



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE TECNOLOGIAS E GEOCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA

BIANCA DE LIMA XAVIER GOMES

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOSSENSORA PARA  
DETECÇÃO DE PROTEÍNAS VIRAIS DO SARS-COV-2**

Recife  
2023

BIANCA DE LIMA XAVIER GOMES

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOSSENSORA PARA  
DETECÇÃO DE PROTEÍNAS VIRAIS DO SARS-COV-2**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia Biomédica.

Orientador(a): Rosa Amalia Fireman Dutra

Recife

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Gomes, Bianca de Lima Xavier.

Desenvolvimento de plataforma biossensora para detecção de proteínas virais do SARS-CoV-2 / Bianca de Lima Xavier Gomes. - Recife, 2023.

46 p. : il., tab.

Orientador(a): Rosa Amalia Fireman Dutra

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Engenharia Biomédica - Bacharelado, 2023.

1. COVID-19. 2. Diagnóstico beira-de-leito. 3. Imunossensor. 4. Óxido de grafeno reduzido. 5. SARS-CoV-2. I. Dutra, Rosa Amalia Fireman. (Orientação).  
II. Título.

620 CDD (22.ed.)

BIANCA DE LIMA XAVIER GOMES

**DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMA BIOCENSORA PARA DETECÇÃO DE  
PROTEÍNAS VIRAIS DO SARS-COV-2**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia Biomédica.

Aprovado em: 03/10/2023

**Banca Examinadora:**

---

Profa. Dra. Rosa Amalia Fireman Dutra  
(Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Emery Cleiton Cabral Correia Lins  
(Examinador)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Erika Ketlem Gomes Trindade  
(Examinadora)

Universidade Federal de Pernambuco

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de expressar minha gratidão a todos que me ajudaram de alguma forma a concluir mais esta etapa da minha vida.

A meus pais, Poliana e Djalma, que sempre fizeram de tudo para que nada me faltasse, e que sempre me deram muito amor, carinho, apoio e incentivaram a mim e a meus irmãos a sempre estudar.

A meus irmãos, Laís e Douglas, que estão comigo desde antes de nascer e que são fonte de orgulho, inspiração e amor, mesmo à distância.

A minha avó, tios e primos, pelo apoio e torcida.

A meu companheiro e amor, Danilo, que sempre me incentiva a ir mais longe e que torna meus dias mais leves e felizes.

A minha professora e orientadora Rosa Dutra, pelo conhecimento compartilhado, confiança, dedicação e pelo ambiente divertido e respeitoso criado no laboratório.

A todos do LABIONICS, em especial aos Nano ICs, pelas conversas e gargalhadas, mesmo em dias de luta.

Aos amigos que fiz durante a faculdade, em especial Raquel e Wel, minhas companheiras de todos esses períodos, com quem construí boas memórias.

Aos amigos e professores que cruzaram meu caminho, desde o Luz e Saber até o Colégio de Aplicação e DEBM: vocês fazem parte da minha formação acadêmica e pessoal.

À Lilian, pela contribuição com esse trabalho ao realizar o MEV. Aos órgãos de fomento de pesquisa, à FACEPE, à CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

E mais importante, a Deus, que me guarda e tem os melhores planos para mim.

*"A persistência é o caminho do êxito."  
(Charles Chaplin)*

## RESUMO

Após três anos e meio do surgimento da COVID-19 (do inglês, *coronavirus disease 2019*), a Organização Mundial da Saúde (OMS) anunciou, em maio de 2023, o fim da Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional para a COVID-19, e especialistas acreditam que a doença está evoluindo para uma fase de epidemia. No entanto, a COVID-19 não está erradicada e pode continuar a causar surtos locais, exigindo uma vigilância contínua e esforços para manter a imunização e as medidas de prevenção. Neste contexto, os biossensores são um dispositivo de diagnóstico atrativo para o controle e gerenciamento da COVID, unindo vantagens como: possibilidade de miniaturização, fácil manuseio, baixo custo, alta sensibilidade, resposta rápida e resultado quantitativo. Na construção de biossensores, a incorporação de óxido de grafeno reduzido (rGO) à plataforma sensora possibilita uma maior sensibilidade analítica, devido ao nanomaterial possuir propriedades de excelente condução elétrica e alta área superficial. Neste trabalho foi desenvolvido um imunossensor destinado à detecção da COVID-19, utilizando a proteína *Spike* do SARS-CoV-2 como analito alvo. O dispositivo sensor foi caracterizado por técnicas eletroquímicas e morfológicas, incluindo análises de estabilidade e velocidade de varredura. Foi obtida curva analítica do imunossensor em modelo anti-IgG/ IgG, determinando uma faixa de resposta linear, aplicável à detecção de antígenos da Covid-19. A resposta analítica com anti-*Spike*/*Spike* em tampão foi satisfatória, mostrando prova-de-conceito com diferenças significativas entre correntes amperométricas em resposta ao controle positivo e negativo. Entretanto, ensaios complementares com maior número de amostras de COVID-19 serão necessários para validação do biossensor, otimizando as etapas de bloqueio de ligações não-específicas.

**Palavras-chaves:** COVID-19; diagnóstico beira-de-leito; imunossensor; óxido de grafeno reduzido; SARS-CoV-2.

## ABSTRACT

Three and a half years after the outbreak of COVID-19, WHO announced the end of the Public Health Emergency of International Concern for COVID-19 in May 2023, and experts believe that the disease is entering an epidemic phase. However, COVID-19 is not eradicated and may continue to cause local outbreaks, requiring continued vigilance and efforts to maintain immunization and prevention measures. In this context, biosensors are an attractive diagnostic device for the control and management of COVID-19, combining advantages such as the possibility of miniaturization, easy handling, low cost, high sensitivity, rapid response and quantitative results. In the construction of biosensors, the incorporation of reduced graphene oxide (rGO) into the sensing platform enables greater analytical sensitivity due to the nanomaterial's excellent electrical conductivity and high surface area. In this work, an immunosensor for the detection of COVID-19 was developed using the SARS-CoV-2 Spike protein as the target analyte. The sensor device was characterized by electrochemical and morphological techniques, including stability and scanning speed analyses. The analytical curve of the immunosensor was obtained in an anti-IgG/IgG model, determining a linear response range applicable to the detection of Covid-19 antigens. The analytical response with anti-Spike/Spike in buffer was satisfactory, showing proof of concept with significant differences between the amperometric currents in response to the positive and negative control. However, additional assays with a larger number of COVID-19 samples will be required to validate the biosensor while optimizing the steps to block non-specific binding.

**Key-words:** COVID-19; immunosensor; point-of-care diagnosis; reduced graphene oxide; SARS-CoV-2.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquemático de um biossensor. . . . .	17
Figura 2 – Sistema trieletródico com eletrodos (a) convencionais e (b) impressos. . . . .	21
Figura 3 – Estrutura molecular do óxido de grafeno reduzido. . . . .	22
Figura 4 – Voltamograma característico da voltametria cíclica em Ferri/Ferro. . . . .	23
Figura 5 – Sinal do potencial aplicado na voltametria de onda quadrada em função do tempo. . . . .	24
Figura 6 – Voltamograma característico da voltametria de onda quadrada para um sistema reversível. . . . .	25
Figura 7 – (a) Voltamograma cíclico com diferentes concentrações de frGO. (b) Concentração de frGO em função da área sob a curva. . . . .	29
Figura 8 – Micrografias por MEV do eletrodo impresso antes (a) e depois (b) de ser modificado com o filme sensor. . . . .	31
Figura 9 – Voltamograma cíclico do teste de velocidade de varredura do filme em Ferri/Ferro. . . . .	32
Figura 10 – Variação da corrente de pico redox em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. . . . .	33
Figura 11 – Logaritmo do módulo das correntes de pico redox em função do logaritmo da velocidade de varredura. . . . .	33
Figura 12 – Teste de estabilidade do filme sensor com glutaraldeído e frGO-EDA 5%. . . . .	35
Figura 13 – Voltamograma cíclico das etapas individuais do biossensor em solução de Ferri/Ferro. . . . .	36
Figura 14 – Voltamograma cíclico do teste de velocidade de varredura do eletrodo modificado com filme/anticorpo/bloqueio. . . . .	37
Figura 15 – Logaritmo do módulo das correntes de pico redox em função do logaritmo da velocidade de varredura. . . . .	37
Figura 16 – Variação da corrente de pico redox em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. . . . .	38
Figura 17 – Voltametria de onda quadrada da resposta analítica com IgG de coelho. . . . .	39
Figura 18 – Resposta analítica com IgG de coelho. . . . .	39
Figura 19 – Resposta analítica contra a proteína <i>Spike</i> . . . . .	40
Figura 20 – Voltamograma de onda quadrada esperado para os controles positivo e negativo contra a <i>Spike</i> . . . . .	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coeficiente de variação para as correntes de pico anódica ( $I_{pa}$ ) e catódica ( $I_{pc}$ ) nas amostras de frGO-EDA com diferentes concentrações. 34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	anticorpo
Ag	antígeno
BSA	albumina sérica bovina, do inglês, <i>bovine serum albumin</i>
COVID-19	doença do coronavírus 2019, do inglês, <i>coronavirus disease 2019</i>
CV	voltametria cíclica, do inglês, <i>cyclic voltammetry</i>
ECA-2	enzima conversora da angiotensina tipo 2
EDA	etilenodiamina
EDC	1-etil- 3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	fragmento de ligação do antígeno, do inglês, <i>fragment antigen-binding</i>
Fc	fragmento cristalizável
FEG	canhão de emissão de campo, do inglês, <i>field emission gun</i>
FERRI	ferricianeto de potássio
FERRO	ferrocianeto de potássio
FET	transistor de efeito de campo, do inglês, <i>field effect transistor</i>
FIB	feixe de íons focalizados, do inglês, <i>focused ion beam</i>
frGO	óxido de grafeno reduzido e funcionalizado, do inglês, <i>functionalized reduced graphene oxide</i>
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier, do inglês, <i>fourier transform infrared spectroscopy</i>
GO	óxido de grafeno, do inglês, <i>graphene oxide</i>
Ig	imunoglobulina
Ipa	corrente de pico anódico
Ipc	corrente de pico catódico

IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
KCl	cloreto de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	fosfato de potássio monobásico
LABIONICS	do inglês, <i>Laboratory of Biosensors and Bioelectronics</i>
LFT	testes de tira de fluxo lateral, do inglês, <i>lateral flow test</i>
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MOPS	ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfônico
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	fosfato de sódio dibásico anidro
NaCl	cloreto de sódio
NHS	N-hidroxisuccinimida
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	tampão salina-fosfato, do inglês, <i>phosphate buffered saline</i>
PEEK	poliéter-éter-cetona, do inglês, <i>polyether ether ketone</i>
RBD	Domínio de Ligação ao Receptor, do inglês, <i>receptor binding domain</i>
SPE	eletrodo impresso, do inglês, <i>screen-printed electrode</i>
rGO	óxido de grafeno reduzido, do inglês, <i>reduced graphene oxide</i>
RT-PCR	transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase, do inglês, <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus 2, do inglês, <i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SWV	voltametria de onda quadrada, do inglês, <i>Square-Wave Voltammetry</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	<i>Objetivos específicos</i>	16
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>17</b>
2.1	BIOSSENSORES	17
2.1.1	<i>Biossensores eletroquímicos</i>	18
2.1.2	<i>Nanomateriais</i>	20
2.1.3	<i>Técnicas eletroquímicas</i>	21
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>26</b>
3.1	MATERIAIS E REAGENTES	26
3.2	MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	26
3.3	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	27
3.4	MONTAGEM DA SUPERFÍCIE NANOESTRUTURADA	27
3.5	IMOBILIZAÇÃO DO ANTI-IGG E RESPOSTA ANALÍTICA COM IGG	27
3.6	IMOBILIZAÇÃO DO ANTI-SPIKE E RESPOSTA ANALÍTICA COM SPIKE	28
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>29</b>
4.1	MONTAGEM E CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE NANOESTRUTURADA	29
4.1.1	<i>Otimização do filme de frGO</i>	29
4.1.2	<i>Efeito do glutaraldeído na estabilidade do filme sensor</i>	30
4.1.3	<i>Análise morfológica do filme</i>	30
4.1.4	<i>Estudos mecânicos</i>	31
4.2	IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO ANTI-SPIKE	34
4.2.1	<i>Prova de conceito com Anti-IgG/IgG de coelho</i>	34
4.2.2	<i>Resposta analítica com IgG</i>	38
4.2.3	<i>Resposta analítica com a proteína Spike</i>	40
4.3	TRABALHOS FUTUROS	41
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>42</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No final de 2019, o mundo foi surpreendido por uma nova doença que viria a ser a causadora de uma das maiores crises sanitário-socioeconômicas já vistas no planeta: a COVID-19 (do inglês, *coronavirus disease 2019*). Com origem na cidade de Wuhan, na China, o vírus SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), altamente transmissível por vias aéreas de forma direta ou indireta, rapidamente se disseminou por todos os continentes, levando a OMS (Organização Mundial da Saúde) a declarar uma pandemia da COVID-19 em março de 2020.

A COVID-19 apresenta uma ampla variedade de sintomas, que podem variar desde febre, tosse seca, fadiga e perda do olfato e/ou paladar, até sintomas mais graves, como dificuldade respiratória, pneumonia e insuficiência respiratória aguda, levando até a morte. Além disso, a doença pode afetar diferentes sistemas do corpo, ocasionando sintomas neurológicos, gastrointestinais e cardiovasculares (Wiersinga *et al.*, 2020). A taxa de letalidade é variável de acordo com cada país, tendo chegado a 14,5 % na Itália, em junho de 2020, segundo dados do *Our World In Data*. No Brasil, até abril de 2023, mais de 700 mil mortes pela COVID-19 já haviam sido confirmadas (Our World In Data, 2023).

