



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



BÁRBARA SILVA LIMA

**IMUNOENSAIO DE FLUXO LATERAL BASEADO EM NANOTUBOS DE
CARBONO PARA DIAGNÓSTICO DE COVID-19**

Recife

2024

BÁRBRA SILVA LIMA

**IMUNOENSAIO DE FLUXO LATERAL BASEADO EM NANOTUBOS DE
CARBONO PARA DIAGNÓSTICO DE COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas

Área de concentração: Biotecnologia e Bioinformática

Orientadora: Rosa Amália Fireman Dutra

Recife

2024

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Lima, Bárbara Silva

Imunoensaio de fluxo lateral baseado em nanotubos de carbono para diagnóstico de Covid-19. / Bárbara Silva Lima. – 2024.

62 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Rosa Amália Fireman Dutra.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, 2024.

Inclui referências.

1. Nanotubo de carbono. 2. Teste rápido. 3. Imunossensor de fluxo lateral. 4. COVID-19. I. Dutra, Rosa Amália Fireman (Orient.). II. Título.

570

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-100

BÁRBARA SILVA LIMA

**IMUNOENSAIO DE FLUXO LATERAL BASEADO EM NANOTUBOS DE
CARBONO PARA DIAGNÓSTICO DE COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 31/01/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rosa Amália Fireman Dutra (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Roberta Cláudia (Examinadora Externa)

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico essa dissertação aos meus guias pela sua proteção. À minha mãe e irmã por todo apoio dado. À minha namorada Talita por confiar em meu potencial. E aos meus amigos de faculdade e vida, que me ajudaram em meus momentos difíceis. Todos foram essenciais para finalização de meu mestrado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente às forças maiores que sempre me sustentaram em bons caminhos e guiou minha jornada.

À minha família, mãe e irmã, que estão comigo desde os primórdios acadêmicos me encorajando a ver o melhor de mim.

À minha namorada Talita que acreditou em mim quando eu não mais acreditava, que me ajudou substancialmente em todos os meus momentos, me incentivando e me impulsionando até aqui.

A todos do Laboratório de biossensores e bioeletrônicos (LABIONICS) pela parceria diária e conversas aleatórias para minimizar a tensão dos experimentos. Agradeço também à minha orientadora, Rosa Dutra, pela oportunidade e orientação.

Um agradecimento especial para meus amigos Paulo Elói, Ryan Cordeiro, Paulo Fernando e Daniella Cavalcanti pelas risadas, conversas e desabafos pós expediente. Poder contar com vocês desde a graduação me fez crescer, evoluir, e conseguir me enxergar onde estou hoje.

Agradeço ao professor Dr. Eduardo Padrón e sua mestrandia Juliana pela disponibilidade para caracterização dos nanotubos. Ao Dr. Moacyr Rêgo por ceder amostras de soro para realização dos experimentos. Além da Dr^a Leda Castilho e a Dr^a Maria Izabel pela concessão dos anticorpos.

Ao PPGCB e à UFPE por formar todo ano alunos qualificados e com perspectivas maiores para o seu futuro.

Ao órgão de fomento FACEPE pelo auxílio financeiro que foi fundamental para o cumprimento desse projeto.

“Eu acho que é uma ótima maneira de viver lutar por si mesmo, lutar por seus amigos, lutar por uma comunidade de pessoas que compartilham sua experiência e lutar por dignidade e uma vida melhor, e haverá um ponto de inflexão. Haverá vitórias e serão alegres.” (PETER STALEY, 2014).

RESUMO

Os nanotubos de carbono (NTC) representam uma classe fascinante de nanomateriais que têm despertado grande interesse devido às suas propriedades únicas e versatilidade em diversas aplicações, como a detecção de patógenos quando utilizados em nanossensores. O imunossensor de fluxo lateral, desempenha um papel fundamental no diagnóstico, fornecendo uma abordagem rápida e eficiente para a detecção de biomarcadores específicos. Durante a pandemia de COVID-19, esse tipo de sensores foram escolhidos para a testagem massiva e monitoramento da população em diversos ambientes. O desenvolvimento contínuo e aprimoramento desses testes são áreas de foco para melhorar sua sensibilidade e precisão. Desta forma, este trabalho buscou desenvolver um imunossensor de fluxo lateral utilizando os nanotubos de carbono como partícula marcadora de reação para detecção de proteína viral. Como resultado, foram investigadas as relações dos NTC aos seus dispersantes, para serem utilizados como rótulo de marcação dos testes de fluxo lateral. O desenvolvimento do teste foi realizado utilizando antígeno e anticorpos de coelho e soro de pacientes positivos e negativos para COVID-19 como prova de conceito. Os anticorpos de galinha foram utilizados para ligação ao alvo por conseguir detectar múltiplos epítomos virais, sendo possível distinguir soro positivo e negativos em baixas concentrações. Foi realizada a caracterização física dos nanotubos de carbono através das análises de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis). A utilização dos NTC promoveu a estabilidade de conjugação ao anticorpo, além da capacidade de promover imunorreações específicas entre antígeno-anticorpo. Desta forma, este trabalho mostrou que a metodologia de dispersão de nanotubos de carbono permite sua utilização em sistemas de fluxo lateral servindo como marcador de reação em diagnósticos sorológicos, o que o torna interessante não só pela detecção de antígenos da COVID-19 demonstrados neste estudo, mas também por outras aplicações em métodos, como a detecção quantitativa pela condutividade dos NTC.

Palavras-chave: Nanotubo de carbono. Teste rápido. Imunossensor de fluxo lateral. COVID-19.

ABSTRACT

Carbon nanotubes (CNTs) represent a fascinating class of nanomaterials that have aroused significant interest due to their unique properties and versatility in various applications, such as pathogen detection when used in nanosensors. The lateral flow immunoassay plays a crucial role in diagnostics, providing a quick and efficient approach for the detection of specific biomarkers. During the COVID-19 pandemic, these types of sensors were chosen for massive testing and population monitoring in various settings. The ongoing development and enhancement of these tests are areas of focus to improve their sensitivity and accuracy. Thus, this work aimed to develop a lateral flow immunoassay using carbon nanotubes as a reaction marker for viral protein detection. As a result, the relationships between CNTs and their dispersants were investigated to be used as labeling agents in lateral flow tests. The test development was carried out using rabbit antibodies and antigens, as well as serum samples from COVID-19 positive and negative patients as a proof of concept. Chicken antibodies were employed for target binding, capable of detecting multiple viral epitopes, enabling the differentiation of positive and negative sera at low concentrations. Physical characterization of carbon nanotubes was conducted through scanning electron microscopy and UV-Vis absorption spectroscopy. The use of CNTs promoted conjugation stability to the antibody, along with the ability to induce specific immune reactions between antigen and antibody. Thus, this work demonstrated that the carbon nanotube dispersion methodology allows their use in lateral flow systems, serving as a reaction marker in serological diagnostics. This makes it not only interesting for the detection of COVID-19 antigens as demonstrated in this study but also for other applications in methods such as quantitative detection based on the conductivity of CNTs.

Keywords: Carbon nanotube. Rapid test. Lateral flow immunosensor. COVID-19.

LISTA DE SÍMBOLOS

Figura 1 –	Estrutura geométrica dos NTC	18
Figura 2 –	Estrutura química dos compostos dispersantes	21
Figura 3 –	Esquema da distribuição das membranas absorventes, fibra de vidro e membrana de nitrocelulose após a montagem do sistema em fluxo lateral	23
Figura 4 –	Esquema de montagem do teste de fluxo lateral	35
Figura 5 –	Imagens de MEV dos nanotubos de carbono de múltiplas camadas	36
Figura 6 –	Espectro UV-vis de NTC dispersos em DMF, Triton X-100, Tween-20, CTAB e SDS	38
Figura 7 –	Espectro de absorção UV-vis de NTC disperso em diferentes concentrações de DMF	40
Figura 8 –	Espectros de absorção UV-vis das soluções NTC em diferentes concentrações dispersos em DMF puro	41
Figura 9 –	Tubos de ensaio contendo NTC disperso em diferentes dispersantes após uma semana de estoque	42
Figura 10 –	Desenho esquemático de IFL utilizando F-NTC	43
Figura 11 –	Fluxo lateral utilizando NTC funcionalizados com EDC/NHS e NTC não funcionalizados para imobilização de anticorpos Ab1	44
Figura 12 –	Tiras de fluxo lateral utilizando NTC conjugado em diferentes concentrações de anticorpo Ab1	45
Figura 13 –	Ensaio de fluxo lateral na presença de diferentes concentrações de IgG de coelho	46
Figura 14 –	Tiras de fluxo lateral utilizando NTC conjugado a diferentes anticorpos contra a proteína Spike do vírus COVID-19	47
Figura 15 –	Ensaio utilizando soro negativo para COVID-19 e diluições do soro positivo	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	GERAL	16
2.2	ESPECÍFICOS	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1.	NANOTUBOS DE CARBONO	17
3.1.1	ESTRUTURA DOS NANOTUBOS DE CARBONO E SUAS PROPRIEDADES	17
3.1.2	SÍNTESE DOS NANOTUBOS DE CABONO	18
3.1.3	DISPERSÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO	19
3.2	DETECÇÃO EM LOCAL DE ATENDIMENTO	21
3.3	IMUNOSENSOR DE FLUXO LATERAL	22
3.3.1	IMUNOSENSOR DE FLUXO LATERAL BASEADO EM NTC	24
3.3.2	DIAGNÓSTICO VIRAL UTILIZANDO IMUNOSENSOR DE FLUXO LATERAL	25
3.4	IFL NO CENÁRIO DA PANDEMIA DA COVID-19	26
3.4.1	ANTICORPOS PARA DETECÇÃO DA SPIKE	28
3.4.2	PRODUÇÃO DA IGY	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5	CONCLUSÃO	51
6	SÚMULA CURRICULAR	52
7	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Os imunossensores de fluxo lateral (IFL) são ensaios que usam uma técnica analítica que combina efetivamente a excelente separação da cromatografia com a reação de reconhecimento imunológico dos imunossensores convencionais. Os IFL surgiram no final da década de 1960 como um método de detecção simples, rápido e de baixo custo, que tem sido usado para analisar pequenas biomoléculas em testes no local de atendimento (também conhecidos como '*Point-of-care testing*', ou pela sigla POC) até os dias atuais (SAITO *et al.*, 2014). Em comparação com os métodos tradicionais de detecção imunológica, os IFL não requerem profissionais qualificados para utilização do teste por ser de fácil uso, tem resultados em menos de 30 minutos e condições de utilização flexíveis. No entanto, apresentam fraca sensibilidade e reprodutibilidade, visto que o nanocompósito marcador de reação, as nanopartículas de ouro, sofrem com a instabilidade química e variação de tamanho. Para suprir essa problemática, uma preocupação crescente tem se concentrado na utilização novos materiais de marcação das reações de antígeno-anticorpo, a fim de tornar as IFL mais sensíveis e precisos, e para serem mais adaptáveis aos testes POC (BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2016).

A descoberta dos nanotubos de carbono (NTC), os alótropos do carbono e tamanho manométrico, sinalizaram o início de uma nova era na ciência dos materiais (IIJIMA, 1991). Os NTC se tornaram o centro de pesquisa de multicampos devido às suas excelentes propriedades e inúmeras utilizações potenciais, principalmente em aplicações biomédicas (RAPHEY *et al.*, 2019). No entanto, devido às fortes interações de van der Waals, os NTC tendem a reduzir sua energia por agregação, empacotando-se em feixes. Essa propriedade de agregação combinada às suas superfícies hidrofóbicas leva à formação de aglomerados quando os tubos entram em contato com a maioria dos solventes. Desta forma, são utilizados diversos tratamentos na sua produção, por meio do processo de funcionalização e dispersão dos NTC (NAQVI *et al.*, 2020). Na área médica, extensas atividades de pesquisa estão em andamento para desenvolver novas metodologias para uso dos NTC no tratamento e diagnóstico de doenças (SHEIKHPOUR; GOLBABAIE; KASAEIAN, 2017). O interesse do uso dos NTC para fins de diagnóstico clínico de doenças se dá por suas vantagens como uma

extensa área de superfície para imobilização de biomoléculas, estabilidade química e baixo custo, tornando-os um tremendo potencial para aplicações em testes de fluxo lateral (GUO, Jiuchuan *et al.*, 2021).

Desde sua descoberta os IFL já foram relatados e aplicados para o diagnóstico e prognóstico de várias doenças infecciosas, doenças cardíacas, tumores, patógenos, pesticidas, toxinas e íons metálicos (URUSOV; ZHERDEV; DZANTIEV, 2019). A aceitabilidade e viabilidade dos testes de fluxo lateral produzidos em larga escala para fins clínicos e de saúde pública foram amplamente demonstradas durante a pandemia de COVID-19 (BUDD *et al.*, 2023). A medida de testagem massiva da população se deu como uma contramedida crucial à propagação do vírus da COVID-19, e até o final de 2022, contou com mais de 3 bilhões de testes para o diagnóstico de SARS-CoV-2 realizados em todo o mundo, segundo à Organização Mundial da Saúde (OMS, 2022). Contudo, as abordagens de diagnóstico convencionais para a detecção de infecções virais, como o SARS-CoV-2, limitam-se à detecção de ácidos nucleicos virais utilizando PCR ou RT-qPCR, ou cultivo do vírus, o que restringe a acessibilidade ao teste, velocidade de ensaio e custo. Portanto, é imperativo explorar as abordagens, ferramentas e técnicas de diagnóstico existentes para melhorar ou reorientar a monitorização precoce e a prevenção de doenças com alto índice propagação (ÖZMEN *et al.*, 2021).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver um imunossensor de fluxo lateral utilizando nanotubos de carbono para diagnóstico da COVID-19.

2.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método de dispersão dos nanotubos de carbono, tornando-os aplicáveis em sistema de fluxo lateral.
- Caracterizar os nanotubos de carbono solúveis em compostos orgânicos.
- Validar o imunoensaio de fluxo lateral com anticorpos de coelho como prova de conceito.
- Aplicar os nanotubos de carbono em imunoensaios utilizando soro de pacientes positivos e negativos para COVID-19.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 NANOTUBOS DE CARBONO

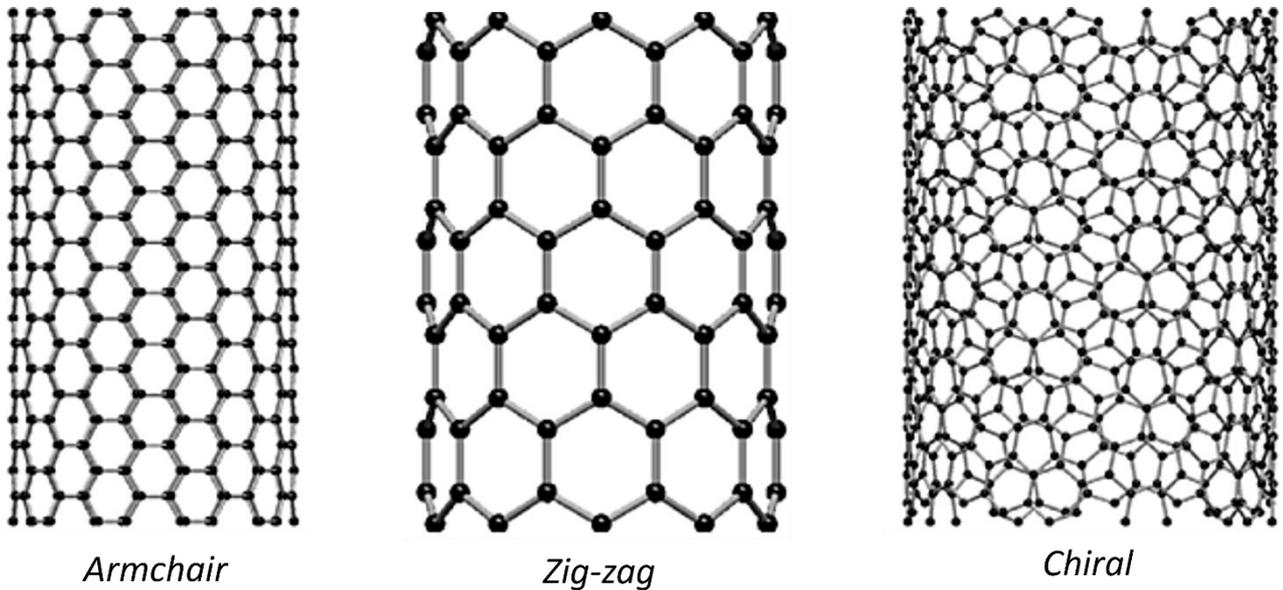
3.1.1 ESTRUTURA DOS NANOTUBOS DE CARBONO E SUAS PROPRIEDADES

Os nanotubos de carbono (NTC), como o próprio nome revela, são materiais em forma de tubos com diâmetro medindo em escala nanométrica cerca de 0,5 à 2,0 nanômetros. Eles são constituídos de alótropos de carbono e sua síntese é realizada em laboratório, pelo crescimento de um tubo cilíndrico oco ou fechado nas pontas de átomos de carbono. Assim, os nanotubos de carbono podem conter um ou mais cilindros, sendo denominados de nanotubo único ou múltiplo: os nanotubos de parede única (SWCNT, do inglês *single wall carbon nanotubes*) e os nanotubos de múltiplas paredes (MWCNT, do inglês *multiple wall carbon nanotubes*). Os NTC foram descritos pela primeira vez em 1991, numa pesquisa desenvolvida por Iijima no Japão, quando os visualizou com um microscópio eletrônico de varredura (IIJIMA, 1991).

