tempo</b>	<b>Concentração</b>
GQD	5 ciclos		
EDC/NHS		1 h	4/6 mmol L <sup>-1</sup>
Aptâmero		1 h	1 nmol mL <sup>-1</sup>
BSA		15 min	1 mg mL <sup>-1</sup>
p24-HIV		1 h	9,3 µg mL <sup>-1</sup>

Após cada etapa, medidas de voltametria cíclica foram realizadas em solução contendo  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$   $1,0\text{ mmol L}^{-1}$  como sonda eletroquímica diluída em PBS pH 7,4,

a uma velocidade de varredura de  $50,0 \text{ mV s}^{-1}$ . O uso da sonda eletroquímica permite visualizar as modificações que ocorrem no eletrodo de trabalho durante a construção do imunossensor, e confirmar a conclusão das etapas. Então etapas que bloqueiam a superfície do eletrodo tendem a diminuir a transferência de elétrons, levando a uma diminuição do sinal observado. O estudo inicial da construção do aptassensor está apresentado na FIGURA 28.

FIGURA 28: A) VOLTAMOGRAMA CÍCLICO E B) CORRENTE DE PICO ANÓDICA REFERENTE A CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO APTASSENSOR E DETECÇÃO DA PROTEÍNA p24-HIV;  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$   $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  EM PBS pH 7,4, VELOCIDADE DE VARREDURA =  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .



Fonte: O autor.

Através dos voltamogramas obtidos foi possível confirmar a potencialidade do modificador como suporte para a formação do aptassensor. O aumento da corrente é evidenciado na FIGURA 28A após a eletrodeposição do GQD, o que indica que o nanomaterial gera uma melhora nas propriedades eletroquímicas do eletrodo base. As imobilizações das biomoléculas não ficam tão claro ao se observar as voltametrias devido ao aumento de capacitância que também ocorre ao se imobilizar espécies não condutoras na superfície do eletrodo. As magnitudes das correntes de pico obtidas após cada etapa envolvida na construção estão apresentadas na FIGURA 28B e mostram que há uma diminuição sucessiva da intensidade do sinal. Para a proteína p24-HIV, mesmo após o bloqueio dos sítios inespecíficos com BSA houve uma diminuição de aproximadamente  $0,35 \text{ μA}$  (4,5%) no sinal, indicando uma interação específica com a proteína alvo.

Esse resultado confirma que é possível imobilizar o aptâmero na superfície do eletrodo, e que uma resposta é obtida com uma posterior imobilização da p24-HIV. Assim, a proposta de utilizar o GQD como suporte para o desenvolvimento de biossensores é validada, e a otimização das propriedades do eletrodo pode ser realizada para extrair o máximo do potencial mostrado nos testes iniciais.

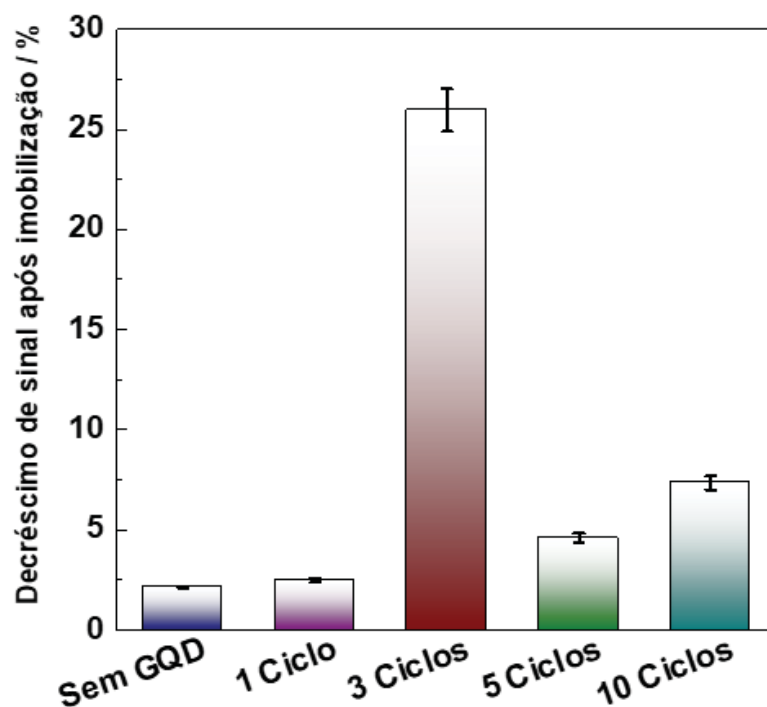
### 3.1.3 Aptassensor – Otimização dos parâmetros envolvidos

#### 3.1.3.1 Deposição eletroquímica dos GQD

Para a imobilização do GQD na superfície do eletrodo foi utilizada a eletrodeposição empregando a voltametria cíclica. Durante a varredura, um potencial suficientemente negativo é aplicado ao eletrodo a fim de reduzir alguns dos grupos funcionais presentes nos GQD. Isso diminui o número de grupos superficiais oxigenados fixando o material à superfície eletródica. Nessa etapa, a principal preocupação é a alta solubilidade do material modificador em solução, causada por seu tamanho reduzido e funcionalização (presente predominantemente nas bordas), que pode gerar uma lixiviação excessiva durante a construção do biossensor. Segundo a literatura, a eletrodeposição gera um filme fino de óxido de grafeno reduzido, “sacrificando” alguns grupos funcionais para formar estruturas com menor solubilidade, resultando em uma modificação mais robusta para o eletrodo [84–87].

Como os grupos funcionais também são importantes para a imobilização do aptâmero à superfície do eletrodo posteriormente, a eletrodeposição impacta diretamente no desempenho final do aptassensor. Para explorar uma condição a qual há um balanceamento entre a quantidade de grupos funcionais remanescentes contra a formação de um filme de óxido de grafeno reduzido estável, foi feito um estudo variando a quantidade de ciclos da eletrodeposição feita por voltametria cíclica (1, 3, 5 e 10 ciclos). Após esse procedimento, o eletrodo foi submetido a todas as demais etapas envolvidas na imobilização do aptâmero e a variação do sinal observado para cada eletrodo (FIGURA 29) indica a efetividade da modificação.

FIGURA 29: DIMINUIÇÃO DA CORRENTE DE PICO ANÓDICO EM PORCENTAGEM APÓS IMOBILIZAÇÃO DO APTÂMERO EM ELETRODOS MODIFICADOS COM QUANTIDADE DIFERENTE DE CICLOS DE ELETRODEPOSIÇÃO.  $K_3[Fe(CN)_6]$  5,0 mmol L<sup>-1</sup>, TAMPÃO: PBS pH 7,4, VELOCIDADE DE VARREDURA = 50 mV s<sup>-1</sup>.



Fonte: O autor.

A partir do estudo realizado (FIGURA 29) é possível observar que há uma variação maior de sinal após a imobilização do aptâmero no eletrodo em que o GQD foi eletrodepositado com 3 ciclos de voltametria cíclica. Também é possível constatar que 1 ciclo não é o suficiente para formar uma superfície funcionalizada estável, que pode estar ligada a não formação do filme ou a uma lixiviação do modificador, enquanto 5 e 10 ciclos já oferece uma redução considerável dos grupos funcionais do GQD, diminuindo a possível quantidade de aptâmero a ser imobilizado na etapa seguinte. Dessa forma, este estudo indica que 3 ciclos de deposição eletroquímica são suficientes para imobilizar o GQD na superfície, conciliando uma quantidade de grupos funcionais adequados para a posterior imobilização do aptâmero e construção do sensor. Portanto, essa condição otimizada foi adotada para todos os sensores construídos a partir deste estudo.

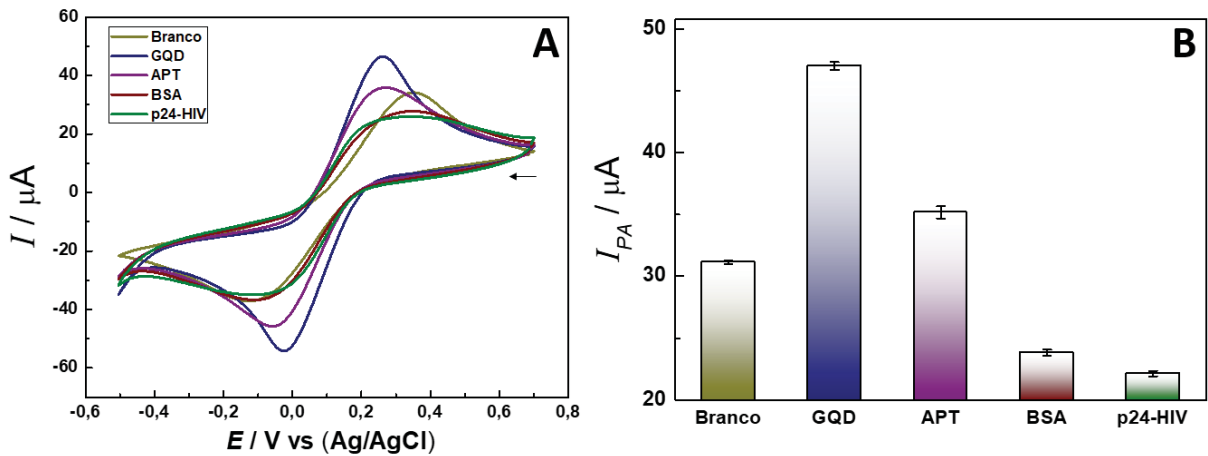
### 3.1.3.2 Avaliação das estratégias de detecção (técnicas eletroquímicas)

A construção do aptassensor depende de uma sequência de etapas que modificam a superfície do eletrodo e impactam as propriedades eletroquímicas dele. Isso abre a possibilidade para o uso de diversas técnicas eletroquímicas que fornecem respostas sobre essa mudança que ocorre em cada etapa. Uma das propriedades que mudam drasticamente devido a imobilização de espécies na superfície do eletrodo é a resistência a transferência de carga, que pode ser avaliada diretamente por espectroscopia de impedância eletroquímica, ou indiretamente pela corrente de pico de uma sonda eletroquímica na voltametria cíclica.

Apesar dos métodos responderem de forma semelhante às mudanças que acontecem no eletrodo, cada um aplica uma perturbação diferente ao eletrodo, o que pode resultar em uma sensibilidade diferente. Assim, todas as etapas para a construção do aptassensor foram realizadas e acompanhadas por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica.

A voltametria cíclica já se provou uma alternativa sólida para acompanhar a construção do aptassensor mesmo em condições não otimizadas e será utilizada como base para a comparação com a espectroscopia de impedância eletroquímica. Para o estudo, diferentes eletrodos (n=3) foram submetidos às técnicas após cada etapa do processo de construção do aptassensor. As informações obtidas empregando a voltametria cíclica e a espectroscopia de impedância eletroquímica são apresentadas nas FIGURA 30 e FIGURA 31, respectivamente.

FIGURA 30: A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS REFERENTE À CADA ETAPA DA CONSTRUÇÃO DO APTASSENSOR PARA INTERAÇÃO ESPECÍFICA COM p24-HIV POR A) VOLTAMETRIA CÍCLICA E B) CORRENTES DE PICO ANÓDICAS.  $K_3[Fe(CN)_6]$  5,0 mmol L<sup>-1</sup>, TAMPÃO: PBS pH 7,4, VELOCIDADE DE VARREDURA = 50 mV s<sup>-1</sup>.



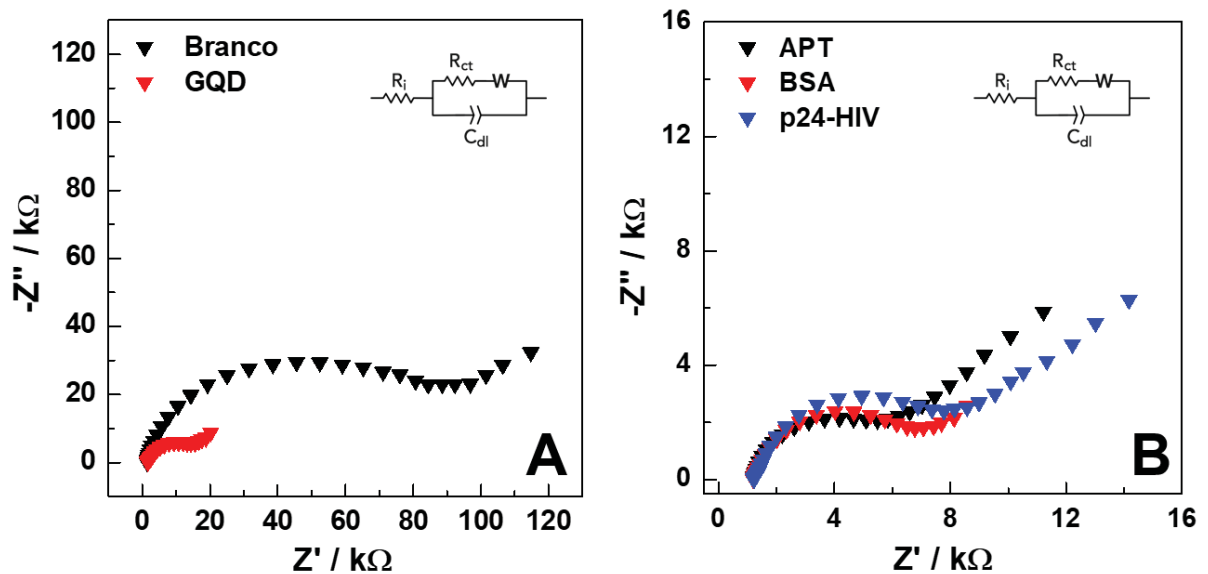
Fonte: O autor.

A FIGURA 30A mostra os voltamogramas cíclicos obtidos após cada etapa da construção do aptassensor para determinação da proteína p24, onde as correntes de pico anódico das triplicatas estão plotadas na FIGURA 30B. As respostas seguiram a tendência observada nos testes iniciais, com o GQD melhorando as propriedades eletroquímicas do eletrodo base e melhorando a transferência de elétrons do dispositivo, visto que a corrente de oxidação do ferrocianeto de potássio aumenta com o eletrodo modificado. Outro ponto importante é o consumo de sítios inespecíficos pela albumina, que é visualizado pela diminuição da corrente entre as duas etapas, com a média dos valores obtidos indo de 35 μA para 24 μA. Isso pode ser um reflexo da maior quantidade de sítios disponíveis após a otimização da eletrodeposição do GQD, melhorou a resposta obtida para a p24-HIV em relação aos testes iniciais (7%), mesmo que em sua maioria seja ocupada pelo BSA. Essa questão pode ser melhorada com a otimização da etapa de imobilização do aptâmero, uma vez que uma maior eficiência na formação da camada seletiva poderá proporcionar uma melhora na sensibilidade do dispositivo.

Os mesmos eletrodos também foram analisados por espectroscopia de impedância eletroquímica. A princípio notou-se uma diferença considerável entre o perfil do branco e o perfil do GQD utilizando  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  como sonda eletroquímica, impossibilitando o uso do mesmo circuito equivalente para ajustar ambos. Para

contornar o problema foi utilizado hidroquinona, que é uma sonda eletroquímica neutra, o que leva a crer que a repulsão entre os grupos funcionais oxigenados do GQD e a sonda eletroquímica negativa pode ter sido a causa da mudança do perfil. Assim, os espectros de impedância obtidos com hidroquinona foram registrados apenas para o branco e GQD, e os íons  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  para o restante das etapas de construção do eletrodo (FIGURA 31).

FIGURA 31: DIAGRAMAS DE NYQUIST PARA A CONSTRUÇÃO DO APTASSENSOR. TAMPÃO: PBS pH 7,4 CONTENDO A) HIDROQUINONA  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  B)  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$   $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , FREQUÊNCIA:  $10^6 \text{ A}$  0,1 Hz.



Fonte: O autor.

Na FIGURA 31A é possível observar uma diminuição considerável no semicírculo formado, o que indica uma menor resistência a transferência de carga para o eletrodo modificado com os *quantum dots* de grafeno, corroborando o aumento de sinal observado também nas voltametrias devido à melhora nas propriedades eletroquímicas do eletrodo. Esse é um resultado positivo, pois além de uma modificação fácil e um suporte funcionalizado para a imobilização de biomoléculas, é possível comprovar que o GQD apresenta vantagens para a construção do biossensor tanto por CV como por EIS.

