



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

DISSERTAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA  
DETECÇÃO DE SARS-CoV-2

CAMILA MACENA RUZO  
(Mestranda)

Manaus-AM

2022



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

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA  
DETECÇÃO DE SARS-CoV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como requisito para à obtenção do título de Mestre em Química.

CAMILA MACENA RUZO

Prof. Dr. WALTER RICARDO BRITO  
(Orientador)

Manaus-AM  
2022

### Ficha Catalográfica

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

R987d Ruzo, Camila Macena  
Desenvolvimento de imunossensor eletroquímico para  
detecção de SARS-CoV-2 / Camila Macena Ruzo . 2022  
73 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Walter Ricardo Brito  
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade  
Federal do Amazonas.

1. Imunossensor eletroquímico. 2. SARS-CoV-2. 3.  
Proteína-N. 4. Anticorpo . I. Brito, Walter Ricardo. II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título

CAMILA MACENA RUZO

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA  
DETECÇÃO DE SARS-CoV-2

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

Aprovada em, 18 de fevereiro de 2022.



---

WALTER RICARDO BRITO (PPGQ/UFAM)

Presidente/Orientador



---

KAREN SEGALA (PPGQ/UFAM)

Membro Interno



---

MARCOS MARQUES DA SILVA PAULA

(DF/UFAM)

Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas  
Manaus, 18 de fevereiro de 2022.

*“Ser brilhante não basta. Precisa se empenhar. A inteligência não é um privilégio. É uma dádiva a ser usada em prol da humanidade”*

*Otto Octavius*

## RESUMO

O SARS-CoV-2 pertencente à família dos coronavírus, consiste em um vírus de RNA de segmento positivo, vírus estes que apresentam em sua estrutura espículas que lhes renderam o nome “corona”. O SARS-CoV-2 é a terceira espécie dos *betacoronavírus* a ocasionar surtos nas últimas décadas, e o primeiro destes a provocar um alto número de infectados e óbitos decorrentes aos efeitos da doença ao redor do mundo, recebendo status de pandemia. O coronavírus apresenta um alto grau de transmissibilidade, sendo necessárias medidas que sejam capazes de frear a propagação. Os testes atuais para COVID-19 consistem em testes moleculares e testes sorológicos, os quais apresentam desvantagens pelo alto custo e demora. Neste trabalho é proposto a fabricação de um imunossensor eletroquímico para detecção de anticorpos de SARS-CoV-2. A imobilização do antígeno (proteína-N) foi realizada em substrato de carbono modificado com grafeno carboxilado (GC). As etapas de construção foram caracterizadas por meio de técnicas eletroquímicas (voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)), análise termogravimétrico (TGA), ATR-FTIR e DRX. A detecção analítica foi executada por meio indireto através da técnica de cronoamperometria, com o uso de anticorpo marcado com a enzima HRP (IgG-HRP), e TMB na presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) como substrato eletroquímico. Empregou-se amostras de soro humano para os respectivos ensaios. Para o substrato de carbono, três camadas de GC mostrou-se suficiente para a otimização dos parâmetros eletroquímicos e posterior imobilização do antígeno, a etapa de imobilização da proteína N foi confirmada por meio de mudanças na resposta eletroquímica do imunossensor, foi constatado o melhor tempo para sua imobilização como sendo o tempo de 30 minutos. Na resposta cronoamperométrica foi registrada uma variação nos valores de corrente catódica para amostras com diagnósticos de IgG-positivos quando comparados às amostras de negativas, corroborando com os resultados disponibilizados por meio da técnica de ELISA.

**Palavras-chave:** imunossensor eletroquímico, SARS-CoV-2, proteína-N, anticorpo.

## ABSTRACT

SARS-CoV-2, belonging to the coronavirus family, consists of a positive-segment RNA virus, viruses that have spicules in their structure that have given them the name “corona”. SARS-CoV-2 is the third species of betacoronavirus to cause outbreaks in recent decades, and the first of these to cause a high number of infections and deaths resulting from the effects of the disease around the world, receiving pandemic status. The coronavirus has a high degree of transmissibility, requiring measures that are able to stop the spread. Current tests for COVID-19 consist of molecular tests and serological tests, which have disadvantages due to their high cost and delay. In this work, the fabrication of electrochemical immunosensor for the detection of SARS-CoV-2 antibodies is proposed. Immobilization of the antigen (N-protein) was performed on a carbon substrate modified with carboxylated graphene (CG). The construction steps were characterized by electrochemical techniques (cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS), thermogravimetric analysis (TGA), , ATR-FTIR and XRD. Analytical detection was performed indirectly through the chronoamperometry technique, using antibody labeled with the enzyme HRP (IgG-HRP), and TMB in the presence of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) as electrochemical substrate. Human serum samples were used for the respective assays. For the carbon substrate, three layers of CG proved to be sufficient for the optimization of electrochemical parameters and subsequent immobilization of the antigen, the immobilization step of the N protein was confirmed through changes in the electrochemical response of the immunosensor, the best time for its immobilization as 30 minutes. In the chronoamperometric response, a variation in anodic current values was recorded for samples with IgG-positive diagnoses when compared to negative samples, corroborating the results available through the ELISA technique.

**Keywords:** Eletroquimic imunossensor, SARS-CoV-2, N-protein, antibody.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3. 1.</b> Classificação taxonômica dos coronavírus (CoVs). (Próprio autor).....	19
<b>Figura 3. 2.</b> Estrutura viral do SARS-CoV-2 (KAUSALYA, 2021).....	20
<b>Figura 3. 3.</b> Componentes gerais de um imunossensor eletroquímico, representado por um imunossensor marcado com elemento de reconhecimento. (Próprio autor).....	24
<b>Figura 3. 4.</b> Representação esquemática da estrutura de um anticorpo. Fragmento Fab: região de ligação ao antígeno, região variável (RV) de cadeia pesada (CP) e região constante (RC) de cadeia leve (CL). Fragmento Fc: região constante (RC) e cadeia pesada (CP). (Próprio autor).....	26
<b>Figura 3. 5.</b> Ilustração dos tipos de procedimentos de imobilização: (i) adsorção, (ii) ligação covalente, (iii) encapsulação e (iv) ligação covalente cruzada. (Próprio autor). 28	
<b>Figura 3. 6.</b> Representação da estrutura do grafeno carboxilado (Próprio autor).....	30
<b>Figura 3. 7.</b> Rota de obtenção por meio da técnica de sonicação para o grafeno carboxilado. (Próprio autor) .....	31
<b>Figura 3. 8.</b> Esquema das etapas da reação química de acoplamento de biomoléculas por meio do EDC/NHS (DE MOL; FISCHER, 2010).....	31
<b>Figura 3. 9.</b> Configuração de um sistema envolvendo três eletrodos. ....	34
<b>Figura 3. 10.</b> Ilustração sobre voltametria cíclica: (a) potencial vs tempo, (b) voltamograma cíclico de processo redox de um sistema reversível, (c) quase reversível e (d) irreversível (WANG, 2006) .....	35
<b>Figura 3. 11.</b> Os diferentes tipos de processos redox que podem ser caracterizados e identificados em um estudo através da voltametria cíclica (MORAES, 2018). ....	36
<b>Figura 3. 12.</b> Gráfico de Nyquist com vetor de impedância (GAMRY, 2005). ....	37
<b>Figura 3. 13.</b> (A) Aplicação dos potenciais (E1) e (E2) em um ensaio cronoamperométrico; (B) Comportamento da corrente em função do tempo na região de	