Na matriz de um NTC, cada átomo de carbono está ligado a três circundantes átomos por hibridização sp^2 . Esta capacidade de entrelace em seus subníveis formando ligações π (π) os torna muito estáveis. Dependendo como os átomos de carbono estão ligados, os NTC podem apresentar propriedades mecânicas e elétricas diferentes, sendo condutores ou metálicos ou semicondutores. As três formas geométricas dos NTC estão representadas na Figura 1. Todos os NTC condutores possuem uma estrutura do tipo *armchair* e os semicondutores apresentam uma estrutura do tipo quiral ou zigzag. Além disso, podem ser classificados como quirais ou aquirais. Os aquirais são simétricos e podem ser de dois tipos, *armchair* ou zigzag, já os quirais são assimétricos. Desta forma, estas propriedades notáveis dos nanotubos de carbono dependem da sua geometria (LIU, Gang *et al.*, 2011). Por outro lado, as suas propriedades elétricas dependem do ângulo de intersecção ao longo do eixo do tubo, que podem transformar os NTC em um condutor melhor do que o cobre, que é normalmente utilizado em fios elétricos e outros materiais. Já em outra orientação possível, podem compartilhar propriedades elétricas que se assemelham aos semicondutores. Os defeitos na superfície dos NTC causados por essas orientações estruturais também influenciam na adesão de novos grupamentos

químicos à parede dos tubos e podem promover uma nova funcionalização (CONLEY; KARTTUNEN, 2022).

Figura 1. Estrutura geométrica dos NTC.



Fonte: A autora (2024).

Os nanotubos de carbono apresentam propriedades eletrônicas, térmicas, ópticas e mecânicas únicas (TANS *et al.*, 1997; TREACY; EBBESEN; GIBSON, 1996). Essas propriedades se tornaram alvo de grande interesse tanto no ramo acadêmico, como industrial, sendo considerado para as mais diversas aplicações, inclusive para fins de detecção (SHEIKHPOUR *et al.*, 2020).

3.1.2 SÍNTESE DOS NANOTUBOS DE CARBONO

Vários métodos de síntese de NTC foram desenvolvidos, que podem ser classificados pela forma como o carbono é montado na estrutura tubular de acordo com o aporte de energia, sendo os três principais: o método de descarga de arco, método de ablação a laser e método de deposição química de vapor (SHOUKAT; IMRAN, 2021). O método de descarga de arco é o método mais antigo usado para a produção de fibras de carbono, e utiliza altas temperaturas, podendo alcançar mais de 3000 °C, para conseguir evaporar os átomos de carbono em um plasma, formando NTC de paredes simples ou múltiplas. O método de ablação a laser envolve a vaporização de grafite em um forno elétrico aquecido a 1200 °C. A característica

comum dos métodos de descarga de arco e ablação a laser é a alta energia que é inserida com meios físicos, para induzir a reorganização dos átomos de carbono em NTC, além da alta temperatura que favorece a melhor cristalização dos NTC. No entanto, os requisitos básicos destes sistemas, tais como condições de vácuo e troca contínua de alvos de grafite, colocam dificuldades para a produção em larga escala dos NTC. No método de deposição química à vapor (DQV) a fonte de carbono é depositada utilizando um catalisador a temperaturas abaixo de 1200 °C. O processo utilizando DQV pode ser realizado sob condições mais brandas, como pressão atmosférica e temperatura mais amenas, além de fontes de carbono, catalisadores e atmosfera apropriados. A estrutura dos NTC, como número de parede, diâmetro, comprimento e orientação, pode ser bem controlada durante o processo de DQV. Portanto, o método DQV tem as vantagens de operação suave, baixo custo e processo controlável, e é o método mais promissor para produção em massa de NTC de única ou múltiplas paredes (ANZAR *et al.*, 2020). O processo de fabricação dos NTC de parede única e de paredes múltiplas é bem semelhante, porém de múltiplas paredes apresentam vantagens industriais sobre os de parede única, como facilidade de produção em massa, baixo custo do produto por unidade e maior estabilidade térmica e química (NAG *et al.*, 2021).

3.1.3 DISPERSÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO

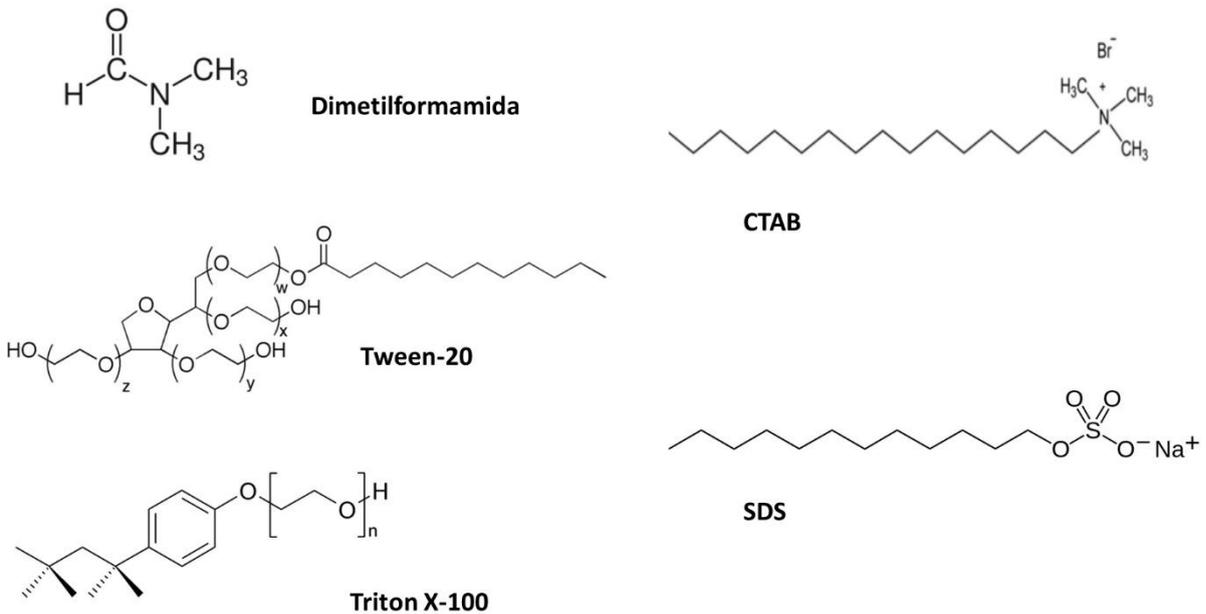
Os NTC adquiridos comerciante são agregados em feixes fortemente ligados pelas forças coesivas de van der Waals (vdW) (GIRIFALCO; HODAK; LEE, R. S., 2000). Além do emaranhamento dos NTC, estes também possuem a característica hidrofílica à maioria dos solventes comuns (ANGELIKOPOULOS; BOCK, 2012; HUANG, Y. Y.; TARENTJEV, 2012; PREMKUMAR; MEZZENGA; GECKELER, 2012).

Essa alta energia de interação torna a dispersão deste nanomaterial uma tarefa desafiadora, visto que muitas aplicações requerem soluções bem dispersas para sua ampla utilização em processos. Atualmente, existem duas principais estratégias empregadas para a dispersão de nanotubos: abordagem mecânica e abordagem química. A abordagem mecânica inclui método de ultrassom e mistura de alto cisalhamento. Por outro lado, a abordagem química inclui métodos covalentes e não covalentes. Enquanto os métodos não covalentes envolvem a adsorção de porções

químicas na superfície do nanotubo, os métodos covalentes comumente usufruem do poder de oxidação dos ácidos fortes, particularmente misturas de HNO_3 e H_2SO_4 (SHAFFER; FAN, X.; WINDLE, 1998; WANG, Yubing; IQBAL; MITRA, 2006), resultando na formação de uma variedade de grupos funcionais na superfície dos NTC, como grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$), carbonila ($-\text{CO}=\text{}$) e hidroxila ($-\text{OH}$), o que fornece o impedimento estérico contínuo, evitando a reforma do feixe, e favorecendo a posterior interação com outras moléculas (THI MAI HOA, 2018).

Mesmo funcionalizados, os NTC ainda podem apresentar dificuldades em se obter dispersões homogêneas na maioria dos solventes. Diversas pesquisas têm sido relatadas sobre o desenvolvimento de tecnologias de dispersão baseadas na combinação de ultrassonicação e tratamento com solventes orgânicos (ABEBE *et al.*, 2021; SEZER; KOÇ, 2018). Kadhum *et al.* empregaram goma arábica e hidroxietilcelulose (HEC-10) para obter dispersões mais estáveis utilizando MWCNT (KADHUM *et al.*, 2017). Já Pião *et al.* utilizou suspensões de NTC incorporados ao metilpirrolidona para conseguir soluções mais dispersas (PIAO *et al.*, 2017). A dispersão de MWCNT com surfactantes como Triton X-100, Tween 20, Tween 80, dodecil sulfato de sódio (SDS) e Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), em água e solventes orgânicos, também foi estudada por Rastogi *et al.* (RASTOGI *et al.*, 2008). Em contrapartida, estudos mais recentes utilizam solventes orgânicos como o dimetilformamida (DMF) para produzir fitas de grafeno por esfoliação, e também como solventes apróticos dipolares em soluções aquosas que se revelando eficazes para estabilizar composto a base de grafeno, como os NTC, em solução sem reagregação (AMIRI *et al.*, 2018; LI, Jianhui *et al.*, 2019). As estruturas químicas dos compostos dispersantes então representadas na Figura 2.

Figura 2. Estrutura química dos compostos dispersantes.



Fonte: A autora (2024).

3.2 DETECÇÃO EM LOCAL DE ATENDIMENTO

O teste no local de atendimento (POC, do inglês *point-of-care*) refere-se ao diagnóstico realizado nas proximidades do atendimento ao paciente. Trata-se de nova estratégia inteligente para detecção em tempo real, rápida, precisa e no local de necessidade do paciente. Um diferencial dos dispositivos de detecção POC é a versatilidade de uso, podendo ser manuseados por profissionais de saúde ou pacientes, mesmo sem uma qualificação técnica, devido aos seus recursos de fácil utilização (KONWAR, Aditya Narayan; BORSE, V., 2020). A introdução do teste POC ocorreu em 1962, quando um método para análise rápida de glicose no sangue foi desenvolvido (CLARK; LYONS, 1962). Pouco tempo depois, em 1977, surgiram os primeiros testes rápidos de gravidez, que foram pioneiros na tendência de diagnóstico personalizado (GÖRETZLEHNER; RUDOLF, 1978).

Os avanços tecnológicos levaram ao desenvolvimento de vários dispositivos inovadores de diagnóstico POC, como a incorporação de nanomateriais para o desenvolvimento de ferramentas versáteis, a fim de melhorar seu desempenho. Dentro da família dos nanomateriais, os NTC são os mais utilizados em diversos dispositivos modernos como transdutores para o aperfeiçoamento de sistemas de

diagnóstico, devido à sua grande área superficial, alta condutividade elétrica e excelentes propriedades de transferência de elétrons (HELLER *et al.*, 2008; WANG, J., 2005).

Atenção especial deve ser dada à importância dos NTC funcionalizados para aplicações médicas, por exemplo, para diagnóstico e tratamento de câncer (YADAV, A. R.; MOHITE, 2020), doenças infecciosas (GUPTA; MURTHY, C. N.; PRABHA, 2018) e distúrbios do sistema nervoso central (XIANG *et al.*, 2020)(XIANG *et al.*, 2020). Quando aplicados a dispositivos eletrônicos, os NTC também aumentam significativamente a sensibilidade do transdutor, como por exemplo, para terapia de doenças virais (ZHU, S. *et al.*, 2019) e diagnóstico viral (MESKHER *et al.*, 2023), contribuindo assim para a rápida detecção de patógenos humanos e animais.

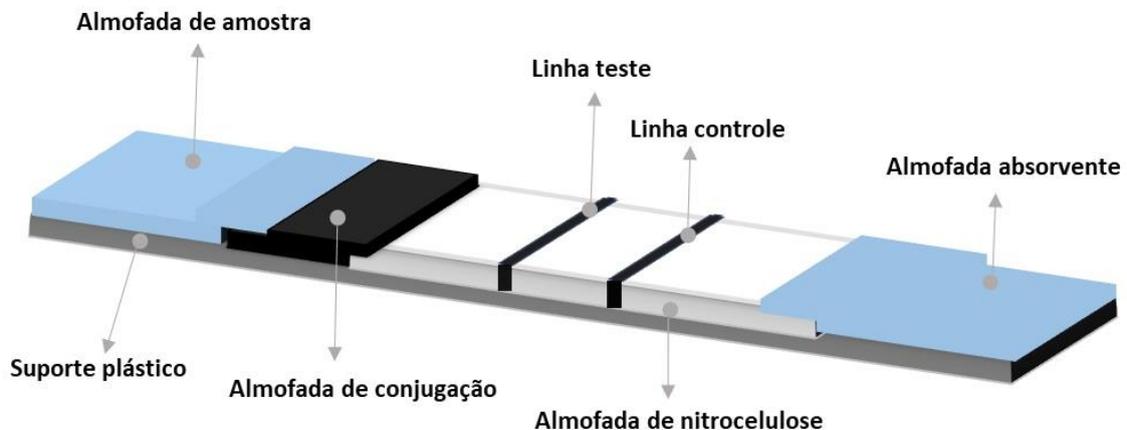
3.3 IMUNOSSENSOR DE FLUXO LATERAL

Nos últimos anos, os imunossensores de fluxo lateral (IFL), ou também conhecidos como testes rápidos, atraíram um interesse gigantesco pois oferecem detecção de analito de forma simples, rápida, portátil e de baixo custo (KASETSIRIKUL; SHIDDIKY; NGUYEN, N.-T., 2020; NARDO, DI *et al.*, 2021). IFL são atualmente os sensores POC mais utilizados para diagnóstico (BRANGEL *et al.*, 2018) e monitoramento viral (GRANT *et al.*, 2020; HSIAO, W. W.-W. *et al.*, 2021), assim como para outras áreas, incluindo análises ambientais (BERGUA *et al.*, 2021; QUESADA-GONZÁLEZ *et al.*, 2018) e aplicações de segurança alimentar (SENATORRALBA *et al.*, 2020).

Introduzidos pela primeira vez na década de 1970 e impulsionados pelo advento dos testes de gravidez caseiros, hoje os IFL ganharam um evidente destaque em diagnóstico em massa. A principal razão pela qual os IFL são tão populares é porque são feitos em substratos à base de papel. Os materiais à base de papel permitem a fabricação sustentável e de baixo custo, enquanto que em suas matrizes porosas fornecem um fluxo impulsionado por forças capilares, para que seja possível interações entre anticorpos e antígenos. Ademais, a utilização de um substrato flexível incentiva o desenvolvimento de diversas estratégias de nanossensores, como por

exemplo, sensor do tipo origami (SENA-TORRALBA *et al.*, 2020). A Figura 3 demonstra as principais partes de um IFL típico. Para resumir a sequência do ensaio, uma amostra líquida é colocada na almofada de amostra localizada na entrada da plataforma de teste para coletar a amostra. A membrana lateral, normalmente feita de nitrocelulose (NC), transporta então a amostra líquida através de ação capilar para a almofada conjugada. Na almofada conjugada, os antígenos da amostra interagem com os anticorpos conjugados da almofada, criando complexos antígeno-anticorpo marcado. O fluido da amostra então transporta esses complexos para a linha de teste, onde estão localizados os anticorpos de captura, e para a linha de controle, que verifica se o IFL está funcionando corretamente. A almofada absorvente atua como uma bomba de fluxo capilar para garantir que o fluxo persista após a membrana NC ficar saturada (SENA-TORRALBA *et al.*, 2020).

Figura 3. Esquema da distribuição das membranas absorventes, fibra de vidro e membrana de nitrocelulose após a montagem do sistema em fluxo lateral.



Fonte: A autora (2024).

Várias nanopartículas têm sido usadas como marcadores para detectar analitos utilizando ensaios de fluxo lateral. As nanopartículas de ouro (NPO) são o padrão para preparação de IFL e foram desenvolvidas para uma variedade de alvos (AMIRI *et al.*, 2018; KADHUM *et al.*, 2017; KAWDE *et al.*, 2010; YU, L. *et al.*, 2016). A abordagem de marcação convencional de fluxo lateral é um imunoenensaio no qual nanopartículas de ouro com uma propriedade única de superfície plasmônica mostram uma cor

vermelha nas linhas de teste e controle permitindo assim uma detecção qualitativa (HOU *et al.*, 2012; LÓPEZ_MARZO *et al.*, 2013). No entanto, devido à área superficial limitada das NPO, a sensibilidade do ensaio é frequentemente baixa. Embora estas estratégias de amplificação aumentem a sensibilidade dos IFL, as baixas concentrações de biomarcadores proteicos específicos em fluidos fisiológicos requerem IFL mais sensíveis. Numerosas nanopartículas, incluindo pontos quânticos, nanotubos de carbono, nanopartículas magnéticas, nanoenzimas, espalhamento Raman e nanopartículas de fluorescência, têm sido utilizadas nos processos de ensaios de fluxo lateral em todo o mundo (MOHAMMADINEJAD; ALEYAGHOOB; ERTAS, 2024).