Após 3 anos e meio do surgimento do vírus, a OMS anunciou, em maio de 2023, o fim da Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional para a COVID-19 (OMS, 2023), e especialistas acreditam que ela está evoluindo para uma fase de epidemia (Biancolella *et al.*, 2023). A disseminação do vírus está mais controlada em nível global, com a maioria das áreas geográficas tendo a capacidade de gerenciar a doença de forma mais eficaz. A transição pode ocorrer devido a uma combinação de fatores, como altas taxas de vacinação, medidas de saúde pública eficazes e uma compreensão mais profunda do vírus (Biancolella *et al.*, 2023). No entanto, é importante ressaltar que a COVID-19 não desapareceu completamente e pode continuar a causar surtos locais, exigindo uma vigilância contínua e esforços para manter a imunização e as medidas de prevenção. Neste quesito, os testes de diagnóstico permanecem de extrema relevância para o gerenciamento da COVID-19 nessa nova fase epidêmica.

Os testes moleculares, como o teste de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR, do inglês, *reverse transcription polymerase chain reaction*), são considerados o padrão ouro para a detecção do vírus, pois baseiam-se na medição do material genético viral, o que os torna altamente precisos e específicos. No entanto, eles exigem equipamentos sofisticados, profissionais especializados e tempo de processamento, o que pode levar a uma demora na entrega dos resultados e custos elevados (YÜCE *et al.*, 2021).

Outra forma de diagnóstico é pela detecção dos anticorpos produzidos pelo sistema imune em resposta a uma infecção pelo SARS-CoV-2 ou pela detecção do antígeno. Os testes de tira de fluxo lateral (LFT, do inglês, *lateral flow test*) se tornaram um dos métodos mais utilizados para diagnóstico da COVID-19 durante a pandemia, sobretudo devido à simplicidade de manuseio, custo acessível, resposta rápida e possibilidade de uso *point-of-care* (atendimento à beira do leito), que permite, por exemplo, a realização de triagens epidemiológicas em campo, especialmente em locais de alto risco, como instalações de saúde e lares de idosos, e o monitoramento contínuo de pessoas mais vulneráveis à COVID-19, como os imunodepressivos e pacientes com comorbidade. Entretanto, os testes de tira são projetados para fornecerem apenas um resultado qualitativo ou pseudo-quantitativo, além de apresentarem um limite de detecção relativamente alto quando comparado com outros métodos como RT-PCR e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) (YÜCE *et al.*, 2021).

Nesse cenário, os biossensores são uma alternativa interessante, unindo vantagens como: possibilidade de miniaturização e integração em dispositivos portáteis, fácil manuseio, baixo custo, alta sensibilidade, sobretudo quando incorporados nanomateriais condutores à superfície, resposta rápida e resultado quantitativo (Otero; Magner, 2020; Pohanka, 2022).

A entrada do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras se dá pelo Domínio de Ligação ao Receptor (RBD, do inglês, *receptor binding domain*), presente na proteína *Spike* do vírus, que reconhece a enzima conversora da angiotensina tipo 2 (ECA-2), expressa por células epiteliais alveolares. Os anticorpos anti-RBD imunoglobulina (Ig) M são os primeiros isótipos a serem produzidos em resposta ao antígeno (Chao *et al.*, 2020). Podem ser detectados a partir do quarto dia após o surgimento dos sintomas (MA *et al.*, 2020) e geralmente evoluem para a classe IgG, mais duradoura no organismo e responsável por fornecer uma proteção a longo prazo. Outra possibilidade é a mudança de classe para IgA. No entanto, embora tenha sido observado que a IgA aparece logo no início da infecção, concomitante com a IgM, ela tem a capacidade de persistir por um longo período, o que pode limitar sua utilidade no diagnóstico precoce (Chao *et al.*, 2020).

Nesse contexto, a detecção de proteínas virais do SARS-CoV-2 parece ser uma das alternativas para um diagnóstico mais eficaz da infecção. Embora a presença do antígeno não confere significado à infecção, a presença de títulos muito elevados dos antígenos em fluidos biológicos está associada a uma replicação viral intensa, o que pode resultar em uma maior precisão no diagnóstico da COVID-19.

## 1.1 OBJETIVOS

Desenvolver uma plataforma imunossensora capaz de detectar proteínas virais do SARS-CoV-2 através de técnicas eletroquímicas.

### 1.1.1 *Objetivos específicos*

- Caracterizar o filme do biossensor eletroquimicamente, por meio de testes de estabilidade e velocidade de varredura, e morfologicamente, por Microscopia Eletrônica de Varredura;
- Caracterizar as etapas de imobilização utilizando-se de técnicas eletroquímicas;
- Avaliar a imobilização de anticorpos anti-IgG específicos para a COVID-19;
- Realizar a curva de concentração para IgG específico para a COVID-19;
- Avaliar a resposta do imunossensor contra a proteína *Spike* do SARS-CoV-2.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

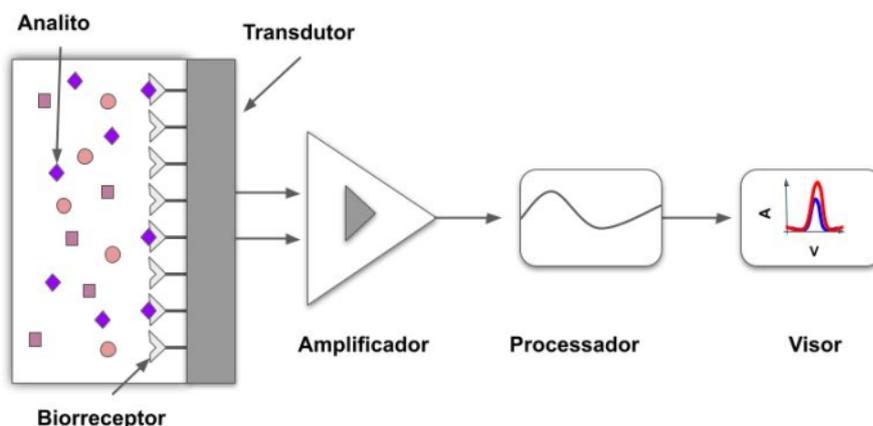
### 2.1 BIOSSENSORES

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*), um biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico que contém um elemento de reconhecimento biológico (biorreceptor) em contato com um transdutor para detecção/quantificação de um determinado analito-alvo.

Diferentes biomoléculas podem ser utilizadas como receptores, como um anticorpo, um aptâmero, uma enzima, um ácido nucleico, uma organela, uma célula ou um material biomimético. Quando o evento de reconhecimento acontece por meio da interação entre um antígeno (Ag) e seu anticorpo (Ac) correspondente, dá-se o nome de imunossensor. Nesse processo, a imobilização pode ser realizada tanto com o anticorpo para detecção do antígeno específico, como também com o antígeno para captura do anticorpo de interesse. Devido à interação Ag-Ac ser altamente específica, os imunossensores permitem uma detecção sensível e específica de substâncias biológicas em diversas aplicações, como diagnóstico médico, segurança alimentar, análise ambiental, entre outras (Felix; Angnes, 2018).

O transdutor é responsável pela conversão do sinal biológico gerado a partir da interação entre o elemento de reconhecimento e o analito-alvo em um sinal mensurável. Esse sinal passa então por um circuito condicionador de sinal para que ele seja amplificado, filtrado e convertido em um sinal digital que pode ser apresentado em um display para melhor visualização e compreensão humana (Ensafi, 2019; Lowe, 1984). Um esquemático do funcionamento geral de um biossensor pode ser visualizado na Figura 1.

Figura 1 – Esquemático de um biossensor.



Fonte: Lima (2023).

Os transdutores estão disponíveis numa grande variedade de modelos, sejam térmicos, ópticos, piezoelétricos ou eletroquímicos. Os biossensores podem ser classificados em diferentes tipos de acordo com o transdutor utilizado.

- Biossensores térmicos: determinam a quantidade de calor liberada ou absorvida em uma reação bioquímica, sendo esse valor proporcional à concentração do analito alvo e à entalpia molar. Estes dispositivos são equipados com termopares ou termistores ultrasensíveis, estes capazes de detectar mudanças de temperatura na faixa de 0,0001 a 0,05 °C (Gopinath; Lakshmipriya, 2019).
- Biossensores piezoelétricos: utilizam-se de um cristal piezoelétrico, geralmente de quartzo ou turmalina, que vibram em uma frequência específica de acordo com a tensão ou corrente aplicada e a massa sobre a superfície do cristal. O inverso também é válido: uma mudança na massa detectada gera uma deformação elástica no cristal, alterando a frequência de oscilação, que pode ser medida eletricamente. Desta forma, se o analito for absorvido na superfície do cristal, que está coberta com o biorreceptor, a frequência ressonante altera-se, sugerindo a ocorrência da ligação (Gopinath; Lakshmipriya, 2019; Naresh; Nohyun, 2021).
- Biossensores ópticos: baseiam-se em mudanças nas propriedades ópticas do sensor em resposta a alterações físico-químicas decorrentes da interação biorreceptor-analito na presença de uma fonte de luz ou com moléculas luminescentes. O processo de transdução induz uma alteração na absorção, transmissão, reflexão, refração, fase, amplitude, frequência e/ou polarização da luz. Alguns dos princípios ópticos mais utilizados nesse tipo de biossensor são: a Ressonância de Plasmon de Superfície, a fluorescência de ondas evanescentes, a quimioluminescência, o índice de refração e a dispersão Raman com reforço da superfície (Naresh; Nohyun, 2021). Porque não há corrente na área de detecção, não há interferência eletromagnética (Chadha, 2022).
- Biossensores eletroquímicos: serão descritos em detalhes na seção a seguir.

### 2.1.1 Biossensores eletroquímicos

Em 1962, Clark e Lyons descreveram o primeiro biossensor para quantificação de glicose, que consistia na imobilização da enzima glicose oxidase entre duas membranas, sendo a primeira permeável à glicose e ao oxigênio, e a segunda, apenas ao oxigênio. O oxigênio molecular remanescente da reação de oxidação da glicose atravessa a segunda membrana e se difunde até chegar à superfície do eletrodo. Assim, a diminuição na quantidade de oxigênio inicial é proporcional à concentração de glicose (Clark; Lyons, 1962).

Desde então, pesquisadores no mundo todo vem trabalhando nesse campo da ciência, sendo os biossensores eletroquímicos os mais estudados e utilizados. Seu funcionamento baseia-se nos sinais eletroquímicos produzidos decorrentes do evento de reconhecimento entre o biorreceptor e o analito na interface eletrodo-solução. Podem ser classificados de acordo com o transdutor eletroquímico utilizado:

- Biossensores potenciométricos: medem a carga acumulada na interface eletrodo-solução sob condição de equilíbrio, ou seja, corrente zero, em relação a um eletrodo de referência. A resposta analítica decorre da variação na concentração de alguma espécie iônica. Eletrodos seletivos de íons e transistores de efeito de campo (FET, do inglês, *field effect transistor*) sensíveis a íons são usados para converter reações bioquímicas em sinais de potencial (Fiorito, 2001; Naresh; Nohyun, 2021).
- Biossensores condutimétricos: quantificam mudanças na condutância entre um par de eletrodos metálicos durante reações eletroquímicas entre o analito e o biorreceptor sob a aplicação de um potencial de corrente alternada (Gopinath; Lakshmipriya, 2019; Naresh; Nohyun, 2021).
- Biossensores impedimétricos: medem a impedância elétrica gerada na interface entre o eletrodo e a solução eletrolítica ao aplicar uma tensão de corrente alternada de baixa amplitude no eletrodo e, em seguida, medir a resposta de corrente dentro e fora de fase em relação à frequência usando um analisador de impedância (Naresh; Nohyun, 2021).
- Biossensores capacitivos: se enquadram como um subgrupo dos biossensores impedimétricos. Eles medem a alteração nas propriedades dielétricas e/ou na espessura da camada dielétrica na interface eletrodo-solução eletrolítica quando o analito interage com o biorreceptor imobilizado na camada dielétrica. Essa interação cria uma dupla camada de íons de carga oposta, resultando na alteração do valor da capacitância (Ertürk; Mattiasson, 2017).
- Biossensores amperométricos/voltamétricos: Operando com um sistema de dois ou três eletrodos, esses sensores medem a corrente gerada pela oxidação ou redução eletroquímica de espécies eletroativas no eletrodo de trabalho quando um potencial constante (amperométrico) ou variado de forma controlada (voltamétrico) é aplicado em relação ao eletrodo de referência (Naresh; Nohyun, 2021). A corrente produzida é linearmente proporcional à concentração do analito (Bard; Faulkner, 2001).

O sistema de três eletrodos é a configuração mais comum para leituras de sensores eletroquímicos. O sistema é composto por um eletrodo de referência, um

eletrodo auxiliar (ou contraeletrodo) e um eletrodo de trabalho mergulhados em uma solução eletrolítica para passagem da corrente elétrica. O eletrodo de trabalho é onde ocorrem as reações eletroquímicas de interesse, enquanto o eletrodo de referência é responsável por manter um potencial constante de referência para medição e controle do potencial aplicado no eletrodo de trabalho. Por sua vez, o eletrodo auxiliar fornece um caminho de baixa resistência para a corrente fluir do eletrodo de trabalho, garantindo que praticamente nenhuma corrente passe pelo eletrodo de referência. O contato elétrico entre os eletrodos se dá por meio de uma solução eletrolítica altamente concentrada em sal inerte, garantindo assim a condutividade elétrica sem haver interferência nas reações químicas, ao mesmo tempo em que mantém uma força iônica apropriada e constante (Pacheco *et al.*, 2013).