cada potencial aplicado; (C) Corrente com $t^{-1/2}$ segundo a equação de Cottrell (FERREIRA; AVACA, 2008).....	39
<b>Figura 3. 14.</b> Diagrama de um equipamento genérico utilizado em termogravimetria (TAKAHASHI; MIURA; MIZUNO, 2011).....	40
<b>Figura 3. 15.</b> Esquema da representação das etapas de obtenção do imunossensor para detecção de anticorpos Ig referentes a SARS-CoV-2.....	46
<b>Figura 3. 16.</b> Curvas termogravimétricas para decomposição do grafeno carboxilado e para o grafeno. ....	48
<b>Figura 3. 17.</b> Espectros de FTIR para o grafeno e grafeno carboxilado.....	49
<b>Figura 3. 18.</b> Espectro Raman para o grafeno e o grafeno carboxilado com a deconvolução das bandas D, G.....	50
<b>Figura 3. 19.</b> Voltamogramas cíclicos para o processo faradaico referente a sonda eletroquímica ferri/ferrocianeto ( $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ ) de potássio nos eletrodos modificados com grafeno carboxilado .....	52
<b>Figura 3. 20.</b> Espectros de impedância eletroquímica para o processo faradaico referente a sonda eletroquímica ferri/ferrocianeto ( $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ ) de potássio nos eletrodos modificados com grafeno carboxilado. ....	53
<b>Figura 3. 21.</b> Circuito proposto por Randles para simulação quanto ao comportamento da célula eletroquímica. ((TICIANELLI; ERNESTO RAFAEL GONZALEZ, 2005) .....	54
<b>Figura 3. 22.</b> Voltamograma cíclico para o processo faradaico referente a sonda eletroquímica ferri/ferrocianeto ( $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ ) de potássio para o estudo tempo de imobilização do agente de acoplamento EDC-NHS.....	55
<b>Figura 3. 23.</b> Espectros de impedância eletroquímica para o processo faradaico referente a sonda eletroquímica ferri/ferrocianeto ( $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ ) de potássio para o estudo tempo de imobilização do agente de acoplamento EDC-NHS .....	56
<b>Figura 3. 24.</b> Voltamograma cíclico para as etapas de construção do imunossensor (PBS (0,1 mol/L, pH 7,4) ) contendo 5 mM de $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ .....	57

<b>Figura 3. 25.</b> Espectro de impedância eletroquímica para as etapas de construção do imunossensor (PBS (0,1 mol/L, pH 7,4) ) contendo 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3}$ .....	58
<b>Figura 3. 26.</b> Voltamograma cíclico para o TMB (1-Step Ultra TMB-ELISA. $\text{H}_2\text{O}_2$ ), com o indicativo para os potenciais de pico anodico (Epa) e potenciais de pico catodico (Epc), juntamente com o potencial para redução do TMB, pH=7, a 0,01 V/s. ....	60
<b>Figura 3. 27.</b> A) Cronoamperogramas referentes as amostras de soro B) Representação gráfica dos valores de corrente observadas nos cronoamperogramas quanto ao tempo de 2 segundos. ....	61
<b>Figura 3. 28.</b> Representação gráfica para os valores de índice de reatividade das amostras de soro.....	63

## SUMÁRIO

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE ABREVIATURAS .....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS .....	16
2.1 . Objetivo Geral .....	16
2.2 . Objetivos específicos .....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....	17
3.1. Um panorama da pandemia ocasionada pela covid-19.....	17
3.2. O SARS-CoV-2 e os coronavírus (CoVs) .....	18
3.3. Testes para COVID-19 .....	20
3.4. Imunossensores eletroquímicos .....	23
3.4.1. Princípio básico dos imunossensores .....	25
3.5. Imobilização de biomoléculas .....	27
3.6. Grafeno carboxilado .....	29
3.7. Imobilização de biomoléculas por meio de carbodiimidas.....	31
3.8. Técnicas de caracterização .....	32
3.8.1. Técnicas eletroquímicas .....	32
3.8.1.1. Voltametria cíclica.....	33
3.8.1.2. Espectroscopia de impedância eletroquímica.....	36
3.8.1.3. Cronoamperometria .....	38
3.1.2. Análises térmicas .....	39
3.1.3. Espectroscopia Raman.....	40
3.1.4. Espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier. ....	41

4. MATERIAIS E METODOS.....	42
4.1. Reagentes.....	42
4.1.1. Grafeno carboxilado (GC).....	42
4.1.2. Estudo das modificações dos eletrodos .....	42
4.1.3. Estudo cronoamperometrico.....	43
4.3. Equipamentos .....	43
5. METODOLOGIA.....	44
5.1. Síntese do grafeno carboxilado.....	44
5.2. Preparo dos eletrodos de carbono .....	44
5.2.1. Limpeza dos eletrodos de carbono dropsense© .....	44
5.2.1.1. Montagem do imunossensor .....	45
5.2.2.2. Caracterização eletroquímica .....	47
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	48
6.1. Caracterização do grafeno carboxilado .....	48
6.1.1. Análise termogravimétrica .....	48
6.1.2. Espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) e espectroscopia Raman .....	49
6.1.3. Caracterização eletroquímica das etapas para obtenção do imunossensor.....	50
6.1.3.1. Caracterização eletroquímica para o grafeno carboxilado.....	50
6.1.3.3. Caracterização eletroquímica para o agente de acoplamento EDC/NHS e as etapas de obtenção para o imunossensor .....	54
6.1.3.4. Determinação analítica de anticorpos de SARS-CoV-2.....	59
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	64
REFERÊNCIAS .....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Ab</b>	Anticorpo
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>ATR - FTIR</b>	Espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier
<b>EDC</b>	1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida
<b>EIC</b>	Eletrodo impresso de carbono
<b>EIE</b>	Espectroscopia de impedância eletroquímica
<b>ELISA</b>	Ensaio de imunoabsorção enzimática
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub></b>	Ferricianeto de potássio
<b>K<sub>4</sub>Fe (CN)<sub>6</sub></b>	Ferrocianeto de potássio
<b>NHS</b>	Hidroxissuccinimida
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>R<sub>ct</sub></b>	Resistência a transferência de carga (íons/elétrons)
<b>TGA</b>	Análise termogravimétrica
<b>TMB</b>	3,3', 5,5' - Tetrametilbenzidina
<b>VC</b>	Voltametria Cíclica

## 1. INTRODUÇÃO

O coronavírus compreende um grupo de vírus de RNA de segmento positivo, que são capazes de infectar seres humanos e animais sendo responsáveis por provocar doenças respiratórias, gastrointestinais, neurológicas e hepáticas, que podem variar de sintomas leves a complicações agudas e crônicas (WU et al., 2020). Pertencentes a família coronaviridae, os coronavírus estão divididos em quatro grupos de gênero, compreendendo cerca de 7 espécies de coronavírus até o presente estudo, grupos estes que são os gammacoronavírus, deltacoronavírus, alphacoronavírus e betacoronavírus (WEISS; LEIBOWITZ, 2011), sendo este último alvo de muitos estudos nos últimos anos.

No final do ano de 2019 na província chinesa de Wuhan várias unidades de saúde locais relataram o surgimento de pacientes com pneumonia de origem até então desconhecida, posteriormente estes casos foram vinculados ao surgimento de um novo coronavírus o SARS-CoV-2 pertencente ao grupo dos betacoronavirus (ZHU et al., 2020). Nos meses seguintes espalhou-se rapidamente por outros países e com o aumento da taxa de infecções em humanos a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou o quadro ocasionado pela nova síndrome respiratória aguda grave (corona vírus) como quadro de pandemia (IMAI et al., 2020).

Uma das soluções possíveis para conter a disseminação do vírus, consiste em realizar testagens em todos os indivíduos para que haja adoção de outras medidas que possam conter sua propagação (TAIPALE; ROMER; LINNARSSON, 2020). Inicialmente os critérios para testagem se restringiam a pacientes que faziam parte de grupo de risco, como por exemplo, pessoas com problemas respiratórios e com idade avançada sem levar em consideração a existência de pacientes assintomáticos.

Com o avanço do vírus destacou-se a necessidade de testes com um diagnóstico rápido e preciso (LOEFFELHOLZ; TANG, 2020). Para detecção do vírus causador da covid-19, pode-se destacar testes do tipo RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), considerado o padrão ouro para detecção de SARS-CoV-2, consiste em um teste molecular que é baseado na reação em cadeia da polimerase, onde é coletado a amostra clínica do paciente do trato respiratório por meio de um swab, apesar de ser um teste com alta especificidade, ele apresenta algumas limitações, como o período de coleta

da amostra, visto que é recomendado que esta coleta seja realizada nos momentos iniciais da doença após o surgimento dos sintomas, devido à alta carga viral apresentada neste período no trato respiratório. Outro fator é a necessidade de laboratórios e pessoas especializadas, além do seu alto custo. Conseqüentemente, métodos alternativos aos testes presentes no mercado surgem como uma solução visto as limitações e o alto custo de testes como RT-PCR.