3.3.1 IMUNOSENSORES DE FLUXO LATERAL BASEADO EM NTC

De forma geral, os IFL são baseados na detecção óptica, onde partículas ou enzimas marcadas fornecem geração ou amplificação de sinal visível. Normalmente, as NPO são os marcadores mais amplamente utilizado em IFL, e apresentam uma excelente biocompatibilidade, fácil preparação e capacidade de ligação à biomoléculas (BORSE, V. B. *et al.*, 2020). No entanto, devido à área superficial limitada das NPO, os ensaios muitas vezes sofrem de baixa sensibilidade e não são capazes de detectar proteínas com baixas concentrações no sangue. Além de que, a intensidade da cor vermelha das NPO é modificada pelo tamanho das partículas. NPO com tamanhos pequenos, como 30 nm, podem ser visualizadas em cor vermelha. À medida que o tamanho das partículas aumenta, podem ser vistas em cor azul ou roxo, dificultando a visualização dos resultados pela variabilidade da cor produzida, levando a falsos negativos e falsos positivos (SHAFIQA; ABDUL AZIZ; MEHRDEL, 2018). Em comparação com as NPO, os NTC possuem mais sítios de ligação devido à sua alta área superficial específica, sendo mais fáceis de conjugar com biomoléculas, como anticorpos para aumentar a sensibilidade do dispositivo. Além de mais barato, a cor preta dos NTC quando vista em contraste com o fundo branco da membrana dos IFL podem ser visualizados mais facilmente, tornando-os adequados para imunoenaios (POSTHUMA-TRUMPIE *et al.*, 2012; SUN, W. *et al.*, 2017).

Diversas pesquisas buscam explorar a propriedade de adsorção de biomoléculas na superfície dos NTC. Qiu *et al* relataram um IFL utilizando NTC funcionalizados com anticorpo para detecção ultrasensível de proteínas (QIU *et al.*, 2019). Assim como Abera *et al* que também obtiveram sucesso na detecção de proteína a partir de NTC conjugados à anticorpo utilizando um imunossensor quantitativo de fluxo lateral (ABERA; CHOI, J.-W., 2010). A utilização de testes rápidos mais sensíveis e com abordagens quantitativas, visando benefícios à sociedade, é um cenário cada vez mais promissor. Sun *et al* utilizaram NTC dispersos em surfactante para desenvolver ensaios quantitativos e semiquantitativos para detecção da droga sintética metanfetamina (SUN, W. *et al.*, 2017). Já Qiu *et al*, em outra publicação, utilizaram os NTC para detecção de sequência de DNA com alta sensibilidade e curto tempo de ensaio, demonstrando ser muito promissor para o diagnóstico de doenças genéticas (QIU *et al.*, 2015). Huang *et al* conseguiram detectar o antígeno carboidrato 19–9 (CA 19–9) ao utilizar as propriedades dos NTC ligados à partículas magnéticas para detectar pequenas concentrações do antígeno em sangue total (HUANG, Y. *et al.*, 2017), assim como também produziu um imunossensor para detecção do fator C do complemento utilizando NTC magnéticos (HUANG, Y. *et al.*, 2019). Devido à excelente característica dos NTC em adsorver moléculas em sua superfície, e seus notáveis resultados como marcador alternativo para IFL, este nanomaterial foi utilizado nesta dissertação em substituição às nanopartículas de ouro que são, atualmente, o padrão ouro nos testes rápidos convencionais.

3.3.2 DIAGNÓSTICO VIRAL UTILIZANDO IMUNOSSENSORES DE FLUXO LATERAL

A alta exposição a microrganismos como bactérias, vírus, fungos, algas e protozoários afetam a vida humana de maneiras favoráveis e prejudiciais, dependendo do ambiente e das condições naturais onde vivem (RANJAN SINGH; BABY MATHEW, 2014). Porém, as doenças infecciosas e virais constituem uma grande parte dos problemas médicos globais, sendo os países em desenvolvimento os mais afetados com essa situação. Nas últimas duas décadas, os humanos foram expostos a numerosos novos agentes virais e agentes virais reemergentes. Uma infinidade de fatores levam ao surgimento de uma doença infecciosa, mas podemos

resumir em apenas em três categorias: (i) a evolução e adaptação do vírus, (ii) fatores ecológicos e (iii) alterações no meio ambiente (KA-WAI HUI, 2006). O aumento na taxa de incidência de infecções virais emergentes e reemergentes e de doenças virais mortais afeta significativamente a saúde humana. Os vírus podem causar doenças respiratórias, intestinais, cutâneas, de órgãos únicos (por exemplo, fígado, pulmão, coração, etc.), multiorgânicas, neurológicas, hematológicas e imunossupressoras (PAYNE, 2017). Além disso, os vírus podem possuir a capacidade de alterar o material genético da célula hospedeira e causar tumores benignos e malignos (LOUTEN, 2016).

Devido à urgência e gravidade das infecções virais, são necessários métodos de detecção rápidos e precisos, fáceis de usar, e que possuam um baixo custo para garantir uma testagem em massa. Abordagens estabelecidas, como os métodos de detecção de patógenos envolvendo cultura de patógenos, imunoenaios, métodos bioquímicos, e métodos de amplificação baseados em ácidos nucleicos e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), são amplamente utilizados em ambientes clínicos. Embora esses métodos sejam altamente sensíveis e específicos, eles exigem equipamentos caros e operadores especializados e não possuem a rapidez dos métodos de detecção mais recentes (RITZI-LEHNERT, 2012; WANG, Yongzhong *et al.*, 2017). Aproximadamente dois bilhões de tiras de fluxo lateral são fabricadas anualmente para diagnóstico, em grande parte devido à imensa popularidade dos IFL em grandes surtos e pandemias virais como dengue, Zika, Chikungunya, e mais recentemente, a Covid-19, onde o teste se mostrou ser rápido e confiável, e que intensificou sua grande importância para prevenir a propagação de doenças virais à população e permitir uma intervenção imediata do paciente infectado (INCE; SEZGINTÜRK, 2022; LEE, D. *et al.*, 2016; MARTINEZ *et al.*, 2010).

3.4 IFL NO CENÁRIO DA PANDEMIA DA COVID-19

Em Dezembro de 2019, o surto da doença do coronavírus 2019 (COVID-19) se espalhou rapidamente pelo mundo, causando diversos danos à saúde e economia global (ZHU, N. *et al.*, 2020). A doença é causada pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), altamente transmissível, que já chegou a infectar mais de 770 milhões pessoas pelo mundo, segundo a Organização Mundial

da Saúde (VELAVAN; MEYER, 2020). Diante esse cenário, foi urgente a necessidade de uma ferramenta de diagnóstica rápida e precisa. Os imunossensores de fluxo lateral foram extensamente utilizados para testagem em massa da população e rápido isolamento do paciente infectado, evitando a transmissão para as demais pessoas.

Apesar dos IFL apresentarem grandes benefícios de testagem para a sociedade, foi percebido a ocorrência de falsos-positivos e baixa sensibilidade às mutações virais, sendo definidos como teste de triagem diagnóstica (GANS *et al.*, 2022). Um grande número de testes sorológicos e metodologias foram desenvolvidos em um curto período de tempo para minimizar os efeitos do vírus na sociedade, e isso impulsionou a evolução dos IFL na busca por ensaios cada vez mais sensíveis. Aliado a isso, esforços foram dedicados à promoção de medidas eficazes de controle e vacinação, prevenção e a contenção dos pacientes infectados que se mostraram ser ações significativamente eficazes (BUDD *et al.*, 2023). No entanto, a doença ainda não foi eliminada. A incerteza de novas mutações no vírus continua a ameaçar a segurança da saúde pública, e o surgimento de vírus altamente contagiosos é uma ameaça eminente.

Atualmente existem dois tipos de teste rápido para detecção da COVID-19, sendo eles, teste rápido para anticorpo e antígeno. Os testes rápidos para anticorpo podem ser para fase aguda da doença (IgG), ou para episódios pós infecção (IgM), e também podem servir para auxiliar no mapeamento da população imunizada (que já teve o vírus ou foi exposta a ele através da vacina). Já o teste rápido para antígeno determina qualitativamente pacientes infectados pelo vírus a partir de proteínas de superfície viral (ASLAN *et al.*, 2021).

Nos testes de antígenos proteínas virais são o alvo para detecção dos vírus. O vírus da doença COVID-19 é o Sars-CoV-2, um vírus de RNA fita simples que pertence à família *Coronaviridae*. Estruturalmente o vírus possui um envelope esférico de bicamada lipídica onde nela é ancorada a proteína spike (S), proteína de membrana (M) e envelope (E). No interior do envelope estão abrigados o material genético do vírus e a proteína nucleocapsídeo (N). O primeiro contato do vírus com a célula é mediado pelo reconhecimento do domínio peptidase da enzima conversora de angiotensina II (ECA2) do hospedeiro com a proteína spike viral. Embora que, qualquer uma das proteínas envolvidas na interação vírus-célula são críticos na

infecção por SARS-CoV-2 e fornecem alvos potenciais para métodos diagnóstico, a proteína spike exerce o papel primordial de ligação à célula do hospedeiro sendo escolhida como principal alvo nos IFL (LETKO; MARZI; MUNSTER, 2020).

3.4.1 ANTICORPOS PARA DETECÇÃO DA SPIKE

Os anticorpos são proteínas produzidas pelo sistema imunológico adaptativo de um animal para reconhecer antígenos específicos, como vírus, bactérias ou outros produtos químicos (MAYNARD; GEORGIU, 2000). Um dos principais desafios da construção de um ensaio de fluxo lateral altamente reprodutível surge da variabilidade entre os anticorpos. A obtenção desses anticorpos pode se dar de diferentes formas, e isso irá definir a definir o tipo de anticorpo e sua especificidade. Nos IFL são necessário três anticorpo: um anticorpo de detecção, um anticorpo de captura e um anticorpo que seja contra a espécie imobilizada na almofada de conjugado (SHYAM *et al.*, 2022).

Com o avanço no processo de desenvolvimento dos anticorpos se tornou possível produzir em laboratório os anticorpos monoclonais e policlonais. Os anticorpos policlonais são preparados a partir de animais imunizados. Eles consistem em misturas complexas de diferentes anticorpos produzidos por muitos clones de células B diferentes no animal. Em contraste, os anticorpos monoclonais são anticorpos específicos produzidos por um único clone de linfócitos B. Como resultado, os policlonais podem ter maior capacidade de reconhecimento devido a múltiplos tipos de anticorpos direcionados ao antígeno, enquanto os monoclonais são mais homogêneos, uma vez que têm como alvo exatamente um único epítipo (LIPMAN *et al.*, 2005).

A escolha do animal para a produção de anticorpos depende da espécie, podendo ser mamíferos ou aves, quantidade de anticorpo desejada, e principalmente da distância evolutiva entre as espécies. Os coelhos são os animais mais comuns, porque eles são geneticamente distintos das fontes de proteínas humanas e de camundongos (BIRCH; RACHER, 2006). Porém as aves tem atraído considerável atenção como fonte alternativa de anticorpos. Os anticorpos da galinha, chamados de IgY, são equivalentes à classe de IgG de mamífero e oferecem muitas vantagens em

relação aos anticorpos tradicionais de mamíferos (CARLANDER; STÅLBERG; LARSSON, 1999).

3.4.2 PRODUÇÃO DA IGY

Apesar da produção de anticorpos de mamíferos predominar, nas aves, os anticorpos produzidos em galinha possuem diversas vantagens, tais como obtenção de maior quantidade de IgY; menor custo; purificação relativamente simples; e maior facilidade de manejo dos animais (CRISTE; URCAN; CORCIONIVOSCHI, 2020). A produção de anticorpos IgY atende à necessidade de melhorias no manejo animal, uma vez que usa ovo de galinha em vez de mamíferos, levando a uma menor exposição ao sofrimento e a redução significativa no número de animais usados (SPILLNER *et al.*, 2012). Isso é possível porque os anticorpos IgY podem ser obtidos diretamente da gema de ovo de galinha por meio de métodos de purificação relativamente simples e de baixo custo. Isso evita a necessidade de sangrar ou abate dos animais utilizados para produção de anticorpos (TAN, S. H. *et al.*, 2012). Além disso, quando comparados a produção de IgG, uma gema de ovo pode produzir 100 mg adicionais de anticorpos IgY e, considerando que as galinhas poedeiras produzem quase 30 ovos por mês, uma única galinha pode substituir vários coelhos na produção de anticorpos (SCHADE *et al.*, 2005). Quando utilizados para fins de detecção de antígenos o IgY se mostram ser uma opção muito favorável, pois reagirá com mais epítomos num antígeno de mamífero, o que proporcionará uma amplificação do sinal (CHEN, C. J. *et al.*, 2022).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO 1

Um teste de fluxo lateral baseado em nanotubos de carbono fragmentados para detecção de SARS-CoV-2

Bárbara Silva Lima¹, Leda Castilho², Moacyr J. B. M. Rêgo³, Moacir Mauricio F. van-Tilburg⁴, Maria Izabel F. Guedes⁴, Rosa Fireman Dutra¹

¹ Laboratório de Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego 1235, Recife 50670-90, Brasil.

² Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

³ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

⁴ Laboratório de Bioquímica Humana, Universidade do Ceará, Fortaleza 60714-903, Brasil

Resumo

O teste rápido descrito é baseado em um teste de fluxo lateral que utiliza matrizes de fragmentos de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTC) conjugados à anticorpos para detectar biomarcadores em baixas concentrações (nanogramas/mililitro). Considerando que a infecção pelo coronavírus resultou em uma grave doença pandêmica devido à rápida transmissão, a detecção do vírus para isolar indivíduos contaminados foi umas das principais estratégias recomendadas para evitar a transmissão. A utilização de nanopartículas como os NTC possibilitou avanços na sensibilidade do teste, sendo demonstrados a partir da caracterização por microscopia eletrônica e espectroscopia. Anticorpo IgY anti-SARS-CoV-2 foi usado como sonda para o dispositivo de fluxo lateral devido à sua capacidade de detecção de múltiplos epítomos. Amostras de soro infectado foram usadas para confirmar a capacidade de detecção específica do vírus. Este dispositivo proposto tem a vantagem de usar NTC em vez de nanopartículas fluorescentes, de ouro ou magnéticas, que são mais estáveis e mais fáceis de funcionalizar para imobilizar proteínas.

Palavras-chave: Fragmento de nanotubo, teste de fluxo latera, IgY, Covid-19.

Introdução

Durante a pandemia de COVID-19, foram tomadas diversas medidas de contingência para evitar a rápida propagação da doença, uma vez que se tratava de uma infecção viral, com elevada taxa de transmissão (TANG *et al.*, 2020). Nesse sentido, quando a vacinação ainda não estava disponível, a testagem massiva e o isolamento do indivíduo eram as únicas medidas e foram adotadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para conter a pandemia (SHEREEN *et al.*, 2020). Os testes rápidos ou testes imunocromatográficos ganharam grande destaque na pandemia, pois comparados às metodologias PCR e analíticas laboratoriais, somente eles tinham a praticidade de uso e podiam ser operados em áreas remotas (BUDD *et al.*, 2023). No entanto, embora sejam amplamente utilizados na prática clínica de rotina, os imunoenaios de fluxo lateral (IFL) sempre foram considerados testes de triagem devido à sua baixa sensibilidade e especificidade diagnóstica. Durante a pandemia, muitos testes rápidos foram desenvolvidos para detectar a presença do vírus SARS-CoV-2 e inspecionados por critérios analíticos, passando a ser chamados de “testes rápidos assegurados” quando havia garantia de precisão e confiabilidade nos resultados (CHOI, J. R., 2020; ZHOU *et al.*, 2021).

Diante de um crescente aumento e a importância de um diagnóstico seguro, houve um grande esforço relacionado ao avanço no desenvolvimento de novos métodos analíticos que atenderiam à demanda, onde seriam produzidos rapidamente e de baixo custo, fáceis de processar e ainda seriam usados em áreas remotas (CHOI, J. R., 2020; VASHIST, 2020). Os nanotubos de carbono (NTC) têm atraído atenção significativa devido às suas propriedades físicas, químicas e elétricas, principalmente no segmento clínico (SOUSA *et al.*, 2020). Características do NTC como maior área de superfície contribui para uma maior imobilização de biomoléculas, o que o torna adequado para aplicações de detecções biomédicas (QIU *et al.*, 2015).

Neste estudo, exploramos a aplicação dos NTC como marcadores de anticorpos em teste de imunoenai de fluxo lateral para detecção do vírus Sars-CoV-2. Para utilizar as propriedades dos NTC para aplicações de imunossensor, a

funcionalização da superfície é necessária para dispersar uniformemente os NTC em solução. Anticorpos de coelho e de galinha foram utilizados para analisar a capacidade de ligação à superfície dos NTC. O anticorpo IgY anti-COVID-19 possibilitou uma maior sensibilidade do teste devido a capacidade de detecção dos anticorpos a múltiplos epítomos do vírus, permitindo o aumento da avidéz na detecção do antígeno em baixas concentrações a partir do soro de pacientes infectados. A espectroscopia UV-vis e microscopia de eletrônica de varredura foram utilizadas para caracterizar o processo de dispersão. As propriedades promissoras dos NTC em IFL levam a novas perspectivas futuras para sua aplicação em diferentes análises, como a avaliação quantitativa a partir da variação da condutividade dos NTC.