A partir do fit utilizando o circuito equivalente de Randles, foi possível retirar os valores de resistência à transferência de carga de todas as etapas, entretanto só é possível comparar os espectros obtidos com a mesma sonda eletroquímica. Do branco para a modificação com o GQD, a resistência diminuiu de  $38,39 \text{ k}\Omega$  para  $17,50$

k $\Omega$  (FIGURA 31A). A resistência para o eletrodo após a imobilização do aptâmero foi de 4,13 k $\Omega$ , aumentando para 5,87 k $\Omega$  após a o bloqueio dos sítios inespecíficos com albumina e para 6,82 k $\Omega$  após a imobilização da proteína p24 do HIV (FIGURA 31B), um aumento de 16% no sinal. Além disso, houve também um aumento da capacitância do eletrodo com a imobilização de novas moléculas, o que também é observado nas voltametrias cíclicas realizadas no teste inicial da construção do aptassensor, principalmente para a etapa de reconhecimento da proteína p24.

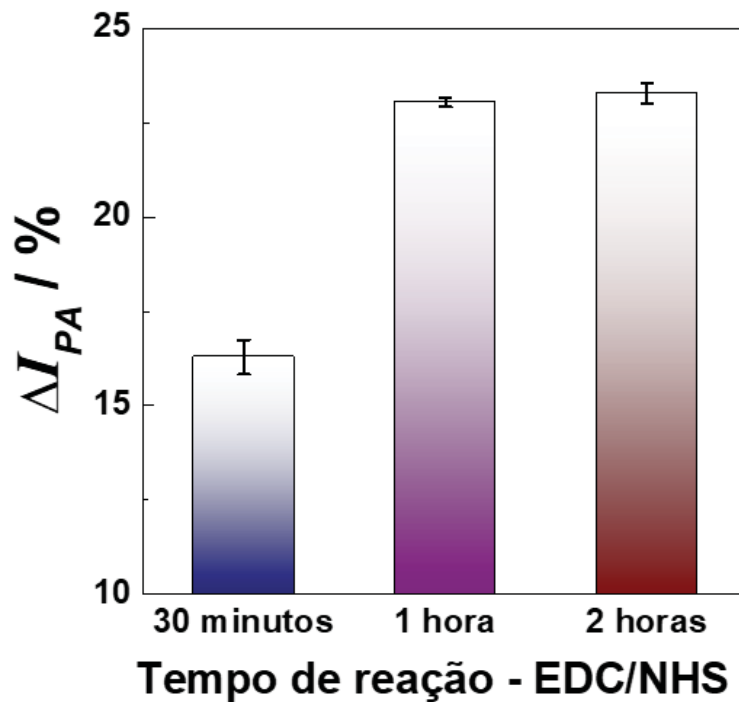
Isso mostra que ambas as técnicas podem ser utilizadas para acompanhar a construção do aptassensor e detecção da p24-HIV. É possível detalhar mais as mudanças que ocorrem no eletrodo entre as etapas utilizando EIS, mas a voltametria cíclica traz uma execução e tratamento de dados mais simples, alcançando resultados semelhantes. Portanto, a técnica de voltametria cíclica será utilizada para otimizar o restante da construção do aptassensor proposto.

### 3.1.3.3 Investigação das etapas de construção do aptassensor

Com a modificação do eletrodo base com o GQD otimizada, os passos para a imobilização do aptâmero que envolve a reação com EDC/NHS para ativar os grupos funcionais e a reação para a imobilização do aptâmero foram estudadas. As reações que ocorrem ao se utilizar o par EDC/NHS e os grupos ácidos carboxílicos presentes no GQD na superfície do eletrodo estão simplificados na FIGURA 32, e levam à formação de uma ligação covalente entre o GQD e o aptâmero, que confere estabilidade e robustez para a modificação do eletrodo.



FIGURA 33: VARIAÇÃO NO SINAL DA Sonda Eletroquímica após Imobilização do Aptâmero utilizando diferentes tempos de reação do EDC/NHS. Concentração (APT):  $1 \text{ ng mL}^{-1}$ ; Tempo de reação (APT): 1 hora.



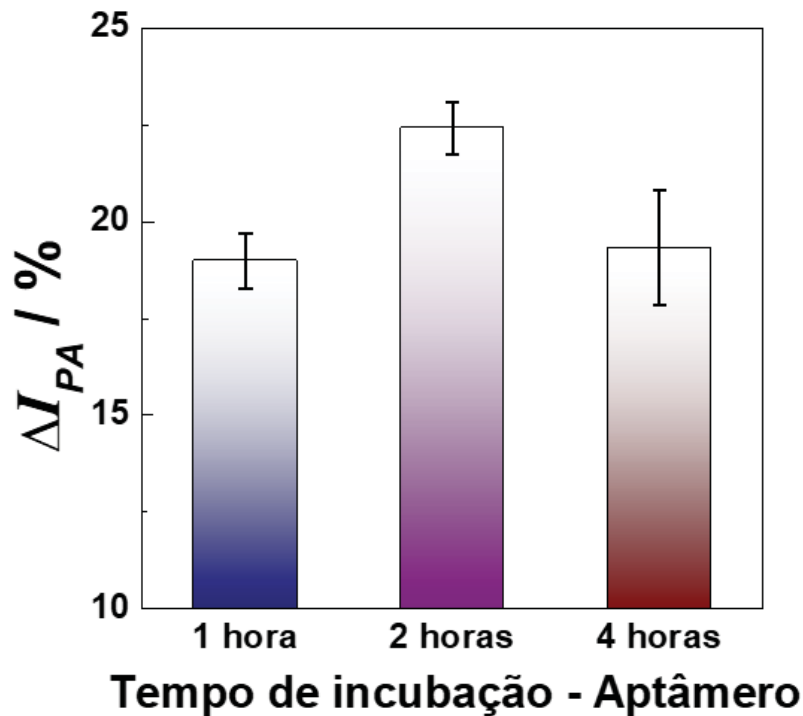
Fonte: O autor.

Como pode ser observado na FIGURA 33, há uma maior variação de sinal quando o tempo de ativação com EDC/NHS é aumentado de 30 minutos para 1 hora, enquanto o aumento do tempo de ativação para 2 horas não resulta em uma diferença significativa. Isso indica que 1 hora de reação é suficiente para ativar todos os grupos funcionais disponíveis para interação, levando a uma maior quantidade de aptâmero imobilizado e bloqueando a superfície. O ganho em relação a 30 minutos de reação é considerável, enquanto o aumento do tempo para 2 horas só diminui a frequência analítica sem melhorar a imobilização do aptâmero. Dessa forma, 1 hora de reação para o EDC/NHS é considerado o valor ótimo e utilizado em todos os estudos posteriores.

Após a ativação da superfície, a imobilização do aptâmero é feita colocando  $2.0 \mu\text{L}$  da solução contendo APT  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  em contato com a superfície ativada do eletrodo de trabalho. O estudo de tempo de reação é realizado para avaliar qual o tempo necessário para que a maior quantidade de grupos funcionais ativados reaja com o aptâmero, imobilizando o mesmo na superfície para formar a camada seletiva do dispositivo. Por conta do volume reduzido, a reação foi realizada em geladeira para

evitar a evaporação da solução, principalmente para os longos tempos de reação, garantindo que a única variável no estudo seja o tempo em que a solução fica em contato com o eletrodo. Para comparar os resultados, a diminuição do sinal da sonda eletroquímica após a imobilização do APT foi avaliada, e os resultados obtidos estão resumidos na FIGURA 34.

FIGURA 34: VARIAÇÃO NO SINAL DA SONDA ELETROQUÍMICA APÓS IMOBILIZAÇÃO DO APTÂMERO UTILIZANDO DIFERENTES TEMPOS DE CONTATO COM A SOLUÇÃO CONTENDO O APTÂMERO. TEMPO DE REAÇÃO (EDC/NHS): 1 HORA; CONCENTRAÇÃO (APT): 1 ng mL<sup>-1</sup>.



Fonte: O autor.

Como é possível observar na FIGURA 34, há um maior impacto no sinal da sonda eletroquímica quando 2 horas de reação do aptâmero são utilizadas, com uma diminuição do sinal observado em 22,4%±0,66%. Aumentar o tempo de reação para 4 horas diminuiu a reprodutibilidade da quantidade de aptâmero imobilizado, gerando uma incerteza maior e nenhum ganho na efetividade da imobilização, com uma diminuição do sinal médio de 19%±1,5%. Dessa forma, o tempo de 2 horas será aplicado em todas as imobilizações do aptâmero como condição ótima.

Além disso, notou-se que a reação em geladeira melhorou a reprodutibilidade da resposta do sensor, diminuindo as variações do sinal obtido tanto após a imobilização do aptâmero quanto para a resposta final com p24-HIV. Não foi possível

identificar qual fato originou essa melhora, uma vez que diversas condições experimentais mudaram ao se colocar na geladeira. Uma hipótese é o contato constante da solução contendo a biomolécula sobre o eletrodo, de modo a disponibilizar de forma homogênea o aptâmero à ligação covalente com os grupos funcionais do GQD ativados pelo EDC/NHS, o que não ocorre fora da geladeira pois a solução contendo o APT evapora e leva a um menor controle das condições.

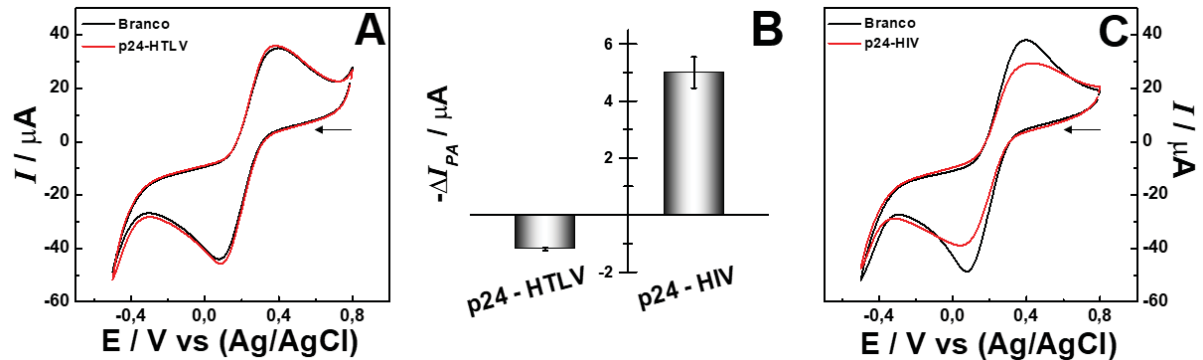
#### 3.1.4 Teste de seletividade

Uma das propriedades mais importantes para um método que envolve diagnóstico é a seletividade. As amostras biológicas são complexas, e muitas vezes reações cruzadas ocorrem, levando a resultados falsos positivos e possíveis reavaliações, aumentando o tempo do diagnóstico. Como o processo de desenvolvimento de um aptâmero depende da interação específica com a proteína de interesse, a seletividade obtida é elevada, semelhante à de anticorpos [54,55].

Para testar a seletividade do aptassensor foi utilizado a proteína p24 do vírus T-linfotrópico humano (HTLV-1), utilizado como proteína controle pois tem estrutura semelhante à p24 do HIV-1 e pode ocasionar um resultado falso positivo, na hipótese de um paciente estar infectado com ela e não com HIV-1. Outra situação, o paciente pode até estar infectado com as duas doenças devido à semelhança nas rotas de transmissão, onde as taxas de coinfeção no Brasil dependem da região, variando entre 2 e 21% [90].

Para o estudo de seletividade, uma concentração de p24-HTLV de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi utilizada, próxima à concentração de p24-HIV, com o mesmo tempo de reação de 1 hora. Voltametrias cíclicas obtidas antes e após exposição às proteínas controle e alvo estão apresentadas na FIGURA 35.

FIGURA 35: A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS ANTES E DEPOIS DO TESTE COM p24-HTLV. B) VARIAÇÃO OBSERVADA NA ALTURA DA CORRENTE DE PICO ANÓDICA PARA CADA PROTEÍNA TESTADA. C) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS ANTES E DEPOIS DO TESTE COM A p24-HIV.



Fonte: O autor.

Como é possível observar na FIGURA 35A, não há uma variação significativa na corrente de pico anódica após a interação do aptassensor com a proteína p24-HTLV, sendo que as respostas obtidas para todos os eletrodos testados ( $n = 5$ ) mostram um pequeno aumento na corrente de pico (FIGURA 35A). Essa variação do sinal indica que houve pouca interação do sensor com a proteína controle e/ou a lixiviação de algumas moléculas imobilizadas anteriormente.

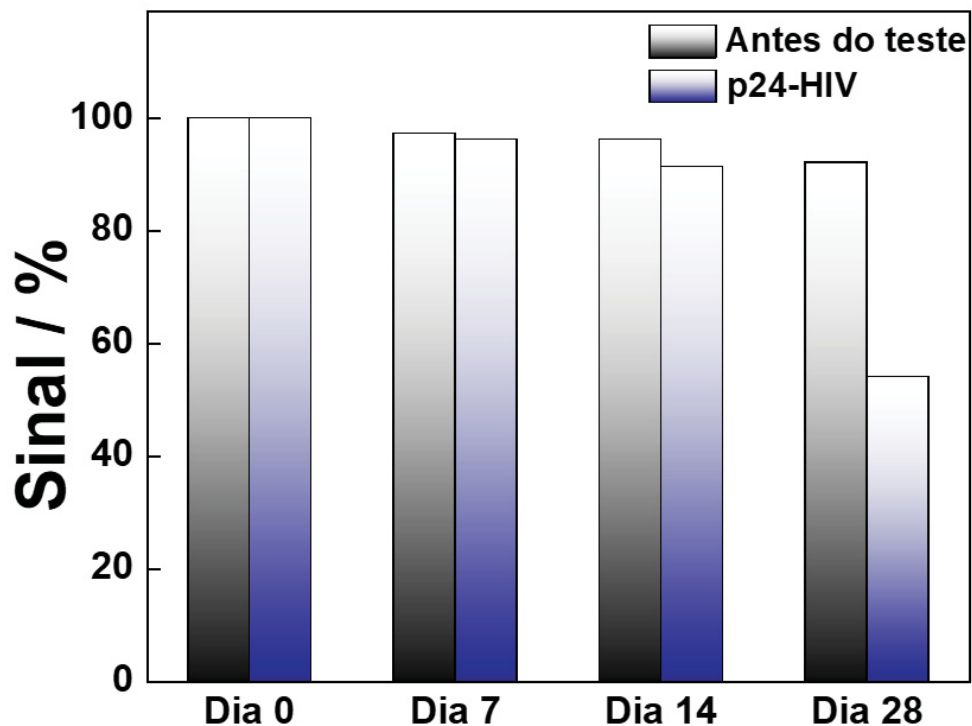
A imobilização da proteína alvo levou a uma diminuição considerável na corrente de pico (FIGURA 35C), causado pela interação específica entre o aptâmero imobilizado no sensor e a proteína p24-HIV, com uma variação de sinal média de  $5,0 \pm 0,54 \mu\text{A}$ . Ambos resultados sugerem uma alta seletividade do sensor, o que afirma o potencial do aptassensor em ser aplicado no diagnóstico de HIV.

### 3.1.5 Estabilidade do aptassensor

Sensores eletroquímicos desenvolvidos como métodos de diagnóstico, assim como os métodos *lateral flow*, tem a possibilidade de serem transportados “prontos”, sendo a análise realizada pela aplicação da amostra “diretamente” no dispositivo. Porém essa possibilidade tem um limite, que pode ser traçada por vários motivos, como desnaturação de enzimas ou, no caso desse trabalho do aptâmero, lixiviação, oxidação ou lise de componentes do dispositivo, gerando uma diminuição na sensibilidade e propriedades seletivas do eletrodo.

Para testar qual o tempo de prateleira do dispositivo, que pode ser armazenado e oferecer uma resposta confiável, eletrodos foram armazenados em geladeira entre uma e quatro semanas, sendo utilizados para determinação de p24-HIV após esse período. Devido ao teste prolongado, os eletrodos foram armazenados em tampão fosfato pH 7,4 com azida de sódio 0,01%, um biocida que impede a proliferação de bactérias e diminui a quantidade de reações de oxidação que podem ocorrer na solução, de forma que as condições de armazenamento não se alterem significativamente durante o estudo. Os resultados obtidos para os eletrodos armazenados estão resumidos na FIGURA 36.

FIGURA 36: VARIAÇÃO NO SINAL DA Sonda ELETROQUÍMICA APÓS ARMAZENAMENTO SOB REFRIGERAÇÃO. ELETRODOS FORAM AVALIADOS ANTES E APÓS IMOBILIZAÇÃO COM  $93 \text{ ng mL}^{-1}$  de p24-HIV EM CADA DIA AVALIADO, A FIM DE IDENTIFICAR EVENTOS DE LIXIVIAÇÃO E SENSIBILIDADE, RESPECTIVAMENTE.



Fonte: O autor.