Os diagnósticos através de testes do tipo (POCT- Point of care testing) podem ser responsáveis por aliviar a pressão em laboratórios e instalações de saúde, reduzindo o tempo de obtenção do diagnóstico, além do seu baixo custo.(RICCÒ et al., 2020). Dessa forma a possibilidade de um teste que seja capaz de identificar a presença do vírus em vários estágios da doença, baseado na interação imunológica entre anticorpos e antígenos expressos pela COVID-19 em amostras sorológicas, com um baixo custo e com a possibilidade de obtenção de resultados em um curto período de tempo, poderiam ajudar a conter a propagação do vírus.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 . Objetivo Geral**

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver e caracterizar imunossensores eletroquímicos para detecção de SARS-CoV-2.

### **2.2 . Objetivos específicos**

- Estudar parâmetros para imobilização das biomoléculas em substrato de carbono;
- Realizar estudos dos eletrodos modificados por meio das técnicas de caracterização eletroquímica, como, espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica (VC);
- Caracterizar quimicamente o compósito grafeno carboxilado por meio das técnicas de espectroscopia Raman, infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com módulo ATR e por meio de análise termogravimétrica;
- Estudo de otimização dos parâmetros para o desenvolvimento dos imunossensores;
- Aplicar o imunossensor eletroquímico desenvolvido para uso em amostras de soro humano;

### **3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA**

#### **3.1. Um panorama da pandemia ocasionada pela covid-19**

No dia 31 de dezembro foram relatados aproximadamente 27 casos de pneumonia de origem desconhecida na cidade de Wuhan província chinesa de Hubei, sendo Wuhan a cidade mais populosa da China Central com uma população de aproximadamente 11 milhões de habitantes. Os primeiros casos relatados desta pneumonia foram associados a pessoas que foram expostas ao mercado local de frutos do mar (SOHRABI et al., 2020). As características clinicas eram muito semelhantes às de outras pneumonias virais, como, febre, tosse seca e falta de ar, porém em alguns casos esses sintomas apareciam de forma mais severa.

Após análises de amostras respiratórias coletadas por meio dos especialistas do Centro Chinês para Controle e Prevenção de Doenças (CCDC), declararam que estes casos de pneumonia foram ocasionados por um novo coronavírus (WANG et al., 2020), logo após a descoberta dos primeiros casos a China notificou a Organização Mundial de Saúde (OMS) e no dia 7 de janeiro de 2020 o novo vírus foi denominado como Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (SARS-CoV-2).

A doença ocasionada pelo SARS-CoV-2 recebeu a denominação de COVID-19. A maioria dos casos iniciais foram resolvidos de forma espontânea, porém alguns pacientes desenvolveram várias complicações fatais, incluindo falência de órgãos, choque séptico, edema pulmonar, pneumonia grave e síndrome de dificuldade respiratória aguda e no dia 11 de janeiro foi reportada a primeira morte por COVID-19 (SOHRABI et al., 2020).

Rapidamente o SARS-CoV-2 se espalhou para lugares fora de Wuhan, foram reportados casos de viajantes voltando da província de Hubei que não haviam tido exposição com nenhum mercado de frutos do mar. Estudos epidemiológicos apontavam o alto nível de transmissibilidade deste vírus (HUANG et al., 2020), após esses relatos a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a COVID-19 como sendo uma emergência a saúde pública de interesse internacional e que a mesma representava um alto risco a países com sistemas de saúde vulneráveis.

No dia 05/03/2020 a OMS decretou situação de pandemia, haviam sido relatados até aquele momento cerca de 96,000 casos e 3.300 mortes (SOHRABI et al., 2020). Até o presente estudo haviam sido relatados cerca de 405,319,387 casos em 220 países e 5,781,589 mortes (KAWANA; MIKASA; IZUMIKAWA, 2020). O vírus SARS-CoV-2 recebeu esta denominação após ter seu genoma viral sequenciado, e através destes resultados em conjunto com outros dados fornecidos foi indicado similaridade de 75 a 80% com outro coronavírus o SARS-CoV (SINGHAL, 2020).

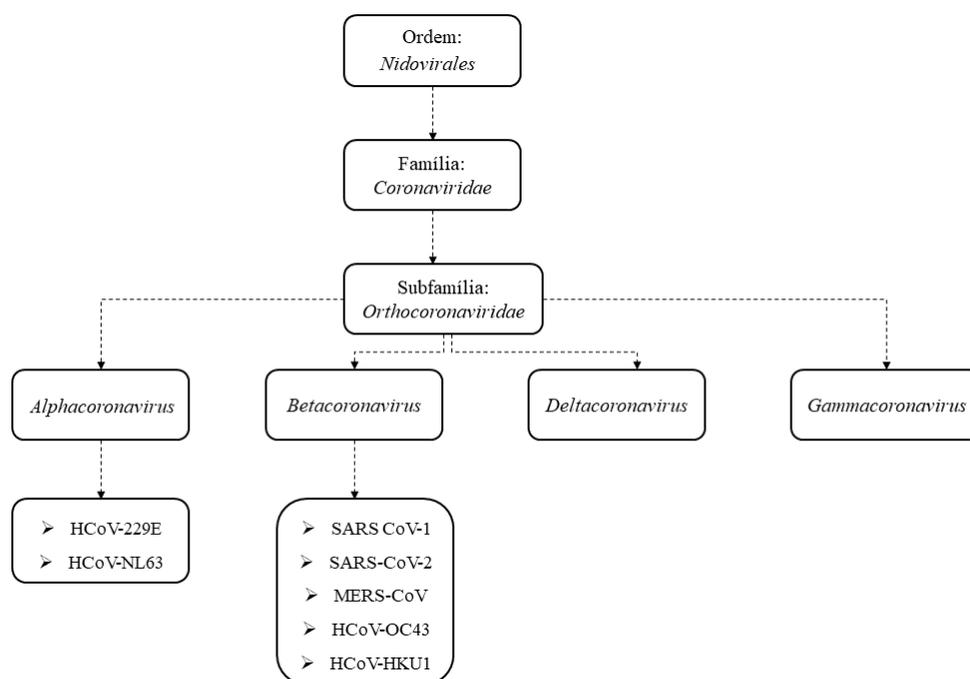
Houveram dois eventos nas últimas décadas envolvendo coronavírus, o SARS-CoV-2 é o terceiro da espécie dos *betacoronavirus* a provocar surtos juntamente com o SARS-CoV (síndrome respiratória aguda grave) e o MERS-CoV (síndrome respiratória do Oriente)(LI et al., 2020). O primeiro evento teve ocorrência nos anos de 2002 à 2003, quando um novo coronavírus do gênero *betacoronavirus*, com origem em morcegos atravessou as espécies até os humanos por meio de hospedeiros intermediários de felinos característicos da província de Guangdong, na China.

Este vírus foi denominado como SARS-CoV ou síndrome respiratória aguda grave, que teve registro de 8.422 casos principalmente na China e Hong Kong, e levou a óbito 916 pessoas, este vírus apresentou taxa de mortalidade de 11% até ser controlado. (CHAN-YEUNG et al., 2003). Quase uma década após o surto de SARS, no ano de 2012 um novo coronavírus surgiu na Arábia Saudita também com origem em morcegos, tendo como camelos dromedários os hospedeiros intermediários, o MERS-CoV ou síndrome respiratória do Oriente Médio registou cerca de 2.494 casos e ocasionou a morte de 858 pessoas, tendo uma taxa de mortalidade de 34%, segundo a Organização das Nações Unidas (ONU).