Materiais e métodos

Reagentes

Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (pureza > 95% em peso) foram adquiridos da Dropsens (Oviedo, ESP), imunoglobulina de coelho (IgG), anticorpo monoclonal anti-IgG de coelho produzido em camundongo (Ab1), anti-IgG de coelho policlonal (Ab2), e anti-IgG de camundongo produzido em cabra (Ab3) foram obtidas da Rhea Biotech (São Paulo, Brazil), IgY anti-spike fornecidos pela Laboratório de Bioquímica Humana (Universidade do Ceará), IgG anti-spike monoclonal e IgG policlonal foram fornecidos pelo Departamento de Engenharia Química (Universidade Federal do Rio de Janeiro). Fiber glass (GFDX203000) (20 cm x30 cm), membranas de nitrocelulose (HFC13502) e cartões laminados (HF000MC100) foram adquiridos da Millipore (Irlanda, IRL). Cloridrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), N-hidroxissulfosuccinimida (NHS), albumina sérica bovina (BSA), Na₃PO₄-12H₂O foram adquiridos da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EUA, <https://www.sigmaaldrich.com/>). Triton X-100, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foram adquiridos da Neon (São Paulo, Brasil, <https://neoncomercial.com.br/>). Sacarose e lauril sulfato de sódio (SDS) foram adquiridos da Vetec (Santa Catarina, Brasil, <https://metaquimica.com/>). Tween 20 foi adquirido da empresa Thermo Fisher BioReagentes (Maharashtra, Índia, <https://www.thermofisher.com/>). N,N-Dimetilformamida (DMF, 99,8%) fornecido pela Dinâmica (São Paulo, Brasil, <https://www.dinamicaquimica.com.br/>). Solução salina tamponada com fosfato (PBS 0,01 M, pH 7,4) e solução tampão de ácido 3-

morfolinopropano 1-sulfônico (MOPS, 0,01M, pH 6,5) foram utilizados sem purificação adicional. As soluções utilizadas foram preparadas com água deionizada do sistema de purificação de água Millipore Milli-Q (Billerica, MA, EUA, <http://www.emdmillipore.com/>).

Produção de anticorpos de IgY anti-SARS-CoV2

A produção de IgY foi realizada de acordo com ARAÚJO, 2007; PEREIRA *et al.*, 2019). Resumidamente, galinhas da raça Legorne de 7 semanas foram imunizadas com SARS-CoV-2 inativado inoculado por doses. Os ovos foram coletados diariamente por 2 meses, sendo utilizada a clara do ovo para processamento e produção dos anticorpos provenientes de galinha.

Funcionalização e fragmentação dos NTC

Inicialmente, 10 mg de NTC foram tratados com 4,8 mL de H₂SO₄ e 1,6 mL de HNO₃ sob ultrasonicação vigorosa por 3 horas. Em seguida, foi retirada a solução ácida excedente e os NTC foram redistribuídos em tubos e preenchidos com água deionizada e levados à centrifugação numa velocidade de agitação de 10.000 RPM por 15 minutos. Este procedimento foi repetido seis vezes, aumentando progressivamente a velocidade de agitação até alcançar 15.000 RPM ou até que a solução de lavagem alcançasse um pH de aproximadamente 6. Após a desacidificação, os fragmentos de NTC (F-NTC) foram secos em estufa à 80°C, permitindo uma pesagem segura para os demais procedimentos.

Dispersão dos fragmentos de NTC

Para redução dos efeitos de agregação, diferentes surfactantes foram testados como dispersantes: Tween-20, Triton x-100, CTAB, SDS e Dimetilformamida (DMF). Neste estudo, 0,5 mg de F-NTC foram dispersos em 1 mL de cada reagente e

ultrasonificados por 2 horas em banho de gelo, obtendo uma mistura escura e homogênea. Os experimentos foram analisados em 3 etapas distintas de dispersão dos NTC: na primeira e segunda etapa foram avaliadas concentrações altas fixas e concentrações baixas variáveis dos dispersantes, respectivamente. Na terceira etapa foram feitas oito concentrações de NTC entre 15-50 µg/mL, variando-se entre 5 µg/mL, monitorando a solubilidade dos nanocompósitos em DMF puro, afim de estabelecer uma referência da relação entre absorvância e concentração, a partir de análises de espectroscopia UV-vis.

Obtenção dos conjugados de F-NTC

Os anticorpos anti-IgY foram imobilizados sobre os F-NTC após a ativação com EDC/NHS, produzindo os conjugados. Seguida à etapa de dispersão, os F-NTC dispersos em DMF (0.5 mg/mL) foram centrifugados em 15.000 RPM por 10 minutos e removido o sobrenadante, em seguida foi acrescentado 1 mL da mistura de EDC (0.05 mM) e NHS (0.04 mM) preparada em tampão MOPS (0.1 M, pH 6.5). Para ativação dos grupos carboxílicos, solução contendo F-NTC foi então incubada à temperatura ambiente e submetida à agitação leve em um orbital durante 15 minutos. Após esta etapa, os F-NTC ativados foram incubados com os anticorpos, previamente após centrifugação à 10.000 RMP (10 min) e remoção do excesso de solução. A reação de imobilização foi realizada por incubação *over-night* em refrigerador, à 4°C. Em seguida, os derivados imobilizados de F-NTC foram centrifugados a 5.000 RPM durante 5 minutos para lavagem e remoção de anticorpos não conjugados remanescentes, e ressuspenso em 1 mL de tampão de conjugação (0,05% de Tween-20 e 1% BSA em PBS pH:7,4) e armazenado a 4°C para utilização posterior.

Previamente à incubação da fibra de vidro com os anticorpos, ela foi tratada embebendo-a com tampão PBS adicionado de tween-20 (0,3%) e sacarose (5%). Em seguida, sobre as fibras de vidro foram realizadas as incubações de soluções preparadas em PBS 0.01 M (pH 7.4) com anti IgY-SARS-CoV-2 e anti-IgG de coelho monoclonal produzido em camundongo, respectivamente. A fibra de vidro foi colocada sobre uma superfície de vidro, e sobre ela pipetada uma solução de anticorpos conjugados aos F-NTC. A reação sobre a fibra de vidro ocorreu em 30 min a 37°C, até a secagem.

Montagem do teste de tira lateral à base de F-NTC

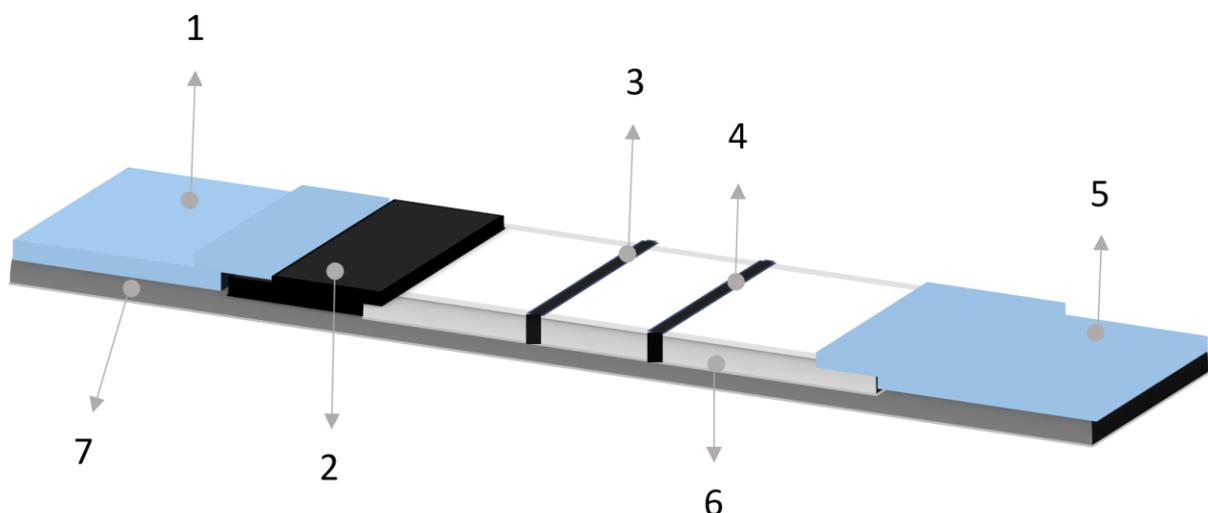
Antes da montagem do cassete contendo o IFL, as almofadas de amostra e absorvente foram tratadas embebendo-as em tampão PBS contendo tween-20 (0,05%) e BSA (0,5%).

As tiras controle e teste foram preparadas pipetando uma solução de anticorpos sobre a membrana de nitrocelulose. Da mesma forma, a fibra de vidro foi incubada pipetando uma solução de conjugados de anti-IgG de coelho e anti IgY de SARS-CoV-2. Após a incubação as fibras de vidro e almofadas foram deixadas em estufa a 37°C, por 20 minutos.

As linhas teste e controle foram realizadas dispensando manualmente 1,5 µL das soluções de anticorpos secundários. Em seguida a membrana foi seca a 37°C por 1h e mantidas a 4°C.

Após o preparo das membranas, fibras de vidro com conjugados e membrana de nitrocelulose, eles foram montados sobre uma superfície plástica autocolante (25 x 30 mm), cortados em tiras de 3 mm em uma *automatic cutter* (Eximio, Shanghai) e armazenado em um ambiente com umidade controlada (Drybox). Na Figura 4 é exibido um desenho esquemático dos componentes e montagem do teste.

Figura 4. Esquema de montagem do teste de fluxo lateral: 1- almofada de amostra, 2- fibra de vidro, 3- linha teste, 4- linha controle, 5- almofada de absorção, 6- membrana de nitrocelulose, 7- suporte plástico.



Procedimento de ensaio

Para o teste de reação, foram utilizadas amostras de soros de pacientes diagnosticados por método molecular infectados por Sars-Cov-2. As amostras foram colhidas de indivíduos após assinarem o termo de consentimento livre esclarecido, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob protocolo número 4.383.724 CAAE 32874720.8.2001.0021.

Os ensaios do IFL foram realizados aplicando na almofada de amostra 50µL de amostra contendo a proteína alvo e 50µL tampão de corrida (PBS tween-20 0,5%) e deslocando a solução em um fluxo contínuo até o final da tira reativa durante 15 minutos. Posteriormente, anticorpo marcado com NTC irá identificar a presença do antígeno e se ligar a ele, formando o complexo antígeno-anticorpo marcado. Na membrana, o complexo antígeno-anticorpo marcado é capturado pelo anticorpo imobilizado na linha teste, e seu excesso, migra para linha controle e é capturado pelo anticorpo secundário. Finalizando o teste ao chegar na almofada de absorção. O resultado positivo do teste se dá pelo acúmulo de complexo e marcação na linha teste e controle. Já o resultado negativo, pela ausência do antígeno na amostra, apenas haverá marcação da linha controle.

Equipamentos Utilizados

O ultrassonicador utilizado foi produzido pela Elmasonic E Plus em potência de 240W (Fisher Scientific, Germany). Espectômetro AvaSpec-2048 (Avantes, EUA). Microscópio eletrônico de varredura (MEV) MIRA3 foi produzido pela empresa Tescan (EUA).

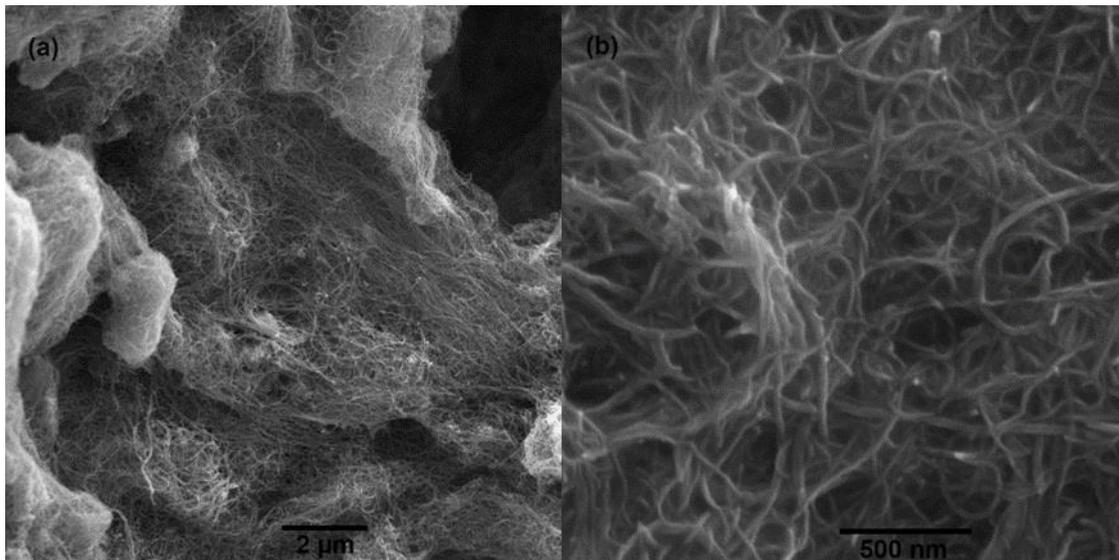
Resultados e discussão

Caracterização dos NTC

A Figura 5 apresenta imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos NTC antes e depois do encurtamento com ácidos. As amostras foram preparadas

sobre uma lamínula de vidro. Pode-se perceber que o comprimento médio dos NTC não encurtados é de cerca de 2 a 10 μm (Fig 5a), e o comprimento dos nanotubos encurtados é de cerca de 500 a 1000 nm (Fig 5b). O comprimento dos NTC foi reduzido significativamente após o tratamento ácido, tornando possível explorar ainda mais as propriedades do nanocompósito em sua forma encurtada.

Figura 5. Imagens de MEV dos nanotubos de carbono de múltiplas camadas: (a) não encurtados e (b) encurtados.



Considerando-se que a agregação de NTC pode prejudicar o deslocamento dos conjugados sobre a membrana imunocromatográfica, bem como pode resultar em pipetagens errôneas, uma das etapas importantes no desenvolvimento do teste de fluxo lateral utilizando F-NTC foi a escolha do agente de dispersão, neste caso, o surfactante que têm a capacidade de reduzir a tensão superficial entre o líquido e os fragmentos de NTC. Para isso, foram testados surfactantes com diferentes cargas dos grupos cabeças, sendo aniônico, catiônico e neutro, determinando qual método de dispersão é o mais eficaz na obtenção de NTC altamente solúveis. Desta forma, foram utilizados o composto orgânico dimetilformamida (DMF) e quatro surfactantes: Tween-20, Triton x-100, CTAB e SDS.

Os experimentos foram divididos em três etapas para melhor análise dos dados. Na primeira etapa todos os 4 surfactantes foram utilizados na concentração de 1%, e o DMF foi utilizado em sua forma pura (99,8%), utilizando concentrações fixas

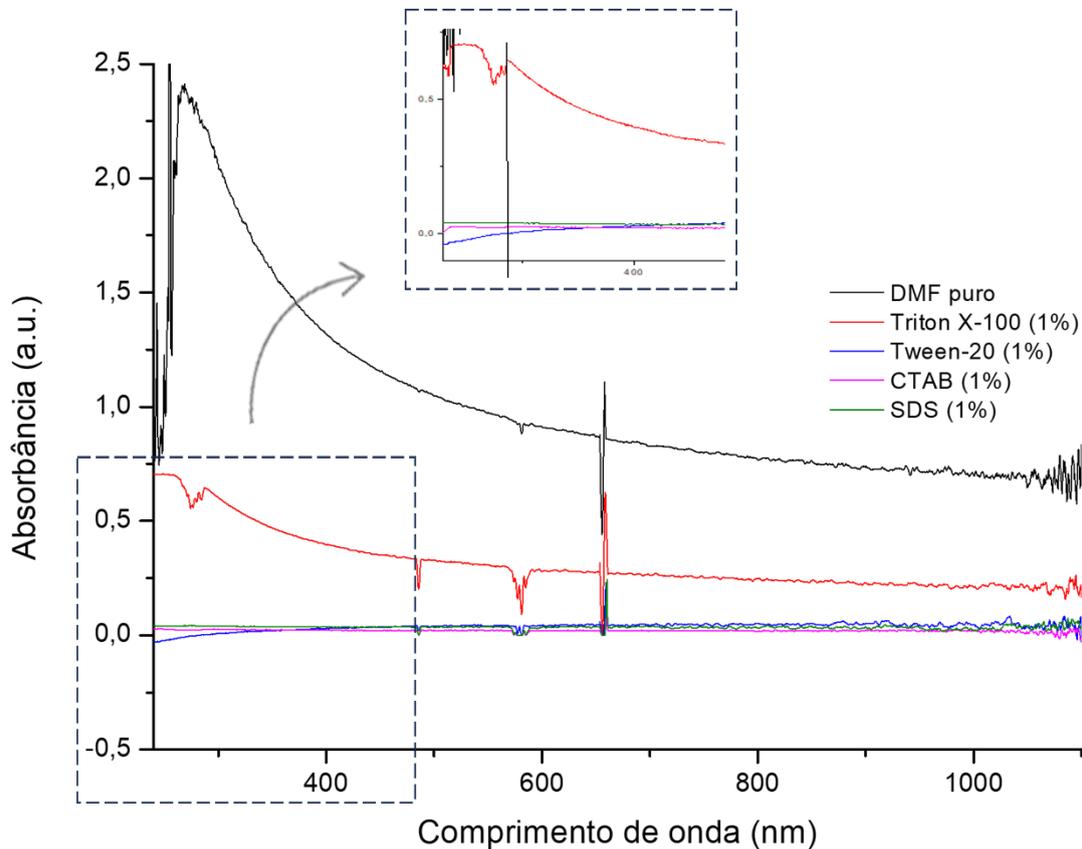
de NTC. Na segunda etapa, foi analisado se a concentração do dispersante acarretava em mudanças na solubilidade do nanocompósito. Na terceira etapa foram feitas várias concentrações de NTC solubilizados. As análises de dispersão dos NTC foram feitas utilizando espectroscopia de absorvância na região do ultravioleta-visível (UV-vis) (AvaSpec-2048) em uma faixa de absorvância entre 250-1110 nm, onde foi utilizado o solvente de cada solução como referência para avaliar apenas a quantidade de NTC individuais dispersos em solução.