Eletrodos de diferentes tipos e formatos são utilizados durante o desenvolvimento e na fabricação de biossensores. Os eletrodos ditos convencionais são compostos por um cilindro maciço de material condutor, como ouro, prata ou carbono, conectados a um contato elétrico. Para proteção, todo esse conjunto é revestido com um material isolante, como vidro ou poliéter-éter-cetona (PEEK, do inglês, *polyether ether ketone*), deixando apenas a superfície do condutor exposta, permitindo assim a interação com o meio em uma extremidade e a conexão com o transdutor na outra (Ferreira, 2019).

Além destes, eletrodos impressos (SPE, do inglês, *screen-printed electrode*) vêm ganhando bastante espaço, já que são descartáveis, escalonáveis, de baixo custo e não necessitam de protocolos tediosos de limpeza para utilização. Por serem miniaturizados, ainda permitem um cuidado *point-of-care* (beira-de-leito), levando resultados laboratoriais de forma rápida e prática a lugares de difícil acesso ou a pacientes com dificuldade de se deslocarem (Taleat; Khoshroo; Mazloum-Ardakani, 2014).

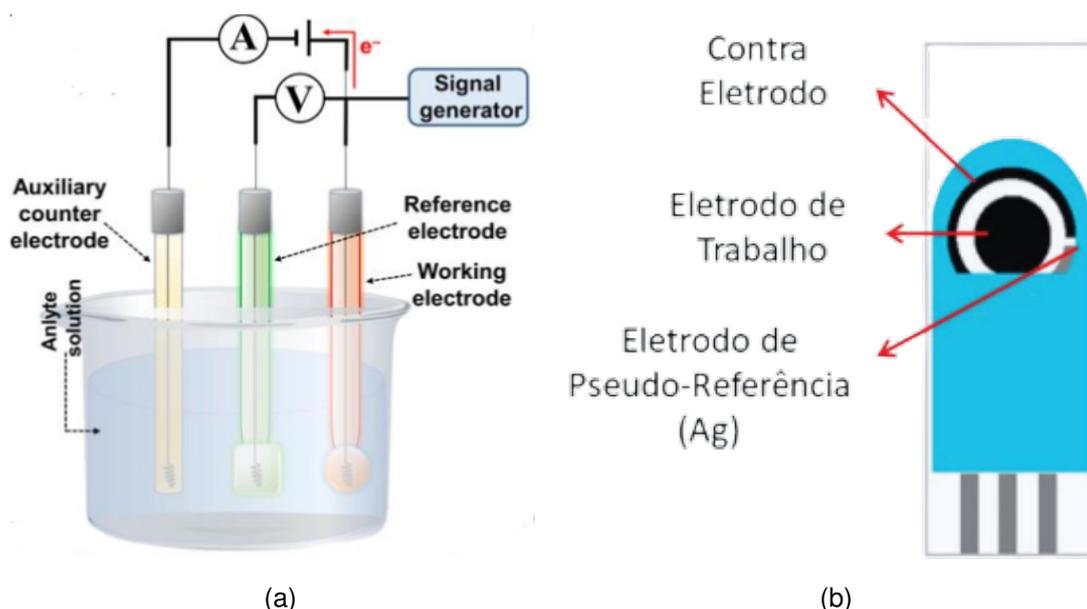
Exemplos de uma célula trieletródica com eletrodos convencionais e de um eletrodo impresso comercial podem ser visualizados na Figura 2.

Quando comparado com outros métodos de transdução, como os ópticos, os transdutores eletroquímicos apresentam vantagens por necessitarem de equipamentos de baixo custo para as medições e terem a possibilidade de trabalhar com amostras túrbidas. No entanto, apresentam uma sensibilidade e seletividade mais limitadas em relação aos ópticos (Lazcka; Campo; Muñoz, 2007).

### 2.1.2 Nanomateriais

Visando uma melhoria no desempenho de biossensores, nanomateriais estão sendo amplamente incorporados às plataformas sensoras. Dentre eles, o grafeno é

Figura 2 – Sistema trieletródico com eletrodos (a) convencionais e (b) impressos.



Fonte: Naresh; Nohyun (2021); Silva *et al.* (2019).

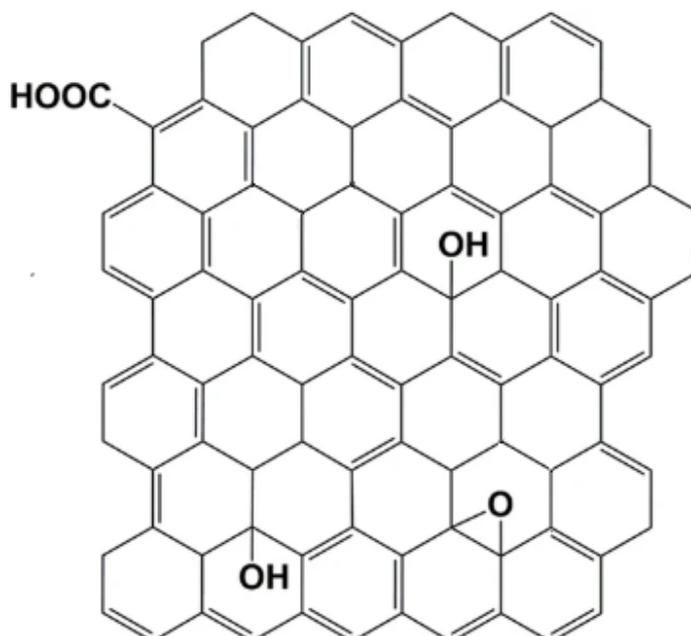
de muito interesse em diversas áreas devido à sua alta área de superfície específica, excelente condutividade elétrica, alta resistência mecânica e propriedades térmicas e ópticas. O grafeno consiste em uma folha plana bidimensional de um átomo de espessura composta por carbonos de hibridização  $sp^2$  organizados em uma estrutura de rede hexagonal e com ligações  $\pi$  fora do plano, sendo elas as responsáveis pela transferência de elétrons do grafeno (Otero; Magner, 2020).

No entanto, a falta de grupos funcionais oxigenados no grafeno o torna pouco atraente para imobilização de biomoléculas (Otero; Magner, 2020). Uma solução consiste na oxidação do grafeno para obtenção do óxido de grafeno (GO, do inglês, *graphene oxide*), que possui grupos epóxi e hidroxilas no seu plano basal e grupos carbonila e carboxila nas extremidades, segundo o modelo Lerf–Klinowski. Contudo, esse processo de oxidação reduz suas ligações  $sp^2$ , tornando-o isolante. É possível reduzir parcialmente o grafeno oxidado, recuperando sua estrutura conjugada e restaurando parcialmente suas propriedades elétricas, produzindo assim o óxido de grafeno reduzido (rGO, do inglês, *reduced graphene oxide*) (Figura 3). Isso é necessário para combinar a hidrofiliabilidade do GO com as propriedades físico-químicas do grafeno (Konios *et al.*, 2014).

### 2.1.3 Técnicas eletroquímicas

As técnicas eletroquímicas são caracterizadas por serem bastante sensíveis, e quando em combinação com a alta especificidade dos imunossensores, os resultados são muito promissores para diversas aplicações (Wen *et al.*, 2016). Dentre essas técni-

Figura 3 – Estrutura molecular do óxido de grafeno reduzido.



Fonte: Adaptado de Bellier *et al.* (2022).

cas, a voltametria cíclica (CV, do inglês, *cyclic voltammetry*) é particularmente valiosa para estudos eletroquímicos iniciais de sistemas complexos para obtenção de informações sobre processos redox, mecanismos de transferência de carga, propriedades eletroquímicas de substâncias, entre outros.

A CV consiste na aplicação de um potencial elétrico a um eletrodo enquanto a corrente resultante é medida. Esse potencial elétrico é varrido ciclicamente, geralmente de forma linear a uma velocidade de varredura  $\nu$ , em V/s, dentro de uma janela de potencial definida de  $E_i$  (potencial inicial onde nenhuma reação redox acontece), indo até  $E_\lambda$  (sendo  $\lambda$  o instante de tempo onde ocorre a mudança de direção da varredura) e voltando a  $E_i$ . O potencial, a qualquer instante de tempo  $t$ , pode ser definido como (Bard; Faulkner, 2001):

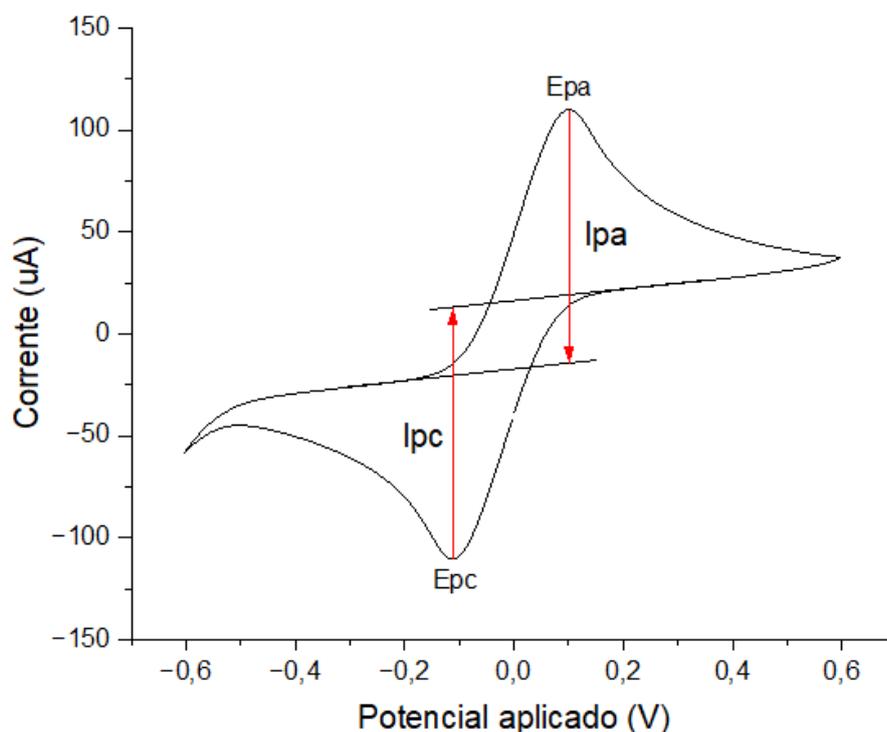
$$E = E_i - \nu t \quad (0 < t \leq \lambda) \quad (2.1)$$

$$E = E_i - 2\nu\lambda + \nu t \quad (t > \lambda) \quad (2.2)$$

O resultado gráfico da voltametria cíclica é chamado de voltamograma. Um par de compostos redox bastante utilizado é o ferricianeto de potássio/ferrocianeto de potássio (Ferri/Ferro), cujo voltamograma tem um formato característico apresentado na Figura 4. Quando o potencial é varrido em direção aos potenciais mais positivos (sentido direto), o eletrodo atrai elétrons, favorecendo o processo de oxidação das espécies eletroativas na solução, em uma janela de potencial adequada. Enquanto que no sentido inverso, ou seja, aplicando-se potenciais em direção a potenciais mais negativos (sentido reverso), o eletrodo passa a ser uma fonte de elétrons, contribuindo

para a redução das espécies (Pacheco *et al.*, 2013). Na varredura de oxidação, gera-se uma corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ ), assim como na redução observa-se a corrente de pico catódico ( $I_{pc}$ ).

Figura 4 – Voltamograma característico da voltametria cíclica em Ferri/Ferro.



Fonte: A Autora (2023).

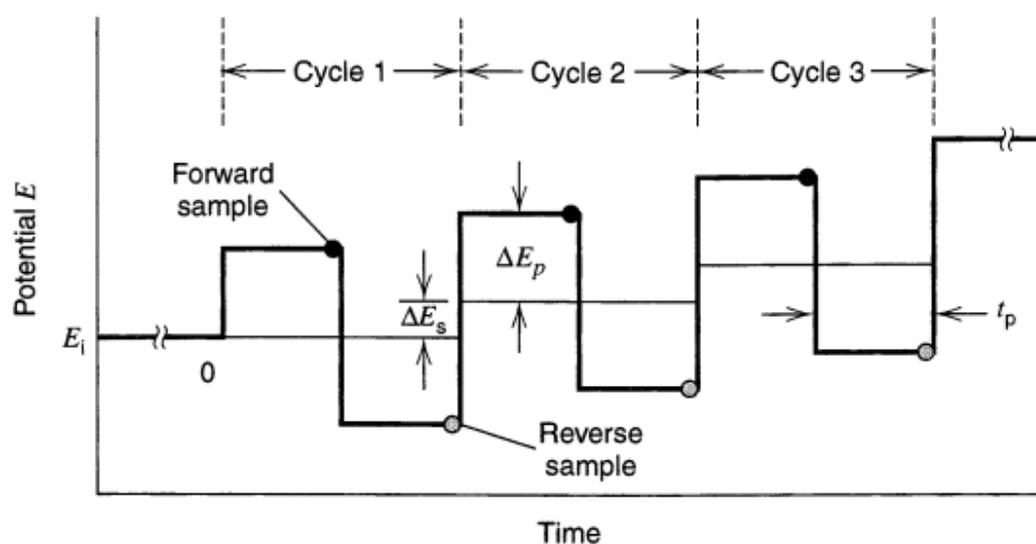
Na voltametria cíclica, em presença de sonda redox, é considerado que o transporte de massas das espécies no interior da solução até a interface com o eletrodo ocorre essencialmente por mecanismo de difusão, ou seja, a criação de um gradiente de concentração de espécies eletroativas é a força motriz para a movimentação espontânea das espécies químicas e formação de corrente. Os transportes por migração (movimento de partículas carregadas pela solução devido à aplicação de um potencial elétrico) e por convecção (transporte de espécies químicas devido à aplicação de forças externas causando agitação da solução) são minimizados ao se usar eletrólito-suporte em excesso na solução e ao acabar com qualquer perturbação mecânica na solução no momento de aplicação do potencial elétrico no eletrodo, respectivamente (Pacheco *et al.*, 2013).