### **3.2. O SARS-CoV-2 e os coronavírus (CoVs)**

Os coronavírus (CoVs) são vírus zoonóticos tradicionalmente considerados patógenos não letais para seres humanos, eles são responsáveis por aproximadamente 15% dos resfriados comuns(LIMA; DE SOUSA; LIMA, 2020). Eles recebem este nome devido a presença de espículas em sua superfície que lhe concedem a aparência semelhante a uma coroa, estes vírus foram descritos pela primeira vez no ano 1965. (DE OLIVEIRA LIMA, 2020).

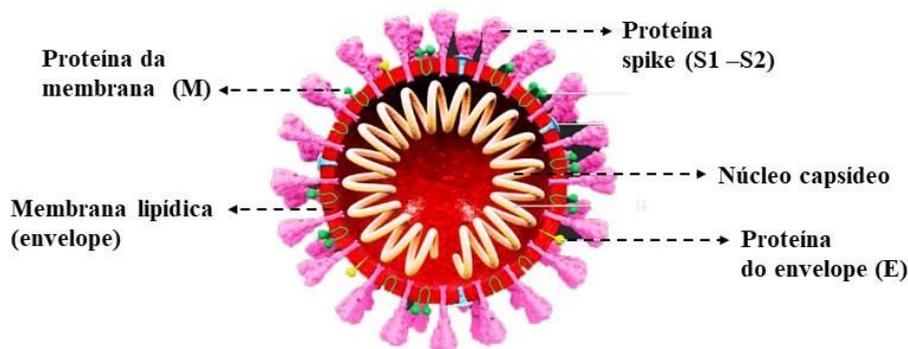
Até o ano de 2019 foram detectadas seis espécies de coronavírus responsáveis por causar doenças em humanos, o SARS-CoV-2 é o sétimo enquanto as espécies HKU1, NL63, OC43 e 229E estão associadas a doenças com sintomas leves do trato respiratório em seres humanos de todas as faixas etárias. (BCHETNIA et al., 2020). Os coronavírus são vírus de genoma RNA de fita simples de sentido positivo ((+) ssRNA), eles pertencem à ordem *Nidovirales*, a família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae* que apresenta 4 gêneros: os alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gama ( $\gamma$ ), delta ( $\delta$ ) coronavírus (**Figura 3.1**) (ANJORIN, 2020).



**Figura 3. 1.** Classificação taxonômica dos coronavírus (CoVs). (Próprio autor).

Por se tratar de um vírus o SARS-CoV-2 é um parasita obrigatório intracelular, ou seja, ele utiliza as estruturas e funções da célula hospedeira em específico, o aparato de tradução dos diferentes tipos de células hospedeiras para expressar suas proteínas virais. O SARS-Cov-2 assim como os demais coronavírus, consiste em um vírus com genoma RNA de fita simples de polaridade positiva ((+) ssRNA), com envelope que varia de 60 nm a 140 nm de diâmetros e com isso são considerados os maiores vírus de RNA (SINGHAL, 2020).

O SARS-CoV-2 apresenta quatro proteínas em sua estrutura: proteína Spike (S), proteína do envelope (E), proteína da membrana (M) e a proteína nucleocapsídica (N) (Figura 3.2).



**Figura 3. 2.** Estrutura viral do SARS-CoV-2 (KAUSALYA, 2021).

O mecanismo de ataque das partículas virais as células iniciam com a ligação destas partículas por meio de suas espículas aos receptores da superfície celular, no caso do SARS-CoV-2 a proteína S tem o papel de conectar o vírus a membrana da célula hospedeira (RAJ et al., 2013).

Os receptores celulares para o SARS-CoV-2 consiste na enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), que são abundantes nas células alveolares do pulmão e possuem grande importância na regulação da pressão arterial, elas são responsáveis por converter moléculas de Angiotensina II (Ang II) em Angiotensina (1-7) (Ang 1-7)(MAGALHAES et al., 2020). A ACE2 apresenta uma alta afinidade com a proteína S do SARS-CoV-2 e por tanto ocorre a ligação com a mesma, formando um complexo molecular com a membrana celular que inicia o processo de fusão do envelope viral com a célula, desta forma o nucleocapsídeo, que contém o material genético do vírus é liberado no citoplasma do hospedeiro, dando início ao processo de replicação viral (JOSE, 2020).

### 3.3. Testes para COVID-19

A COVID-19 rapidamente se tornou uma emergência sanitária a nível mundial, desta forma a necessidade de se compreender as características deste novo coronavírus se tornou essencial ao combate desta doença. A transmissão do vírus SARS-CoV-2 pode

ocorrer por meio do contato com gotículas de saliva de uma pessoa contaminada ao falar ou tossir, ou por meio do contato com superfícies de objetos contaminados, o vírus apresenta período de incubação de 1 a 15 dias podendo variar. (MAGNO et al., 2020). A COVID-19 pode se manifestar em pacientes na forma assintomática ou sintomática, onde assintomáticos são configurados como aqueles que apresentam carga viral porém não apresentam nenhum sintoma relacionado a doença, enquanto os pacientes sintomáticos são aqueles que apresentam a carga viral e o quadro de sintomas, em ambos os casos o vírus pode ser transmitido (ESTEVÃO, 2020).

Alguns fatores contribuem para os altos níveis de infecção por SARS-CoV-2, fatores estes como, a identificação tardia ou ausência da detecção das fontes de infecção, e o não cumprimento de medidas sanitárias de controle a pandemia, como o não uso de máscaras e aglomerações (HUANG et al., 2020). Devido ao alto índice de propagação do vírus e por este crescimento na maioria das vezes ser muito superior à capacidade de resposta eficaz dos serviços de saúde, é necessário que sejam adotadas medidas capazes de conter a propagação do vírus.

A testagem da população surge como uma estratégia capaz de auxiliar no combate a pandemia e no rastreamento de casos de COVID-19, desta forma sendo capaz de acompanhar a dimensão da propagação do vírus, a fim de detectar novos casos sejam de pacientes assintomáticos ou sintomáticos, e também a possibilidade de obter informações a respeito da faixa etária de infectados e a transmissão do SARS-CoV-2 por regiões. Existem dois tipos de testes utilizados para determinar a infecção por SARS-CoV-2, os testes sorológicos e os testes moleculares.

#### **a) RT-PCR ou teste molecular**

A técnica da reação em cadeia de polimerase de transcrição reversa em tempo real (RT-PCR, é considerada a técnica padrão ouro quanto ao diagnóstico laboratorial para COVID-19, por apresentar uma detecção e quantificação sensível e específica de alvos para ácidos nucleicos, ela é capaz de direcionar e identificar patógenos específicos, quanto ao seu material genético (SOUZA, 2020).

Para realização do diagnóstico por meio da técnica de RT-PCR é feita a coleta de amostras do trato respiratório, onde esta coleta deve ser realizada nos dias iniciais a

infecção, pois é constatado a presença do RNA viral no trato respiratório nos primeiros dias (BRASIL (C), 2020).

Então após a detecção do material genético viral, que para o SARS-CoV-2 consiste no ácido ribonucleico (RNA), é feita a conversão para ácido desoxirribonucleico (DNA) em laboratório com intuito de facilitar a reação em cadeia da polimerase (PCR). O teste molecular busca detectar o material genético do vírus por meio de uma sequência particular de umas das proteínas do vírus, então esta sequência é multiplicada em laboratório até o momento que sua “visualização” é possível. Esta visualização é feita por meio de equipamento específico que é capaz de detectar um sinal luminoso que é gerado durante o processo de multiplicação da sequência viral por meio dos reagentes fluorescentes utilizados, e quando esse sinal luminoso excede determinado valor é considerado positivo para SARS-CoV-2 (MALAVÉ, 2021).

#### **b) Teste sorológico**

A terminologia sorologia é designada a exames cujo objetivo é identificar a presença de anticorpos específicos no sangue produzidos pelo organismo contra a infecção, os exames mais comuns são aqueles que investigam as imunoglobulinas IgM e IgG, que possuem ação conjunta no combate imediato e a longo prazo de infecções. (MALAVÉ, 2021). Os testes sorológicos podem ser por imunoensaio enzimático (ELISA), imunoensaio quimioluminescente (CLIA) ou através de testes rápidos.