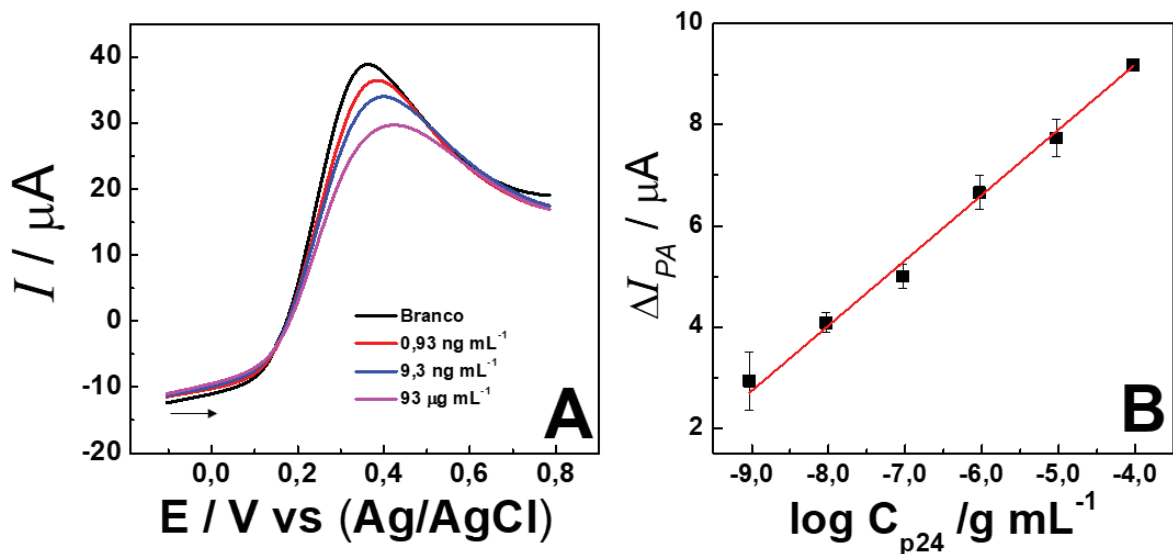
Como detalhado na FIGURA 36, os resultados obtidos para os dias de armazenamento estão plotados em uma relação de porcentagem comparado ao resultado obtido no dia 0. As barras pretas representam o sinal da sonda eletroquímica antes da determinação da p24-HIV, sendo possível observar que não há processos de lixiviação nem adsorção relevantes. Entretanto, a determinação da proteína com

os eletrodos armazenados sofre uma diminuição considerável do sinal de 14 para 28 dias com uma redução de 91% para 54% do sinal observado no dia 0 provavelmente ligado a algum processo de inativação do aptâmero, desde que não há indicativo de variação relevante na quantidade de espécies imobilizadas antes da quantificação da proteína. Dessa forma, 14 dias de armazenamento dos eletrodos em geladeira nas condições descritas não oferecem variação significativa em relação ao resultado obtido no dia 0, e pode ser considerado uma condição estável para executar a determinação da proteína.

### 3.1.6 Curva analítica

Para fim de diagnósticos, a simples presença da proteína na amostra é o suficiente para entregar o resultado desejado, mas entender como o sinal obtido se relaciona com a quantidade de proteína presente na amostra pode ajudar a determinar os limites de concentração onde o eletrodo é eficiente e as condições em que a amostra pode ser analisada. Para isso, a concentração de p24-HIV foi avaliada realizando diluições em décadas, de  $93 \mu\text{g mL}^{-1}$  (estoque) até  $0,93 \text{ ng mL}^{-1}$  ( $n=4$ ). Os resultados obtidos estão apresentados na FIGURA 37.

FIGURA 37: A) REPRESENTAÇÃO DO PICO ANÓDICO DA VOLTAMETRIA CÍCLICA OBTIDA ANTES E APÓS REAÇÃO COM p24-HIV NAS CONCENTRAÇÕES ESPECIFICADAS; B) CURVA ANALÍTICA OBTIDA PARA O DISPOSITIVO PROPOSTO.  $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  EM PBS pH 7,4. VELOCIDADE DE VARREDURA:  $100 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $n = 4$ .



Fonte: O autor.

O aptassensor desenvolvido apresentou uma relação linear entre o pico anódico e o logaritmo da concentração de p24-HIV entre  $0,93 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $93 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  (FIGURA 37B), com uma sensibilidade de  $1,293 \text{ } \mu\text{A dec}^{-1}$  e um  $R^2 = 0,996$ . A FIGURA 37A ilustra a resposta obtida para a curva, com o sinal do pico anódico obtido antes do teste, em preto, e o sinal obtido após o teste com a p24-HIV em alguns dos pontos da curva. Os limites de detecção ( $LD = 3xS_{Br}/\text{Sensibilidade}$ ) e quantificação ( $LQ = 10xS_{Br}/\text{Sensibilidade}$ ) de  $51,7 \text{ pg mL}^{-1}$  e  $930 \text{ pg mL}^{-1}$  foram obtidos, respectivamente. Os parâmetros importantes obtidos para o aptassensor foram comparados com outros sensores para p24-HIV descritos na literatura, que estão resumidos na TABELA 3.

TABELA 3: REGIÃO LINEAR E LIMITES DE DETEÇÃO PARA SENSORES PARA p24-HIV ENCONTRADOS NA LITERATURA.

Eletrodo	Método	RL	LD / pg mL <sup>-1</sup>	Referência
GQD-SPE/Aptâmero	Eletroquímico ( <i>Label-free</i> )	0,0009 – 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	51,7	Este trabalho [91]
AuNP/MWCNTs/AEP	Eletroquímico (HRP)	0,01 – 60 ng $\text{mL}^{-1}$	6,4	[92]
$\mu\text{PACs}$	Colorimétrico (HRP)	0,0001 – 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	190,0	[93]
MIP de MWCNTs	Eletroquímico ( <i>Label-free</i> )	0,0001 - 2 ng $\text{mL}^{-1}$	0,083	[94]
Eletrodo de Óxido de grafeno-nanotubos de carbono-silica	Eletroquímico (HRP)	0,5 $\text{pg mL}^{-1}$ – 8,5 $\text{ng mL}^{-1}$	0,15	[95]
Au CuL	Eletroquímico (HRP)	0,5 - 200 ng $\text{mL}^{-1}$	200	[96]
Polímero de coordenação Ce(III)	Fluorescência	4 - 28 $\text{pg mL}^{-1}$	1,1	[97]

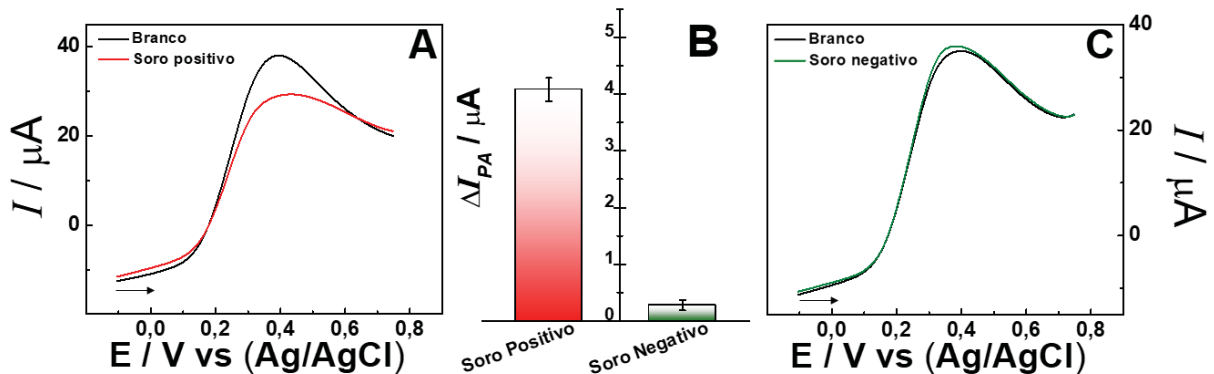
RL = Faixa de resposta linear. LD = Limite de detecção. HRP = Horseradish peroxidase. AuNP = Nanopartículas de ouro. AEP = Própolis extraído por acetona. MWCNT = Nanotubos de carbono de paredes múltiplas. MIP = Polímeros molecularmente impressos.  $\mu\text{PACs}$  = Microchips plásticos arranjados em micro-poços. Au|CuL= Eletrodo de ouro modificado com monocamada de ácido mercaptosuccínico hidrazida de cobre (II).

Como pode ser observado na TABELA 3, o sensor desenvolvido tem limites de detecção compatíveis com os outros sensores descritos na literatura, mesmo utilizando uma abordagem simples desde a síntese do GQD até a configuração não enzimática, que combinados com a excelente seletividade do aptâmero resultou em um dispositivo pronto para ser testado em amostras de soro humano.

### 3.1.7 Determinação de p24-HIV em amostras reais fortificadas

A concentração de p24-HIV em sangue durante os estágios iniciais da infecção pode variar entre  $0,1 \text{ pg mL}^{-1}$  e  $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$  [77], sendo que parte dessa faixa está dentro dos limites de detecção do aptassensor desenvolvido, desconsiderando qualquer tratamento de amostra. Para avaliar como o dispositivo se comporta na amostra biológica que precisa ser analisada para fins de diagnósticos, soro humano foi diluído 100 vezes e fortificado com p24-HIV até uma concentração final de  $9,3 \text{ ng mL}^{-1}$  (dentro da faixa linear do eletrodo proposto) e testado em conjunto com o soro sem a proteína alvo. Este estudo é uma aproximação, uma vez que estágios para a preparação de amostras, como uma diálise ou liofilização para remover o excesso de água da amostra, podem concentrar o material em um volume menor e deixar uma margem mais confortável para o uso do dispositivo proposto. De qualquer forma, esse estudo pode providenciar informações valiosas sobre adsorção e reatividade inespecífica do aptassensor no meio biológico. Os resultados obtidos para o teste em amostras podem ser observados na FIGURA 38.

FIGURA 38: A) PICO ANÓDICO DA RESPOSTA OBTIDA POR VOLTAMETRIA CÍCLICA PARA A AMOSTRA DE SORO FORTIFICADO COM p24-HIV (9,3 ng mL<sup>-1</sup>) B) VARIAÇÃO NO SINAL DA SONDA ELETROQUÍMICA OBTIDA PARA O SORO FORTIFICADO COM p24-HIV (BARRA VERMELHA) E SORO NEGATIVO (BARRA VERDE). C) PICO ANÓDICO DA RESPOSTA OBTIDA POR VOLTAMETRIA CÍCLICA PARA A AMOSTRA DE SORO SEM A PROTEÍNA ALVO. 5 mmol L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] EM PBS pH 7,4; n = 4.



Fonte: O autor.

A FIGURA 38A e C mostram a mudança do sinal voltamétrico do teste do soro com e sem a proteína p24-HIV, respectivamente. O sinal obtido para o soro fortificado com 9,3 ng mL<sup>-1</sup> de p24-HIV (FIGURA 38B, barra vermelha) de 4,1  $\mu\text{A} \pm 0,21 \mu\text{A}$  foi ligeiramente maior do que o obtido para a mesma concentração na curva analítica, mas é esperado e justificado dentro das condições da amostra. Entretanto, o soro sem a proteína alvo (FIGURA 38B, barra verde) gerou pouca variação no sinal observado, com um sinal médio de 0,28  $\mu\text{A} \pm 0,09 \mu\text{A}$ . Essa diferença entre o sinal positivo e negativo mostra que o dispositivo pode fornecer um resultado de p24-HIV válido em amostras reais, com os níveis relatados de biomarcador.

Dessa forma, o aptassensor proposto alcança o objetivo mais relevante do trabalho, que é demonstrar que as vantagens dos sensores eletroquímicos podem ser exploradas para desenvolver um método de diagnóstico relevante, com a portabilidade oferecida pelo uso de eletrodos impressos e a sua facilidade de manuseio e posterior descarte.

### 3.1.8 CONCLUSÃO

O nanomaterial de carbono explorado nesse trabalho são os *quantum dots* de grafeno, sintetizado através de um rota simples e barata. A modificação com GQD

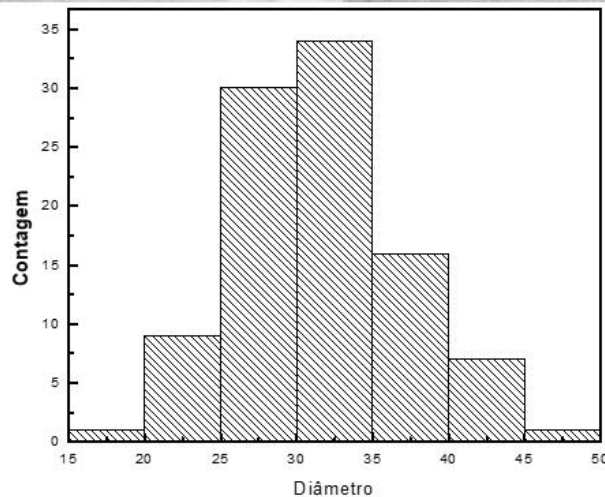
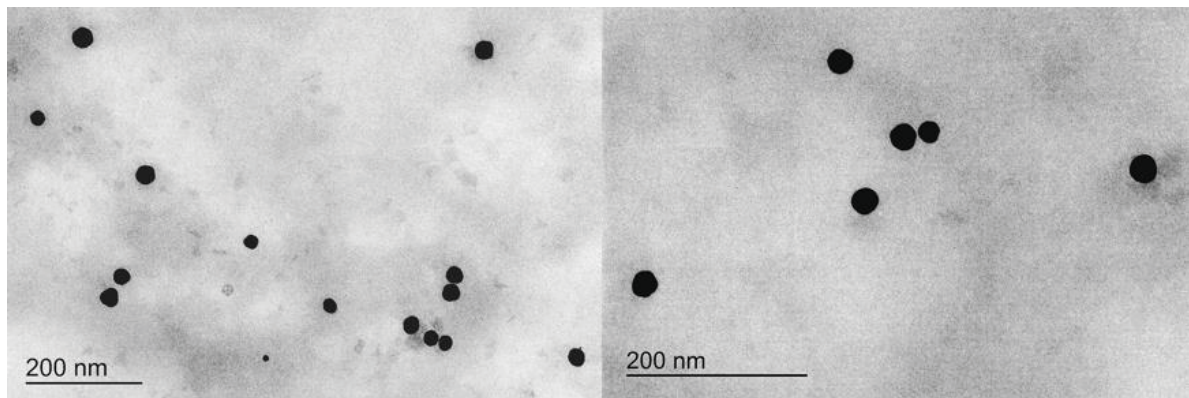
melhorou a resposta eletroquímica do eletrodo base, e permitiu a formação da camada seletiva do sensor pela imobilização do aptâmero através da reação com o par EDC/NHS. A interação com a p24-HIV (proteína alvo) foi observada, e a seletividade comprovada ao confirmar que a interação com uma proteína semelhante (p24-HTLV) não ocorreu. A otimização do aptassensor resultou em um dispositivo que oferece uma resposta linear para p24-HIV entre  $0,93 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $93 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , com um limite de detecção de  $51,7 \text{ pg mL}^{-1}$  e limite de quantificação de  $930 \text{ pg mL}^{-1}$ . Além disso, foi possível diferenciar amostras reais que foram fortificadas com p24-HIV de amostras sem a proteína alvo, indicando que o objetivo final do projeto foi alcançado. Os resultados obtidos nesse projeto foram publicados na revista científica *Analytica Chimica Acta* [60].

## 3.2 BIOSSENSOR PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPO ANTI-S DE SARS-COV-2

### 3.2.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro, e interação com o peptídeo

A partir da síntese das nanopartículas de ouro descrita nos materiais e métodos, foi obtido um volume de aproximadamente 50 mL de solução, trazendo a concentração teórica de nanopartículas para  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  considerando que 100% do sal de ouro foi convertido a nanopartículas. Para verificar o resultado da síntese, as nanopartículas foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). As imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão obtidos estão ilustrados na FIGURA 39.

FIGURA 39: IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO SINTETIZADAS E A CONTAGEM DAS AuNPs DEPENDENTE DO TAMANHO REALIZADA ATRAVÉS DO SOFTWARE IMAGEJ.