As reações eletródicas decorrentes dos processos redox acontecem na interface eletrodo/solução e resultam na geração de corrente elétrica, sendo esta decomposta em duas componentes: a corrente faradaica (responde à Lei de Faraday) e a corrente capacitiva (ou não faradaica). Enquanto a primeira está diretamente relacionada com as reações de transferência de carga que acontecem na interface do eletrodo e, portanto, geralmente é a mais relevante nas análises, a segunda é decor-

rente do armazenamento de cargas elétricas na superfície quando esta transferência de carga não é possível, mas existe uma diferença de potencial. Esse comportamento se assemelha ao de um capacitor, e diz-se que uma dupla camada elétrica é formada na interface eletrodo/solução (Bard; Faulkner, 2001).

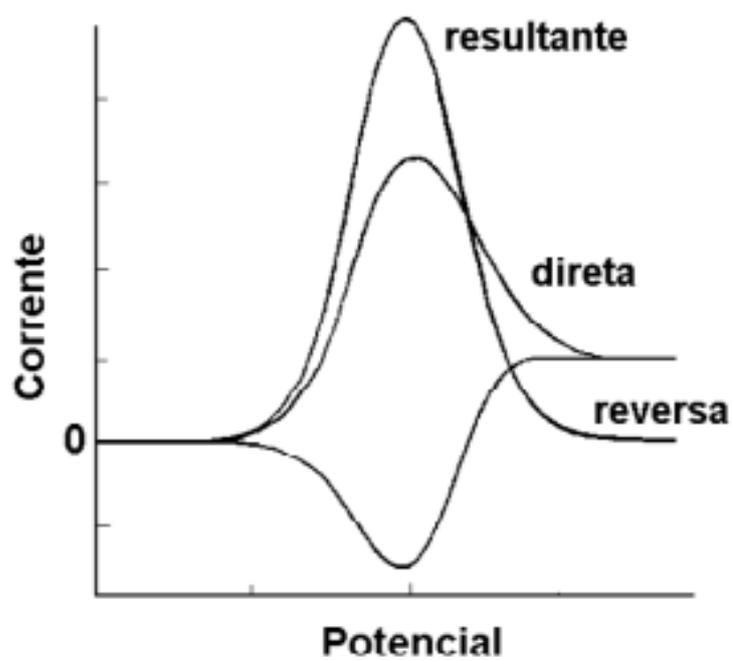
A voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês, *Square-Wave Voltammetry*) é uma técnica que permite diferenciar a corrente capacitiva da faradaica, tendo assim uma excelente sensibilidade. Diferentemente da CV, o sinal aplicado ao eletrodo, mostrado na Figura 5, consiste em uma onda quadrada simétrica de amplitude  $\Delta E_p$ , formada por dois pulsos, um na direção direta (quando a direção do pulso coincide com a direção da varredura) e outro na direção reversa (quando a direção do pulso se opõe à direção da varredura). Esta onda é sobreposta a uma rampa de potencial em forma de escada caracterizada pelo degrau de potencial de amplitude  $\Delta E_s$  e pelo período (ou largura do degrau)  $\tau$ . A corrente é amostrada em duas ocasiões distintas: uma vez ao final do pulso direto e outra vez ao final do pulso reverso (Pacheco *et al.*, 2013). O voltamograma resultante da diferença entre essas duas correntes em função do potencial aplicado apresenta um pico característico como mostrado na Figura 6, que pode ser mais ou menos estreito alterando-se os parâmetros de amplitude da onda e frequência de varredura.

Figura 5 – Sinal do potencial aplicado na voltametria de onda quadrada em função do tempo.



Fonte: Bard; Faulkner (2001).

Figura 6 – Voltamograma característico da voltametria de onda quadrada para um sistema reversível.



Fonte: Souza *et al.* (2003).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 MATERIAIS E REAGENTES

Óxido de grafeno reduzido e funcionalizado com tetraetilenopentamina (frGO), etilenodiamina (EDA) 98%, glutaraldeído (50% w/w), 1-etil- 3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), albumina sérica bovina (BSA), ferrocianeto de potássio ( $K_4Fe(CN)_6$ ) e ferricianeto de potássio ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfônico (MOPS) foi adquirido da HiMedia Laboratories LLC (Kennett Square, PA, EUA).

Os anticorpos anti-IgG e IgG de coelho produzidos em cabra e específicos para a COVID foram adquiridos da Rhea Biotech (Campinas, SP, Brasil). O anticorpo monoclonal anti-*Spike* foi obtido da Invitrogen (Waltham, MA, EUA) e a proteína *Spike* (aa1-1208) foi obtida com a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ/LECC/COPPE).

O tampão salina-fosfato (PBS, do inglês, *phosphate buffered saline*) (0,01 M, pH 7,4) foi preparado pela dissolução de 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 8,0 g de cloreto de sódio (NaCl), 0,24 g de fosfato de potássio monobásico ( $KH_2PO_4$ ) e 1,44 g de fosfato de sódio dibásico anidro ( $Na_2HPO_4$ ), em 1 L de água de osmose.

#### 3.2 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

Para a realização dos experimentos foram utilizados eletrodos impressos produzidos a partir de tinta de grafite desenvolvidos pelo grupo de pesquisa LABIONICS (*Laboratory of Biosensors and Bioelectronics*) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), orientado pela prof<sup>a</sup> Rosa Dutra. O eletrodo de trabalho possui uma área de 10 mm<sup>2</sup>. Todas as etapas de modificação da superfície sensora foram monitoradas realizando-se leituras de voltametria cíclica em solução equimolar de 5 mM de ferricianeto/ferrrocianeto de potássio preparados em KCl a 0,1 M como eletrólito de suporte. Foi aplicado um potencial de -0,6 a 0,6 V, com 3 ciclos e a uma velocidade de varredura de 50 mV/s.

Para obtenção das medidas analíticas, foi utilizada a técnica de voltametria de onda quadrada, definindo a janela de potencial entre 0,4 e -0,4 V com uma amplitude de onda de 100 mV, amplitude do degrau de potencial de 3 mV e frequência de varredura a 20 Hz.

O equipamento empregado para as medidas eletroquímicas foi o potencios-tato/galvanostato PalmSens (Houten, GA, Holanda), controlado por intermédio do *software* PSTrace, versão 2.1. Todos os experimentos foram feitos à temperatura ambiente ( $23 \pm 1$  °C), exceto quando informado diferentemente.

Todos os gráficos e as análises estatísticas foram realizados utilizando o *software* OriginPro, versão 10.0 (OriginLab Co., Northampton, MA, EUA).

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Para a caracterização morfológica da superfície sensora, foi empregado o microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo AURIGA com varredura de feixe cruzado (Zeiss, Jena, Alemanha). O microscópio combina um canhão de elétrons FEG (do inglês, *field emission gun*) com um feixe de íons focalizados (FIB, do inglês, *focused ion beam*), proporcionando melhor qualidade de imagem em comparação com a tradicional fonte de filamentos. O MEV foi operado a um potencial de 10 kV e a uma resolução de 2  $\mu\text{m}$  para obtenção das micrografias.

### 3.4 MONTAGEM DA SUPERFÍCIE NANOESTRUTURADA

Considerando a importância de serem utilizados eletrodos limpos e livres de impurezas adsorvidas à superfície a fim de garantir uma boa reprodutibilidade e estabilidade durante a montagem da plataforma sensora, análises eletroquímicas por meio de técnicas de CV foram apreciadas para definição dos eletrodos aptos para modificação da superfície. Foram considerados aptos os eletrodos que apresentavam diferença de potencial entre os picos redox de, no máximo, 320 mV e diferença de corrente pico a pico de, no mínimo, 80  $\mu\text{A}$ .

Primeiramente, foram depositados sobre a superfície do eletrodo limpo 3  $\mu\text{L}$  da solução de glutaraldeído (0,225 mM, preparado em tampão fosfato de sódio, pH 7,0), com o eletrodo deixado para secar na bancada. Em seguida, foram pipetados 3  $\mu\text{L}$  da dispersão de frGO (0,4 mg/mL, preparada em solução aquosa com 5% de EDA e depois submetida a uma sonicação de 30 min). A secagem foi feita na estufa a 40  $^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 1h 30 min. Imediatamente antes de pipetar a dispersão de frGO-EDA sobre o eletrodo, ela era agitada no vórtex por alguns segundos.

### 3.5 IMOBILIZAÇÃO DO ANTI-IGG E RESPOSTA ANALÍTICA COM IGG

Para a imobilização do anticorpo, fez-se uso da química do EDC/NHS para ativação dos grupos carboxílicos da proteína. Dessa forma, primeiramente o anti-IgG de coelho (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , diluído em PBS, pH 6,5) foi misturado com a solução de EDC/NHS (40 mM e 100 mM, respectivamente, preparados em tampão MOPS, 0,1 M, pH 6,0) na proporção volumétrica de 2:1:1 em um microtubo Eppendorf® por 30 min. Uma alíquota de 4  $\mu\text{L}$  foi então pipetada sobre o eletrodo de trabalho e incubada *overnight* em câmara úmida na geladeira a  $4 \pm 2$   $^{\circ}\text{C}$ . No dia seguinte, a lavagem dos eletrodos foi realizada mergulhando-os em um béquer contendo 5 mL de PBS (pH 7,4) por 10 s

sob agitação magnética leve, e depois lavando-os com água de osmose. O bloqueio dos sítios não ligantes foi feito incubando 4  $\mu\text{L}$  de BSA (0,5%, preparado em água deionizada) por 2 h em câmara úmida. Novamente realizou-se a lavagem dos eletrodos seguindo o protocolo descrito anteriormente.

Para a resposta analítica da superfície sensora, foram incubados 4  $\mu\text{L}$  de IgG de coelho (0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , diluído em PBS) em câmara úmida por 20 min, com 5 incubações sucessivas. Entre cada incubação, os eletrodos passaram pelo processo de lavagem já descrito.

### 3.6 IMOBILIZAÇÃO DO ANTI-SPIKE E RESPOSTA ANALÍTICA COM SPIKE

A imobilização do anti-*Spike* à plataforma sensora ocorreu de forma similar à descrita no item 3.5, com exceção da concentração utilizada de anti-*Spike*, que foi de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ficando a uma concentração final de 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  quando misturado com EDC/NHS.

A resposta analítica da superfície sensora foi obtida incubando 4  $\mu\text{L}$  de proteína *Spike* (0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , diluído em PBS) em câmara úmida por 20 min. Para o controle negativo, a fim de reduzir o efeito matriz, foram incubados 4  $\mu\text{L}$  de 10  $\text{pg}/\text{mL}$ .

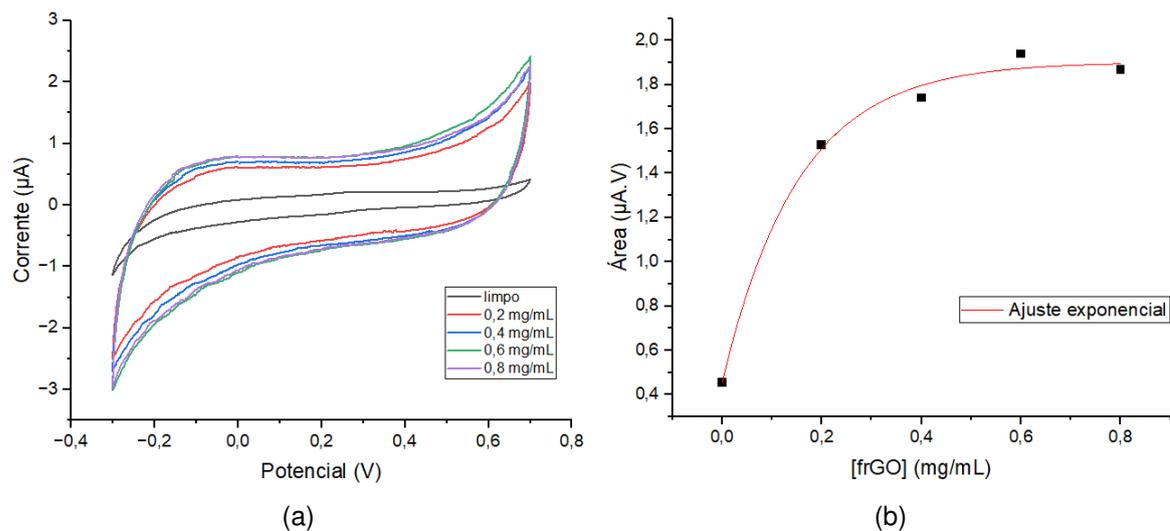
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 MONTAGEM E CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE NANOESTRUTURADA

#### 4.1.1 Otimização do filme de frGO

Devido a apresentar excelente propriedade condutora e alta razão de aspecto (área superficial/volume), o rGO tem sido um nanomaterial amplamente estudado na construção de plataformas biossensores eletroquímicas, visando um aumento da sensibilidade analítica. Considerando que a quantidade de rGO utilizada apresenta dependência com a performance analítica; ensaios de caracterização eletroquímica foram conduzidos para definir a concentração ótima do frGO. Neste estudo, foi utilizada inicialmente a concentração de 0,2 mg/mL de frGO para realização dos testes por *drop-casting* de deposição do nanomaterial à superfície eletródica, variando-se de 1 a 4 o número de camadas de frGO de deposição. Para a análise foram realizadas as respectivas leituras de CV em presença de KCl 0,1 M nas sucessivas deposições. Na Figura 7a foi possível visualizar as voltametrias cíclicas obtidas para cada número de camada. Na Figura 7b em que foi plotada curva de efeito da área eletroativa em função do número de camadas, observou-se que a partir da 3ª camada, a área eletroativa obtida não aumentou significativamente, estabilizando em um platô. Dessa forma, escolheu-se a concentração de frGO de 0,4 mg/mL.