O exame é realizado a partir das amostras de sangue coletadas, e para que se tenha uma maior sensibilidade frente a detecção dos anticorpos é solicitado que o exame seja realizado pelo menos 5 dias após o início dos sintomas, pois existe um tempo mínimo para produção de anticorpos por nosso organismo (GREEN et al., 2020).

Após a infecção do organismo pelo SARS-CoV-2 o antígeno estimula o sistema imunológico a desenvolver uma resposta frente a infecção, os anticorpos do tipo IgM aparecem mais cedo e alcançam taxas altas na fase aguda da doença, em seguida a taxa de anticorpo IgM para o SARS-CoV-2 vão reduzindo e a conseqüentemente o IgG aumenta rapidamente, apresentando valores até quatro vezes maior na fase de recuperação da doença (BRASIL (C), 2020). Na **Tabela 3.1** é feito o comparativo entre as técnicas de

testagem para SARS-CoV-2 quanto algumas características dos testes moleculares e sorológicos.

<b>Formato</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>Teste sorológico</b>	<b>Teste rápido</b>
<b>Analito</b>	Genoma viral (RNA)	Anticorpo	Anticorpo
<b>Amostra</b>	Secreção das vias respiratórias	Sangue	Sangue
<b>Tempo de resposta</b>	2h	4h	~20 min
<b>Sensibilidade</b>	>98%	~ 85%	~ 85%
<b>Especificidade</b>	100%	> 94%	> 94%
<b>Maior precisão</b>	Desde o primeiro dia dos sintomas devido à alta sensibilidade	Apenas alguns dias após os primeiros sintomas, com chances de falso negativos durante o início da infecção devido à ausência de anticorpos	Durante a fase aguda da doença, com chances de falso negativos durante o início da infecção devido à baixa sensibilidade
<b>Padrão ouro</b>	Sim	Não	Não

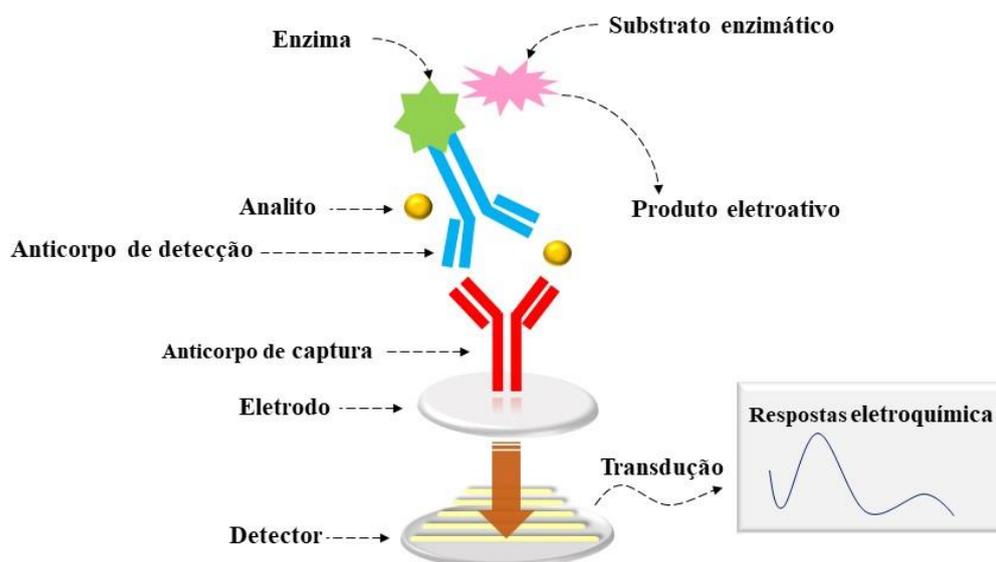
**Tabela 3. 1** Dados comparativos dos tipos de testes para SARS-CoV-2. (SOUZA, 2020)

### 3.4. Imunossensores eletroquímicos

Os biossensores correspondem a dispositivos que utilizam como receptor um componente de natureza biológica, que quando imobilizado a um transdutor adequado é capaz de realizar o reconhecimento de determinada espécie em uma amostra (THÉVENOT et al., 2001), os materiais utilizados como receptores em biossensores podem ser classificados em três grupos de acordo com o seu mecanismo: os biocatalíticos que compreendem as enzimas, o grupo de bioafinidade que inclui ácidos nucleicos, anticorpos e antígenos, e o grupo de microrganismo que compreende os microrganismos (MEHROTRA, 2016).

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o princípio do transdutor utilizado, eles podem ser classificados como, biossensores eletroquímicos, potenciométricos, amperométricos e condutimétricos, biossensores óticos que são capazes de realizar medidas de luminescência, fluorescência e elipsométricas, os biossensores mássicos onde são relacionadas as variações de massa em uma superfície com a oscilação da frequência dos cristais piezelétricos, e os biossensores térmicos onde é possível mensurar o efeito calorífico da interação entre o analito e o receptor (DOS SANTOS RICCARDI; DA COSTA; YAMANAKA, 2002).

Dentre os biossensores destaca-se a classe dos imunossensores eletroquímicos, que consistem em dispositivos analíticos que se baseiam na interação imunológica entre antígeno- anticorpo (FELIX; ANGNES, 2018), neste caso tanto o anticorpo ou o antígeno podem ser imobilizados na superfície do transdutor para realizar a detecção, desta forma fornecendo sinais de acordo com a concentração da espécie. A construção de um imunossensor envolve etapas de imobilização de anticorpos captadores na superfície de um eletrodo, comumente são utilizado eletrodos de materiais inertes, como alguns metais, como, platina e ouro e algumas formas de carbono(RICCI; ADORNETTO; PALLESCHI, 2012).



**Figura 3. 3.** Componentes gerais de um imunossensor eletroquímico, representado por um imunossensor marcado com elemento de reconhecimento. (Próprio autor).

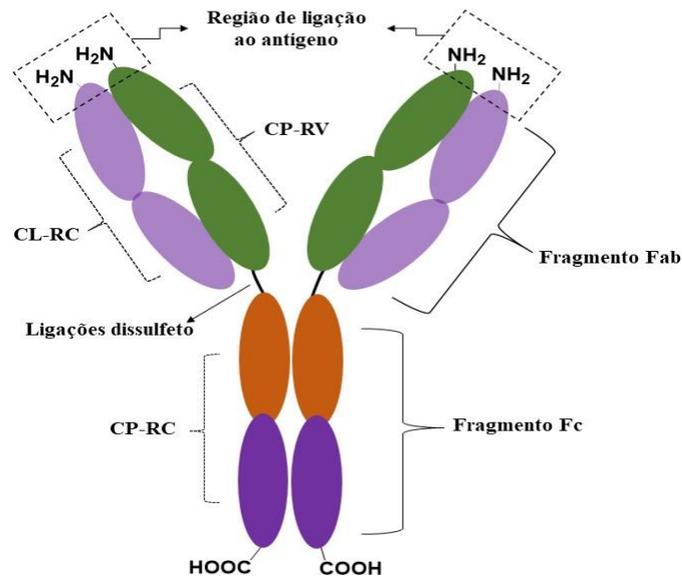
Este anticorpo irá interagir com o antígeno em específico desta maneira formando uma camada transdutora, na etapa seguinte é adicionado um anticorpo de detecção que é ligado a uma enzima, dando origem a um produto eletroativo que estará relacionado com a presença de determinado antígeno, sendo assim gerada uma resposta eletroquímica baseada na reação de reconhecimento molecular deste antígeno em específico (HOCK, 1997) (**Figura 3.3**). São chamados imunossensores amperométricos os imunossensores que realizam medidas de corrente relacionadas com a concentração de uma espécie em específica, sejam elas antígenos ou anticorpos (CHO et al., 2018).

### 3.4.1. Princípio básico dos imunossensores

Os imunossensores eletroquímicos compreendem dispositivos analíticos capazes de detectar a interação imunológica entre antígeno (Ag) e anticorpo (Ab) com a formação de um complexo estável. O uso de anticorpos no campo dos biossensores tem se mostrado uma ferramenta de grande importância em diversas áreas, seu emprego compreende desde diagnósticos clínicos, a análises de fármacos e alimentos, além do uso no campo ambiental com monitoramento (CESEWSKI; JOHNSON, 2020).