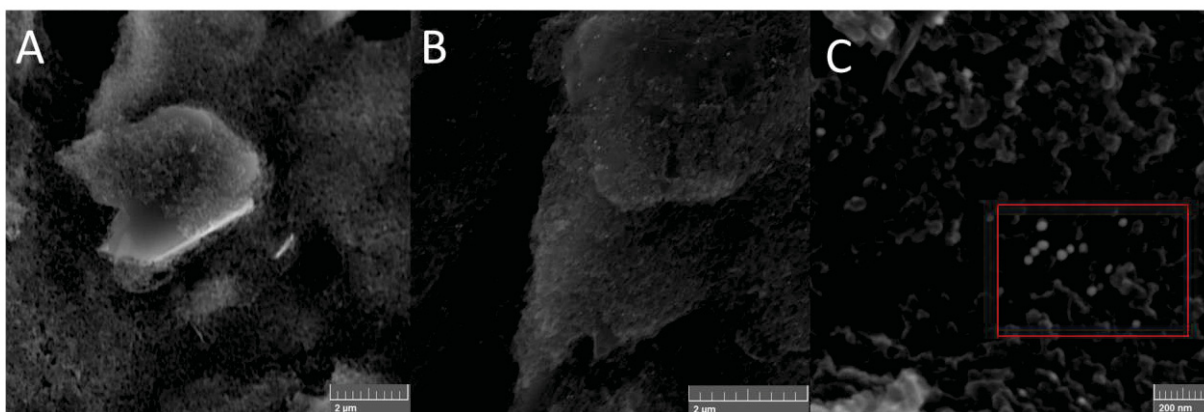


Fonte: O autor

Como pode ser observado na imagem de MET presente na FIGURA 39, as nanopartículas de ouro sintetizadas têm formato esférico, o que coincide com os relatos de literatura [79]. O tamanho das partículas contadas através do software ImageJ está entre 17 e 45 nm, com um tamanho médio de 30 nm ( $n = 98$ ), que apesar de serem consideradas nanopartículas nessa faixa de tamanho, estão acima do tamanho médio citado em literatura para essa rota de síntese, de aproximadamente 20 nm [19]. Isso pode ter sido causado por erros instrumentais ou aleatório, principalmente na etapa de aquecimento, onde temperaturas inferiores ao ideal desfavorecem a nucleação na etapa de formação das nanopartículas, resultando em um material com tamanho maior do que se é esperado da síntese. Outra possibilidade apesar de menos provável, é a pureza do citrato de sódio, pois como discutido na introdução, a quantidade de citrato de sódio na reação influencia no tamanho da nanopartícula sintetizada. Assim, um citrato de sódio úmido ou impuro pode levar a uma alteração no tamanho da partícula sintetizada em relação ao esperado.

As nanopartículas também podem ser observadas nas imagens de MEV dos eletrodos modificados com as AuNPs, com tamanho similar ao observado pelas imagens de MET. Na FIGURA 40 é possível observar o eletrodo não modificado (A), e o eletrodo com a presença das nanopartículas de ouro (B e C).

FIGURA 40: IMAGEM DE MEV DO ELETRODO NÃO MODIFICADO (A = 20 kx) E MODIFICADO COM AS AuNPs SINTETIZADAS (B = 30 kx, C = 150 kx).

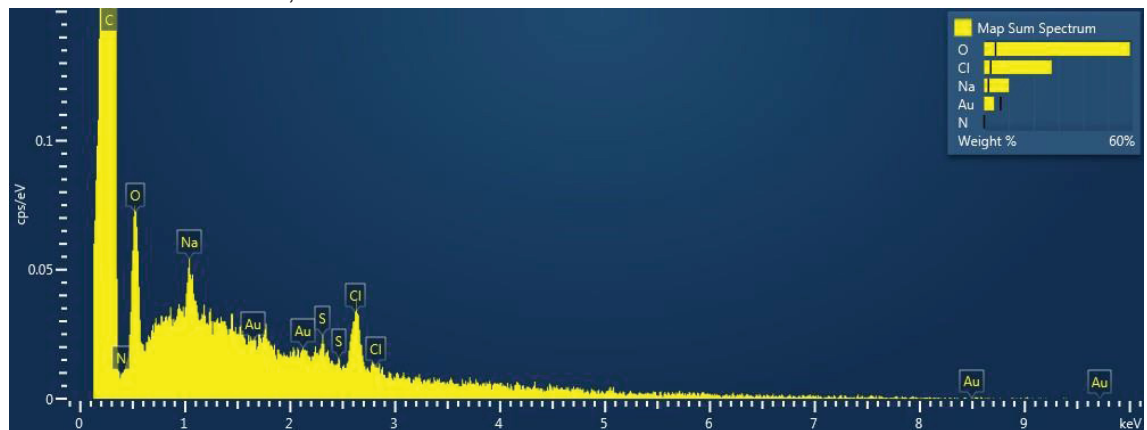


A diferença entre as imagens do SPE sem modificação e com a presença das nanopartículas após deposição por drop-casting pode ser mais bem observada em uma ampliação maior da microscopia, onde o tamanho das nanopartículas pode ser

diferenciado das rugosidades do eletrodo. Na FIGURA 40C está em evidência uma região onde há uma concentração maior das AuNPs no eletrodo modificado.

Outra forma de caracterização é pelo espectro de EDS, onde um feixe de energia é incidido em uma área, e a dispersão dessa energia é registrada. Como cada átomo apresenta níveis de energia específicos, que ao interagirem com o feixe, absorvem e dispersam energias em quantidades bem definidas, a resposta da dispersão dos feixes pode ser traduzida para os elementos que absorvem parte da energia incidida e dispersam a energia registrada. Para a área observada na FIGURA 40B, o espectro de EDS ilustrado na FIGURA 41 foi obtido.

FIGURA 41: ESPECTRO DE ENERGIA DISPERSIVA OBTIDO PARA O ELETRODO MODIFICADO COM AS AuNPs, NA REGIÃO DESTACADA DA FIGURA 40B.



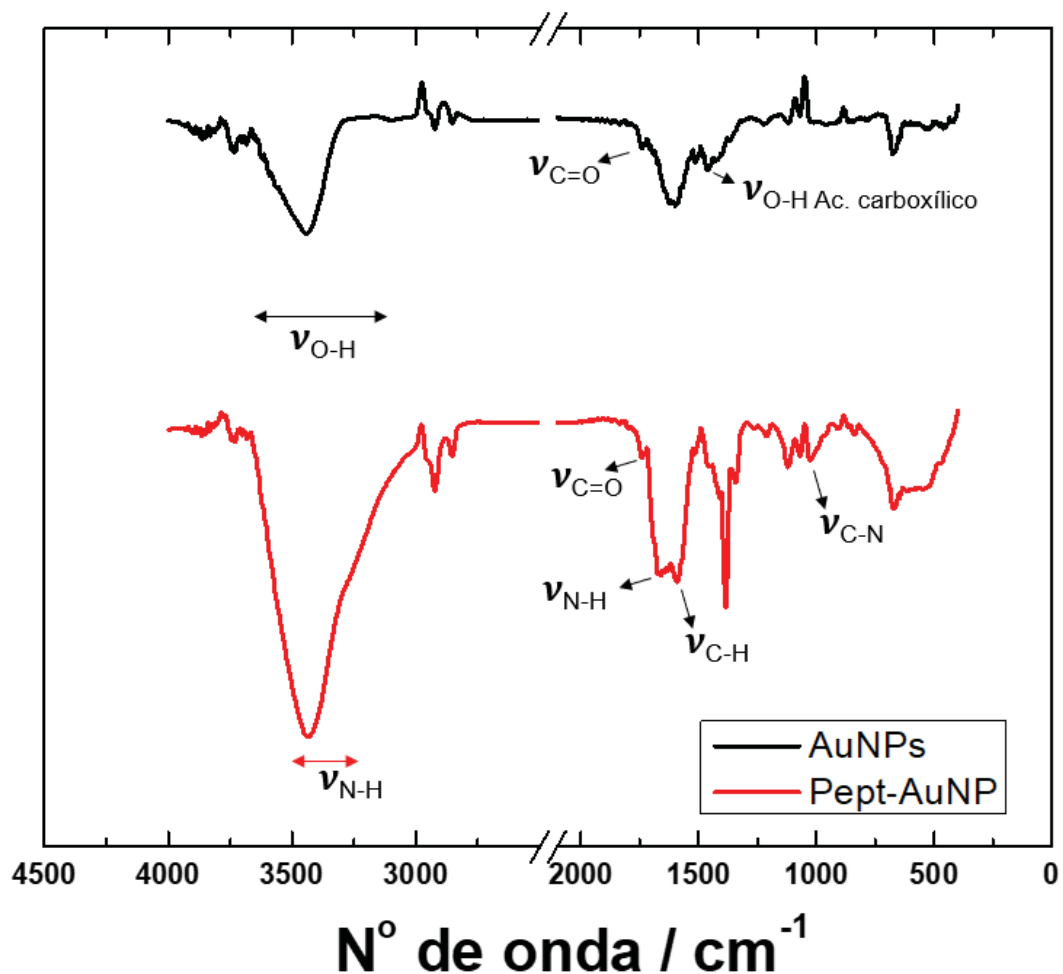
O espectro de EDS aponta a presença de ouro a partir da proporção em relação a outros elementos identificados nessa região do eletrodo. Esse resultado evidencia a natureza química das nanopartículas, que junto às imagens de microscopia corroboram a síntese das nanopartículas, permitindo o uso do material para a interação com o peptídeo a ser utilizado para a construção do biossensor.

O peptídeo é uma cadeia de aminoácidos pequena, que dependendo da sua composição pode oferecer interações semelhantes a outros biomateriais. Nesse caso, o peptídeo foi sintetizado para se ligar em anticorpos anti-proteína S de SARS-CoV-2, mimetizando uma porção da proteína S. Além disso, o peptídeo conta com uma “cauda” que tem afinidade por ouro, que pode ser utilizado para se ligar às nanopartículas de ouro. Apesar da sequência de aminoácidos não poder ser desvendada nesse momento por se tratar de uma pesquisa paralela do grupo de pesquisa liderado pelo prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, a literatura envolvendo os *solid-binding peptides* foi apresentada na introdução, ressaltando o uso de peptídeos

atrelados às nanopartículas de ouro para facilitar o uso em métodos de diagnósticos como lateral-flow, métodos ópticos e eletroquímicos [52,98–100].

A ligação do peptídeo com as AuNPs foi feita como descrito na seção de materiais e métodos, dando origem ao composto que será chamado de Pept-AuNP. A caracterização do material foi realizada por FTIR e MEV, focando na diferença observada para os resultados anteriores. O FTIR obtido para as AuNPs antes e depois da ligação com os peptídeos está ilustrado na FIGURA 42.

FIGURA 42: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO OBTIDO PARA AS NANOPARTÍCULAS DE OURO (PRETO) E PARA AS NANOPARTÍCULAS DE OURO LIGADAS AO PEPTÍDEO.

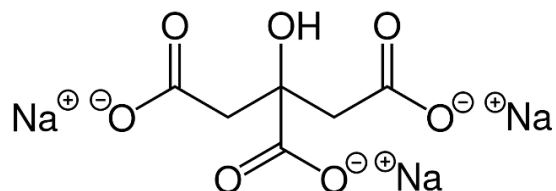


Fonte: O autor

Como pode ser observado na FIGURA 42, o espectro de FTIR obtido para as AuNPs não apresenta muitos estiramentos, principalmente pelo fato de as interações com o ouro não apresentarem estiramentos observáveis por infravermelho. Os estiramentos observados em  $3550\text{ cm}^{-1}$  a  $3200\text{ cm}^{-1}$  (estiramento O-H de álcool),  $1760$

$\text{cm}^{-1}$  (estiramento  $\text{C}=\text{O}$  de ácido carboxílico) e  $1440 \text{ cm}^{-1}$  (estiramento  $\text{O}-\text{H}$  de ácido carboxílico) dizem respeito ao citrato de sódio, reagente e estabilizante das nanopartículas de ouro, que tem a seguinte fórmula:

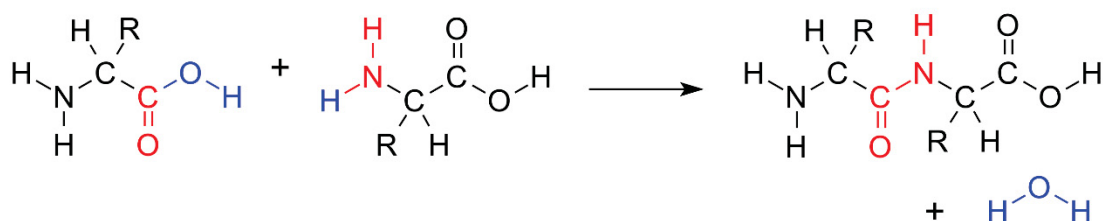
FIGURA 43: ESTRUTURA QUÍMICA DO CITRATO DE SÓDIO.



Assim, é possível perceber que os estiramentos observados somente para a nanopartícula de ouro coincidem com os grupamentos presentes no reagente da síntese, explicando os resultados obtidos.

Já para o FTIR do Pept-AuNP, é possível observar mais estiramentos característicos. Entre  $3500 \text{ cm}^{-1}$  e  $3300 \text{ cm}^{-1}$ , além do estiramento para a ligação  $\text{O}-\text{H}$  de álcool é também o número de onda para o estiramento da ligação  $\text{N}-\text{H}$  de aminas primárias e secundárias. Em  $1680 \text{ cm}^{-1}$  é possível observar o estiramento  $\text{C}=\text{O}$  de amida secundária, entre  $1650 \text{ cm}^{-1}$  e  $1580 \text{ cm}^{-1}$  a deformação do grupamento  $\text{N}-\text{H}$ , e entre  $1250$  e  $1020$ , o estiramento  $\text{C}-\text{N}$ . Todos esses grupamentos fazem parte de uma estrutura que se repete na formação das proteínas, que é a ligação peptídica.

FIGURA 44: REPRESENTAÇÃO DA LIGAÇÃO PEPTÍDICA ENTRE AMINOÁCIDOS

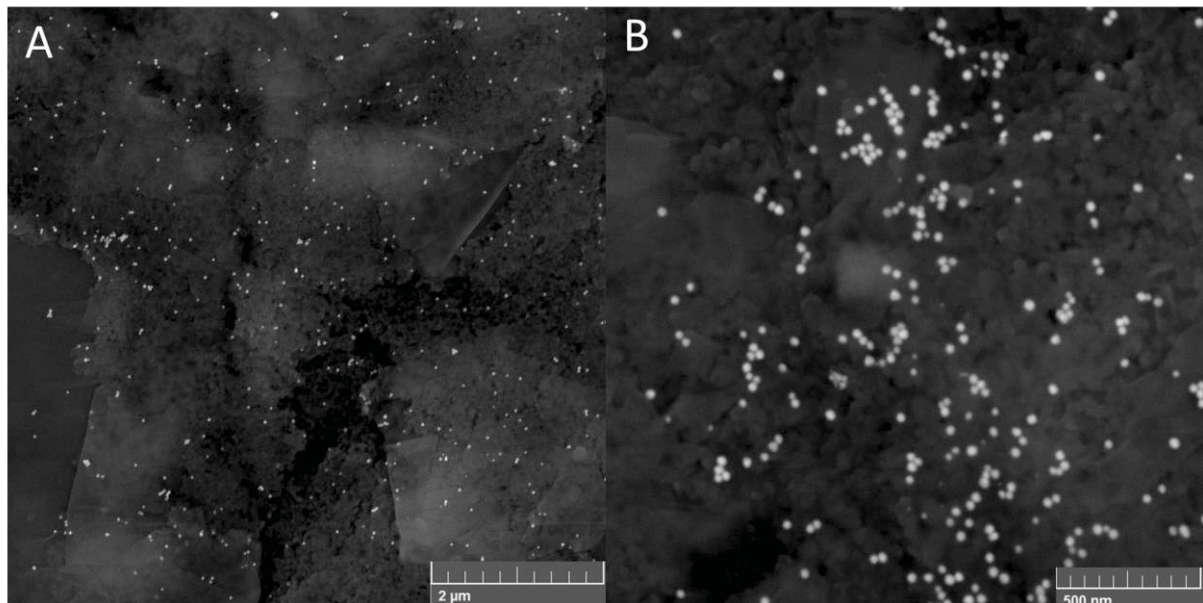


A ligação peptídica ilustrada na FIGURA 44 é observada tanto para a formação de um dipeptídeo, através da ligação de dois aminoácidos, assim como a formação de proteínas onde cadeias de polipeptídeos são formadas através da repetição dessa ligação entre os grupos amino e carboxílico dos aminoácidos. Assim, os estiramentos presentes no FTIR como  $\text{N}-\text{H}$  de aminas e amidas,  $\text{C}=\text{O}$  de amidas e estiramento  $\text{C}-\text{N}$ , que não estão presentes antes da interação das nanopartículas de ouro com o

peptídeo, permitem atestar a presença desse tipo de estrutura no compósito formado após a interação do peptídeo com as nanopartículas de ouro.

Além do espectro de infravermelho, foram obtidas imagens de MEV do eletrodo após a modificação do mesmo com as nanopartículas de ouro ligadas ao peptídeo. As imagens obtidas estão ilustradas na FIGURA 45.