Figura 7 – (a) Voltamograma cíclico com diferentes concentrações de frGO. (b) Concentração de frGO em função da área sob a curva.



Fonte: A Autora (2023).

#### 4.1.2 Efeito do glutaraldeído na estabilidade do filme sensor

Nanomateriais simplesmente adsorvidos à superfície sensora podem resultar em superfícies mais instáveis, visto que eles podem ser lixiviados durante as medidas. Assim, optou-se por primeiro adicionar o glutaraldeído à superfície do eletrodo de trabalho antes do frGO.

O glutaraldeído é um composto da família dos aldeídos e possui duas terminações com -CHO. A carbonila presente nesse grupo reage com a amina presente no frGO para formar uma imina (ou Base de Schiff), uma ligação altamente estável e covalente.

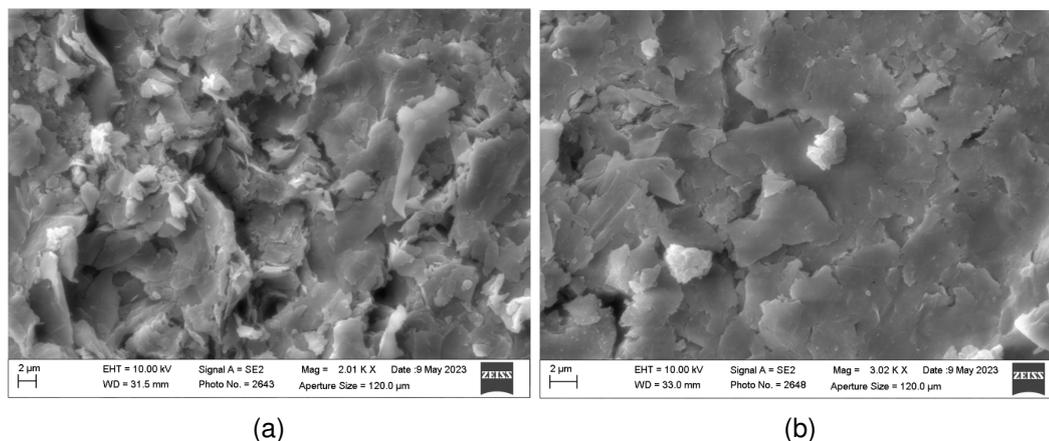
Para estimar a concentração de glutaraldeído a ser utilizada, levou-se em consideração a estequiometria da reação entre os dois compostos, tomando-se a quantidade de grupos amino e carbonila em cada um deles e a quantidade de grupos amino livres desejada.

A estabilidade do filme nanoestruturado obtido composto pela deposição (*drop-casting*) de glutaraldeído e frGO foi verificada realizando-se um teste de estabilidade eletroquímica por submeter os eletrodos a sucessivas varreduras de voltametria cíclica. Os eletrodos foram submetidos a 30 ciclos de CV em presença do par redox de Ferri/Ferrocianeto de potássio. O experimento foi realizado em triplicata, obtendo-se a média e o desvio padrão do coeficiente de variação para as medidas de correntes de picos anódicos e catódicos, que foram de  $(2,10 \pm 0,14)\%$  e  $(2,85 \pm 0,78)\%$ , respectivamente. Tal resultado demonstrou uma estabilidade do filme adequada, visto que os CVs foram encontrados abaixo de 5%, sendo este o limite aceitável.

#### 4.1.3 Análise morfológica do filme

A caracterização morfológica do filme nanoestruturado da superfície eletródica foi realizada por MEV. As micrografias do eletrodo impresso limpo (Figura 8a) e do eletrodo modificado com o glutaraldeído e o frGO são visualizadas na Figura 8b. Foi possível notar uma superfície mais porosa, com a presença de estruturas e saliências na imagem em (a). Entretanto, após a montagem do filme nanoestruturado do frGO montado sobre o glutaraldeído, observou-se uma superfície mais uniforme, com menos rugosidades e preenchida pelas prováveis nanoestruturas de folhas do grafeno que juntam-se às reentrâncias do filme, conferindo uma maior homogeneidade à superfície. Uma superfície composta de filmes com estrutura mais regular permite sinais eletroquímicos mais estáveis.

Figura 8 – Micrografias por MEV do eletrodo impresso antes (a) e depois (b) de ser modificado com o filme sensor.



Fonte: A Autora (2023).

#### 4.1.4 Estudos mecanísticos

O teste de velocidade de varredura é bastante utilizado para analisar as propriedades de transferência de carga do filme e o mecanismo de transporte das espécies eletroativas na solução até a interface eletrodo/eletrólito. Aqui, o estudo foi realizado submetendo-se o eletrodo às diversas medições de CV em Ferri/Ferro, variando-se a velocidade de varredura de 10 a 150 mV/s, com espaçamento de 10 mV/s. O resultado pode ser visualizado na Figura 9. Primeiramente, observou-se um discreto deslocamento dos picos redox em direção aos valores mais positivos de potencial, no caso dos picos anódicos, e aos valores mais negativos, no caso dos picos catódicos. Isso pode ser um indicativo de transporte de massa ou contaminantes sendo adsorvidos à superfície sensora. Além disso, considerando-se que em um sistema totalmente reversível o potencial dos picos redox deve permanecer constante ao se variar a velocidade de varredura, para o processo estudado levou-se a crer que o sistema em questão não seria totalmente reversível (Yilmaz *et al.*, 2015).

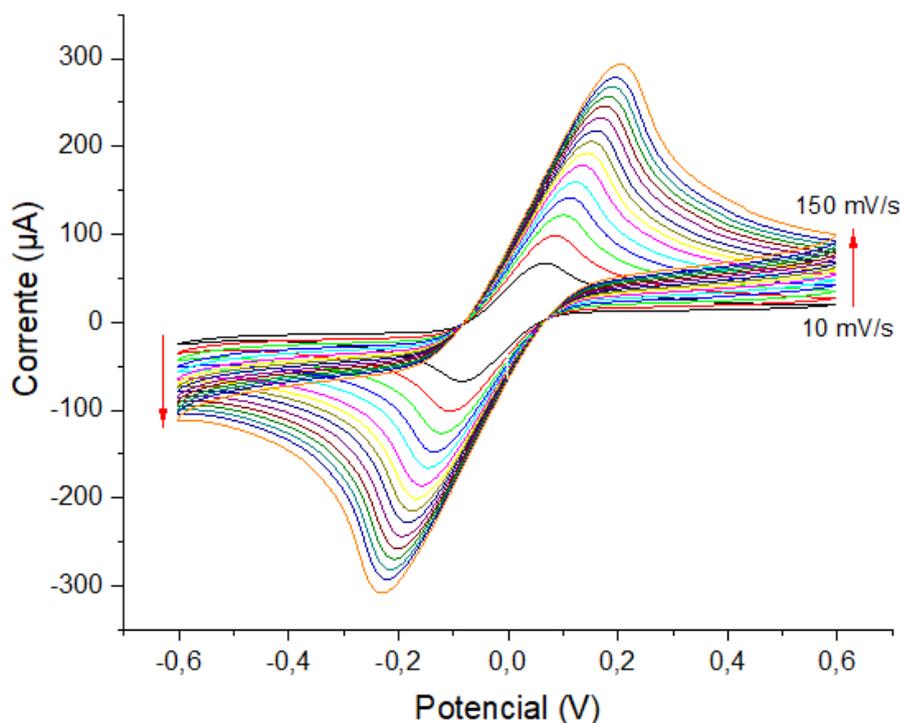
Analisando-se a curva da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 10), observou-se um comportamento linear para ambas as correntes de pico anódica e catódica, sendo elas descritas, respectivamente, pelas equações:

$$I_{pa} = -8,749 + 26,616\nu \quad (r = 0,999) \quad (4.1)$$

$$I_{pc} = 9,810 - 27,201\nu \quad (r = 0,999) \quad (4.2)$$

o que está de acordo com a teoria descrita pela equação de Randles-Sevcik (Bard; Faulkner, 2001):

Figura 9 – Voltamograma cíclico do teste de velocidade de varredura do filme em Ferri/Ferro.



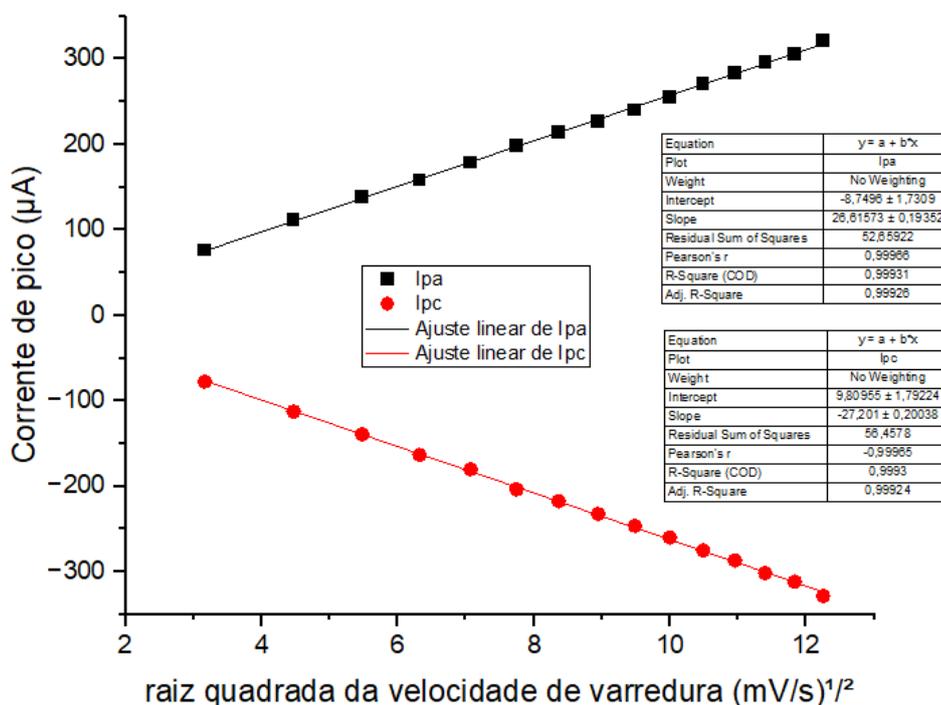
Fonte: A Autora (2023).

$$I_p = (2.6910^8)AD^{1/2}n^{3/2}C\nu^{1/2} \quad (4.3)$$

onde  $I_p$  é o valor da corrente de pico,  $A$  é a área do eletrodo ( $m^2$ ),  $D$  é o coeficiente de difusão da solução ( $m^2/s$ ),  $n$  é o número de elétrons envolvidos na reação redox,  $\nu$  é a velocidade de varredura ( $V/s$ ) e  $C$  é a concentração da molécula-alvo em solução ( $mol/L$ ).

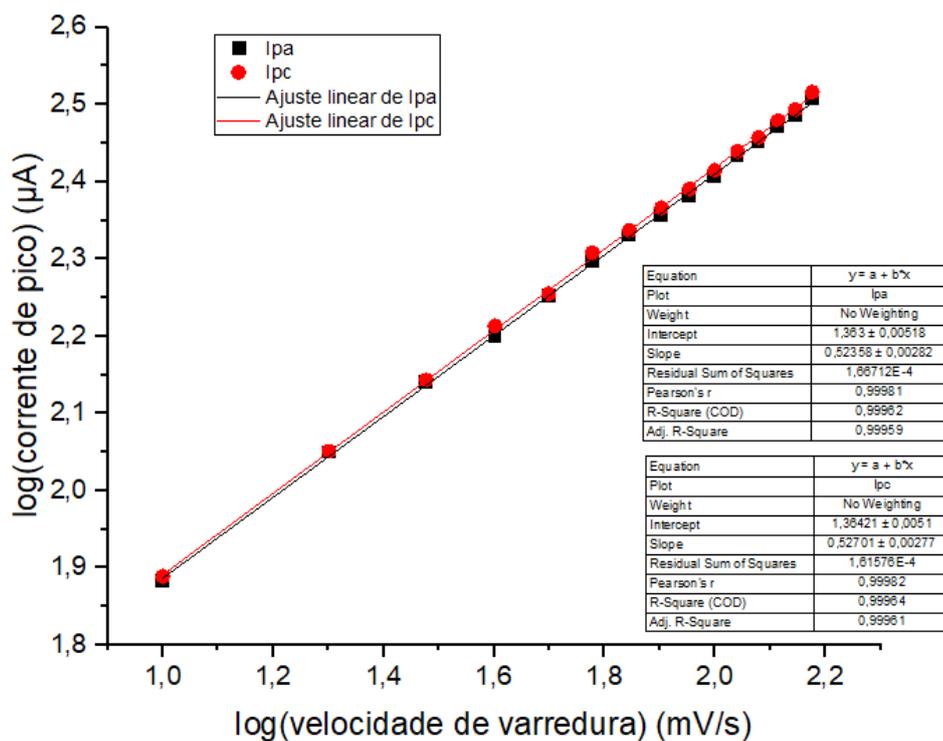
Outra informação derivada do teste de velocidade de varredura foi obtida por meio da análise da curva obtida com o logaritmo do módulo da corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura. Ao realizar um ajuste linear dos pontos de dados e examinar o coeficiente angular  $\alpha$  da equação da reta resultante, foi possível concluir qual o mecanismo predominante de transporte das espécies na solução. Quando o valor de  $\alpha$  se aproxima de 1, isso indica que o transporte ocorre principalmente por migração; por outro lado, quando  $\alpha$  se aproxima de 0,5, isso sugere que o transporte é predominantemente governado pela difusão (Silva *et al.*, 2021). Na Figura 11 foi determinado que o coeficiente angular da reta foi encontrado em 0,524 e 0,527 para  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$ , respectivamente, logo, um valor muito próximo do teórico (0,5), o que vem a confirmar que o movimento das espécies na solução é regido pela difusão, como esperado.