Estudo de agentes dispersantes e carreadores de NTC

Os NTC exibem absorção característica na região UV-vis, que está associada à concentração de NTC suspensos em solução e à intensidade do espectro de absorção correspondente. A princípio, as soluções de NTC foram dispersas em DMF e nos quatro surfactantes, submetidas a 2 horas de sonicator, e diluídas na proporção adequada para análise. Em seguida, as soluções foram analisadas por UV-vis e sua absorvância foi detectada. Nas medições de UV-vis, os NTC exibem picos característicos na região espectral ultravioleta, enquanto apenas NTC individuais dispersos estão ativos na região UV-vis. Desta forma, quanto maior o valor de absorvância, maior será a concentração de NTC dispersos. A análise das amostras está sendo representada pela Figura 6, quando se pode observar que o DMF se destacou notavelmente entre todos os outros dispersantes, obtendo um pico de absorção máxima em torno de 260 nm, o que já é descrito na literatura. Para efeito de comparação, foi feita uma aproximação (linhas tracejadas) e inserido no gráfico. Com isso, pode-se observar um pico de absorção menor e um pouco deslocado em torno de 280 nm para o Triton X-100, não obtendo resultado significativo. O DMF superou em cerca de 4 vezes o Triton X-100, comparando os valores de seus picos.

Já os surfactantes Tween-20, CTAB e SDS obtiveram praticamente os mesmos resultados, não apresentando picos na região de absorção dos NTC. A partir dos resultados obtidos, é possível indicar que a dispersabilidade dos NTC foi melhor alcançada pelo solvente orgânico DMF em sua forma pura (PA).

Figura 6. Espectro UV-vis de NTC (0,25 mg/mL) dispersos em: DMF (linha preta); Triton X-100 (linha vermelha); Tween-20 (linha azul); CTAB (linha roxa); SDS (linha verde). A inserção em linhas tracejadas mostra uma aproximação de uma determinada área do gráfico.



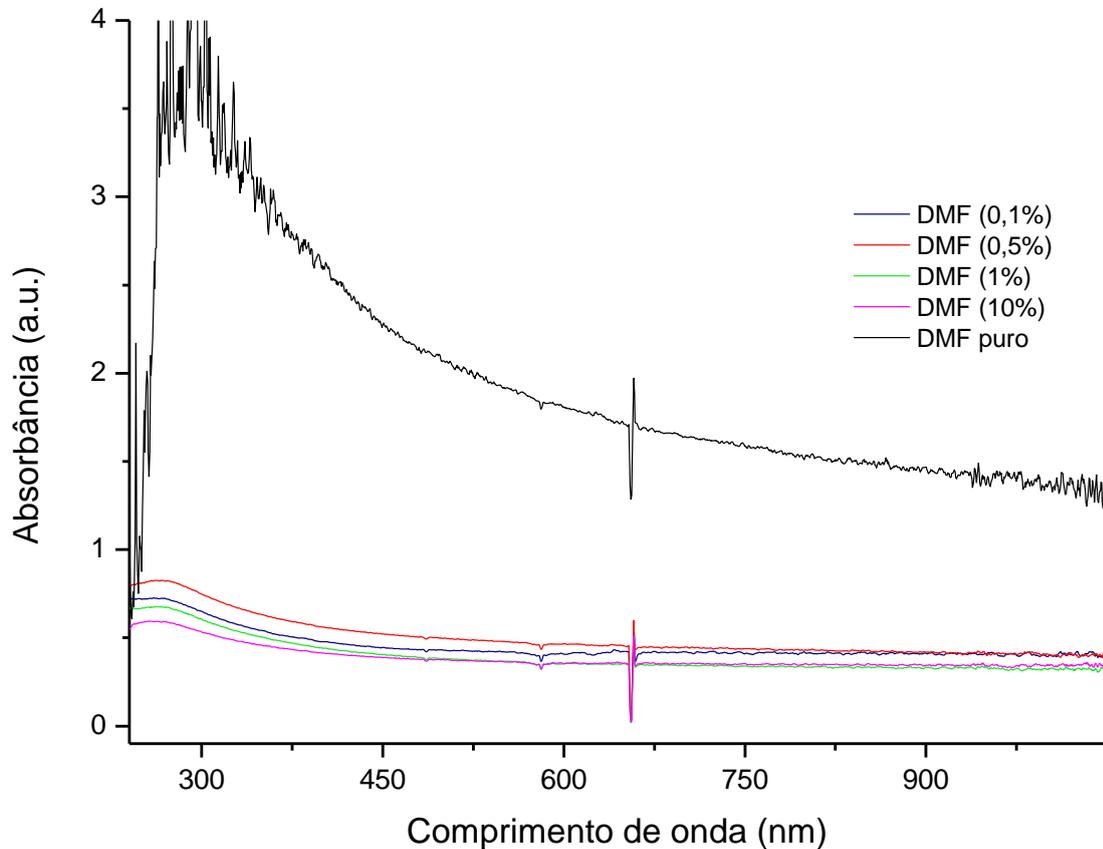
O DMF é uma pequena molécula orgânica, solvente polar aprótico e inerte, composta por grupos amida e grupos metil. Os grupos amida e os grupos metil correspondem aos grupos hidrofílicos e aos grupos hidrofóbicos, respectivamente, e com isso, aumenta a capacidade dos grupos amida em formar ligações de hidrogênio. A dispersão dos NTC dependeu principalmente da quebra da forte atração de van der Waals entre os tubos pelas moléculas de DMF, o que pode enfraquecer a força de ligação entre os NTC e dispersar melhor com o auxílio de sonicação.

A quantidade de solvente é um fator chave que afeta diretamente a solubilidade dos NTC. Um estudo recente publicado por Baomin *et al* demonstrou que a concentração relativa dos compostos dispersantes, ou seja, a relação dispersante/NTC nas suspensões é um parâmetro crítico. Seus experimentos foram realizados utilizando concentração baixas de DMF para dispersar NTC, variando percentualmente entre 0,6 à 0,9% (BAOMIN WANG; BO PANG, 2020). Tomando

como referência a metodologia de dispersão de Baomin, foi necessário fazer uma segunda etapa de avaliação para analisar se seria mais viável utilizar o DMF puro ou diluído em baixas concentrações. Na Figura 7 está plotado um gráfico indicando a variação dos picos de absorção dos NTC com a variação da concentração de DMF de 0,1; 0,5; 1 e 10%, comparada ao solvente puro. É notória a diferença do pico de absorção do DMF puro, quando comparado os picos correspondentes às concentrações abaixo de 10%, o que contradiz a metodologia de Wang. Isto pode ter acontecido porque pequenas quantidades de DMF não conseguiram recobrir nem separar eficientemente os NTC. O mesmo fundamento não pode ser extrapolado para os surfactantes, onde foi percebido por Alafogianni *et al* que soluções contendo surfactantes como dispersantes, requerem baixas concentrações de partículas, pois quantidades excessivas levarão à formação de micelas de surfactante redundantes, recobrando completamente os tubos de carbono, e inviabilizando seu uso como marcador biológico (ALAFOGIANNI et al., 2016).

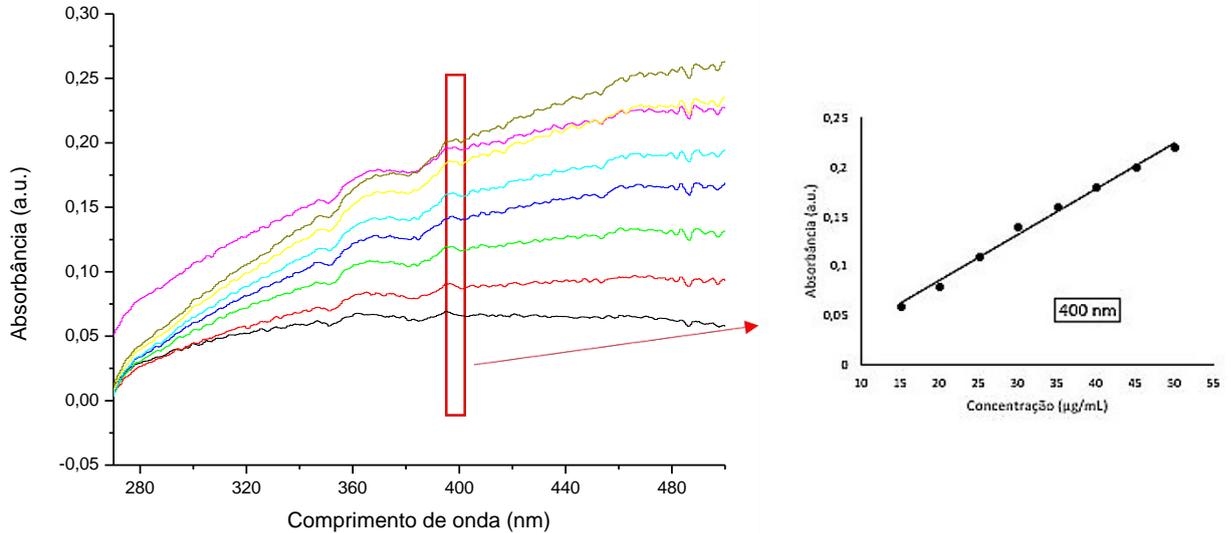
Desta forma, o solvente escolhido para dispersão eficiente dos NTC foi o DMF puro, sendo o melhor para formar partículas menores e menos agregadas. Os ruídos apresentados na faixa que representa o pico de absorção máxima do DMF puro foram devidos a perturbações externas às leituras.

Figura 7. Espectro de absorção UV-vis de NTC (0,25 mg/mL) disperso em diferentes concentrações de DMF: 0,1% (linha azul); 0,5% (linha vermelha); 1% (linha verde); 10% (linha rosa); puro (linha preta).



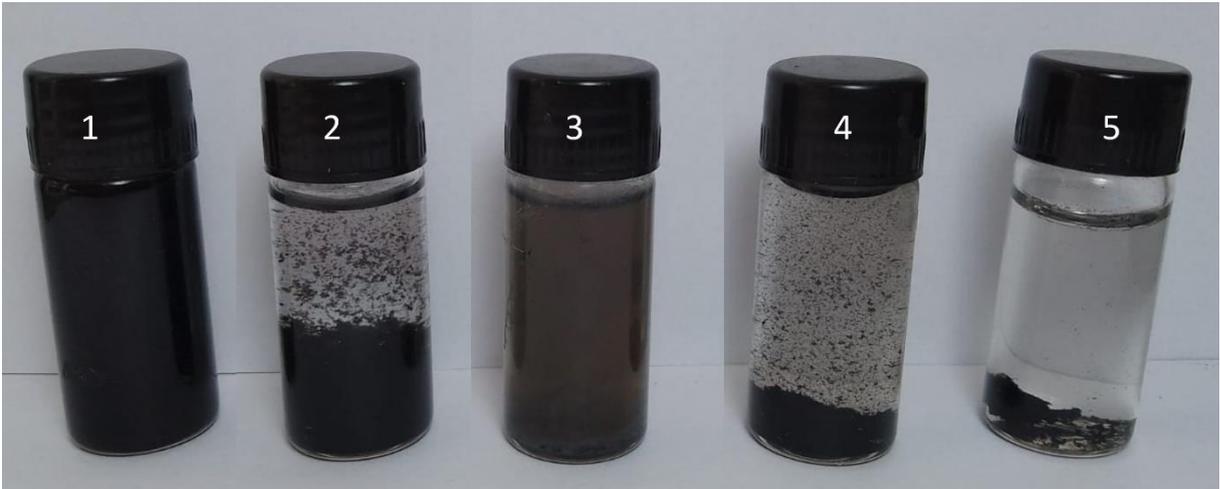
Em soluções com baixas concentrações de NTC, a absorbância obtida pela espectroscopia UV-Vis pode ser linearmente relacionada à sua concentração, conforme descrito pela Lei de Lambert-Beer. Para estabelecer uma referência da relação entre absorbância e concentração, foram feitas as oito concentrações de NTC entre 15-50 $\mu\text{g/mL}$, monitorando a solubilidade dos nanocompósitos em DMF puro por espectroscopia UV-vis. Observou-se uma relação linear entre a absorbância e as concentrações das soluções de NTC ($y = 0,0046x - 0,0071$, $R^2 = 0,9933$) no comprimento de onda de 400 nm, demonstrado na Figura 8. Os resultados obtidos foram consistentes com relatório anterior (LEE, J. U. et al., 2007).

Figura 8. Espectros de absorção UV-vis das soluções NTC em diferentes concentrações dispersos em DMF puro: 15 $\mu\text{g/mL}$ (linha preta), 20 $\mu\text{g/mL}$ (linha vermelha), 25 $\mu\text{g/mL}$ (linha verde claro), 30 $\mu\text{g/mL}$ (linha azul), 35 $\mu\text{g/mL}$ (linha cianeto), 40 $\mu\text{g/mL}$ (linha amarela), 45 $\mu\text{g/mL}$ (linha rosa) e 50 $\mu\text{g/mL}$ (linha verde escuro). A imagem inserida: curva linear de concentração com absorbância a 400 nm.



O tempo de estocagem dos NTC dispersos também foi analisado em função da estabilidade da dispersão. Após a dispersão em DMF e nos quatro surfactantes nas concentrações propostas, os NTC foram guardados em temperatura ambiente e sem manuseio durante uma semana, como observado na Figura 9. O primeiro tubo contendo NTC dispersos em DMF continua apresentando uma coloração preta e sem acúmulo do nanocompósito no fundo. Já os tubos 2, 3, 4 e 5 contendo os surfactantes: Triton X-100, Tween-20, CTAB e SDS, respectivamente, sofreram com a precipitação dos NTC, o que corrobora com os resultados obtidos por UV-vis que evidenciaram o baixo poder de dispersão destes surfactantes quando comparados ao DMF.

Figura 9. Tubos de ensaio contendo NTC disperso em diferentes dispersantes após uma semana de estoque. (1) DMF, (2) Triton X-100, (3) Tween-20, (4) CTAB e (5) SDS.