FIGURA 45: IMAGENS DE MEV DA SUPERFÍCIE DO ELETRODO MODIFICADO COM O Pept-AuNP EM RESOLUÇÃO AUMENTADA EM A) 30kx E B) 100 kx.



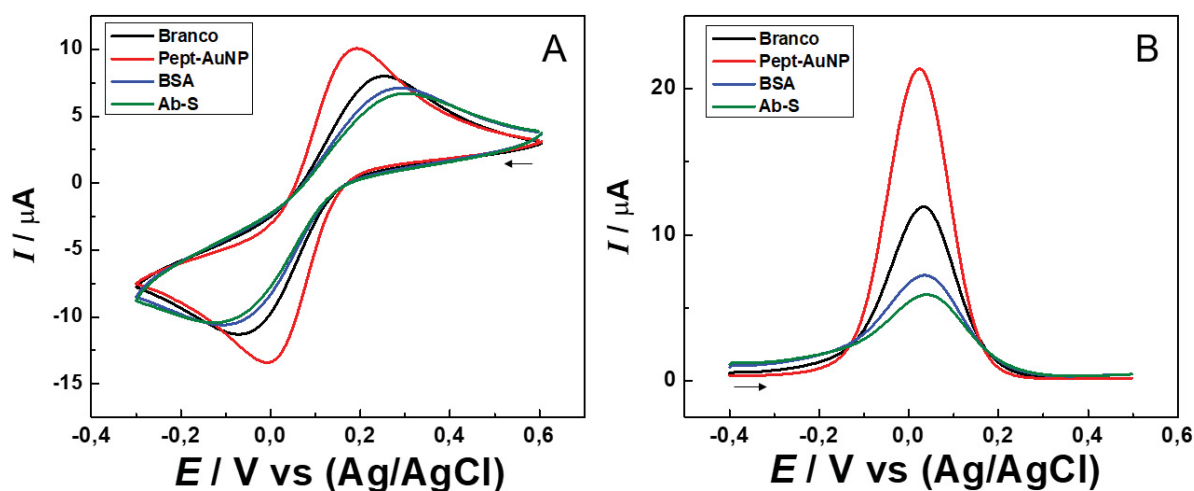
Como é possível observar na FIGURA 45, há uma maior densidade de AuNPs se comparado com as imagens das nanopartículas de ouro sem a presença do peptídeo. Isso pode indicar que a presença dos peptídeos pode melhorar a modificação do eletrodo por conta da estrutura do peptídeo, e a interação entre o eletrodo e o modificador mais propensa a acontecer apesar da modificação por drop-casting. Isso pode estar relacionado a um maior número de interações como ligações de hidrogênio ou por forças de van der Waals, uma vez que a interação entre o Pept-AuNP e a superfície do eletrodo de trabalho foi realizada por adsorção.

### 3.2.2 Potencialidade do sensor aplicando o Pept-AuNP

Para comprovar a potencialidade do Pept-AuNP atuando como uma camada seletiva para a detecção de anticorpos anti-proteína S do SARS-CoV-2 (Ab-S) foram realizados estudos preliminares para verificar uma interação inicial com o Ab-S. Para

isso, a solução com o peptídeo agregado às nanopartículas de ouro foi diluída 100 vezes, depositada no eletrodo de trabalho pelo método drop-casting e seco em estufa. Na sequência, o eletrodo foi incubado com albumina de soro bovino (BSA) 1 mg mL<sup>-1</sup> para bloquear possíveis sítios inespecíficos. O sensor foi então colocado em contato com uma solução contendo os anticorpos anti-SARS-CoV-2 a uma concentração de 15,4 µg mL<sup>-1</sup> para que interaja com a superfície do eletrodo que foi modificada com o Pept-AuNP. Para avaliar as interações que ocorrem no sensor, foram realizadas medidas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial para cada etapa até a interação com o anticorpo específico. As medidas eletroquímicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial foram realizadas em uma solução tampão fosfato salino 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 usando o par ferri/ferrocianeto de potássio como sonda eletroquímica. Os resultados obtidos para essas medidas iniciais estão ilustrados na FIGURA 46.

FIGURA 46: A) MEDIDAS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA E B) VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL EM 0,1 mol L<sup>-1</sup> PBS pH 7,4 NA PRESENÇA DE 1 mmol L<sup>-1</sup> DE [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR. CV:  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ , STEP = 7,5mV. DPV: STEP = 5 mV, AMPLITUDE: 0,15 V, MODULATION TIME: 0,5 s, INTERVAL TIME: 1s.



Como é possível observar na FIGURA 46, o sinal da onda eletroquímica mostra um aumento na altura de pico nas duas técnicas utilizadas para o eletrodo modificado com o Pept-AuNP. Isso indica que apesar da ligação com os peptídeos, as nanopartículas de ouro ainda melhoram o desempenho eletroquímico do sensor comparado ao eletrodo base, por causa de sua condutividade e grande área superficial. Esse comportamento também foi observado em outros trabalhos na

literatura que utilizam a mesma estratégia para modificar sensores eletroquímicos [99].

A etapa de bloqueio dos sítios inespecíficos com albumina de soro bovino (BSA) diminuiu o sinal eletroquímico observado para o sensor devido à adição da molécula grande e pouco condutora na superfície do eletrodo de trabalho. Esta estratégia para o bloqueio dos sítios inespecíficos é altamente difundida, mas pode ser substituída por caseína ou outras proteínas volumosas que interajam com sítios reativos não específicos, ajudando a melhorar a seletividade do método após a etapa de bloqueio [44,101,102]. Isso pode ser notado ao se observar a última etapa que é a interação com o anticorpo específico.

Na última etapa, o sensor é submetido à interação com uma solução contendo o Ab-S que interage especificamente com o peptídeo. Como a superfície já teve seus sítios inespecíficos bloqueados, qualquer mudança no sinal é um indicativo de uma interação com a região específica no eletrodo, nesse caso, com os peptídeos imobilizados previamente no eletrodo de trabalho. Essa interação é observada através da diminuição do sinal da sonda eletroquímica utilizada, atestando o acúmulo de mais moléculas biológicas e pouco condutivas na superfície do eletrodo através da diminuição da transferência de elétrons de elétrons entre o eletrodo e as espécies em solução.

Com isso, a arquitetura inicialmente proposta para a construção do biossensor para a interação com o anticorpo anti-S do SARS-CoV-2 se mostrou capaz de interagir com a molécula alvo, habilitando os estudos de otimização para aprimorar a capacidade analítica do dispositivo.

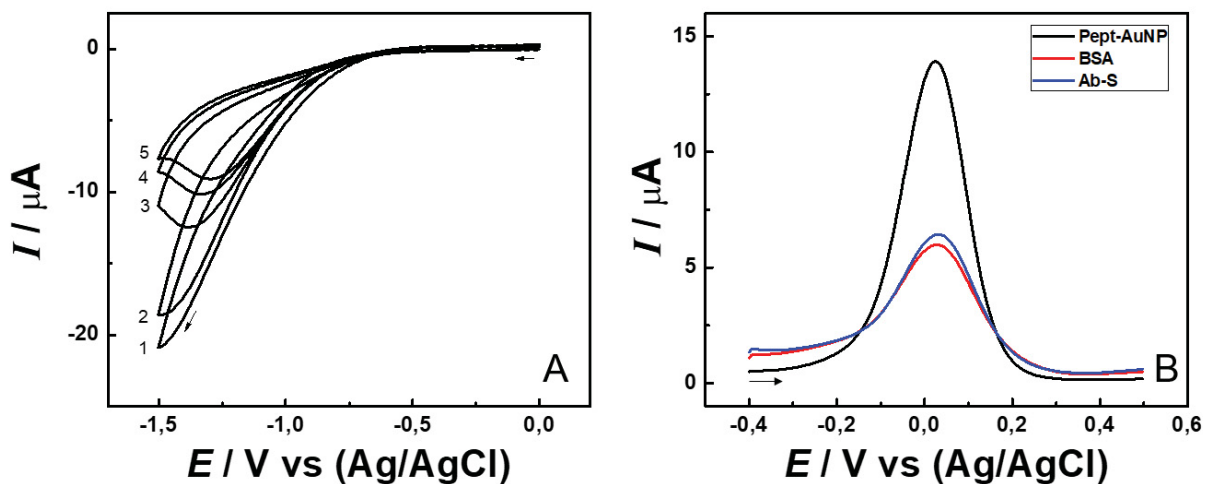
### 3.2.3 Avaliação do método de modificação do eletrodo

Uma das condições otimizáveis na etapa de construção do biossensor é a forma de modificação do eletrodo. Na literatura estão descritos diversos procedimentos para imobilização de partículas na superfície dos eletrodos, que pode envolver diversos métodos que dependem da espécie a ser imobilizada e o material que forma a superfície. Dentre os métodos mais simples e que não envolvem a adição de mais materiais ou reações, a eletrodeposição e a adsorção executada pelo método de drop-

casting na prova conceito oferecem abordagens mais rápidas para a modificação dos eletrodos.

Assim, foi testado a eletrodeposição do Pept-AuNP através da voltametria cíclica, que é utilizado para forçar uma mudança na interação entre o eletrodo e o modificador, visando melhorar a quantidade ou a estabilidade da interação. Zhou et al. realizou a eletrodeposição de nanopartículas de ouro em um eletrodo de ITO modificado com óxido de grafeno reduzido e nanobastões de zinco usando 20 ciclos de voltametria cíclica entre -1,4 V e +0,2 V vs (Ag/AgCl) [103]. Para testar a eletrodeposição no eletrodo proposto, foi variado o potencial entre 0 e -1,5 V por cinco ciclos a uma velocidade de varredura de 25 mV s<sup>-1</sup>. Para comparar a efetividade da modificação, o biossensor foi construído e a resposta para a interação com o anticorpo específico foi comparada com o resultado inicial obtido com a modificação do eletrodo por adsorção. O perfil observado para a eletrodeposição e as etapas pertinentes ao biossensor estão ilustradas na FIGURA 47.

FIGURA 47: A) PERFIL OBTIDO PARA A ELETRODEPOSIÇÃO DO PEPT-AuNP NA SUPERFÍCIE DO ELETRODO DE TRABALHO,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ , STEP = 7,5 mV,  $C_{\text{Pept-AuNP}}$ : 1:9. B) VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL EM 0,1 mol L<sup>-1</sup> PBS pH 7,4 NA PRESENÇA DE 1 mmol L<sup>-1</sup> DE  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  PARA CADA ETAPA DE CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR.



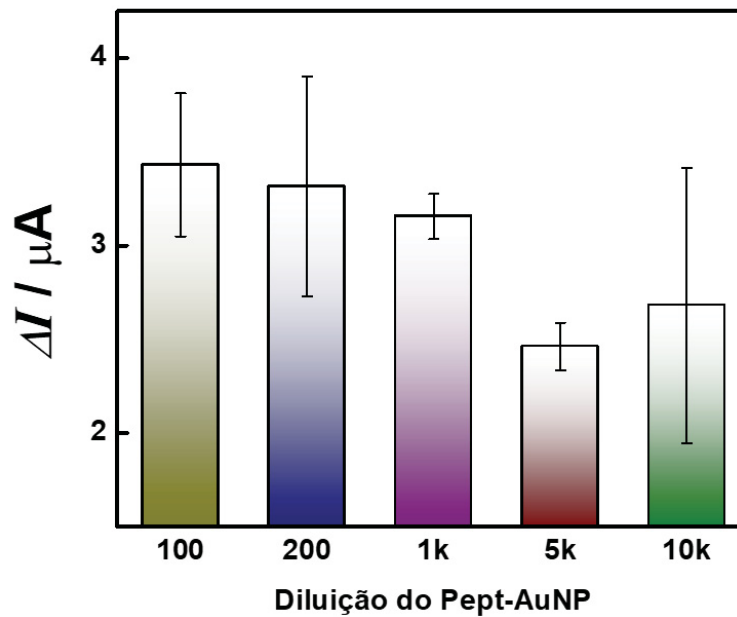
O perfil da eletrodeposição observado (FIGURA 47A) não apresenta picos característicos, e a corrente desenvolvida pode estar relacionada aos grupamentos funcionais presentes no eletrodo de carbono, uma vez que os picos referentes à reação de oxidação do ouro são encontrados em uma faixa de potencial muito mais positiva (próximos a +1V vs (Ag/AgCl)), e normalmente em meio ácido. Portanto, é esperado que as nanopartículas de ouro em si não tenham reagido

eletroquimicamente (pois já estão reduzidas) para que a eletrodeposição ocorresse, e sim uma mudança nos grupos funcionais que podem alterar a interação com os grupamentos na superfície das nanopartículas com o eletrodo de trabalho, incidindo na modificação. Entretanto, essa alternativa não se mostra eficiente para a modificação do eletrodo, uma vez que na interação com o anticorpo específico não foi identificado nenhuma alteração significativa na altura de pico, indicando que não houve a reação com analito de interesse na triplicata realizada. Dessa forma, a proposta inicial de modificação do eletrodo por drop-casting será realizada como padrão para a construção do biossensor eletroquímico. Com o método de construção do biossensor estabelecido, é possível realizar a otimização dos procedimentos de cada etapa para melhorar os parâmetros analíticos do método proposto.

#### 3.2.4 Otimização dos parâmetros para construção do biossensor para SARS-CoV-2

Uma das primeiras definições a ser otimizada dentro do método proposto é a concentração da solução do Pept-AuNP, que influencia a quantidade de material que vai ser depositada sobre o eletrodo, impactando diretamente na modificação e no desempenho final do dispositivo. A proporção da mistura (1:9 v/v Peptídeo/AuNP) entre as nanopartículas de ouro e o peptídeo utilizado nesse projeto foram otimizadas em um projeto paralelo em andamento. Assim, a mistura homogeneizada do peptídeo e nanopartículas de ouro (Pept-AuNP) foi diluída em diversas proporções (100, 200, 1000, 5000 e 10000 vezes) para avaliar a melhor condição para a construir o biossensor. Para comparar cada valor testado, a diminuição da corrente de pico após a interação com o anticorpo do SARS-CoV-2 foi utilizada como parâmetro. Os valores obtidos foram resumidos na FIGURA 48.

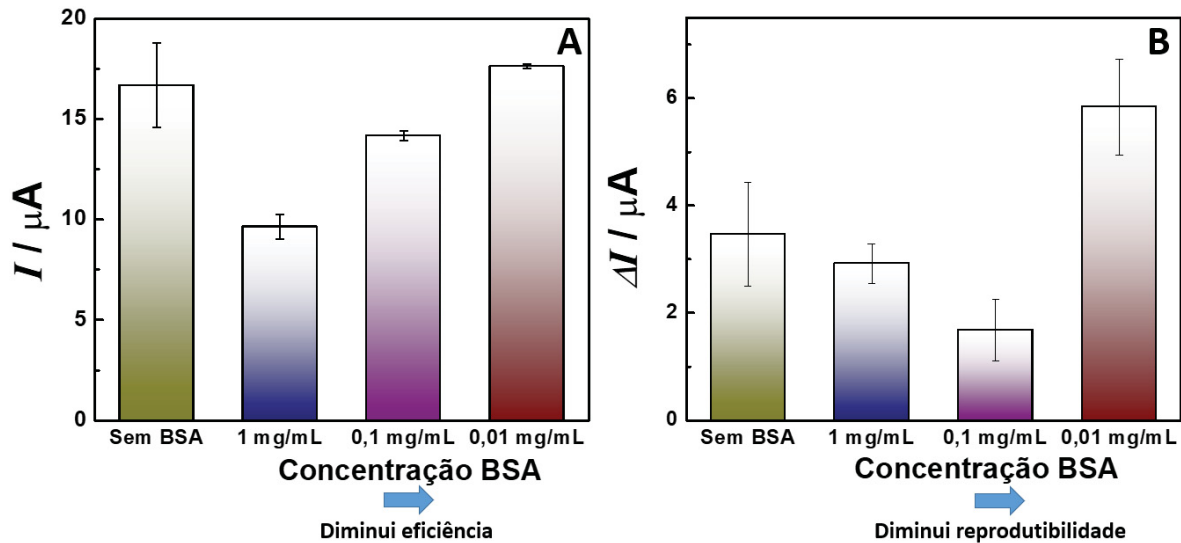
FIGURA 48: VARIAÇÃO DE SINAL OBSERVADO APÓS REAÇÃO COM O ANTICORPO SARS-CoV-2 PARA ELETRODOS MODIFICADOS COM DIFERENTES DILUIÇÕES DA SOLUÇÃO PEPT-AuNP (n = 3).