Os anticorpos ou imunoglobulina, englobam uma larga família de glicoproteínas (Ig), formadas por quatro cadeias polipeptídicas, que compreendem duas cadeias leves (L) e duas de cadeias pesadas (H) (NUNES DE CASTRO, [s.d.]), estas cadeias polipeptídicas idênticas de peso molecular de aproximadamente ~24 kDa são denominadas cadeias leves, e as que apresentam ~50 kDa são denominadas cadeias pesadas, elas dão um formato característico em “Y” (**Figura 3.4**), onde cada par de cadeia leve e pesada é conectada por uma única ligação covalente dissulfeto.

Dentre a estrutura de um anticorpo. o fragmento cristalizável (Fc) é responsável pela interação com os receptores das proteínas ou da superfície celular contendo os terminais carboxílicos (COOH). O fragmento de ligação ao antígeno (Fab) é responsável pela interação com antígeno e apresenta terminais amino (NH<sub>2</sub>) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, [s.d.]).



**Figura 3. 4.** Representação esquemática da estrutura de um anticorpo. Fragmento Fab: região de ligação ao antígeno, região variável (RV) de cadeia pesada (CP) e região constante (RC) de cadeia leve (CL). Fragmento Fc: região constante (RC) e cadeia pesada (CP). (Próprio autor)

Existem cinco classes de imunoglobulina (Ig) em humanos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, onde cada uma delas é distinguida pelo isótopo de suas cadeias pesadas. Dentre as imunoglobulinas, a IgG aparece com abundância em nosso organismo, ela corresponde a uma fração de 70% de todos os anticorpos (ARAÚJO F., 2013), por esta questão o IgG corresponde a imunoglobulina investigada com mais frequência em exames sorológicos e a mais utilizada em aplicações em imunossensores (WUJCIK et al., 2014).

Quanto a utilização de material imunológico como objeto para reconhecimento apresenta a vantagem quanto a sua especificidade durante o processo de formação do complexo imunológico, além da sua disponibilidade comercial, já que são materiais passíveis de serem fabricados, outra vantagem diz a respeito ao uso de pequenos volumes, visto que pequenas concentrações sejam de anticorpos ou antígenos são suficientes para realizar uma análise efetiva (OLIVEIRA, 2019).

Segundo estudos de Makaraviciute e Ramanaviciene (2013) temos que a proporção de moléculas de anticorpo imobilizadas está relacionada com a sensibilidade, estabilidade e longevidade de um imunossensor (MAKARAVICIUTE; RAMANAVICIENE, 2013). A categoria dos imunossensores subdivide em outras duas

categorias principais, os imunossensores etiquetados ou marcados e os imunossensores livres de etiqueta (label-free) (LIM; AHMED, 2016).

Os imunossensores marcados, estão baseados em imobilização de antígenos ou anticorpos sobre a superfície do transdutor ligado a um elemento complementar marcado que será o responsável por gerar o sinal que será detectado, geralmente os imunossensores marcados ou etiquetados são usados em imunoenaios do tipo *sandwich*, onde o elemento utilizado para marcar podem ser enzimas, nanopartículas funcionalizadas, nanopartículas híbridas (inorgânicas-biológicas) e marcadores redox. Então é gerada uma resposta baseada na reação do marcador (PEI et al., 2013). Esta imobilização etiquetada de anticorpos apresenta vantagens e desvantagens, como a possibilidade de minimizar o impedimento estérico, desta forma, facilitando a interação entre antígeno e anticorpo, conseqüentemente, aumentando a sensibilidade e a especificidade da análise, porém de acordo com o processo de imobilização utilizada pode haver dificuldade quanto a interação com o anticorpo. (LIM; AHMED, 2016).

Os imunossensores do tipo label-free consistem em ensaios ou estratégias no qual não utilizam moléculas marcadoras, nestes ensaios as medidas são realizadas diretamente a partir da interação dos anticorpos e dos antígenos com a formação do complexo antígeno-anticorpo, o reconhecimento do antígeno na superfície do eletrodo pode ser monitorado eletroquimicamente, esse reconhecimento pode ser observado por meio da passivação da superfície do eletrodo modificado, desta maneira o sinal observado durante a medição é inversamente proporcional a concentração do antígeno ou anticorpo avaliado (MIYAZAKI et al., 2017). Estes tipos de imunossensores apresentam vantagens por simplificarem amplamente o procedimento de preparação e as etapas de detecção. (MOLLARASOULI; KURBANOGLU; OZKAN, 2019; OKUNO et al., 2007; WEI et al., 2020).

### **3.5. Imobilização de biomoléculas**

As biomoléculas são amplamente empregadas na construção de biossensores, devidos suas características como alta seletividade e especificidade com o analito (GRAÇA; FERREIRA, 2015). O processo de imobilização das biomoléculas para construção de dispositivos mais precisos e estáveis reúnem inúmeras técnicas que

apresentam como finalidade o objetivo de mantê-las em uma determinada superfície, preservando suas propriedades após estes procedimentos (BARBOSA, 2014).

A imobilização de biomoléculas poder ser realizada por diferentes técnicas, que podem ser classificadas em: (i) adsorção, (ii) ligação covalente, (iii) encapsulação e (iv) ligação covalente cruzada (*crosslinking*) (ROSA, 2008), (**Figura 3.5**).



**Figura 3. 5.** Ilustração dos tipos de procedimentos de imobilização: (i) adsorção, (ii) ligação covalente, (iii) encapsulação e (iv) ligação covalente cruzada. (Próprio autor).

Cada técnica de imobilização de biomoléculas apresenta vantagens e desvantagens, e podem influenciar no sinal analítico do biossensor, desta forma parâmetros como limite de detecção, exatidão, limite de quantificação e precisão podem sofrer interferência devidos as características do processo selecionado (SHEN; RUSLING; DIXIT, 2017)

#### a) Adsorção

Consiste em uma técnica simples na qual a interação entre as biomoléculas e o substrato é baseada em interações relativamente fracas que pode ser atribuída às ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals (BARBOSA, 2014). O substrato é colocado em contato com a solução que contém as biomoléculas. As moléculas que não forem adsorvidas durante a imobilização são removidas após a lavagem da superfície de interesse(substrato) (WELCH et al., 2017)

#### b) Ligação covalente

A imobilização por ligação covalente é a técnica mais utilizada, e baseia-se na ancoragem de enzimas através da ligação com seus grupos funcionais a grupos reativos presentes na superfície de interesse por meio de compostos químicos, um exemplo, é o sistema EDC-NHS. Porém esta técnica apresenta a desvantagem quanto a perda da

atividade enzimática, devido as alterações nas conformações de seus sítios ativos (DE et al., 2016).

**c) Encapsulação**

Nesta técnica é preparado um polímero a partir de uma solução contendo as biomoléculas, destas formas as moléculas ficam retidas na matriz polimérica durante o processo de polimerização. Um destaque para o uso desta técnica é a não perda de atividade enzimática, por não haver reação entre a matriz e a enzima, outro fator que colabora para o uso da técnica de encapsulação é o fator de estabilidade química e física frente as outras técnicas utilizadas para imobilização. (ROSA, 2008)

**d) Ligação covalente cruzada**

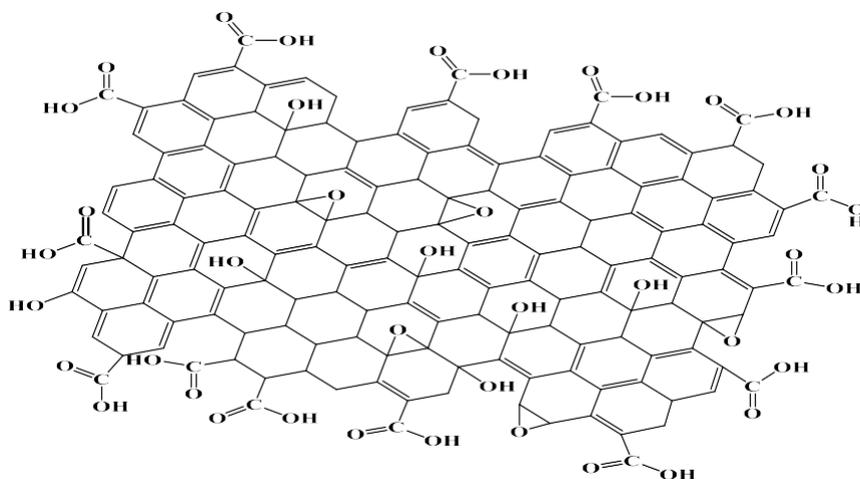
O processo de imobilização através da técnica da ligação covalente cruzada (crosslinking) se baseia na formação de um sistema reticulado das biomoléculas, assim formando uma rede rígida, tendo como vantagem uma ligação enzima-enzima mais sólida. Esta técnica apresenta como desvantagem a possível formação de barreiras de difusão, resultando no aumento do tempo de resposta do biossensor. Alguns exemplos de agentes de ligação cruzada já empregados na construção de biossensores: glutaraldeído e o álcool polivinílico, com grupos estirilpiridínicos (PVA-SbQ) (ANDREESCU et al., 2002).