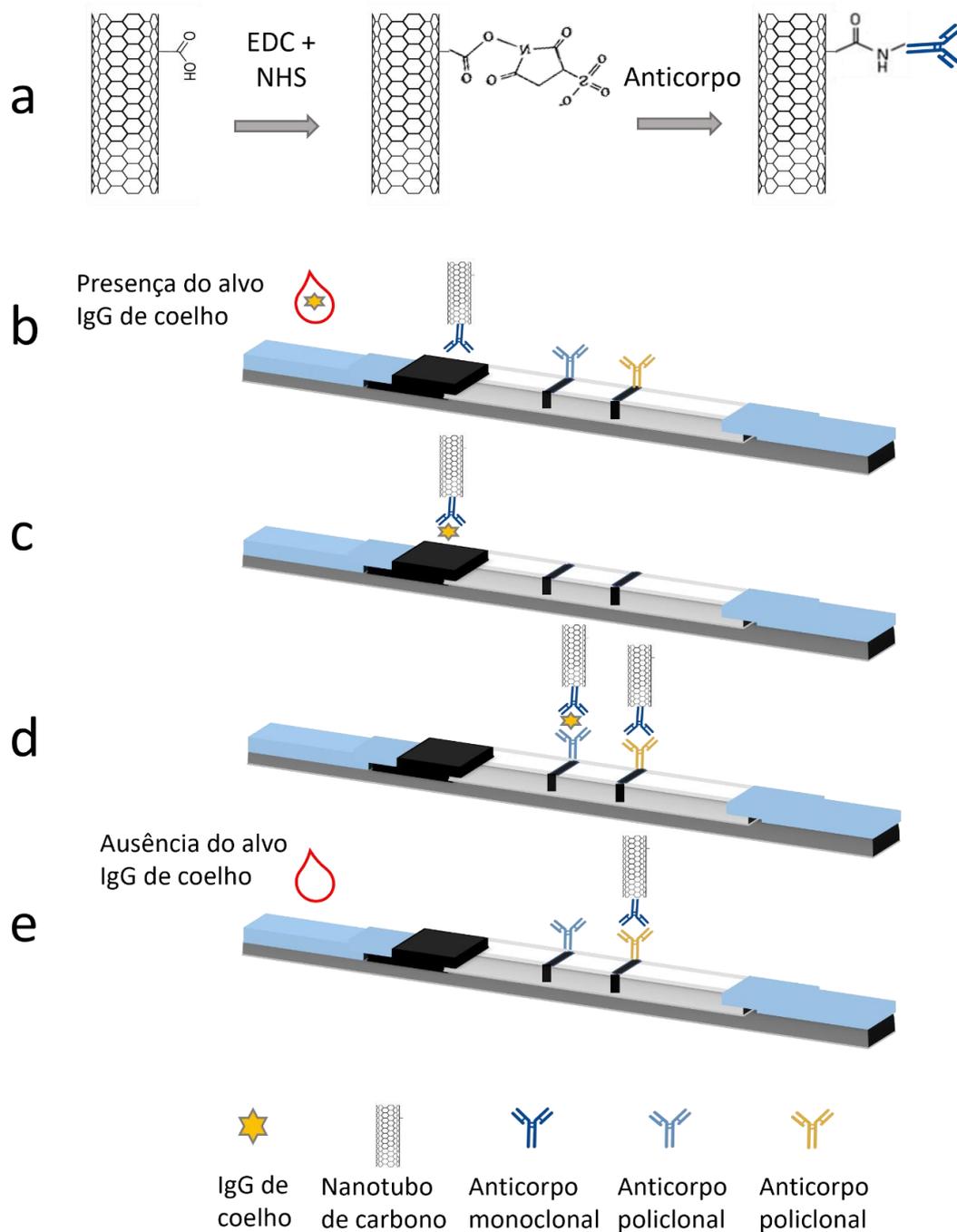


Princípio do IFL baseado em NTC

O princípio de funcionamento do IFL baseado em NTC é ilustrado na Figura 10. Anticorpo IgG de coelho e anti-IgG foram utilizados como modelo para demonstrar a prova de conceito. Os NTC carboxilados foram funcionalizados com anticorpo anti-IgG (Ab1) pela química de carbodiimidas EDC/NHS, que favoreceu a ligação entre os grupos carboxílicos na superfície do NTC e grupos amino do anticorpo (Figura 10a). A solução contendo a proteína alvo (IgG de coelho) foi aplicada na almofada de amostra e deslocada através da tira por ação da capilaridade (Figura 10b). O alvo interage primeiro com o conjugado NTC-Ab1 e ocorre uma imunorreação entre o IgG de coelho da amostra e o anti-IgG na superfície do NTC. Essa interação formou o complexo NTC—anti-IgG—IgG que migrou ao longo da tira teste (Figura 10c). Ao alcançar a linha teste, o anti-IgG policlonal (Ab2) pré-imobilizado interagiu com o IgG de coelho do complexo em um segundo evento de imunorreação. Foi formada a primeira faixa escura característica da tira, devido ao acúmulo de NTC na linha teste (Figura 10d). A intensidade da faixa preta que aparece na linha de teste depende da concentração do alvo IgG de coelho. À medida que a solução continua o fluxo e passa pela linha de controle, o excesso de conjugado NTC-Ab1 pelo anticorpo policlonal secundário anti-IgG de camundongo (Ab3) pré-imobilizado (Figura 10e). Desta maneira, na presença do alvo, duas faixas pretas são observadas a olho nu. Na

ausência do alvo, apenas a linha controle foi observada, devido a captura do conjugado NTC-Ab1 pelo anti-IgG (Ab3), o que garante o correto funcionamento do teste.

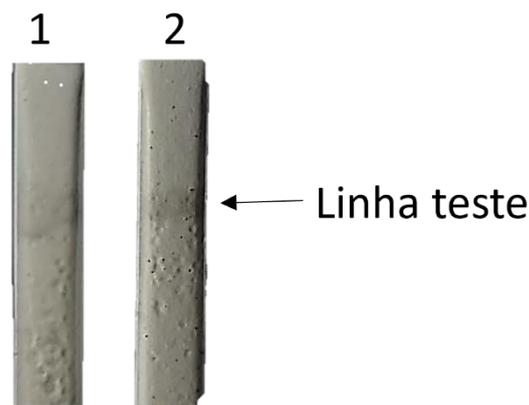
Figura 10. Desenho esquemático de IFL utilizando F-NTC. (a) ativação dos grupos carboxílicos dos NTC a partir do EDC/NHS, para posterior conjugação ao anticorpo. (b) aplicação da amostra contendo o alvo. (c) captura do alvo pelo conjugado. (d) interação do alvo-conjugado com o anticorpo da linha teste e controle. (e) ausência do alvo na amostra formando apenas a linha controle.



Otimização de parâmetros do ensaio

Uma das etapas mais importantes do IFL é a conjugação dos NTC com os anticorpos de interesse, uma vez que este conjugado terá afinidades distintas com a molécula alvo dependendo do quão eficiente foi realizada a conjugação. Desta forma, foi feito teste utilizando NTC não funcionalizados e NTC funcionalizados com EDC/NHS (0,05 e 0,04 mM, respectivamente). Na figura 11 são apresentadas duas tiras onde foram utilizados anticorpos Ab1 imobilizados em NTC funcionalizados com EDC/NHS (tira 1) e não funcionalizados (tira 2). As tiras foram confeccionadas utilizando o alvo IgG de coelho como amostra e Ab2 na linha teste para interação com os conjugados analisados. Os NTC funcionalizados com EDC/NHS (tira 1) pareceu demonstrar uma maior eficiência na imobilização dos anticorpos ao NTC, melhorando a estabilidade e seletividade do conjugado ao seu alvo, e conseqüentemente, aumentando seu acúmulo na linha teste ao interagir com os anticorpos específicos, provavelmente atribuída a uma ligação covalente entre os F-NTC e os anticorpos.

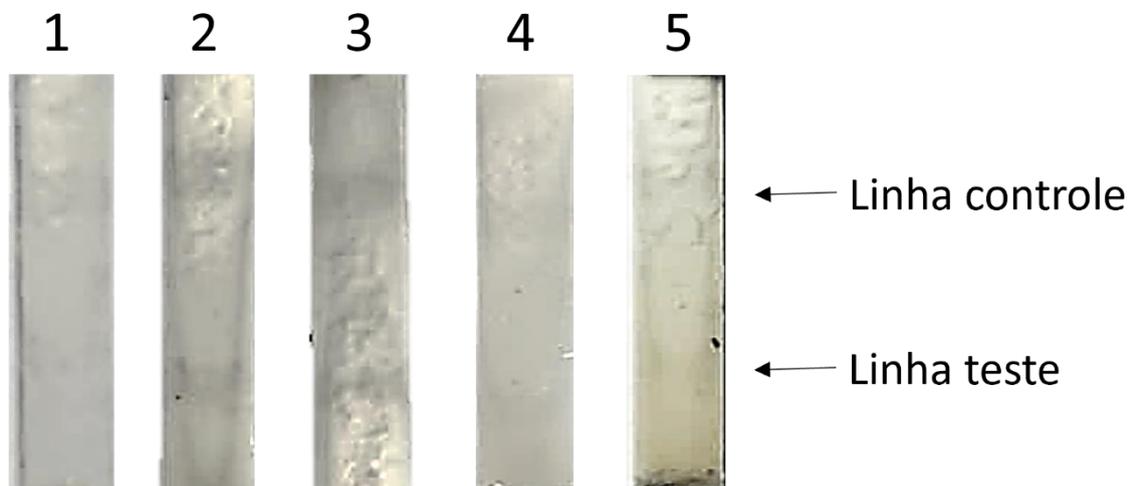
Figura 11. Fluxo lateral utilizando NTC funcionalizados com EDC/NHS (tira 1) e NTC não funcionalizados (tira 2) para imobilização de anticorpos Ab1.



Após carboxil-funcionalizados os F-NTC, foram testadas diferentes concentrações do anticorpo Ab1 para conjugação. Na Figura 12 é exibida imagens de tiras com concentrações de anticorpos Ab1 em 0, 1, 5, 25 e 50 µg. A tira 1 é o controle negativo, que não apresentou marcação em preto na linha teste, pois não foi adicionado o alvo na solução de amostra. As tiras 2 e 3 são as concentrações de 1 e 5 µg, e apresentaram marcações na linha teste bem similares, sendo preconizada

como padrão de conjugação a menor de concentração entre elas. Já as tiras 4 e 5, com 25 e 50 μg respectivamente, vão diminuindo a faixa de marcação na linha teste com o aumento da concentração de Ab1 no nanotubo, o que é explicado pelo sobrecarga dos anticorpos nas paredes do NTC, impedindo a ligação com o alvo. Em todas as tiras pode-se observar a marcação da linha controle, validando os resultados obtidos nos testes.

Figura 12. Tiras de fluxo lateral utilizando NTC conjugado em diferentes concentrações de anticorpo Ab1. Tira 1 representa o fluxo dos NTC não conjugados; Tira 2 (1 μg); Tira 3 (5 μg); Tira 4 (25 μg); Tira 5 (50 μg).

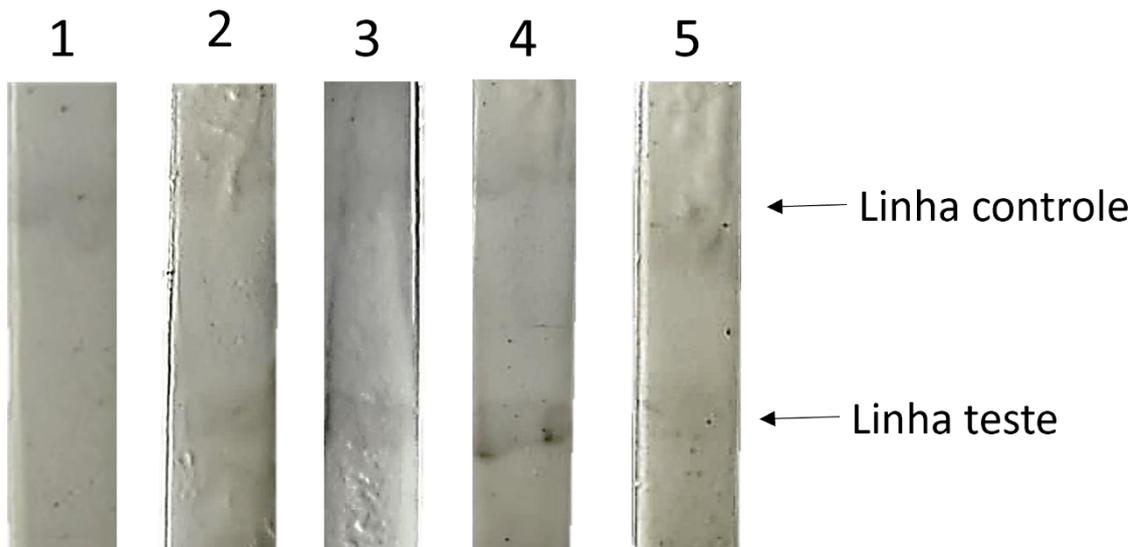


Reatividade da Linha Controle

Com base nas condições experimentais otimizadas, soluções de amostras com diferentes concentrações de IgG de coelho foram testadas no F-NTC-IFL. A Figura 13 apresenta as imagens fotográficas típicas do IFL baseado em NTC funcionalizados com anticorpos anti-IgG de coelho após serem testados com diferentes concentrações do alvo IgG de coelho (0,01; 0,1; 1 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). É possível observar que na tira 1, onde não há o alvo, houve a marcação da linha controle, porém a linha teste não marcou, indicando a confiabilidade do teste. As demais tiras reativas tiveram a intensidade da linha de teste mais visível e marcada com o aumento da concentração de IgG alvo até 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (tira 4), e depois pareceu saturar na concentração mais elevada de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A linha teste é bastante visível, mesmo na presença de 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IgG alvo, o que pode ser utilizado como limiar para a detecção visual de IgG

de coelho. Desta forma é possível afirmar que o teste desenvolvido pode medir concentrações na ordem de $0,01 \mu\text{g/mL}$ sendo, portanto, mais sensível que os testes convencionais IFL usando nanopartículas de ouro.

Figura 13. Ensaio de fluxo lateral na presença de diferentes concentrações de IgG de coelho. (1) controle negativo. (2) $0,01 \mu\text{g/mL}$. (3) $0,1 \mu\text{g/mL}$; (4) $1 \mu\text{g/mL}$; (5) $10 \mu\text{g/mL}$.

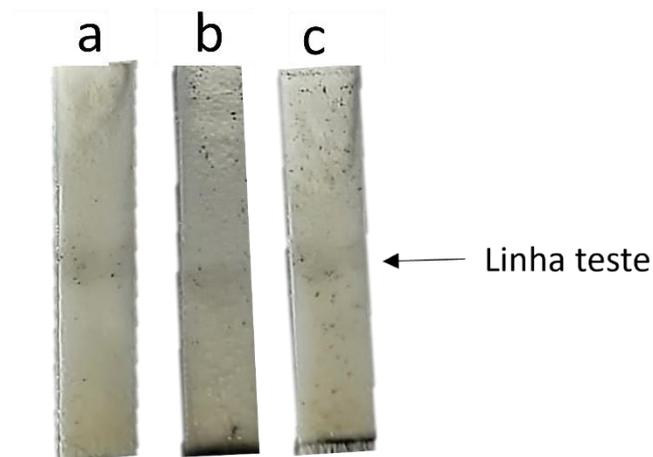


Reatividade da linha teste (detecção de SARS-COV2)

Foi realizada a corrida no fluxo lateral utilizando anticorpos de COVID, visando analisar a atividades dos diferentes anticorpos contra a proteína Spike do vírus. Os anticorpos utilizados para conjugação com os NTC foram: o IgG anti-Spike monoclonal, o IgG anti Spike policlonal produzido em camundongo, assim com um anticorpo IgY anti SARS-COV2. Foi utilizado $1 \mu\text{g/mL}$ de cada anticorpo para conjugação com os F-NTC. Já a proteína Spike do vírus serviu como antígeno e foi imobilizada na linha teste do imunossensor na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$. Com isso foi possível verificar a capacidade da reação de afinidade do anticorpo conjugado ao seu antígeno, com posterior formação do complexo antígeno-NTC-anticorpo na linha teste. Na Figura 14 são exibidas as tiras correspondentes aos anticorpos utilizados, sendo (a) NTC-anti-spike monoclonal, (b) NTC-anti-spike policlonal e (c) NTC-IgY anti-spike. Todas as tiras mostraram reatividade na linha teste, mostrando que a forte interação dos anticorpos ao NTC serve como sonda para ligação específica com o a proteína Spike. Anticorpos de imunoglobulina G (IgG) de mamíferos (coelhos,

camundongos, etc.) são comumente empregados como ligantes biológicos em imunoenaios, porém já se encontram relatos recentes que comprovam que o anticorpo de gema de ovo de galinha (imunoglobulina Y, IgY) pode funcionar como uma alternativa poderosa ao IgG para construir imunoenaios com alto desempenho (DOU *et al.*, 2022). Ao considerar o bem-estar animal, requisitos técnicos e custos, a IgY oferece diversas vantagens, como ser não invasiva, potencial de produção em larga escala, baixo custo, além de ter sensibilidade e alta especificidade em comparação com a IgG (PEREIRA *et al.*, 2019). Desta forma, o anticorpo escolhido para conjugação com o NTC foi o IgY anti-spike, visando a amplificação do sinal no processo de imunoensaio com a proteína do vírus.

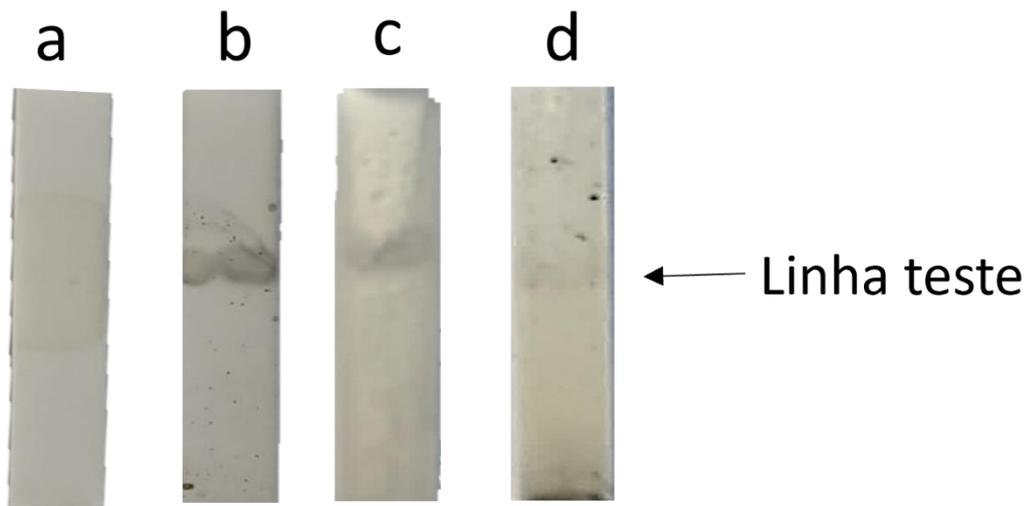
Figura 14. Tiras de fluxo lateral utilizando NTC conjugado a diferentes anticorpos contra a proteína Spike do vírus COVID. (a) NTC conjugado a anti-Spike monoclonal. (b) NTC conjugado a anti-Spike policlonal. (c) NTC conjugado a IgY anti-Spike.