Como é possível observar na FIGURA 48, há uma tendência de menor variação da altura de pico após reação com o anticorpo específico conforme a concentração do Pept-AuNP diminui. Também é notável um maior desvio padrão dos valores máximos e mínimos testados, somente com a diluição de 1000 e 5000 vezes apresentando resultados confiáveis entre as triplicatas realizadas. A concentração de Pept-AuNP influencia diretamente na formação da camada seletiva e na interação que ocorre com o anticorpo específico posteriormente, de forma que o Pept-AuNP diluído 1000 vezes foi considerado como ótimo, pois apresenta maior sinal para a mesma concentração de anticorpo e menor desvio padrão entre as medidas.

Outra etapa otimizável na construção do biossensor é o bloqueio com albumina de soro bovino (BSA), utilizado para reagir com sítios inespecíficos presentes na superfície do eletrodo, permitindo somente a interação específica entre o peptídeo e o anticorpo do SARS-CoV-2. Essa otimização pode ser abordada de duas maneiras, pela concentração de BSA utilizada e o tempo de reação utilizada para o bloqueio. Como o tempo de reação afeta a frequência com a qual as medidas podem ser realizadas, a variação da concentração foi testada entre 1 e 0,01 mg mL<sup>-1</sup>. A altura da corrente de pico após o bloqueio com BSA e a variação obtida para a reação com o Ab-S posteriormente foram comparados entre cada condição, e estão resumidos na FIGURA 49.

FIGURA 49: A) PICO DE CORRENTE OBSERVADO PARA ELETRODOS BLOQUEADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BSA ( $n = 3$ ). B) VARIAÇÃO DO SINAL OBSERVADO PARA A MESMA CONCENTRAÇÃO DE ANTICORPO PARA OS ELETRODOS BLOQUEADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BSA ( $n = 3$ ).

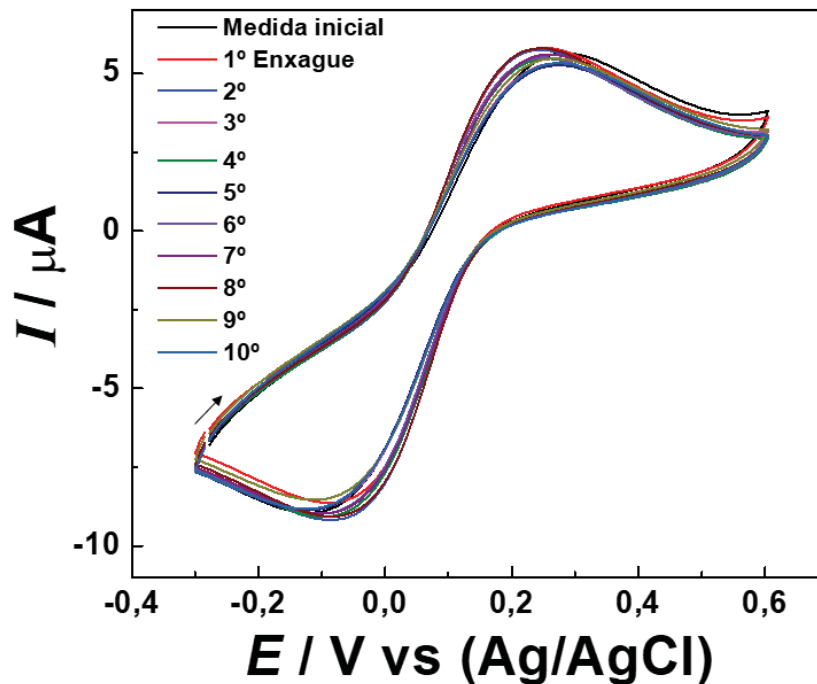


Como pode ser observado na FIGURA 49A, há uma diminuição da altura de pico observada para o eletrodo quando bloqueado com a maior concentração de BSA, indicando que há efetivamente a imobilização e por consequência o bloqueio de sítios inespecíficos. Em concentrações menores de BSA a eficiência do bloqueio diminui, com o bloqueio utilizando  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$  não oferecendo nenhuma mudança significativa na altura de pico, indicando que a reação não provocou o efeito desejado na construção do biossensor. Na FIGURA 49B está explícito a variação na altura de pico dos biossensores construídos após a interação com o anticorpo do SARS-CoV-2, sendo possível observar uma diminuição da reprodutibilidade das medidas conforme soluções de BSA mais diluídas são utilizadas. Além disso, a resposta ao Ab-S do sensor bloqueado com  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  diminui comparado ao bloqueio com  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , mas aumenta consideravelmente quando foi utilizado  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$  de BSA. Entretanto, essa variação observada para o bloqueio com a solução menos concentrada de BSA é maior até do que a observada para o eletrodo que não foi bloqueado, o que pode indicar uma remoção do Pept-AuNP da superfície durante a etapa bloqueio. Por consequência, isso põe em dúvida a seletividade do eletrodo, e o sinal observado pode ter tido uma contribuição de interações inespecíficas.

Outro ponto que merece atenção é o processo de lixiviação das espécies depositadas sobre o eletrodo, uma vez que a modificação do SPE acontece por drop-casting e interações não covalentes, o que pode afetar a estabilidade do eletrodo e reprodutibilidade das medidas após uma quantidade grande de etapas. Para avaliar a

estabilidade da modificação foi realizado um estudo com enxagues do biossensor construído até a etapa de bloqueio com BSA, e o sinal da sonda eletroquímica avaliado após cada enxague. Os voltamogramas obtidos durante o estudo estão ilustrados na FIGURA 50.

FIGURA 50: VOLTAMETRIAS CÍCLICAS OBTIDAS EM CONDIÇÃO INICIAL E APÓS CADA ENXAGUE. MEDIDAS EM  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS pH 7,4 NA PRESENÇA DE  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  DE  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ , STEP = 7,5 mV.



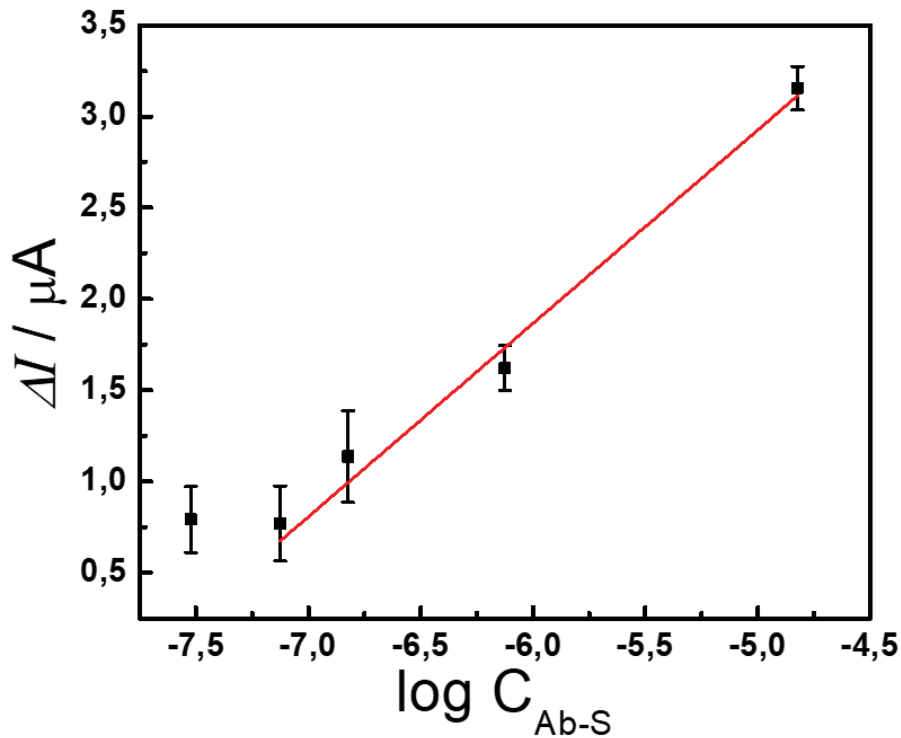
Como pode ser observado na FIGURA 50, houve uma mudança pouco significativa nas medidas realizadas após cada enxague do eletrodo. Foi quantificado uma variação de 5,65% no valor da altura do pico entre os 10 enxagues, e uma variação 4,10% da corrente de pico no potencial de pico. Isso indica que apesar da modificação menos robusta, os enxagues e as etapas de montagem do eletrodo influenciam minimamente no sinal obtido e na estabilidade da modificação.

Com isso, as etapas críticas para a construção do biossensor foram otimizadas, com os melhores parâmetros para a formação da camada seletiva, bloqueio de interações inespecíficas e estabilidade comprovada, sendo possível realizar as etapas de curva analítica e testagem em amostra real fortificada.

### 3.2.5 Curva Analítica

Com as etapas críticas para a construção do biossensor otimizadas, é possível realizar as medidas variando a concentração da biomolécula de interesse para a elaboração da curva analítica. Assim, foram realizadas triplicatas de 5 pontos de concentração entre  $30 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $15 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , e o sinal obtido para as medidas de voltametria de pulso diferencial plotado em função do log da concentração testada. A variação dos sinais obtidos para cada concentração e a curva analítica correspondente, estão ilustrados na FIGURA 51.

FIGURA 51: CURVA ANALÍTICA OBTIDA PARA O BIOSSENSOR OTIMIZADO ( $n = 3$ ).



Como pode ser observado na FIGURA 51, o sinal obtido variou linearmente com o log da concentração entre  $75 \text{ ng mL}^{-1}$  e  $15 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Nessas condições, a sensibilidade obtida foi de  $1,059 \text{ } \mu\text{A dec}^{-1}$  com um  $R^2$  de 0,984. A linearidade em função do log da concentração é uma característica comum de biossensores de afinidade, sendo descrito frequentemente em literatura [104–106]. Com isso, o limite de quantificação alcançado pelo método foi de  $75 \text{ ng mL}^{-1}$ . Com isso, é possível comparar o sensor desenvolvido com métodos encontrados na literatura que partilham

do mesmo objetivo de detectar o anticorpo anti-SARS-CoV-2. Os artigos encontrados com propostas e métodos semelhantes estão dispostos na TABELA 4.

TABELA 4: SENSORES ELETROQUÍMICOS RELATADOS EM LITERATURA QUE QUANTIFICAM ANTICORPOS ANTI-PROTEÍNA S DO SARS-CoV-2.

Método	RL	LQ	Referência
ePAD-GO-SP	3 pg mL <sup>-1</sup> a 1 μg mL <sup>-1</sup>	3 ng mL <sup>-1</sup>	[106]
SPE-NiONPs-SP	1 fg mL <sup>-1</sup> a 1 μg mL <sup>-1</sup>	1 fg mL <sup>-1</sup>	[107]
GCE-Au-ME-SP	0,1 fg mL <sup>-1</sup> a 10 pg mL <sup>-1</sup>	0,1 fg mL <sup>-1</sup>	[108]
SPE-Pept-AuNP	75 ng mL <sup>-1</sup> a 15 μg mL <sup>-1</sup>	75 ng mL <sup>-1</sup>	Este trabalho

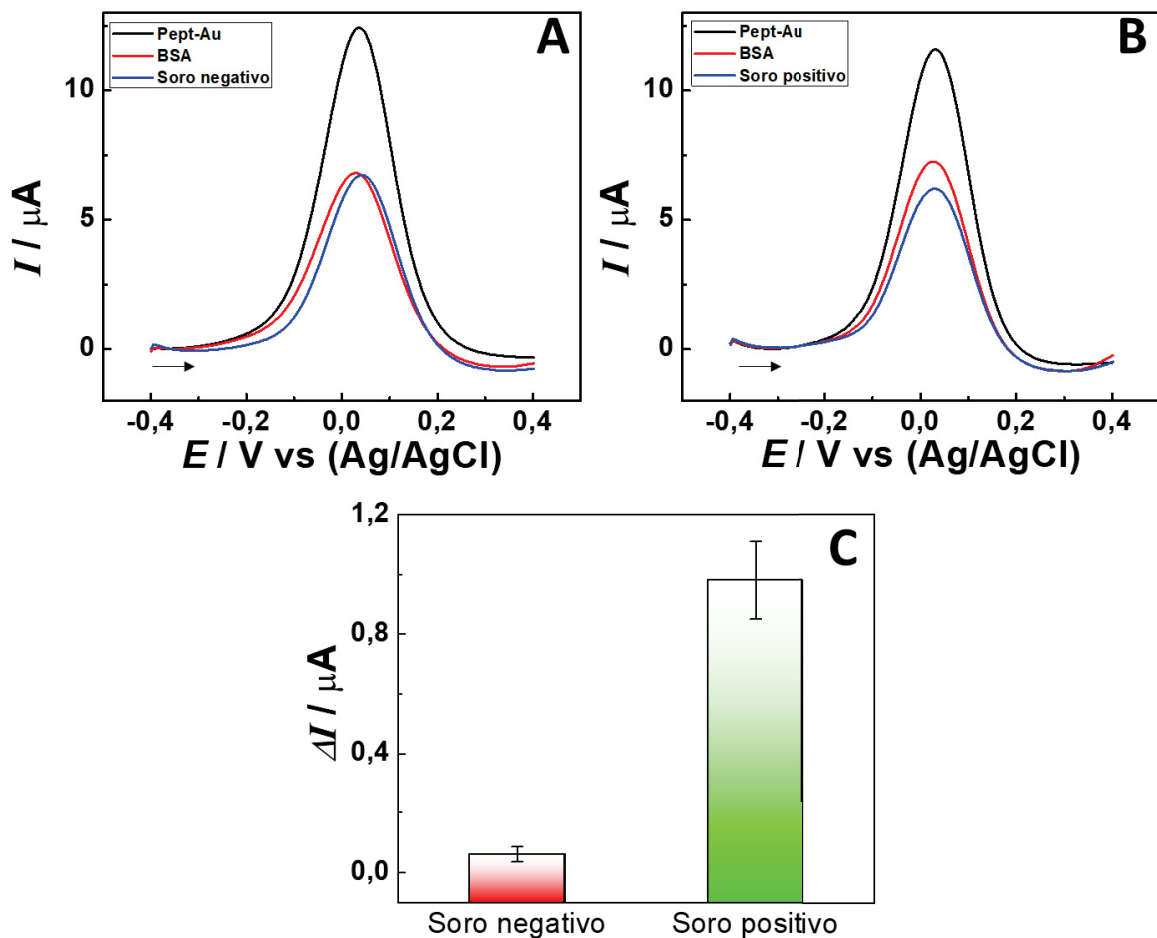
RL = Região Linear; LQ = Limite de Quantificação; ePAD = Dispositivo analítico de papel para diagnósticos; GO = Óxido de grafeno; SP = Proteína S do SARS-CoV-2; NiONPs = Nanopartículas de hidróxido de níquel; ME = Mercaptoetanol.

Os trabalhos da literatura para a determinação de anticorpos anti-proteína S de SARS-CoV-2 disponíveis na TABELA 4 confirmam a versatilidade dos biossensores eletroquímicos, com diferentes nanopartículas e métodos de modificação para alcançar o mesmo objetivo. O dispositivo desenvolvido tem faixa linear e limite de quantificação acima dos trabalhos da literatura, e o fator que pode ter contribuído para que isso acontecesse é a escolha do método de modificação do eletrodo, onde os outros trabalhos da literatura utilizam reagentes para realizar a modificação por ligação covalente entre a proteína e as nanopartículas, como mercaptoetanol [108] e EDC/NHS [106,107]. Apesar disso, o método de construção simples é uma vantagem do método proposto. A modificação da nanopartícula com o peptídeo foi realizada sem reagentes adicionais, de forma rápida e estável. Além de conferir a seletividade do método, a modificação da AuNP com o peptídeo levou a uma melhora na interação com o eletrodo, como mostrado pelas imagens de MEV, permitindo uma deposição consistente do compósito por adsorção. Apesar da simplicidade, o eletrodo responde em uma faixa apropriada de concentração, que permite o uso em amostras reais.

### 3.2.6 Amostra real fortificada

Para avaliar o desempenho do sensor otimizado em amostras reais, amostras de soro comercial foram diluídas 10000 vezes, pois amostras mais concentradas bloqueavam significativamente o eletrodo, e fortificadas com o anticorpo Ab-S. A concentração utilizada de anticorpo foi de  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , dentro da faixa linear obtida para o sensor. Os sinais obtidos para os testes com amostras com e sem os anticorpos alvo, e a resposta média obtida para a triplicata de cada condição estão ilustrados na FIGURA 52.

FIGURA 52: VOLTAMETRIAS DE PULSO DIFERENCIAL OBTIDAS DURANTE A CONSTRUÇÃO E TESTE DOS SENSORES CONSTRUÍDOS EM A) SORO NEGATIVO E B) SORO POSITIVO. C) VARIAÇÃO DE SINAL MÉDIO APÓS INTERAÇÃO DOS BIOCENSORES COM AS AMOSTRAS DE SORO NEGATIVO E POSITIVO.