### **3.6. Grafeno carboxilado**

O desenvolvimento no campo da nanociência possibilitou nos últimos anos o avanço no desenvolvimento de materiais compósitos, o principal objetivo destes materiais é agregar as propriedades químicas e físicas, resultando em novas características, como, o aumento da área superficial, melhora no armazenamento energético, emprego de filmes finos diminuindo a quantidade de imperfeições, confinamento dos portadores de carga nas dimensões reduzidas das nanopartículas, suporte para catalisadores e agentes de reforço em matrizes poliméricas.

Uma das principais áreas de aplicação dos compósitos é o campo dos biossensores eletroquímicos, pois tais materiais podem proporcionar a melhoria nas propriedades

físicas, químicas, magnéticas, desta forma tendo aumento da eficiência e sensibilidade desses sistemas. (SILVA, 2018).



**Figura 3. 6.** Representação da estrutura do grafeno carboxilado (Próprio autor).

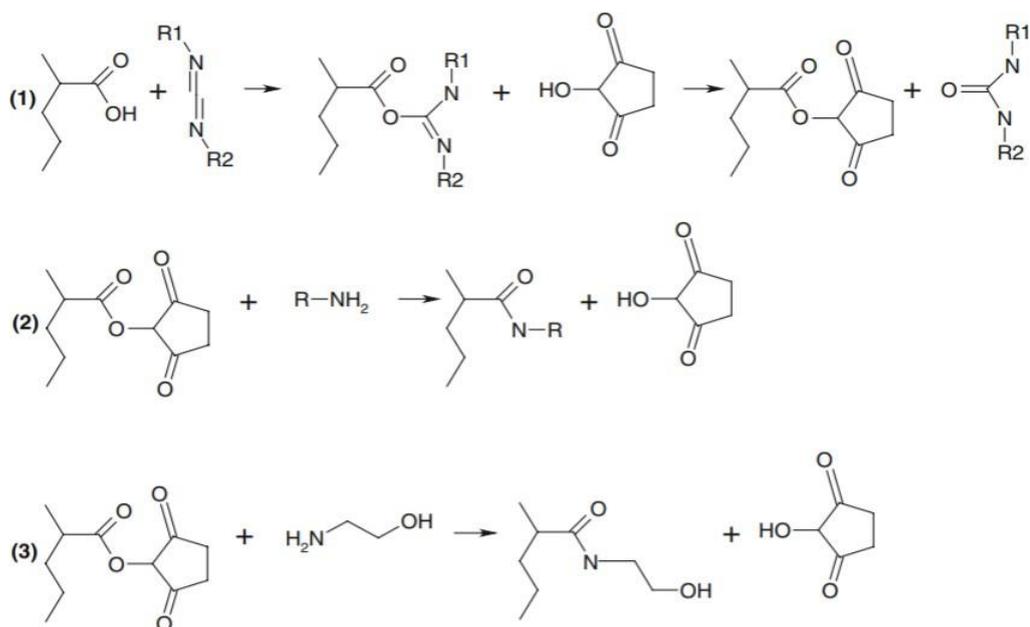
Dentre os grafenos quimicamente modificados, o grafeno carboxilado (GC) (**Figura 3.6**) se assemelha quimicamente ao óxido de grafeno, onde apresenta estruturas gráficas que são constituídas por uma camada de grafeno funcionalizada com grupos, tais como, hidroxilas, epóxis, carbonilas e grupos carboxílicos. Algumas vantagens do emprego de grafeno carboxilado no desenvolvimento de biossensores baseia se em sua natureza condutiva e pela presença de grupos carboxílicos em sua estrutura, que podem desempenhar o papel de ancoragem para biomoléculas (RABCHINSKII et al., 2020). Os métodos mais descritos para a obtenção do grafeno carboxilado consistem em métodos envolvendo a oxidação do grafite por meio do uso do permanganato, como no método abordado por Hummers e Offeman (AN WONG, 2014), outra abordagem para obtenção do grafeno carboxilado consiste no uso da técnica de sonicação do grafeno na presença de ácido sulfúrico e ácido nítrico (**Figura 3.7**) (CHHABRA et al., 2012).



**Figura 3. 7.** Rota de obtenção por meio da técnica de sonicação para o grafeno carboxilado. (Próprio autor)

### 3.7. Imobilização de biomoléculas por meio de carbodiimidas

Uma estratégia muito explorada para ancoragem de biomoléculas em superfícies modificadas consiste no uso de reagentes de acoplamento, como por exemplo, o sistema contendo carbodiimida que apresenta grande estabilidade na imobilização antígenos, anticorpos e enzimas. O 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) é um agente de acoplamento solúvel em água que tem sido empregado no uso de acoplamento de grupos carboxilas e amins primárias, juntamente com hidroxisuccinimida (NHS) (GOGOLA, 2018) (**Figura 3.8**).



**Figura 3. 8.**Esquema das etapas da reação química de acoplamento de biomoléculas por meio do EDC/NHS (DE MOL; FISCHER, 2010).

A etapa inicial da reação de acoplamento consiste na ativação de grupos carboxilas por meio do sistema EDC/NHS, o EDC inicialmente forma um éster que na etapa seguinte sofre uma substituição nucleofílica na presença de um nucleófilo forte, neste caso uma amina primária, esta reação de aminação é favorecida quando trabalhada em pH neutro, na etapa final, os ésteres restantes são desativados com etanolamina (WICKRAMATHILAKA; TAO, 2019).

### **3.8. Técnicas de caracterização**

#### **3.8.1. Técnicas eletroquímicas**

Os estudos a respeito da eletroquímica tiveram seu início na Itália, ao final do século XVII (1791) com Luigi Galvani (1737 – 1798) que ao dessecar um sapo, percebeu que ao tocar com determinadas lâminas as terminações nervosas do anfíbio, seus músculos se contraíam, essas observações foram ponto de partida para os estudos envolvendo a descoberta e a formulação do conceito de corrente elétrica. Em 1880, Alessandro Volta (1745 – 1827) anunciou em carta enviada à Royal Society (Londres), que ao acoplar placas de zinco e prata por uma pasta e mergulhá-las em uma solução salina, era possível observar um fluxo de energia (BOCKRIS; REDDY, 2000).

Volta considerava que o fluxo era resultante somente dos contatos das placas de metal, devido à grande importância de Volta, apenas no ano de 1834 foi considerado a importância da solução salina, quando ao estabelecer as leis estequiométricas da eletroquímica, Michael Faraday (1791 – 1867) pode demonstrar a função do eletrólito nos processos relacionados a pilha. Mais tarde no século XX, Debye (1884 – 1966) e Hückel (1896 – 1980) descreveram a primeira teoria válida para a condutividade de soluções iônicas.(PACHECO et al., 2013).