Ensaio com amostras biológicas de pacientes soros positivos e negativos para a COVID-19 mostraram reatividades às diferentes diluições investigadas. Para os ensaios, utilizou as diluições 1:2, 1:10 e 1:100. A Figura 15 apresenta resultados das tiras contendo o conjugado de NTC-IgY e o soro dos pacientes immobilizados na linha teste para analisar a aplicabilidade do ensaio em amostra biológica. Pode-se observar que na tira (a) onde é representado o controle com soro de paciente negativo, não houve reação com conjugado, mostrando que o IgY anti-COVID-19 baseado em múltiplos epítomos, é específico para amostras positivas de infectados. Além disso, já nas demais tiras positivas a marcação da tira teste, observa-se que a quantidade dos

NTC conjugados vai tornando-se menos evidente com as diluições do soro do paciente, onde a tira (b) representa a maior diluição 1:2, (c) 1:10, e até em diluição de 1:100 (d) foi possível ver uma faixa escura na linha teste. Ou seja, em níveis séricos mais baixos que os testes usando ouro coloidal.

Figura 15. Ensaio utilizando soro negativo para Covid-19 (a), e diluições do soro positivo em (b) 1:2, (c) 1:10 e (d) 1:100.



Com os resultados obtidos pode-se evidenciar a capacidade de reconhecimento do conjugado NTC-IgY utilizando soro como amostra, além de conseguir distinguir pacientes com diagnóstico clínico positivo e negativo para a proteína Spike do vírus da COVID-19.

Conclusão

Neste estudo, foi desenvolvido um IFL baseado em fragmentos de nanotubos de carbono. A IgY anti-SARS-CoV-2 apresentou reatividade com as amostras de soros, e alta sensibilidade analítica, permitindo mensurar concentrações na ordem de nanogramas/mililitro. Acredita-se que o êxito tenha sido devido a otimização das etapas importantes, como a escolha correta do agente dispersantes. O IFL baseado em NTC abre assim uma nova possibilidade para nova geração de testes rápidos para antígeno, mostrando-se muito promissor para o diagnóstico do

vírus Sars-CoV-2 a partir sua proteína Spike. Trabalhos futuros terão como objetivo a detecção quantitativa por meio da variação da condutividade com a presença dos F-NTC.

Agradecimentos

Este trabalho foi suportado pelo CNPq, Grant 311651/2022-4 e o Ministério da Educação e Cultura (MEC), Brasil (Proc. 23076.052927/2022-36 SIPAC). Bárbara Silva Lima agradece a FACEPE pela bolsa de mestrado.

Referências

- A. Cláudia Marinho da Silva, C.M. Lima Amaral, M.A. Maestre Herazo, E. Nattaly Nobre Santos, E. Petterson Viana Pereira, H. Paula Silva da Costa, E. Rodrigues Freitas, C. Renata Figueiredo Gadelha, M. Izabel Florindo Guedes, M. Fraga van Tilburg, Production and characterization of egg yolk antibodies against the ZIKV NS2B expressed in *Nicotiana benthamiana*, *Int Immunopharmacol* 125 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.111088>.
- B. De Meulenaer, A. Huyghebaert, Isolation and Purification of Chicken Egg Yolk Immunoglobulins: A Review, *Food Agric Immunol* 13 (2001) 275–288. <https://doi.org/10.1080/09540100120094537>.
- Baomin Wang, Bo Pang, The Influence of N,N-Dimethylformamide on Dispersion of Multi-Walled Carbon Nanotubes, *Russian Journal of Physical Chemistry A* 94 (2020) 810–817. <https://doi.org/10.1134/S0036024420040019>.
- C. Parolo, A. Sena-Torralba, J.F. Bergua, E. Calucho, C. Fuentes-Chust, L. Hu, L. Rivas, R. Álvarez-Diduk, E.P. Nguyen, S. Cinti, D. Quesada-González, A. Merkoçi, Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays, *Nat Protoc* 15 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0357-x>.
- J. Budd, B.S. Miller, N.E. Weckman, D. Cherkaoui, D. Huang, A. Thomas Decruz, N. Fongwen, G.-R. Han, M. Broto, C.S. Estcourt, J. Gibbs, D. Pillay, P. Sonnenberg, R. Meurant, M.R. Thomas, N. Keegan, M.M. Stevens, E. Nastouli, E.J. Topol, A.M. Johnson, M. Shahmanesh, A. Ozcan, J.J. Collins, M. Fernandez Suarez, B. Rodriguez, R.W. Peeling, R.A. Mckendry, Lateral flow test engineering and lessons learned from COVID-19, *Nature Reviews Bioengineering* | 1 (2023) 13–31. <https://doi.org/10.1038/s44222-022-00007-3>.
- J.R. Choi, Development of Point-of-Care Biosensors for COVID-19, *Front Chem* 8 (2020). <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00517>.
- J.U. Lee, J. Huh, K.H. Kim, C. Park, W.H. Jo, Aqueous suspension of carbon nanotubes via non-covalent functionalization with oligothiophene-terminated poly(ethylene glycol), *Carbon* N Y 45 (2007) 1051–1057. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2006.12.017>.

L. Dou, Y. Zhang, Y. Bai, Y. Li, M. Liu, S. Shao, Q. Li, W. Yu, J. Shen, Z. Wang, Advances in Chicken IgY-Based Immunoassays for the Detection of Chemical and Biological Hazards in Food Samples, *J Agric Food Chem* 70 (2022) 976–991. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c06750>.

L.W. Zhang, M.F. Kai, K.M. Liew, Evaluation of microstructure and mechanical performance of CNT-reinforced cementitious composites at elevated temperatures, *Compos Part A Appl Sci Manuf* 95 (2017) 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2017.02.001>.

M.A. Shereen, S. Khan, A. Kazmi, N. Bashir, R. Siddique, COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses, *J Adv Res* 24 (2020) 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005>.

N. Anzar, R. Hasan, M. Tyagi, N. Yadav, J. Narang, Carbon nanotube - A review on Synthesis, Properties and plethora of applications in the field of biomedical science, *Sensors International* 1 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2020.100003>.

P. Alafogianni, K. Dassios, S. Farmaki, S.K. Antiohos, T.E. Matikas, N.-M. Barkoula, On the efficiency of UV–vis spectroscopy in assessing the dispersion quality in sonicated aqueous suspensions of carbon nanotubes, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 495 (2016) 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.01.053>.

S. Rathinavel, K. Priyadharshini, D. Panda, A review on carbon nanotube: An overview of synthesis, properties, functionalization, characterization, and the application, *Mater Sci Eng B Solid State Mater Adv Technol* 268 (2021) 115095. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2021.115095>.

S. Wei, S. Duan, X. Liu, H. Wang, S. Ding, Y. Chen, J. Xie, J. Tian, N. Yu, pingju Ge, xinglin Zhang, X. chen, Y. Li, Q. Meng, Chicken Egg Yolk Antibodies (IgYs) block the binding of multiple SARS-CoV-2 spike protein variants to human ACE2, *Int Immunopharmacol* 90 (2021) 107172. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107172>.

S.K. Vashist, In Vitro Diagnostic Assays for COVID-19: Recent Advances and Emerging Trends, *Diagnostics* 10 (2020) 202. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10040202>.

W. Qiu, K. Baryeh, S. Takalkar, W. Chen, G. Liu, Carbon nanotube-based lateral flow immunoassay for ultrasensitive detection of proteins: application to the determination of IgG, *Microchimica Acta* 186 (2019). <https://doi.org/10.1007/S00604-019-3508-4>.

W. Tan, Y. Lu, J. Zhang, J. Wang, Y. Dan, Z. Tan, X. He, C. Qian, Q. Sun, Q. Hu, H. Liu, S. Ye, X. Xiang, Y. Zhou, W. Zhang, Y. Guo, X.H. Wang, W. He, X. Wan, F. Sun, Q. Wei, C. Chen, G. Pan, J. Xia, Q. Mao, Y. Chen, G. Deng, Viral kinetics and antibody responses in patients with COVID-19, *MedRxiv* (2020). <https://doi.org/10.1101/2020.03.24.20042382>.

Y. Morinaga, H. Yamada, Y. Yoshida, H. Kawasuji, Y. Yamamoto, Analytical sensitivity of six lateral flow antigen test kits for variant strains of SARS-CoV-2, *Journal of Infection and Chemotherapy* 29 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2022.10.004>.

Y. Sakai-Tagawa, S. Yamayoshi, P.J. Halfmann, Y. Kawaoka, Comparative sensitivity of rapid antigen tests for the delta variant (B.1.617.2) of sars-cov-2, *Viruses* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/v13112183>.

Y. Zhou, Y. Wu, L. Ding, X. Huang, Y. Xiong, Point-of-care COVID-19 diagnostics powered by lateral flow assay, (2021). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116452>.

Y.-W. Tang, J.E. Schmitz, D.H. Persing, C.W. Stratton, Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges, *J Clin Microbiol* 58 (2020). <https://doi.org/10.1128/JCM.00512-20>.

5 CONCLUSÕES

A utilização de nanotubos de carbono modificados e tratados com DMF, sob efeitos da sonicação, obtidos através da metodologia desenvolvida neste trabalho se mostrou bem promissora em sistemas de fluxo lateral. Estes nanotubos possuem uma boa estabilidade sem formação de aglomerados visíveis de nanotubos de carbono, superando dificuldades descritas quanto a manutenção da solubilidade desses nanomateriais.

A caracterização destes nanotubos por MEV e espectroscopia de UV-Vis permitiram identificar diferentes grupos de nanotubos de carbono após a solubilização, a maioria em sua forma encurtada. A conjugação dos NTC carboxilados se deu de forma eficiente, possibilitando que estes NTC possam ser funcionalizados com anticorpos para aplicações em imunoenaios, como para a detecção da COVID-19. A utilização do anticorpo IgY anti-COVID-19 possibilitou uma maior sensibilidade do teste devido a capacidade de detecção dos anticorpos a múltiplos epítomos do vírus, permitindo o aumento da avidéz na detecção do antígeno em baixas concentrações a partir do soro de pacientes infectados.

Por fim, fica comprovada a aplicação de nanotubos de carbono para aplicação em teste de lateral, abrindo novas perspectivas para sua aplicação em diferentes análises, como a avaliação quantitativa a partir da variação da condutividade dos NTC em biossensores eletroquímicos associados às vantagens dos testes rápidos.

6 SÚMULA CURRICULAR

- Participação no I Congresso On-line Luso-Brasileiro de Ciências Laboratoriais com o trabalho “Desenvolvimento de eletrodos impressos baseados em compostos de grafeno para aplicação em biossensores eletroquímicos” em 2022.
- Participação no I Encontro do PPGCB com o trabalho “Desenvolvimento de teste rápido baseado em imunossensor para detecção de imunoglobulinas contra COVID-19” em 2022.
- Ministrou a palestra “Importância do diagnóstico clínico das anemias na atenção básica de saúde” realizada pela UNIP-Universidade Paulista em 2022.
- Ministrou a palestra “Biossensores: A ciência aplicada no diagnóstico clínico” realizada pela IPESU/FAREC em 2022.
- Ministrou a palestra “Leucemia linfocítica crônica (LLC): Diagnóstico clínico e laboratorial” realizada pelo Centro Universitário do Recife – UNIPESU em 2023.
- Ministrou a palestra “Atenção laboratorial aos resultados críticos nas dosagens bioquímicas” realizada pelo Centro Universitário do Recife – UNIPESU em 2023.
- Ministrou a palestra “Avanços biotecnológicos voltados para as técnicas de análises clínicas” realizada pelo Centro Universitário do Recife – UNIPESU em 2023.
- Participação no II Encontro do PPGCB com o trabalho “Imunoensaio de fluxo lateral baseado em nanotubos de carbono para diagnóstico de COVID-19” em 2023.

7 REFERÊNCIAS

ABEBE, B. *et al.* Synthesis and characterization of ZnO/PVA nanocomposites for antibacterial and electrochemical applications. **Inorganic and Nano-Metal Chemistry**, 3 ago. 2021. v. 51, n. 8, p. 1127–1138.

ABERA, A.; CHOI, J.-W. Quantitative lateral flow immunosensor using carbon nanotubes as label. **Analytical Methods**, 2010. v. 2, n. 11, p. 1819. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c0ay00412j>>.

AMIRI, A. *et al.* A review on liquid-phase exfoliation for scalable production of pure graphene, wrinkled, crumpled and functionalized graphene and challenges. **FlatChem**, mar. 2018. v. 8, p. 40–71. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452262718300047>>.

ANGELIKOPOULOS, P.; BOCK, H. The science of dispersing carbon nanotubes with surfactants. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 2012. v. 14, n. 27, p. 9546. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c2cp23436j>>.

ANZAR, N. *et al.* Carbon nanotube - A review on Synthesis , Properties and plethora of applications in the field of biomedical science. **Sensors International**, 2020. v. 1, n. February, p. 100003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sintl.2020.100003>>.

ARAÚJO, A. S. **PRODUÇÃO DE ANTIVENENO BOTRÓPICO EM OVOS DE GALINHA**. [S.l.]: Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/SSLA-7UCJ8X/1/disserta_ao_imprensa.pdf>.

ASLAN, Ö. *et al.* Evaluation of anti-SARS-CoV-2 antibody levels: two different methods. **Revista da Associação Médica Brasileira**, abr. 2021. v. 67, n. 4, p. 597–601. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302021000500597&tIng=en>.

BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. Lateral flow assays: Principles, designs and labels. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, set. 2016. v. 82, p. 286–306. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993616300668>>.

BAOMIN WANG; BO PANG. The Influence of N,N-Dimethylformamide on Dispersion of Multi-Walled Carbon Nanotubes. **Russian Journal of Physical Chemistry A**, 16 abr. 2020. v. 94, n. 4, p. 810–817. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1134/S0036024420040019>>.

BERGUA, J. F. *et al.* Lateral flow device for water fecal pollution assessment: from troubleshooting of its microfluidics using bioluminescence to colorimetric monitoring of generic *Escherichia coli*. **Lab on a Chip**, 2021. v. 21, n. 12, p. 2417–2426. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=D1LC00090J>>.

BIRCH, J. R.; RACHER, A. J. Antibody production. **Advanced Drug Delivery Reviews**, ago. 2006. v. 58, n. 5–6, p. 671–685. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X06000883>>.

BORSE, V. B. *et al.* Perspectives of characterization and bioconjugation of gold nanoparticles and their application in lateral flow immunosensing. **Drug Delivery and Translational Research**, 4 ago. 2020. v. 10, n. 4, p. 878–902. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s13346-020-00771-y>>.

BRANGEL, P. *et al.* A Serological Point-of-Care Test for the Detection of IgG Antibodies against Ebola Virus in Human Survivors. **ACS Nano**, 23 jan. 2018. v. 12, n. 1, p. 63–73. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.7b07021>>.

BUDD, J. *et al.* Lateral flow test engineering and lessons learned from COVID-19. **Nature Reviews Bioengineering**, 19 jan. 2023. v. 1, n. 1, p. 13–31. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s44222-022-00007-3>>.

CARLANDER, D.; STÅLBERG, J.; LARSSON, A. Chicken Antibodies. **Upsala Journal of Medical Sciences**, 18 jan. 1999. v. 104, n. 3, p. 179–189. Disponível em: <<https://ujms.net/index.php/ujms/article/view/6604>>.

CHEN, C. J. *et al.* Affordable IgY-based antiviral prophylaxis for resource-limited settings to address epidemic and pandemic risks. **Journal of Global Health**, 26 fev. 2022. v. 12, p. 05009. Disponível em: <<http://jogh.org/documents/2022/jogh-12-05009.pdf>>.

CHOI, J. R. Development of Point-of-Care Biosensors for COVID-19. **Frontiers in Chemistry**, 27 maio. 2020. v. 8. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2020.00517/full>>.

CLARK, L. C.; LYONS, C. ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 15 out. 1962. v. 102, n. 1, p. 29–45. Disponível em: <<https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>>.

CONLEY, K.; KARTTUNEN, A. J. Bridging the Junction: Electrical Conductivity of Carbon Nanotube Networks. **The Journal of Physical Chemistry C**, 13 out. 2022. v. 126, n. 40, p. 17266–17274. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcc.2c03904>>.

CRISTE, A.; URCAN, A. C.; CORCIONIVOSCHI, N. Avian IgY antibodies, ancestors of mammalian antibodies – production and application. **Romanian Biotechnological Letters**, 30 abr. 2020. v. 25, n. 2, p. 1311–1319. Disponível em: <<https://www.e-repository.org/rbl/vol.25/iss.2/1.pdf>>.

DOU, L. *et al.* Advances in Chicken IgY-Based Immunoassays for the Detection of Chemical and Biological Hazards in Food Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2 fev. 2022. v. 70, n. 4, p. 976–991. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.1c06750>>.

GANS, J. S. *et al.* False-Positive Results in Rapid Antigen Tests for SARS-CoV-2. **JAMA**, 1 fev. 2022. v. 327, n. 5, p. 485. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2788067>>.

GIRIFALCO, L. A.; HODAK, M.; LEE, R. S. Carbon nanotubes, buckyballs, ropes,

and a universal graphitic potential. **Physical Review B**, 15 nov. 2000. v. 62, n. 19, p. 13104–13110. Disponível em: <<https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevB.62.13104>>.