Como pode ser observado na FIGURA 52, há uma clara diferença entre o sinal obtido para a amostra com o anticorpo anti-proteína S do SARS-CoV-2 (Soro positivo) e a amostra sem o mesmo (Soro negativo). A incubação com a amostra negativa não ofereceu diferença significativa do sinal observado antes da interação com o soro, indicando pouca interação com espécies inespecíficas devido ao bloqueio com BSA utilizado na construção do biossensor. Por outro lado, a amostra com o anticorpo mostrou uma redução no sinal observado da sonda eletroquímica, influenciado pela interação específica. Entretanto, o sinal para a concentração utilizada na amostra apresentou uma variação comparado ao da curva analítica (cerca de 33% menor do que o esperado), apontando para uma perda de sensibilidade em matriz complexa. Com isso, apesar da diluição da amostra por conta da matriz, a amostra ainda incide em um impacto no desempenho do biossensor desenvolvido. Esse aspecto pode ser a consequência de algumas escolhas na otimização como a modificação por *drop-casting*, que apesar de se mostrar eficiente e fácil de realizar, pode oferecer algumas desvantagens como a citada em amostras mais complexas.

Quanto à concentração de anticorpo encontrada em uma amostra real, estudos mostram que indivíduos saudáveis (acima de 13 anos) tem uma concentração média de IgG próxima a  $13 \text{ mg mL}^{-1}$ , e que se espera um aumento considerável da concentração de anticorpos durante o período da doença. Isho et al. apesar de apontar para um aumento de anticorpos não cita a concentração de IgG em sangue durante a doença, mas faz um paralelo com o observado em amostras de saliva, apontando para um aumento de aproximadamente 10 vezes na concentração de IgG na amostra (de  $45.8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  para  $452,9 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Sendo assim, algo nesse sentido também é esperado na amostra de soro utilizada, e a concentração utilizada no teste fica dentro do esperado para alguém acometido pelo SARS-CoV-2. Sendo assim, apesar das limitações do eletrodo, a diferença significativa entre as amostras positivas e negativas leva a crer que o dispositivo pode ser utilizado para a determinação de anticorpos em amostras reais. Sobretudo, o estudo com amostras e melhorias no eletrodo podem levar ao contorno desses obstáculos encontrados no desenvolvimento do biossensor, e o material desenvolvido aqui contribui para avanço do conhecimento na área de biossensores eletroquímicos [109,110].

### 3.2.7 Conclusão

Os peptídeos se mostraram materiais muito fáceis de serem aplicados na construção de biossensores, pois permitiram a interação específica com o anticorpo anti-proteína S de SARS-CoV-2 sem necessitar o uso de reações complexas para a modificação das nanopartículas de ouro. Apesar da adsorção se mostrar a metodologia mais aplicável entre as mais acessíveis, o dispositivo proposto se mostrou robusto o suficiente para permitir a aplicação em amostras de soro fortificadas, quantificando níveis adequados de anticorpo através de uma metodologia muito simples de construção do biossensor. Apesar das diferenças observadas nas caracterizações entre a nanopartícula de ouro sintetizada e as citadas em literatura, o nanomaterial teve uma atuação fundamental no desenvolvimento desse trabalho, desempenhando um papel crítico de melhorar a sensibilidade do sensor e servir de plataforma para a imobilização do peptídeo.

## 3.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em constante processo de evolução, o desenvolvimento dos biossensores permitiu a determinação de uma grande quantidade de moléculas de interesse, principalmente bioquímicas e imunológicas, que resultou no controle de biomarcadores e criação de métodos de diagnóstico eficientes. Os biossensores eletroquímicos têm de enfrentar diversos desafios, entre a determinação de espécies em concentração abaixo de nanogramas por mililitro, seletividade, e testes em amostras complexas. Entretanto, a grande quantidade de eletrodos e modificadores disponíveis tornam os biossensores eletroquímicos mais do que capazes de enfrentar esses desafios, com um potencial enorme que se renova com o desenvolvimento de novos materiais.

A versatilidade é uma palavra que foi utilizada para descrever diversos aspectos da construção dos biossensores, e é um fato que tornou o desenvolvimento desses dispositivos muito mais interessante. Pode ser que com todo o conhecimento adquirido, dinheiro e tempo, seria possível desenvolver dispositivos muito mais complexos, com diversas nanopartículas e múltiplos procedimentos para construir o biossensor. Entretanto, a contribuição para ciência realizada nesse doutorado foca na

acessibilidade e facilidade de preparação dos sensores. Boa parte dessa decisão é filosófica, e faz parte das escolhas que fazemos enquanto pessoa. É claro que é importante pesquisar métodos para se alcançar o menor limite de quantificação possível, mas parte da popularização dos métodos eletroquímicos como métodos de diagnóstico passa também pela facilidade de construção e preço dos dispositivos, que sempre foi um ponto forte da eletroquímica. Com isso, parte do objetivo desde o mestrado foi desenvolver métodos que precisam de menos tempo, etapas, quantidade de reagentes para alcançar o objetivo de quantificar um biomarcador. Em parte, esse objetivo só foi alcançado com o acesso a biomoléculas com excelentes propriedades, diferenciando o trabalho desenvolvido aqui dos demais. Por isso, fica aqui novamente o meu agradecimento a todos os parceiros que permitiram o meu desenvolvimento e o desse trabalho de doutorado.

O desenho experimental dos projetos desenvolvidos pode ser aplicado para o diagnóstico de outras doenças ao realizar a troca das biomoléculas, considerando uma semelhança nas propriedades como seletividade e detalhes como a presença de peptídeos para habilitar a mesma rota de modificação. Dentro das otimizações que podem ser realizadas para continuar o progresso nessa linha de pesquisa, algumas alternativas se destacam, como o uso de eletrodos manufaturados no laboratório para diminuir o custo do teste, o teste com outras técnicas eletroquímicas, e outros parâmetros que podem facilitar o direcionamento do biossensor para o desenvolvimento de métodos point-of-care e a popularização dos métodos eletroquímicos em laboratórios especializados.

#### 4 REFERÊNCIAS

- [1] ScienceDirect Search Results - Keywords(sensor) n.d. <https://www.sciencedirect.com/search?q=sensor&articleTypes=FLA&lastSelectedFacet=subjectAreas&subjectAreas=1300%2C1600%2C2500> (accessed June 10, 2022).
- [2] Maddipatla D, Narakathu BB, Atashbar M. Recent Progress in Manufacturing Techniques of Printed and Flexible Sensors: A Review. **Biosensors (Basel)** 2020;10. <https://doi.org/10.3390/BIOS10120199>.
- [3] Baracu AM, Gugoasa LAD. Review—Recent Advances in Microfabrication, Design and Applications of Amperometric Sensors and Biosensors. **J Electrochem Soc** 2021;168:037503. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ABE8B6>.
- [4] Bard AJ, Faulkner LR. Electrochemical methods: Fundamentals and applications. **Electrochemical Methods** 2001;2:580–632.
- [5] Davy H. XXIII. Electro-chemical researches, on the decomposition of the earths; with observations on the metals obtained from the alkaline earths, and on the amalgam procured from ammonia. **Philosophical Transactions R Soc** 1808;98:333–70. <https://doi.org/http://doi.org/10.1098/rstl.1808.0023>.
- [6] Ehl RG, Ihde AJ. Faraday's electrochemical laws and the determination of equivalent weights. **J Chem Educ** 1954;31:226–32. <https://doi.org/10.1021/ed031p226>.
- [7] Hickling A. Studies in electrode polarisation. **Transactions of the Faraday Society** 1941:27–33.
- [8] Harvey D. Voltammetric Methods 2019. <https://chem.libretexts.org/@go/page/70712>.
- [9] Moldenhauer J, Meier M, Paul DW. Rapid and Direct Determination of Diffusion Coefficients Using Microelectrode Arrays. **J Electrochem Soc** 2016;163:H672. <https://doi.org/10.1149/2.0561608JES>.
- [10] Pacheco WF, Semaan FS, de Almeida VGK, Ritta AGSL, Aucélio RQ. Voltammetry: A brief review about concepts. **Revista Virtual de Química** 2013;5:516–37. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20130040>.

- [11] Adarakatti PS, Kempahanumakkagari SK. Modified electrodes for sensing. **SPR Electrochemistry** 2019;15:58–95. <https://doi.org/10.1039/9781788013895-00058>.
- [12] International Organization for Standardization. ISO/TS 80004-1:2015(en) Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core terms 2015. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-1:ed-2:v1:en> (accessed May 20, 2021).
- [13] Mingos DMP. Historical introduction to gold colloids, clusters and nanoparticles. **Struct Bond** 2014;161:1–47. [https://doi.org/10.1007/430\\_2013\\_138](https://doi.org/10.1007/430_2013_138).
- [14] Zsigmondy R, Alexander J. Colloids and the ultramicroscope; a manual of colloid chemistry and ultramicroscopy. 1st ed. New York, J. Wiley & Sons; 1909.
- [15] Brainina K, Stozhko N, Bukharinova M, Vikulova E. Nanomaterials: Electrochemical Properties and Application in Sensors. **Physical Sciences Reviews** 2019;3. <https://doi.org/10.1515/psr-2018-8050>.
- [16] Kleijn SEF, Lai SCS, Koper MTM, Unwin PR. Electrochemistry of Nanoparticles. **Angewandte Chemie International Edition** 2014;53:3558–86. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201306828>.
- [17] Paixão TRLC. Measuring Electrochemical Surface Area of Nanomaterials versus the Randles Ševčík Equation. **ChemElectroChem** 2020;7:3414–5. <https://doi.org/10.1002/celec.202000633>.
- [18] Daruich De Souza C, Ribeiro Nogueira B, Rostelato MECM. Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction. **J Alloys Compd** 2019;798:714–40. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.05.153>.
- [19] Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discuss Faraday Soc** 1951;11:55–75. <https://doi.org/10.1039/DF9511100055>.
- [20] Gold Nanoparticles – nanoComposix n.d. <https://nanocomposix.com/pages/gold-nanoparticles> (accessed June 24, 2022).
- [21] Hammami I, Alabdallah NM, jomaa A al, kamoun M. Gold nanoparticles: Synthesis properties and applications. **J King Saud Univ Sci** 2021;33. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101560>.
- [22] Li Y, Schluesener HJ, Xu S, Org WG. Gold nanoparticle-based biosensors. **Gold Bull** 2010;43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF03214964>.

- [23] He L, Musick MD, Nicewarner SR, Salinas FG, Benkovic SJ, Natan MJ, et al. Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance for ultrasensitive detection of DNA hybridization. **J Am Chem Soc** 2000;122:9071–7. <https://doi.org/10.1021/JA001215B>.
- [24] Xiao Y, Patolsky F, Katz E, Hainfeld JF, Willner I. Plugging into enzymes: Nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle. **Science (1979)** 2003;299:1877–81. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1080664/>.
- [25] Andreescu S, Luck LA. Studies of the binding and signaling of surface-immobilized periplasmic glucose receptors on gold nanoparticles: A glucose biosensor application. **Anal Biochem** 2008;375:282–90. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2007.12.035>.
- [26] Raj CR, Jena BK. Efficient electrocatalytic oxidation of NADH at gold nanoparticles self-assembled on three-dimensional sol-gel network. **Chemical Communications** 2005:2005–7. <https://doi.org/10.1039/B500430F>.
- [27] Liu T, Tang J, Jiang L. The enhancement effect of gold nanoparticles as a surface modifier on DNA sensor sensitivity. **Biochem Biophys Res Commun** 2004;313:3–7. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2003.11.098>.
- [28] Guo S, Wang E. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. **Anal Chim Acta** 2007;598:181–92. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.054>.
- [29] Muniandy S, Teh SJ, Thong KL, Thiha A, Dinshaw IJ, Lai CW, et al. Carbon Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors for Foodborne Bacterial Detection. **Crit Rev Anal Chem** 2019;49:510–33. <https://doi.org/10.1080/10408347.2018.1561243>.
- [30] Power AC, Gorey B, Chandra S, Chapman J. Carbon nanomaterials and their application to electrochemical sensors: a review. **Nanotechnol Rev** 2018;7:19–41. <https://doi.org/10.1515/NTREV-2017-0160>.
- [31] Xu X, Ray R, Gu Y, Ploehn HJ, Gearheart L, Raker K, et al. Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. **J Am Chem Soc** 2004;126:12736–7. <https://doi.org/10.1021/ja040082h>.
- [32] Wang Y, Hu A. Carbon quantum dots: Synthesis, properties and applications. **J Mater Chem C Mater** 2014;2:6921–39. <https://doi.org/10.1039/c4tc00988f>.

- [33] Shen J, Zhu Y, Yang X, Li C. Graphene quantum dots: Emergent nanolights for bioimaging, sensors, catalysis and photovoltaic devices. **Chemical Communications** 2012;48:3686–99. <https://doi.org/10.1039/c2cc00110a>.
- [34] Choi SH. Unique properties of graphene quantum dots and their applications in photonic/electronic devices. **J Phys D Appl Phys** 2017;50. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aa5244>.
- [35] Bacon M, Bradley SJ, Nann T. Graphene quantum dots. **Particle and Particle Systems Characterization** 2014;31:415–28. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201300252>.
- [36] Li L, Wu G, Yang G, Peng J, Zhao J, Zhu JJ. Focusing on luminescent graphene quantum dots: Current status and future perspectives. **Nanoscale** 2013;5:4015–39. <https://doi.org/10.1039/c3nr33849e>.
- [37] Peng J, Gao W, Gupta BK, Liu Z, Romero-Aburto R, Ge L, et al. Graphene quantum dots derived from carbon fibers. **Nano Lett** 2012;12:844–9. <https://doi.org/10.1021/nl2038979>.
- [38] Wang CI, Wu WC, Periasamy AP, Chang HT. Electrochemical synthesis of photoluminescent carbon nanodots from glycine for highly sensitive detection of hemoglobin. **Green Chemistry** 2014;16:2509–14. <https://doi.org/10.1039/c3gc42325e>.
- [39] Clark LC, Lyons C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. **Ann N Y Acad Sci** 1962;102:29–45. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>.
- [40] Wang J. Electrochemical glucose biosensors. **Chem Rev** 2008;108:814–25. <https://doi.org/10.1021/cr068123a>.
- [41] Newman JD, Setford SJ. Enzymatic biosensors. **Mol Biotechnol** 2006;32:249–68. <https://doi.org/10.1385/MB:32:3:249>.
- [42] Bhalla N, Jolly P, Formisano N, Estrela P. Introduction to biosensors. **Essays Biochem** 2016:60–1. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>.
- [43] Quesada-González D, Merkoçi A. Nanomaterial-based devices for point-of-care diagnostic applications. **Chem Soc Rev** 2018;47:4697–709. <https://doi.org/10.1039/C7CS00837F>.
- [44] Daniels JS, Pourmand N. Label-free impedance biosensors: Opportunities and challenges. **Electroanalysis** 2007;19:1239–57. <https://doi.org/10.1002/elan.200603855>.

- [45] Radecka H, Radecki J. Label-free Electrochemical Immunosensors for Viruses and Antibodies Detection-Review. **J Mex Chem Soc** 2016;59:269–75. <https://doi.org/10.1007/s12599-015-0395-z>.
- [46] Ramnani P, Saucedo NM, Mulchandani A. Carbon nanomaterial-based electrochemical biosensors for label-free sensing of environmental pollutants. **Chemosphere** 2016;143:85–98. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.063>.
- [47] Andryukov BG, Besednova NN, Romashko R v., Zaporozhets TS, Efimov TA. Label-free biosensors for laboratory-based diagnostics of infections: Current achievements and new trends. **Biosensors (Basel)** 2020;10. <https://doi.org/10.3390/bios10020011>.
- [48] Scouten WH, Luong JHT, Stephen Brown R. Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. **Trends Biotechnol** 1995;13:178–85. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)88935-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)88935-0).
- [49] Sandhyarani N. Surface modification methods for electrochemical biosensors. **Electrochemical Biosensors** 2019:45–75. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816491-4.00003-6>.
- [50] Do HD, Vandermies M, Fickers P, Theron CW. Non-Conventional Yeast Species for Recombinant Protein and Metabolite Production. **Reference Module in Life Sciences** 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20885-6>.
- [51] Kim KS, Jang J ryang, Choe WS, Yoo PJ. Electrochemical detection of Bisphenol A with high sensitivity and selectivity using recombinant protein-immobilized graphene electrodes. **Biosens Bioelectron** 2015;71:214–21. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.04.042>.
- [52] Care A, Bergquist PL, Sunna A. Solid-binding peptides: Smart tools for nanobiotechnology. **Trends Biotechnol** 2015;33:259–68. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.02.005>.
- [53] Puiu M, Idili A, Moscone D, Ricci F, Bala C. A modular electrochemical peptide-based sensor for antibody detection. **Chemical Communications** 2014;50:8962–5. <https://doi.org/10.1039/c4cc02858a>.
- [54] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. **Science (1979)** 1990;249:505–10. <https://doi.org/doi:10.1126/science.2200121>.