Figura 10 – Variação da corrente de pico redox em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.



Fonte: A Autora (2023).

Figura 11 – Logaritmo do módulo das correntes de pico redox em função do logaritmo da velocidade de varredura.



Fonte: A Autora (2023).

## 4.2 IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO ANTI-SPIKE

### 4.2.1 Prova de conceito com Anti-IgG/IgG de coelho

Como uma prova de conceito para o imunossensor, primeiramente foi utilizado o imunocomplexo anti-IgG/IgG de coelho na plataforma sensora.

A imobilização do elemento de reconhecimento é uma das etapas mais críticas e importantes no desenvolvimento do biossensor (Silva *et al.*, 2016). A abordagem mais atrativa para a construção de um imunossensor é a imobilização ordenada do anticorpo por meio de sua porção Fc (fragmento cristalizável). Isso ocorre porque, ao fazê-lo, a porção Fab (do inglês, *fragment antigen-binding*) permanece disponível para interagir com os epítomos do antígeno. Dado que a região Fc apresenta uma carboxila em sua extremidade, a qual é capaz de reagir favoravelmente com grupos amina em condições termodinâmicas adequadas, formando uma ligação amida estável, é altamente benéfico utilizar grupos amina para a imobilização covalente do anticorpo na plataforma.

Nesse contexto, com o objetivo de aumentar a disponibilidade de grupos amina no frGO, que possui uma concentração de 1,1 mmol de grupos NH<sub>2</sub> por grama, o EDA foi selecionado para desempenhar essa função. A estratégia adotada neste trabalho teve como base a hipótese de que o frGO se ligaria ao glutaraldeído por uma extremidade aminada, enquanto os demais grupos amina ficariam livres para posterior imobilização do anticorpo.

Duas concentrações diferentes foram testadas: 5% e 10%. Uma avaliação da estabilidade do filme com glutaraldeído e frGO-EDA foi realizada aplicando-se 30 ciclos de CV em Ferri/Ferro. Os valores obtidos para o cálculo do coeficiente de variação dos picos anódico (*I<sub>pa</sub>*) e catódico (*I<sub>pc</sub>*) são mostrados na Tabela 1. Dessa forma, escolheu-se a concentração de EDA 5%, uma vez que nessa concentração foram encontrados os valores mais baixos, tanto para a média quanto para o desvio padrão, do coeficiente de variação obtido. A análise de sucessivos CVs do teste de estabilidade do filme com EDA 5% é visualizado na Figura 12.

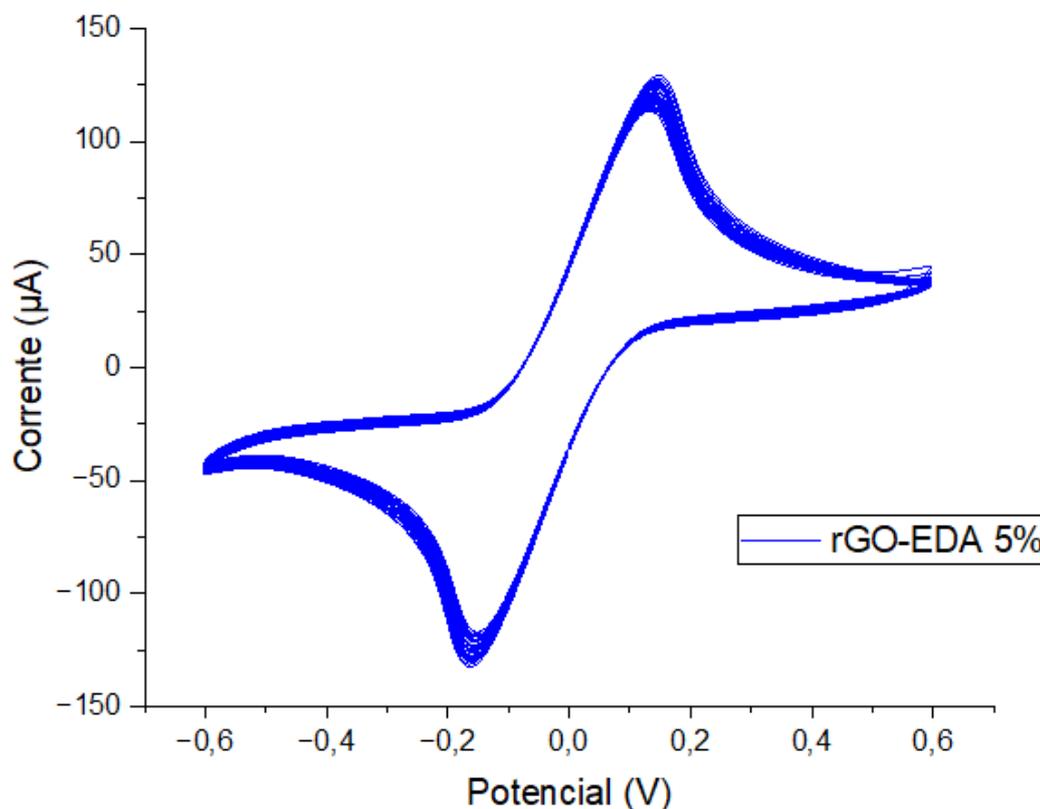
Tabela 1 – Coeficiente de variação para as correntes de pico anódica (*I<sub>pa</sub>*) e catódica (*I<sub>pc</sub>*) nas amostras de frGO-EDA com diferentes concentrações.

frGO-EDA 5%		frGO-EDA 10%	
<i>I<sub>pa</sub></i>	<i>I<sub>pc</sub></i>	<i>I<sub>pa</sub></i>	<i>I<sub>pc</sub></i>
4,0 ± 0%	3,7 ± 0,1%	4,6 ± 1,4%	4,6 ± 1,4%

Fonte: A Autora (2023).

Disto foi possível atribuir que o simples processo de incubação do frGO com EDA e sonicação por 30 min garantiu eficácia na funcionalização. Tal achado foi

Figura 12 – Teste de estabilidade do filme sensor com glutaraldeído e frGO-EDA 5%.



Fonte: A Autora (2023).

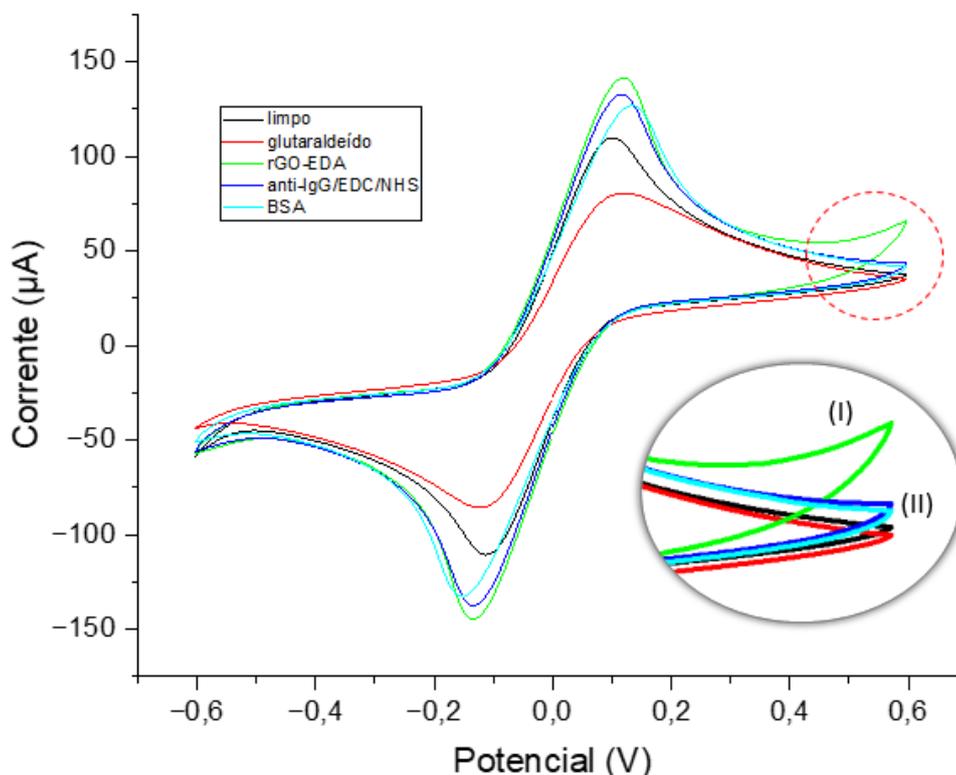
confirmado pelo aumento no pico de oxidação no potencial de 0,5 V, destacado no pico (II) do inserto da Figura 13 (Gootzen *et al.*, 1998).

O uso da química do EDC/NHS é bastante efetiva na formação de ligação amida para imobilização covalente da proteína (Guler; Sarac, 2016). A escolha do tampão e do pH utilizados na preparação das soluções de EDC/NHS tem influência direta na eficácia da imobilização. Citratos e fosfatos reduzem a reatividade do EDC. Além disso, as reações com EDC são mais eficientes com o pH entre 4,7 e 6,0 (Thermo Scientific, 2011).

A confirmação da imobilização de anti-IgG foi verificada pela alteração nos picos de corrente anódico e catódico na CV (Figura 13), decrescidos de 5,6 % e 4,4 %, respectivamente. Ademais, percebeu-se uma redução do pico de corrente no potencial 0,5 V (destaque (II) do inserto na Figura 13), indicando que os grupos amins foram provavelmente extintos, dando lugar a um provável grupo amida da ligação entre a amina do frGO-EDA e o grupo carboxílico do anticorpo.

A fim de evitar ligações não-específicas na resposta analítica sensora, o uso de agentes de bloqueio foi testado. Embora a glicina seja um agente de bloqueio atrativo por resultar em uma pequena alteração sobre a corrente de resposta sensora, aqui

Figura 13 – Voltamograma cíclico das etapas individuais do biossensor em solução de Ferri/Ferro.



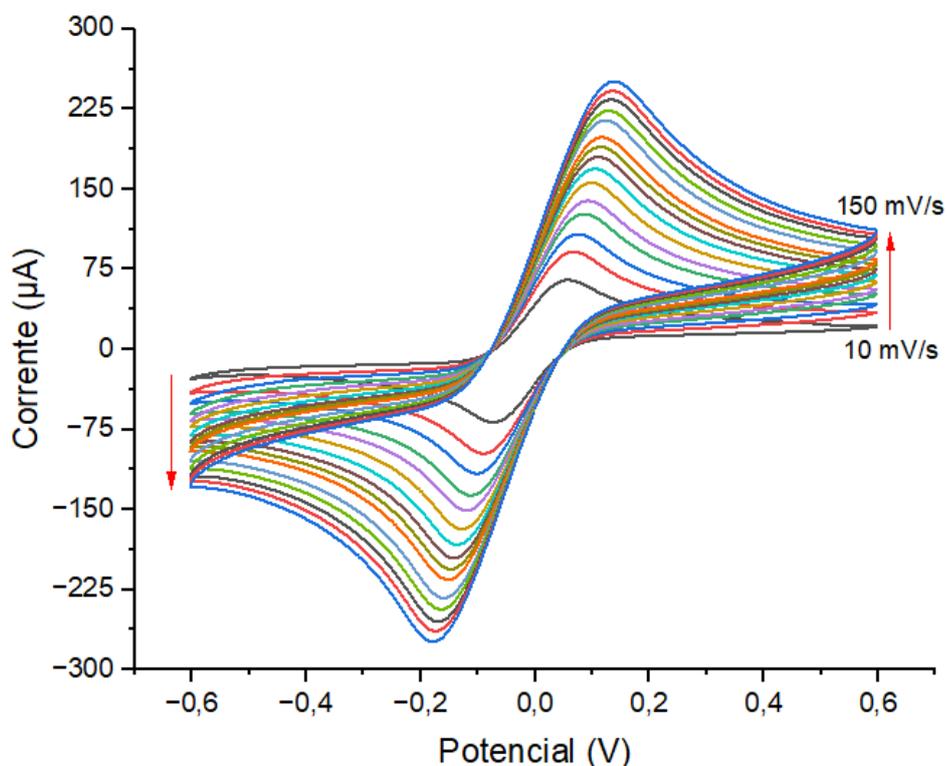
Fonte: A Autora (2023).

optou-se por utilizar o BSA por ser uma proteína de maior peso molecular, visto que o rGO constrói uma superfície mais porosa.

Ainda na Figura 13, também observou-se uma queda de corrente na etapa de bloqueio, evidenciando a presença do BSA, que tem um caráter isolante.