GÖRETZLEHNER, G.; RUDOLF, K. [50 years ago--1927--the 1st demonstration of chorionic gonadotropin in the urine of pregnant women by Aschheim and Zondek]. **Zentralblatt fur Gynakologie**, 1978. v. 100, n. 10, p. 638–41. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/354280>>.

GRANT, B. D. *et al.* SARS-CoV-2 Coronavirus Nucleocapsid Antigen-Detecting Half-Strip Lateral Flow Assay Toward the Development of Point of Care Tests Using Commercially Available Reagents. **Analytical Chemistry**, 18 ago. 2020. v. 92, n. 16, p. 11305–11309.

GUO, Jiuchuan *et al.* Nanomaterial Labels in Lateral Flow Immunoassays for Point-of-Care-Testing. **Journal of Materials Science & Technology**, jan. 2021. v. 60, p. 90–104. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1005030220305259>>.

GUPTA, S.; MURTHY, C. N.; PRABHA, C. R. Recent advances in carbon nanotube based electrochemical biosensors. **International Journal of Biological Macromolecules**, mar. 2018. v. 108, p. 687–703. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017324224>>.

HELLER, I. *et al.* Identifying the Mechanism of Biosensing with Carbon Nanotube Transistors. **Nano Letters**, 1 fev. 2008. v. 8, n. 2, p. 591–595. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nl072996i>>.

HOU, S.-Y. *et al.* MicroRNA detection using lateral flow nucleic acid strips with gold nanoparticles. **Talanta**, set. 2012. v. 99, p. 375–379. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914012004614>>.

HSIAO, W. W.-W. *et al.* Recent Advances in Novel Lateral Flow Technologies for Detection of COVID-19. **Biosensors**, 25 ago. 2021. v. 11, n. 9, p. 295.

HUANG, Y. *et al.* Lateral flow assay for carbohydrate antigen 19–9 in whole blood by using magnetized carbon nanotubes. **Microchimica Acta**, 25 nov. 2017. v. 184, n. 11, p. 4287–4294. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00604-017-2464-0>>.

_____ *et al.* Magnetized Carbon Nanotube Based Lateral Flow Immunoassay for Visual Detection of Complement Factor B. **Molecules**, 30 jul. 2019. v. 24, n. 15, p. 2759. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/24/15/2759>>.

HUANG, Y. Y.; TARENTJEV, E. M. Dispersion of Carbon Nanotubes: Mixing, Sonication, Stabilization, and Composite Properties. **Polymers**, 23 jan. 2012. v. 4, n. 1, p. 275–295. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2073-4360/4/1/275>>.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, nov. 1991. v. 354, n. 6348, p. 56–58.

INCE, B.; SEZGINTÜRK, M. K. Lateral flow assays for viruses diagnosis: Up-to-date technology and future prospects. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, dez. 2022. v. 157, p. 116725. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993622002084>>.

KA-WAI HUI, E. Reasons for the increase in emerging and re-emerging viral infectious diseases. **Microbes and Infection**, mar. 2006. v. 8, n. 3, p. 905–916. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457905003187>>.

KADHUM, M. J. *et al.* Polymer-Stabilized Multi-Walled Carbon Nanotube Dispersions in High-Salinity Brines. **Energy & Fuels**, 18 maio. 2017. v. 31, n. 5, p. 5024–5030. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.energyfuels.7b00522>>.

KASETSIRIKUL, S.; SHIDDIKY, M. J. A.; NGUYEN, N.-T. Challenges and perspectives in the development of paper-based lateral flow assays. **Microfluidics and Nanofluidics**, 12 fev. 2020. v. 24, n. 2, p. 17. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10404-020-2321-z>>.

KAWDE, A.-N. *et al.* Moving Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay to the Point-of-Care Dry-Reagent Strip Biosensors. **American Journal of Biomedical Sciences**, jan. 2010. p. 23–32. Disponível em: <http://www.nwpii.com/ajbms/papers/AJBMS_2010_1_03.pdf>.

KONWAR, Aditya Narayan; BORSE, V. Current status of point-of-care diagnostic devices in the Indian healthcare system with an update on COVID-19 pandemic. **Sensors International**, 2020. v. 1, p. 100015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2666351120300152>>.

LEE, D. *et al.* Simple and Highly Sensitive Molecular Diagnosis of Zika Virus by Lateral Flow Assays. **Analytical Chemistry**, 20 dez. 2016. v. 88, n. 24, p. 12272–12278. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.6b03460>>.

LETKO, M.; MARZI, A.; MUNSTER, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. **Nature Microbiology**, 24 fev. 2020. v. 5, n. 4, p. 562–569. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41564-020-0688-y>>.

LI, Jianhui *et al.* Salt and water co-assisted exfoliation of graphite in organic solvent for efficient and large scale production of high-quality graphene. **Journal of Colloid and Interface Science**, fev. 2019. v. 535, p. 92–99. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979718311755>>.

LIPMAN, N. S. *et al.* Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. **ILAR Journal**, 1 jan. 2005. v. 46, n. 3, p. 258–268. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ilarjournal/article-lookup/doi/10.1093/ilar.46.3.258>>.

LIU, Gang *et al.* A carbon nanotube-based high-sensitivity electrochemical immunosensor for rapid and portable detection of clenbuterol. **Biosensors and Bioelectronics**, out. 2011. v. 28, n. 1, p. 308–313. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566311004659>>.

LÓPEZ_MARZO, A. M. *et al.* High sensitive gold-nanoparticle based lateral flow Immunodevice for Cd²⁺ detection in drinking waters. **Biosensors and Bioelectronics**, set. 2013. v. 47, p. 190–198. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566313001292>>.

LOUTEN, J. Virus Transmission and Epidemiology. **Essential Human Virology**. [S.l.]: Elsevier, 2016, p. 71–92.

MARTINEZ, A. W. *et al.* Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. **Analytical Chemistry**, 1 jan. 2010. v. 82, n. 1, p. 3–10. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac9013989>>.

MAYNARD, J.; GEORGIU, G. Antibody Engineering. **Annual Review of Biomedical Engineering**, ago. 2000. v. 2, n. 1, p. 339–376. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bioeng.2.1.339>>.

MESKHER, H. *et al.* Recent trends in carbon nanotube (CNT)-based biosensors for the fast and sensitive detection of human viruses: a critical review. **Nanoscale Advances**, 2023. v. 5, n. 4, p. 992–1010. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=D2NA00236A>>.

MOHAMMADINEJAD, A.; ALEYAGHOOB, G.; ERTAS, Y. N. Nanomaterials in Lateral Flow Assay. [S.l.]: [s.n.], 2024, p. 49–81.

NAG, A. *et al.* Multi-Walled Carbon Nanotubes-Based Sensors for Strain Sensing Applications. **Sensors**, 10 fev. 2021. v. 21, n. 4, p. 1261. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1424-8220/21/4/1261>>.

NAQVI, S. T. R. *et al.* Modification strategies for improving the solubility/dispersion of carbon nanotubes. **Journal of Molecular Liquids**, jan. 2020. v. 297, p. 111919. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167732219343041>>.

NARDO, F. DI *et al.* Ten Years of Lateral Flow Immunoassay Technique Applications: Trends, Challenges and Future Perspectives. **Sensors**, 30 jul. 2021. v. 21, n. 15, p. 5185. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1424-8220/21/15/5185>>.

ÖZMEN, E. N. *et al.* Graphene and carbon nanotubes interfaced electrochemical nanobiosensors for the detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) and other respiratory viral infections: A review. **Materials Science and Engineering: C**, out. 2021. v. 129, p. 112356. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493121004963>>.

PAROLO, C. *et al.* Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays. **Nature Protocols**, 23 dez. 2020. v. 15, n. 12, p. 3788–3816. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41596-020-0357-x>>.

PAYNE, S. Viral Pathogenesis. **Viruses**. [S.l.]: Elsevier, 2017, p. 87–95.

PEREIRA, E. P. V. *et al.* Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human

and veterinary health: A review. **International Immunopharmacology**, ago. 2019. v. 73, p. 293–303. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576919302206>>.

PIAO, S. H. *et al.* Dispersion state and rheological characteristics of carbon nanotube suspensions. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, ago. 2017. v. 52, p. 369–375. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1226086X17302046>>.

POSTHUMA-TRUMPIE, G. A. *et al.* Amorphous carbon nanoparticles: a versatile label for rapid diagnostic (immuno)assays. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 9 jan. 2012. v. 402, n. 2, p. 593–600. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00216-011-5340-5>>.

PREMKUMAR, T.; MEZZENGA, R.; GECKELER, K. E. Carbon Nanotubes in the Liquid Phase: Addressing the Issue of Dispersion. **Small**, 7 maio. 2012. v. 8, n. 9, p. 1299–1313. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/sml.201101786>>.

QIU, W. *et al.* Carbon nanotube-based lateral flow biosensor for sensitive and rapid detection of DNA sequence. **Biosensors and Bioelectronics**, fev. 2015. v. 64, p. 367–372. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566314007155>>.

_____ *et al.* Carbon nanotube-based lateral flow immunoassay for ultrasensitive detection of proteins: application to the determination of IgG. **Microchimica Acta**, 13 jul. 2019. v. 186, n. 7, p. 436. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00604-019-3508-4>>.

QUESADA-GONZÁLEZ, D. *et al.* Uranium (VI) detection in groundwater using a gold nanoparticle/paper-based lateral flow device. **Scientific Reports**, 1 nov. 2018. v. 8, n. 1, p. 16157. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-018-34610-5>>.

RANJAN SINGH, S.; BABY MATHEW, B. A Review on Recent Diseases Caused by Microbes. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, 2014. v. 2, n. 4, p. 106–115. Disponível em: <<http://pubs.sciepub.com/jaem/2/4/4>>.

RAPHEY, V. R. *et al.* Advanced biomedical applications of carbon nanotube. **Materials Science and Engineering: C**, jul. 2019. v. 100, p. 616–630. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493118320101>>.

RASTOGI, R. *et al.* Comparative study of carbon nanotube dispersion using surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, dez. 2008. v. 328, n. 2, p. 421–428. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979708010898>>.

RITZI-LEHNERT, M. Development of chip-compatible sample preparation for diagnosis of infectious diseases. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, 9 mar. 2012. v. 12, n. 2, p. 189–206. Disponível em:

<<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/erm.11.98>>.

SAITO, N. *et al.* Safe Clinical Use of Carbon Nanotubes as Innovative Biomaterials. **Chemical Reviews**, 11 jun. 2014. v. 114, n. 11, p. 6040–6079. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr400341h>>.

SCHADE, R. *et al.* Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY-technology): A Review of Progress in Production and Use in Research and Human and Veterinary Medicine. **Alternatives to Laboratory Animals**, 9 abr. 2005. v. 33, n. 2, p. 129–154. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/026119290503300208>>.

SENA-TORRALBA, A. *et al.* Recent advances and challenges in food-borne allergen detection. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, nov. 2020. v. 132, p. 116050. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016599362030279X>>.

SEZER, N.; KOÇ, M. Stabilization of the aqueous dispersion of carbon nanotubes using different approaches. **Thermal Science and Engineering Progress**, dez. 2018. v. 8, p. 411–417.

SHAFFER, M. S. P.; FAN, X.; WINDLE, A. H. Dispersion and packing of carbon nanotubes. **Carbon**, nov. 1998. v. 36, n. 11, p. 1603–1612. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008622398001304>>.

SHAFIQA, A. R.; ABDUL AZIZ, A.; MEHRDEL, B. Nanoparticle Optical Properties: Size Dependence of a Single Gold Spherical Nanoparticle. **Journal of Physics: Conference Series**, ago. 2018. v. 1083, p. 012040. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/1083/1/012040>>.

SHEIKHPOUR, M. *et al.* The Applications of Carbon Nanotubes in the Diagnosis and Treatment of Lung Cancer: A Critical Review. **International Journal of Nanomedicine**, set. 2020. v. Volume 15, p. 7063–7078. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/the-applications-of-carbon-nanotubes-in-the-diagnosis-and-treatment-of-peer-reviewed-article-IJN>>.

_____; GOLBABAIE, A.; KASAEIAN, A. Carbon nanotubes: A review of novel strategies for cancer diagnosis and treatment. **Materials Science and Engineering: C**, jul. 2017. v. 76, p. 1289–1304. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493116320598>>.

SHEREEN, M. A. *et al.* COVID-19 infection: Emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses. **Journal of Advanced Research**, jul. 2020. v. 24, p. 91–98. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123220300540>>.

SHOUKAT, R.; IMRAN, M. Carbon nanotubes : a review on properties , synthesis methods and applications in micro and nanotechnology. **Microsystem Technologies**, 2021. v. 27, n. 12, p. 4183–4192. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00542-021-05211-6>>.

SHYAM, K. U. *et al.* Antibody-based lateral flow chromatographic assays for

detecting fish and shrimp pathogens: A technical review. **Aquaculture**, set. 2022. v. 558, p. 738345. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848622004616>>.

SOUSA, S. P. B. *et al.* Health and Safety Concerns Related to CNT and Graphene Products, and Related Composites. **Journal of Composites Science**, 4 ago. 2020. v. 4, n. 3, p. 106. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2504-477X/4/3/106>>.

SPILLNER, E. *et al.* Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. **Biologicals**, set. 2012. v. 40, n. 5, p. 313–322. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1045105612000759>>.

SUN, W. *et al.* A novel multi-walled carbon nanotube-based antibody conjugate for quantitative and semi-quantitative lateral flow assays. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 3 out. 2017. v. 81, n. 10, p. 1874–1882. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bbb/article/81/10/1874/5938128>>.

TAN, S. H. *et al.* A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure. **Journal of Immunological Methods**, jun. 2012. v. 380, n. 1–2, p. 73–76. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175912000804>>.

TANG, Y.-W. *et al.* Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. **Journal of Clinical Microbiology**, 26 maio. 2020. v. 58, n. 6. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.00512-20>>.

TANS, S. J. *et al.* Individual single-wall carbon nanotubes as quantum wires. **Nature**, abr. 1997. v. 386, n. 6624, p. 474–477. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/386474a0>>.

THESS, A. *et al.* Crystalline Ropes of Metallic Carbon Nanotubes. **Science**, 26 jul. 1996. v. 273, n. 5274, p. 483–487. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.273.5274.483>>.

THI MAI HOA, L. Characterization of multi-walled carbon nanotubes functionalized by a mixture of HNO₃/H₂SO₄. **Diamond and Related Materials**, out. 2018. v. 89, p. 43–51. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092596351830325X>>.

TREACY, M. M. J.; EBBESEN, T. W.; GIBSON, J. M. Exceptionally high Young's modulus observed for individual carbon nanotubes. **Nature**, jun. 1996. v. 381, n. 6584, p. 678–680. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/381678a0>>.

URUSOV; ZHERDEV; DZANTIEV. Towards Lateral Flow Quantitative Assays: Detection Approaches. **Biosensors**, 17 jul. 2019. v. 9, n. 3, p. 89. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-6374/9/3/89>>.

VASHIST, S. K. In Vitro Diagnostic Assays for COVID-19: Recent Advances and Emerging Trends. **Diagnostics**, 5 abr. 2020. v. 10, n. 4, p. 202. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2075-4418/10/4/202>>.

VELAVAN, T. P.; MEYER, C. G. The COVID-19 epidemic. **Tropical Medicine & International Health**, 16 mar. 2020. v. 25, n. 3, p. 278–280. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tmi.13383>>.

WANG, J. Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. **Electroanalysis**, 18 jan. 2005. v. 17, n. 1, p. 7–14. Disponível em: <<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elan.200403113>>.

WANG, Yongzhong *et al.* Application of nanodiagnostics in point-of-care tests for infectious diseases. **International Journal of Nanomedicine**, jul. 2017. v. Volume 12, p. 4789–4803. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/application-of-nanodiagnostics-in-point-of-care-tests-for-infectious-d-peer-reviewed-article-IJN>>.

WANG, Yubing; IQBAL, Z.; MITRA, S. Rapidly Functionalized, Water-Dispersed Carbon Nanotubes at High Concentration. **Journal of the American Chemical Society**, 1 jan. 2006. v. 128, n. 1, p. 95–99. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja053003q>>.

XIANG, C. *et al.* Biomimetic carbon nanotubes for neurological disease therapeutics as inherent medication. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, fev. 2020. v. 10, n. 2, p. 239–248. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211383519306069>>.

YADAV, A. R.; MOHITE, S. K. Carbon nanotubes as an effective solution for cancer therapy. **RESEARCH JOURNAL OF PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND TECHNOLOGY**, 2020. v. 12, n. 4, p. 301–307. Disponível em: <<http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:rjpdf&volume=12&issue=4&article=012>>.

YU, L. *et al.* Development of an immunochromatographic test strip and ic-ELISA for tetrabromobisphenol: a detection in lake water and rice pudding samples. **Food and Agricultural Immunology**, 3 jul. 2016. v. 27, n. 4, p. 460–470. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09540105.2015.1126234>>.

ZHOU, Y. *et al.* Point-of-care COVID-19 diagnostics powered by lateral flow assay. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, dez. 2021. v. 145, p. 116452. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993621002752>>.

ZHU, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, 20 fev. 2020. v. 382, n. 8, p. 727–733. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2001017>>.

ZHU, S. *et al.* Anti-betadnavirus activity of isoprinosine and improved efficacy using carbon nanotubes based drug delivery system. **Aquaculture**, out. 2019. v. 512, p. 734377. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848619314693>>.