- [55] D. Jayasena S. Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. **Clin Chem** 1999;45:1628–50. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.74>.
- [56] Tao D, Shui B, Gu Y, Cheng J, Zhang W, Jaffrezic-Renault N, et al. Development of a Label-Free Electrochemical Aptasensor for the Detection of Tau381 and its Preliminary Application in AD and Non-AD Patients' Sera. **Biosensors** 2019, **Vol 9, Page 84** 2019;9:84. <https://doi.org/10.3390/BIOS9030084>.
- [57] Diferença entre pandemia, epidemia, endemia e surto n.d. <https://hilab.com.br/blog/pandemia-epidemia-endemia-e-surto-diferencas/> (accessed June 24, 2022).
- [58] Strimbu K, Tavel JA. What are Biomarkers? **Curr Opin HIV AIDS** 2010;5:463. <https://doi.org/10.1097/COH.0B013E32833ED177>.
- [59] Michèle R, Giambérini L. History of Biomarkers. **Ecological Biomarkers** 2013:15–35. <https://doi.org/doi:10.1201/b13036-3>.
- [60] Murphy K, Weaver C. Janeway's Immunobiology. 9th ed. CRC Press; 2016.
- [61] Stingaciu LR, Ivanova O, Ohl M, Biehl R, Richter D. Fast antibody fragment motion: flexible linkers act as entropic spring. **Scientific Reports** 2016 **6:1** 2016;6:1–13. <https://doi.org/10.1038/srep22148>.
- [62] Overview of ELISA | Thermo Fisher Scientific - BR n.d. <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html> (accessed July 14, 2021).
- [63] L. Sheng, M. Christopher AM. Detection of HIV-1 p24 antigen in patients with varying degrees of viremia using an ELISA with a photochemical signal amplification system. **Clinical Chim Acta** 2016;176:100–106. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.02.022>.
- [64] Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. **Essays Biochem** 2016;60:111. <https://doi.org/10.1042/EBC20150012>.
- [65] Bahadır EB, Sezgintürk MK. Lateral flow assays: Principles, designs and labels. **TrAC Trends in Analytical Chemistry** 2016;82:286–306. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2016.06.006>.
- [66] Zhou P, Yang X lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature** 2020;579:270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.

- [67] CDC Museum COVID-19 Timeline | David J. Sencer CDC Museum | CDC n.d. <https://www.cdc.gov/museum/timeline/covid19.html> (accessed June 18, 2022).
- [68] Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease** 2020;1866:165878. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2020.165878>.
- [69] Zhang Q, Xiang R, Huo S, Zhou Y, Jiang S, Wang Q, et al. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. **Signal Transduct Target Ther** 2021;6:1–19. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00653-w>.
- [70] Liustrovaite V, Drobysh M, Rucinskiene A, Baradoke A, Ramanaviciene A, Plikusiene I, et al. Towards an Electrochemical Immunosensor for the Detection of Antibodies against SARS-CoV-2 Spike Protein. **J Electrochem Soc** 2022;169:037523. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/AC5D91>.
- [71] Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep** 1981;30:305–8.
- [72] Sharp PM, Beatrice H. Hahn. Origins of HIV and the AIDS epidemic. **Cold Spring Harb Perspect Med** 2011:1–22. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006841> a006841 [pii].
- [73] Maartens G, Celum C, Lewin SR, Town C, Africa S. Seminar HIV infection : epidemiology , pathogenesis , treatment , and prevention. **The Lancet** 2014;384:258–71. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60164-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60164-1).
- [74] Teeparuksapun K, Hedström M, Wong EY, Tang S, Hewlett IK, Mattiasson B. Ultrasensitive detection of HIV-1 p24 antigen using nanofunctionalized surfaces in a capacitive immunosensor. **Anal Chem** 2010;82:8406–11. <https://doi.org/10.1021/ac102144a>.
- [75] Gan N, Du X, Cao Y, Hu F, Li T, Jiang Q. An ultrasensitive electrochemical immunosensor for HIV p24 based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> nanomagnetic probes and nanogold colloid-labeled enzyme-antibody copolymer as signal tag. **Materials** 2013;6:1255–69. <https://doi.org/10.3390/ma6041255>.
- [76] Angel M, Rodrigo M, Heger Z, Cernei N, Maria A, Jinemez J. HIV Biosensors – The Potential of the Electrochemical Way. **Int J Electrochem Sci** 2014;9:3449–57.

- [77] Gray ER, Bain R, Varsaneux O, Peeling RW, Stevens MM, McKendry RA. P24 revisited: A landscape review of antigen detection for early HIV diagnosis. **Aids** 2018;32:2089–102. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001982>.
- [78] Gevaerd A, Banks CE, Bergamini MF, Marcolino-Junior LH. Graphene Quantum Dots Modified Screen-printed Electrodes as Electroanalytical Sensing Platform for Diethylstilbestrol. **Electroanalysis** 2019;31:838–43. <https://doi.org/10.1002/elan.201800838>.
- [79] Uchimiya M, Pignatello JJ, White JC, Hu SL, Ferreira PJ. Surface Interactions between Gold Nanoparticles and Biochar. **Sci Rep** 2017;7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03916-1>.
- [80] Dong Y, Shao J, Chen C, Li H, Wang R, Chi Y, et al. Blue luminescent graphene quantum dots and graphene oxide prepared by tuning the carbonization degree of citric acid. **Carbon N Y** 2012;50:4738–43. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2012.06.002>.
- [81] Gevaerd A. Desenvolvimento de dispositivos baseados em (nano)materiais de carbono para a detecção eletroquímica de espécies de interesse. Universidade Federal do Paraná, 2019.
- [82] Arvand M, Hemmati S. Analytical methodology for the electro-catalytic determination of estradiol and progesterone based on graphene quantum dots and poly(sulfosalicylic acid) co-modified electrode. **Talanta** 2017;174:243–55. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.083>.
- [83] Cinti S, Arduini F. Graphene-based screen-printed electrochemical (bio)sensors and their applications: Efforts and criticisms. **Biosens Bioelectron** 2017;89:107–22. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.005>.
- [84] Yu Y, Liu W, Ma J, Tao Y, Qin Y, Kong Y. An efficient chiral sensing platform based on graphene quantum dot-tartaric acid hybrids. **RSC Adv** 2016;6:84127–32. <https://doi.org/10.1039/c6ra18477d>.
- [85] Cogal S. Electrochemical Determination of Dopamine Using a Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene)-Reduced Graphene Oxide-Modified Glassy Carbon Electrode. **https://DoiOrg/101080/0003271920171387791** 2018;51:1666–79. <https://doi.org/10.1080/00032719.2017.1387791>.
- [86] Cogal S. Electrochemical Determination of Dopamine Using a Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene)-Reduced Graphene Oxide-Modified Glassy Carbon

- Electrode. <https://doi.org/10.1080/0003271920171387791> 2018;51:1666–79. <https://doi.org/10.1080/00032719.2017.1387791>.
- [87] Hashemzadeh N, Hasanzadeh M, Shadjou N, Eivazi-Ziaei J, Khoubnasabjafari M, Jouyban A. Graphene quantum dot modified glassy carbon electrode for the determination of doxorubicin hydrochloride in human plasma. **J Pharm Anal** 2016;6:235–41. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2016.03.003>.
- [88] Bart J, Tiggelaar R, Yang M, Schlautmann S, Zuilhof H, Gardeniers H. Room-temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices. **Lab Chip** 2009;9:3481–8. <https://doi.org/10.1039/B914270C>.
- [89] Martins G, Gogola JL, Caetano FR, Kalinke C, Jorge TR, Santos CND, et al. Quick electrochemical immunoassay for hantavirus detection based on biochar platform. **Talanta** 2019;204:163–71. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.101>.
- [90] Ribeiro ML, Gonçalves JP, de Moraes VMS, Moura LCRV, Coêlho MRCD. HTLV 1/2 prevalence and risk factors in individuals with HIV/AIDS in Pernambuco, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2019;52:0–2. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0244-2018>.
- [91] Gogola JL, Martins G, Gevaerd A, Blanes L, Cardoso J, Marchini FK, et al. Label-free aptasensor for p24-HIV protein detection based on graphene quantum dots as an electrochemical signal amplifier. **Anal Chim Acta** 2021;1166:338548. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2021.338548>.
- [92] Kheiri F, Sabzi RE, Jannatdoust E, Shojaeefar E, Sedghi H. A novel amperometric immunosensor based on acetone-extracted propolis for the detection of the HIV-1p24 antigen. **Biosens Bioelectron** 2011;26:4457–63. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.05.002>.
- [93] Li F, Li H, Wang Z, Wu J, Wang W, Zhou L, et al. Mobile phone mediated point-of-care testing of HIV p24 antigen through plastic micro-pit array chips. **Sens Actuators B Chem** 2018;271:189–94. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.05.090>.
- [94] Ma Y, Shen XL, Zeng Q, Wang HS, Wang LS. A multi-walled carbon nanotubes based molecularly imprinted polymers electrochemical sensor for the sensitive determination of HIV-p24. **Talanta** 2017;164:121–7. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.11.043>.

- [95] Fang YS, Huang XJ, Wang LS, Wang JF. An enhanced sensitive electrochemical immunosensor based on efficient encapsulation of enzyme in silica matrix for the detection of human immunodeficiency virus p24. **Biosens Bioelectron** 2015;64:324–32. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.022>.
- [96] Gan N, Li TH, Lei JP, Wang LY, Yang X. Electrochemical immunosensor for human immunodeficiency virus p24 antigen based on Mercapto succinic acid hydrazide copper monolayer modified gold electrode. **Fenxi Huaxue/ Chinese Journal of Analytical Chemistry** 2008;36:1167–71. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(08\)60064-X](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(08)60064-X).
- [97] Du M, Li N, Mao G, Liu Y, Wang X, Tian S, et al. Self-assembled fluorescent Ce(III) coordination polymer as ratiometric probe for HIV antigen detection. **Anal Chim Acta** 2019;1084:116–22. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.08.010>.
- [98] Zong J, Cobb SL, Cameron NR. Peptide-functionalized gold nanoparticles: Versatile biomaterials for diagnostic and therapeutic applications. **Biomater Sci** 2017;5:872–86. <https://doi.org/10.1039/C7BM00006E>.
- [99] Sun K, Chang Y, Zhou B, Wang X, Liu L. Gold nanoparticles-based electrochemical method for the detection of protein kinase with a peptide-like inhibitor as the bioreceptor. **Int J Nanomedicine** 2017;12:1905. <https://doi.org/10.2147/IJN.S127957>.
- [100] Li XY, Feng FY, Zhou XD, Hu JM. Rational design of an anchoring peptide for high-efficiency and quantitative modification of peptides and DNA strands on gold nanoparticles. **Nanoscale** 2018;10:11491–7. <https://doi.org/10.1039/C8NR03565B>.
- [101] Seo H bin, Gu MB. Aptamer-based sandwich-type biosensors. **J Biol Eng** 2017;11:1–7. <https://doi.org/10.1186/s13036-017-0054-7>.
- [102] Vanova V, Mitrevska K, Milosavljevic V, Hynek D, Richtera L, Adam V. Peptide-based electrochemical biosensors utilized for protein detection. **Biosens Bioelectron** 2021;180. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113087>.
- [103] Zhou F, Jing W, Liu S, Mao Q, Xu Y, Han F, et al. Electrodeposition of gold nanoparticles on ZnO nanorods for improved performance of enzymatic glucose sensors. **Mater Sci Semicond Process** 2020;105. <https://doi.org/10.1016/J.MSSP.2019.104708>.

- [104] Djaileb A, Charron B, Hojjat Jodaylami M, Thibault V, Coutu J, Stevenson K, et al. A rapid and quantitative serum test for SARS-CoV-2 antibodies with portable surface plasmon resonance sensing n.d.
- [105] Zhang Z, Wang X, Wei X, Zheng SW, Lenhart BJ, Xu P, et al. Multiplex quantitative detection of SARS-CoV-2 specific IgG and IgM antibodies based on DNA-assisted nanopore sensing. **Biosens Bioelectron** 2021;181. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2021.113134>.
- [106] Yakoh A, Pimpitak U, Rengpipat S, Hirankarn N, Chailapakul O, Chaiyo S. Paper-based electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: Detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen. **Biosens Bioelectron** 2021;176. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2020.112912>.
- [107] Rahmati Z, Roushani M, Hosseini H, Choobin H. An electrochemical immunosensor using SARS-CoV-2 spike protein-nickel hydroxide nanoparticles bio-conjugate modified SPCE for ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 antibodies. **Microchemical Journal** 2021;170. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2021.106718>.
- [108] Liv L, Yener M, Çoban G, Şevval ·, Can A. Electrochemical biosensing platform based on hydrogen bonding for detection of the SARS-CoV-2 spike antibody n.d.;1:3. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03752-3>.
- [109] Isho B, Abe KT, Zuo M, Jamal AJ, Rathod B, Wang JH, et al. Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients. **Sci Immunol** 2020;5. <https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.ABE5511>.
- [110] Jazayeri MH, Pourfathollah AA, Rasaee MJ, Porpak Z, Jafari ME. The concentration of total serum IgG and IgM in sera of healthy individuals varies at different age intervals. **Biomedicine & Aging Pathology** 2013;3:241–5. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMAG.2013.09.002>.

## ANEXO A : PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1. Jeferson L. Gogola, Gustavo Martins, Fabio R. Caetano, Taíssa Ricciardi-Jorge, Claudia N. Duarte dos Santos, Luiz H. Marcolino-Junior, Márcio F. Bergamini, Label-free electrochemical immunosensor for quick detection of anti-hantavirus antibody, *Journal of Electroanalytical Chemistry (Qualis A2)*, Volume 842, 2019, Páginas 140-145, ISSN 1572-6657.
2. Gustavo Martins, Jeferson L. Gogola, Fabio R. Caetano, Cristiane Kalinke, Taíssa R. Jorge, Claudia N.D. Santos, Márcio F. Bergamini, Luiz H. Marcolino-Junior, Quick electrochemical immunoassay for hantavirus detection based on biochar platform, *Talanta (Qualis A1)*, Volume 204, 2019, Páginas 163-171, ISSN 0039-9140.
3. Gustavo Martins, Jeferson L. Gogola, Lucas H. Budni, Bruno C. Janegitz, Luiz H. Marcolino-Junior, Márcio F. Bergamini, 3D-printed electrode as a new platform for electrochemical immunosensors for virus detection, *Analytica Chimica Acta (Qualis A1)*, Volume 1147, 2021, Páginas 30-37, ISSN 0003-2670.
4. Jeferson L. Gogola, Gustavo Martins, Ava Gevaerd, Lucas Blanes, Josiane Cardoso, Fabricio Klerynton Marchini, Craig E. Banks, Márcio F. Bergamini, Luiz H. Marcolino-Junior, Label-free aptasensor for p24-HIV protein detection based on graphene quantum dots as an electrochemical signal amplifier, *Analytica Chimica Acta (Qualis A1)*, Volume 1166, 2021, 338548, ISSN 0003-2670.
5. Jefferson H.S. Carvalho, Jeferson L. Gogola, Márcio F. Bergamini, Luiz H. Marcolino-Junior, Bruno C. Janegitz, Disposable and low-cost lab-made screen-printed electrodes for voltammetric determination of L-dopa, *Sensors and Actuators Reports*, Volume 3, 2021, 100056, ISSN 2666-0539.

## ANEXO B : DISCIPLINAS CURSADAS

A seguinte tabela apresenta as disciplinas cursadas durante o período do doutorado.

Disciplina	Professor	Conceito
Métodos eletroquímicos de análise	Luiz Humberto Marcolino Jr. Márcio Bergamini Dênio Emanuel Pires Souto	A
Tópicos especiais em química II – Novas tendências no tratamento de resíduos	Patrício Peralta-Zamora	B
Prática de docência em química	Márcio Fernando Bergamini	A
Eletroquímica e interfaces	Marcio Eduardo Vidotti Miyata	A
Imunologia avançada	Adriana Frohlich Mercadante Silvio Marques Zanata Tárcio Teodoro Braga	C
Seminários D1	Maria Rita Sierakowski	A
Seminários D2	Ronny Rocha Ribeiro	B