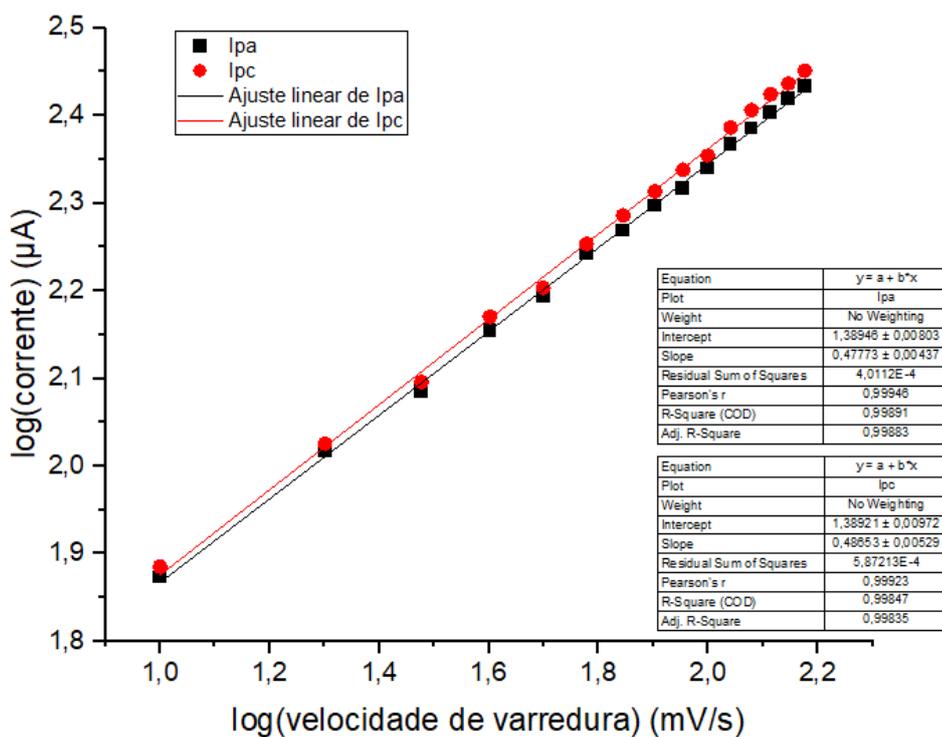
Levando-se em consideração que a estabilidade da plataforma sensora é um parâmetro importante na performance analítica do biossensor, foi conduzido o estudo da velocidade de varredura, após a imobilização do anti-IgG e a etapa de bloqueio (Figura 14). O procedimento foi conduzido com o objetivo de obter uma comparação com o mesmo teste realizado utilizando-se o eletrodo impresso modificado apenas com o filme sensor. Observou-se que, embora ainda existisse uma variação na diferença de potencial entre os picos redox de 139% entre a menor e a maior velocidade de varredura, essa variação foi menor quando comparada com os 192% obtidos com o eletrodo com o filme. Isto pode ser um indicativo de menos espécies sendo adsorvidas na superfície após o uso do bloqueio. Esta hipótese também é corroborada pelo gráfico do logaritmo do módulo das correntes de pico redox em função do logaritmo da velocidade de varredura (Figura 15), onde observa-se uma redução no coeficiente angular da reta, com  $\alpha$  igual a 0,478 e 0,486 para os picos de oxidação e redução, respectivamente.

Figura 14 – Voltamograma cíclico do teste de velocidade de varredura do eletrodo modificado com filme/anticorpo/bloqueio.



Fonte: A Autora (2023).

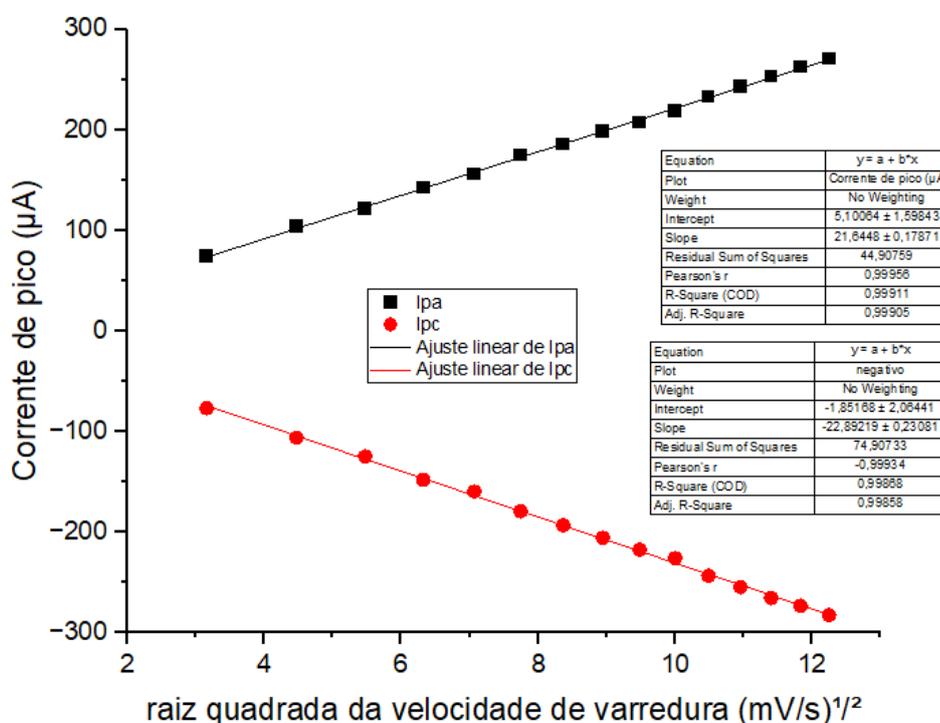
Figura 15 – Logaritmo do módulo das correntes de pico redox em função do logaritmo da velocidade de varredura.



Fonte: A Autora (2023).

Analisando as correntes de pico redox, considera-se que houve um aumento linear em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 16).

Figura 16 – Variação da corrente de pico redox em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.



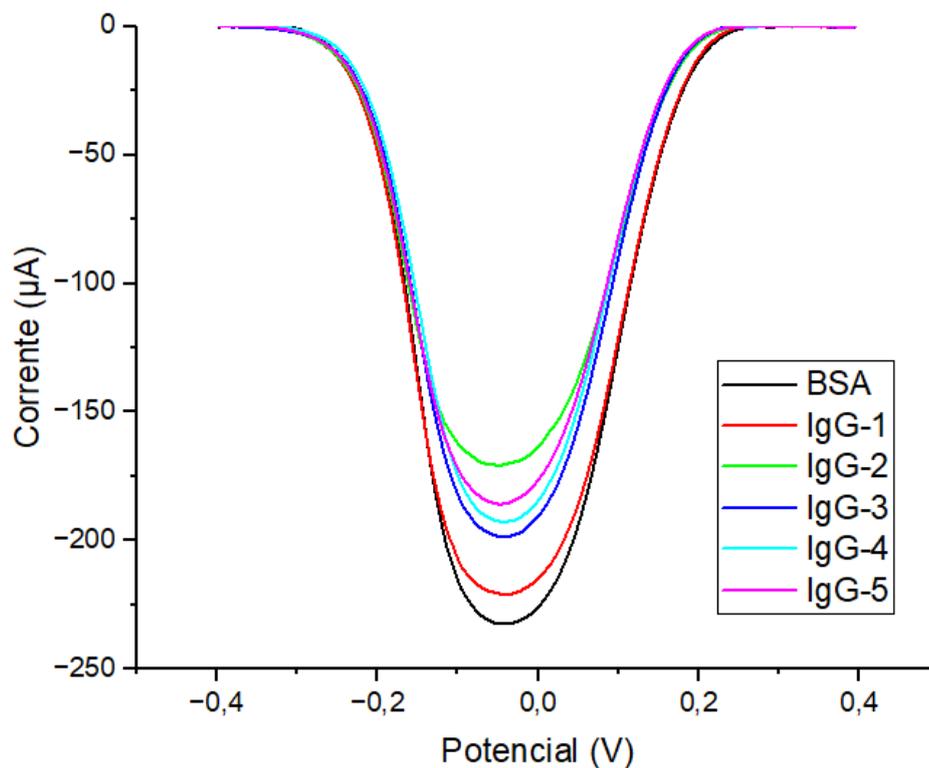
Fonte: A Autora (2023).

#### 4.2.2 Resposta analítica com IgG

Devido à maior sensibilidade da técnica de voltametria de onda quadrada em comparação com a voltametria cíclica, ela foi escolhida para análise da resposta analítica do biossensor. Optou-se pela corrente de pico catódica por haver muitas espécies no sangue que sofrem oxidação, o que poderia interferir na resposta imunossensora.

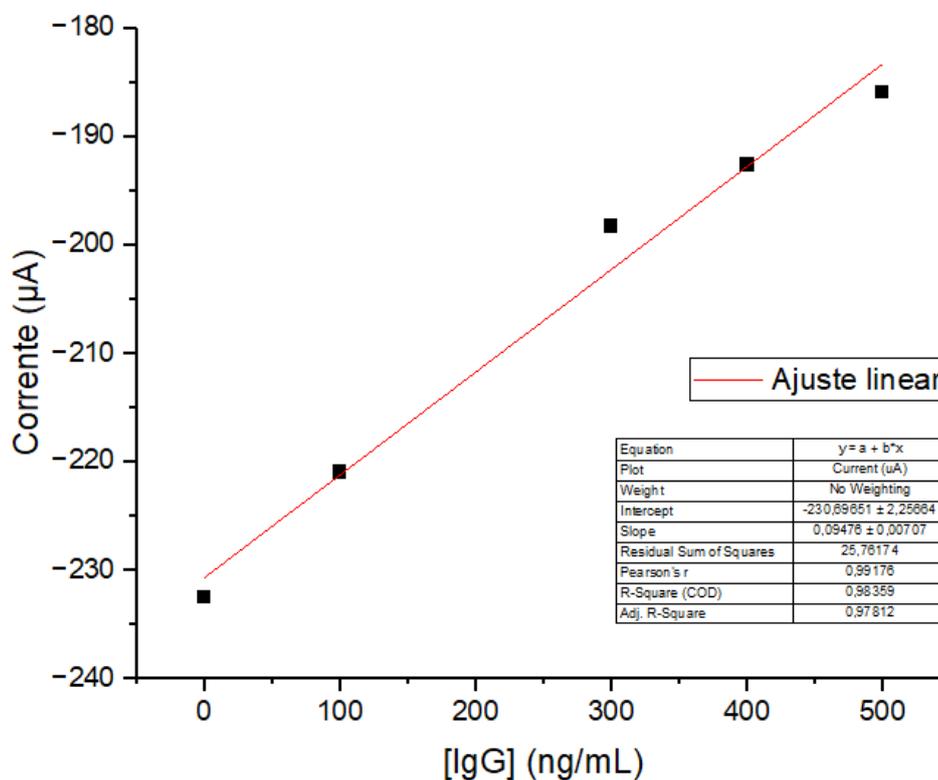
Os voltamogramas resultantes para cinco incubações sucessivas de IgG de coelho a 100 ng/mL podem ser visualizados na Figura 17. Nota-se um decaimento da corrente de pico catódica aparentemente linear à medida que as incubações são realizadas, com exceção da segunda incubação, que apresentou um comportamento diferente das demais. Essa diferença pode ser explicada como um erro de leitura, visto que problemas técnicos com o potenciostato foram enfrentados justamente neste momento. Dessa forma, o ponto relativo à incubação 2 foi considerado um outlier e não foi plotado no gráfico da curva de concentração do IgG, visualizada na Figura 18. Observa-se um ajuste linear com  $r = 0,992$  e  $R^2 = 0,983$ , indicando uma resposta linear do biossensor contra o IgG de coelho específico para a COVID-19.

Figura 17 – Voltametria de onda quadrada da resposta analítica com IgG de coelho.



Fonte: A Autora (2023).

Figura 18 – Resposta analítica com IgG de coelho.



Fonte: A Autora (2023).

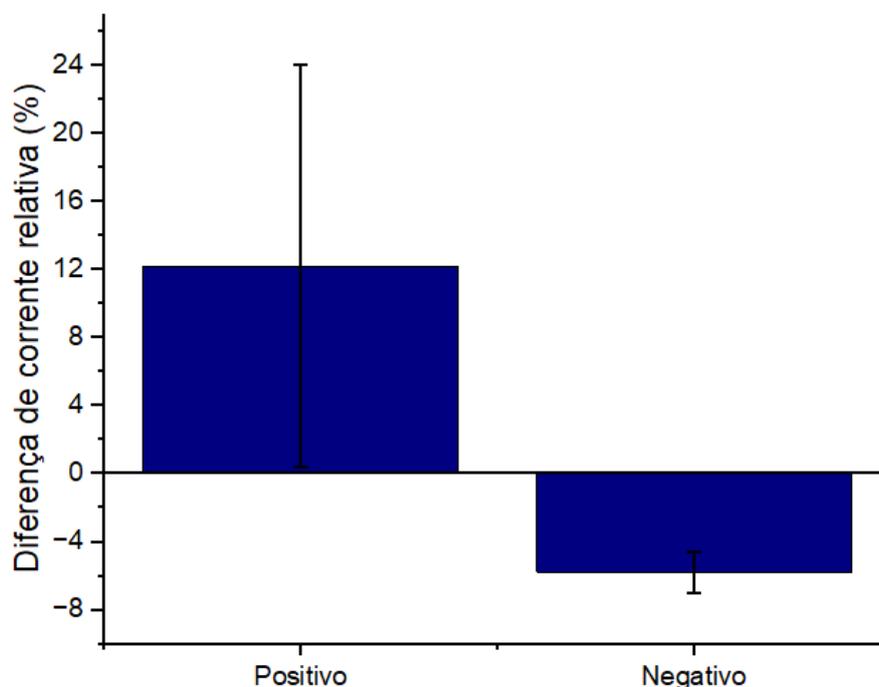
### 4.2.3 Resposta analítica com a proteína Spike

A resposta analítica contra o SARS-CoV-2 foi avaliada incubando por 20 minutos uma alíquota da proteína *Spike* a uma concentração de 100 ng/mL, diluída em PBS, como controle positivo, e a uma concentração de 10 pg/mL como controle negativo visando reduzir o efeito matriz. Para esse ensaio foram utilizadas duplicatas de eletrodo. A diferença percentual da corrente de pico catódico para o controle positivo/negativo ( $I_{antes}$ ) em relação à etapa de bloqueio ( $I_{depois}$ ) foi calculada usando a seguinte equação:

$$\Delta I_p = \frac{I_{antes} - I_{depois}}{I_{antes}} \quad (4.4)$$

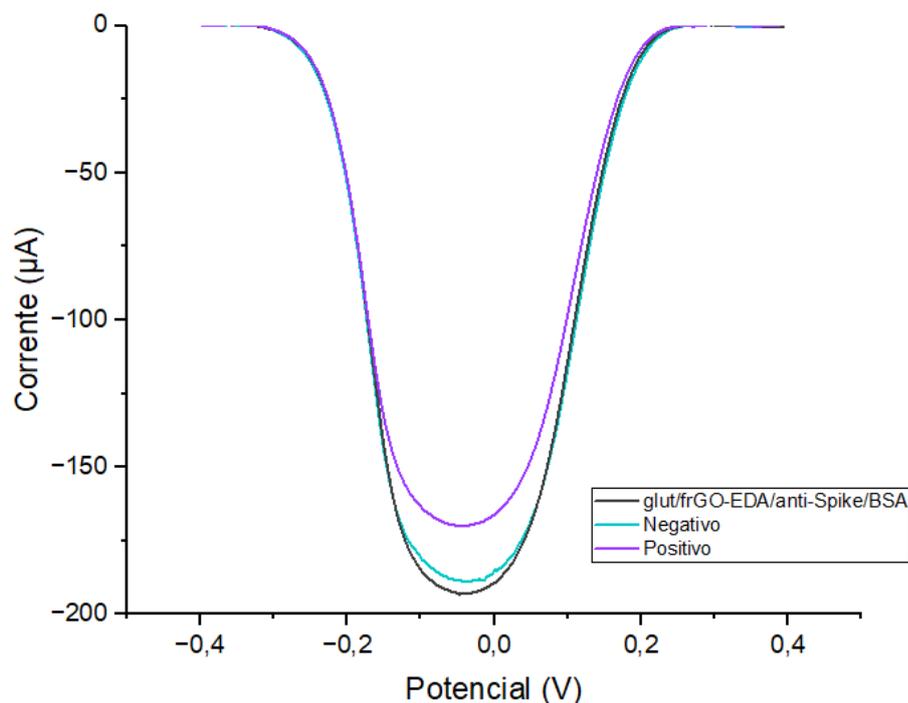
Os valores obtidos da média e desvio padrão podem ser visualizados na Figura 19. Notou-se que o imunossensor foi capaz de diferenciar o positivo do controle. No entanto, observou-se um desvio padrão elevado para o resultado positivo, bem como uma variação de corrente negativa para o controle negativo. Acredita-se que isso ocorreu devido à concentração de BSA utilizada no processo de bloqueio não ter sido adequada, o que necessitaria de lavagens mais rigorosas para remoção das moléculas em excesso. Os voltamogramas de SWV esperados para os controles negativo e positivo da proteína *Spike* são mostrados na Figura 20.

Figura 19 – Resposta analítica contra a proteína *Spike*.



Fonte: A Autora (2023).

Figura 20 – Voltamograma de onda quadrada esperado para os controles positivo e negativo contra a *Spike*.



Fonte: A Autora (2023).

### 4.3 TRABALHOS FUTUROS

Em trabalhos futuros, espera-se conduzir mais testes de caracterização da plataforma sensora com a técnica de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *fourier transform infrared spectroscopy*) para investigar a presença de grupos funcionais, como amina, carboxila e amida, ao longo do processo de montagem da superfície nanoestruturada do biossensor. Essa análise ajudará a confirmar a imobilização bem-sucedida das moléculas na superfície.

Além disso, a realização de um teste para otimização do processo de bloqueio também é de grande importância para obtenção de uma resposta analítica mais específica para a proteína *Spike* em amostra biológica. Em seguida, será possível obter os valores de parâmetros importantes de um biossensor, como limite de detecção, limite de quantificação e intervalo de linearidade.

Por fim, serão feitos testes de repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade a longo prazo do biossensor.

## 5 CONCLUSÕES

Neste estudo, foi desenvolvido um imunossensor destinado à detecção da COVID-19, utilizando a proteína *Spike* do SARS-CoV-2 como alvo. O dispositivo sensor foi caracterizado por técnicas eletroquímicas e morfológicas, incluindo análises de estabilidade, velocidade de varredura e microscopia eletrônica de varredura, a fim de avaliar a robustez do filme sensor e entender os mecanismos subjacentes de transferência de massa. Espera-se, em trabalhos futuros, realizar análises adicionais por FTIR para aprofundar a caracterização química da superfície biossensora.

Foi obtida curva analítica do imunossensor em modelo anti-IgG/ IgG, determinando uma faixa de resposta linear, aplicável à detecção de antígenos da Covid-19. A resposta analítica com anti-*Spike*/*Spike* em tampão foi satisfatória, mostrando prova-de-conceito com diferenças significativas entre correntes amperométricas em resposta ao controle positivo e negativo. Entretanto, ensaios complementares com maior número de amostras de COVID-19 serão necessários para validação do biossensor, otimizando as etapas de bloqueio de ligações não-específicas. Essas etapas futuras são importantes para aprimorar o desempenho do biossensor e sua aplicabilidade na detecção precisa e rápida da COVID-19.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2. ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, Inc, 2001.

BELLIER, N.; BAIPAYWAD, P.; RYU, N. *et al.* **Recent biomedical advancements in graphene oxide- and reduced graphene oxide-based nanocomposite nanocarriers**. *Biomaterials Research*, v. 26, [n.p.], 26 nov. 2022. <https://doi.org/10.1186/s40824-022-00313-2>

BIANCOLELLA, M.; COLONA, V. L.; LUZZATTO, L. *et al.* **COVID-19 annual update: a narrative review**. *Human Genomics*, v. 17, n. 68, [n.p.], 24 jul. 2023. <https://doi.org/10.1186/s40246-023-00515-2>

CHAO, Y. X.; RÖTZSCHKE, O.; TAN, E. K. **The role of IgA in COVID-19**. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 87, p. 182-183, jul. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.05.057>

CLARK, L. C.; LYONS, C. **Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery**. *Annals of the New York Academy of Sciences*, n. 102, p. 29–45, 1962.

ENSAFI, A. A. **An introduction to sensors and biosensors**. *In: Electrochemical Biosensors*, p. 1–10, 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816491-4.00001-2>

ERTÜRK, G.; MATTIASSON, B. **Capacitive Biosensors and Molecularly Imprinted Electrodes**. *Sensors*, v. 17, n. 2, [n.p.], 17 fev. 2017. <https://doi.org/10.3390/s17020390>.

FELIX, F. S.; ANGNES, L. **Electrochemical immunosensors: A powerful tool for analytical applications**. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 102, p. 470–478, 15 abr. 2018.

FERREIRA, P. A. B. **Desenvolvimento de imunossensor supercapacitivo para detecção de Cistatina C**. 2019. 71 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

FIORITO, P. A. **Construção de biossensores utilizando polímeros condutores eletrônicos**. 2001. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

GOOTZEN, J. F. E.; WONDERS, A. H.; VISSCHER, W.; VAN SANTEN, R. A.; VAN VEEN, J. A. R. **A DEMS and cyclic voltammetry study of NH<sub>3</sub> oxidation on platinumized platinum**. *Electrochimica Acta*, v. 43, n.12-13, p. 1851–1861, 5 maio 1998. [https://doi.org/10.1016/s0013-4686\(97\)00285-5](https://doi.org/10.1016/s0013-4686(97)00285-5)

GOPINATH, S.C.B., LAKSHMIPRIYA, T. **An introduction to biosensors and biomolecules**. *In: Gopinath S.C.B., LakshmiPriya T., editors. Nanobiosensors for Biomolecular Targeting*. 1st ed. Elsevier; Cambridge, MA, USA: 2019. p. 1–17

GULER, Z.; SARAC, A. S. **Electrochemical impedance and spectroscopy study of the EDC/NHS activation of the carboxyl groups on poly( $\epsilon$ -caprolactone)/poly(m-anthranilic acid) nanofibers.** Express Polymer Letters, v. 10, n. 2, p. 96-110, 31 jan. 2016. <https://doi.org/10.3144/EXPRESSPOLYMLET.2016.11>

KONIOS, D. *et al.* **Dispersion behaviour of graphene oxide and reduced graphene oxide.** Journal of Colloid and Interface Science, v. 430, p. 108-112, 15 set. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.05.033>.

LANDIM, V. P. A.; SILVA, B. V. M.; SOBRAL FILHO, D. C.; DUTRA, R. F. **A Novel Redox-free Immunosensor Concept Based on Cobalt Phthalocyanine@carbon Nanotubes Pseudocapacitor for Cardiac B-type Natriuretic Peptide Detection.** Electroanalysis, v. 33, p. 2302–2309, 2021. <https://doi.org/10.1002/elan.202100177>

LAZCKA, O.; CAMPO, F. J. D.; MUÑOZ, F. X. **Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors.** Biosensors and Bioelectronics, v. 22, n. 7, p. 1205–1217, 15 fev. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.036>

LIMA, L. A. D. **Desenvolvimento de compósitos à base de polipirrol e corantes paracaplicação em superfícies biossensoras.** 2023. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

LOWE, C. R. **Biosensors.** Trends in biotechnology, v. 2, n. 3, p. 59-65, mai. 1984. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(84\)90011-8](https://doi.org/10.1016/0167-7799(84)90011-8)

MA, H.; ZENG, W.; HE, H. *et al.* **Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19.** Cellular Molecular Immunology, v. 17, p. 773–775, 28 mai. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0474-z>

NARESH, V.; NOHYUN, L. **A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors.** Sensors, v. 21, n. 4, [n.p.], 5 fev. 2021. <https://doi.org/10.3390/s21197423>

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic.** 5 mai. 2023. Disponível em: [https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic?gclid=EAlaIQobChMI9b58-S0gQMVN0FIAB2YCw xzEAAYASABEgJnbPD\\_BwE](https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic?gclid=EAlaIQobChMI9b58-S0gQMVN0FIAB2YCw xzEAAYASABEgJnbPD_BwE). Acesso em: 4 set. 2023.

OTERO, F.; MAGNER, E. **Biosensors** — Recent Advances and Future Challenges in Electrode Materials. Sensors, v. 20, n. 12, [n.p.], 23 jun. 2020. <https://doi.org/10.3390/s20123561>

OUR WORLD IN DATA. **Coronavirus pandemic (COVID-19).** Disponível em: <https://ourworldindata.org/coronavirus>. Acesso em: 03 out. 2023.

PACHECO, W. F. *et al.* **Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos.** Revista Virtual de Química, v. 5, n. 4, p. 516–537, 12 ago. 2013.

POHANKA, M. **Progress in Biosensors for the Point-of-Care Diagnosis of COVID-19.** Sensors, v. 22, n. 19, [n.p.], 29 set. 2022. <https://doi.org/10.3390/s22197423>

SILVA, B. V. M.; RODRÍGUEZ, B. A. G.; SALES, G. F.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; DUTRA, R. F. **An ultrasensitive human cardiac troponin T graphene screen-printed electrode based on electropolymerized-molecularly imprinted conducting polymer.** Biosensors Bioelectronics, v. 77, p. 978–985, 15 mar. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.10.068>

SILVA, B. V. M.; CORDEIRO, M. T.; RODRIGUES, M. A. B.; MARQUES, E. T. A.; DUTRA, R. F. **A Label and Probe-Free Zika Virus Immunosensor Prussian Blue@carbon Nanotube-Based for Amperometric Detection of the NS2B Protein.** Biosensors, v. 11, n. 5, [n.p.], 16 mai. 2021. <https://doi.org/10.3390/bios11050157>

SILVA, R. A.; SILVA, R. M. P.; SANTOS, K. T.; ARAUJO, T. S.; ALCÂNTARA, A. C.; SUFFREDINI, H. B.. **Metodologia Para Detecção Eletroquímica Qualitativa de Compostos Orgânicos Em Interfaces Petróleo/Água.** Química Nova, v. 42, n. 1, p. 95–98, jan. 2019. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170298>

SOUZA, D. D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. **Voltametria de onda quadrada.** Primeira parte: aspectos teóricos. Química Nova, v. 26, n. 1, p. 81–89, jan. 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100015>

TALEAT, Z.; KHOSHROO, A.; MAZLOUM-ARDAKANI, M. **Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013).** Microchimica Acta, v. 181, n. 9-10, p. 865–891, 8 abr. 2014. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1181-1>

THERMO SCIENTIFIC. **NHS and Sulfo-NHS.** [S.l.]: Thermo Fisher Scientific Inc, 2011.

YILMAZ, U. T.; UZUN, D.; YILMAZ, H. **A new method for rapid and sensitive determination of cholic acid in gallbladder bile using voltammetric techniques.** Microchemical Journal, v. 122, p. 159–163, set. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.05.002>

YÜCE, M.; FILIZTEKIN, E.; ÖZKAYA, K. G. **COVID-19 diagnosis: A review of current methods.** Biosensors Bioelectronics, v. 172, 15 jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112752>

WEN, W. *et al.* **Recent Advances in Electrochemical Immunosensors.** Analytical Chemistry, v. 89, n. 1, p. 138–156, 9 nov. 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04281>

WIERSINGA, W.J.; RHODES, A.; CHENG, A.C.; PEACOCK, S.J.; PRESCOTT, H.C. **Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review.** JAMA, v. 324, n. 8, p. 782-793, 25 ago. 2020. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.12839>