O desenvolvimento de estudos na área de eletroquímica proporcionou o avanço de inúmeras técnicas neste campo, tais técnicas têm sido empregadas com vários objetivos, dentre eles o monitoramento ambiental, processos e controle de qualidade industriais e análises no campo biomédico. São denominadas técnicas eletroquímicas ou eletroanalíticas, os métodos que consistem no uso de propriedades elétricas mensuráveis

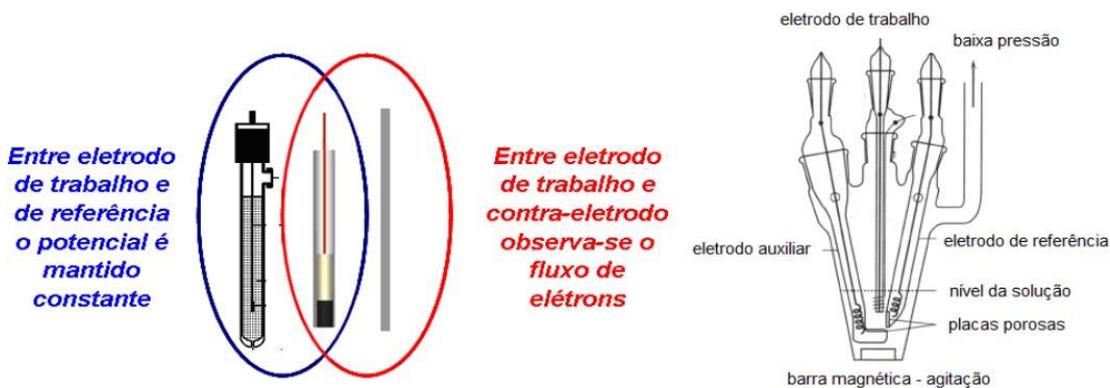
de um determinado sistema, tais como, corrente elétrica, diferença de potencial e acúmulo interfacial de cargas, originárias de fenômenos envolvendo espécies redox que podem interagir de forma física e/ou química, com componentes do meio (não interfaciais) ou de interfaces.

Estas interações são observadas ao se aplicar perturbações controladas ao sistema, como por exemplo, uma diferença de potencial entre os eletrodos de uma célula eletroquímica. Estes sinais que recebem o nome de sinais eletroanalíticos, podem estar relacionados com propriedades químicas intrínsecas do objeto de estudo. Estes métodos apresentam uma gama de vantagens tais como alta sensibilidade, seletividade e baixo custo instrumental (PACHECO et al., 2013).

### **3.8.1.1. Voltametria cíclica**

A técnica de voltametria cíclica consiste em uma técnica eletroanalítica usualmente utilizada para obter informações qualitativas envolvendo processos eletroquímicos. Um dos pontos importantes a respeito desta técnica é a capacidade de fornecer informações rapidamente sobre os processos redox investigados, como, informações termodinâmicas de processos redox, cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos.

As informações a respeito do analito investigado são obtidas a partir do registro do parâmetro corrente ( $i$ ) em função do potencial ( $E$ ) que é aplicado durante a reação de eletrolise, este registro é denominado voltamograma e a magnitude de corrente é obtida pela transferência de elétrons durante um processo de oxirredução que ocorre em uma célula eletroquímica (**Figura 3.9**) constituída por eletrodo de trabalho, contra eletrodo e eletrodo de referência (PACHECO et al., 2013).

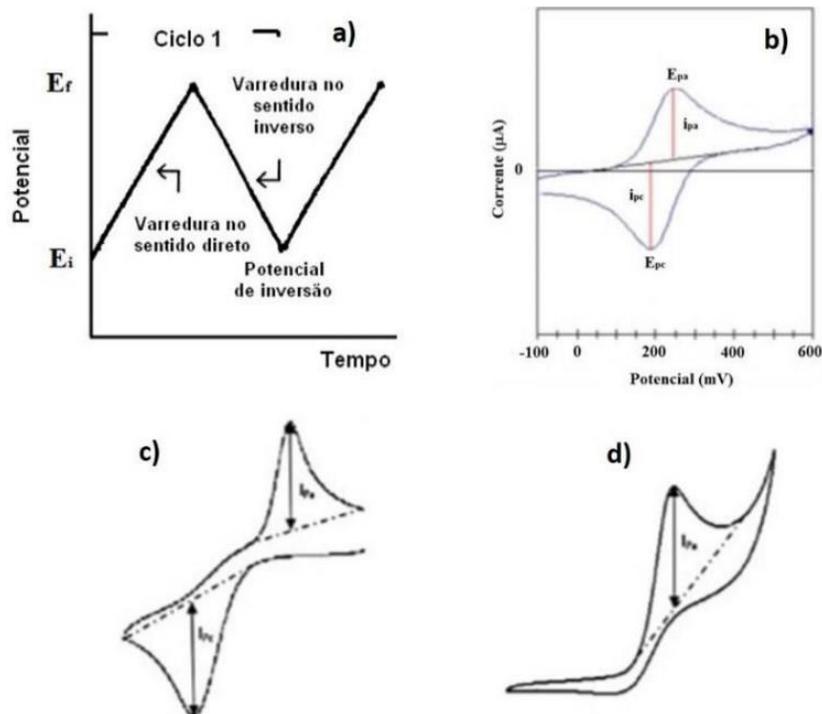


**Figura 3. 9.**Configuração de um sistema envolvendo três eletrodos.

O princípio de funcionamento da voltametria cíclica (VC) consiste em aplicar um potencial inicial ( $E_i$ ) crescente até um potencial denominado potencial final ( $E_f$ ), onde a varredura é feita em sentido direto, quando isto ocorre, a varredura é invertida retornando ao ( $E_i$ ) (potencial de inversão), quando este processo se repete temos a formação de uma onda triangular, este número de repetições é chamado de números de ciclos (**Fig.3.10A**)(MILAZZO et al., 2001).

Em (**Figura 3.10B**) é apresentado um voltamograma cíclico (curva potencial vs corrente) para um ciclo de varredura, que corresponde a resposta eletroquímica para um par redox com comportamento reversível. Os parâmetros que podem ser destacados em um voltamograma cíclico a partir do processo eletródico são, potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ), potencial de pico catódico ( $E_{pc}$ ), corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ ), corrente de pico catódico ( $I_{pc}$ ) e a diferença entre o potencial de pico anódico e de pico catódico ( $\Delta E_p$ ) (PACHECO et al., 2013).

Processos que apresentam comportamento quase-reversíveis devido a velocidade relativa de transferência de elétrons com respeito ao transporte de massa é insuficiente para manter o equilíbrio das espécies na superfície do eletrodo, estes processos quase reversíveis também apresentam um par de picos (**Figura 3.10C**). Processos irreversíveis apresentam a velocidade de transferência de carga muito lenta quando comparada com a velocidade de varredura, deste modo as concentrações das espécies que sofrem oxidação e redução não serão mais em função apenas do potencial (**Figura 3.10D**)(DOMÉNECH-CARBÓ; LABUDA; SCHOLZ, 2013)



**Figura 3. 10.** Ilustração sobre voltametria cíclica: (a) potencial vs tempo, (b) voltamograma cíclico de processo redox de um sistema reversível, (c) quase reversível e (d) irreversível (WANG, 2006).

O tipo de voltamograma gerado é resultante do tipo de mecanismo redox que a amostra em estudo sofre sobre a superfície do eletrodo. Desta maneira, a partir dos principais parâmetros extraídos de um voltamograma cíclico pode se obter informações relacionadas quanto a reversibilidade do sistema em estudo, além da elucidação de mecanismos de reações eletroquímicas, detecção da existência de reações acopladas a processos eletroquímicos, identificação de espécies presentes em solução, assim como a presença de intermediários, e análise semiquantitativas das velocidades de reação.

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

\* $\alpha$  coeficiente de transferência de carga e o  $E_{p/2}$  o valor do potencial que é determinado à metade do valor da corrente de pico ( $I_p$ ).

**Figura 3. 11.** Os diferentes tipos de processos redox que podem ser caracterizados e identificados em um estudo através da voltametria cíclica (MORAES, 2018).

Na **Figura 3.11** são apresentados brevemente os diferentes tipos sistemas que podem ser diagnosticados e caracterizados em um estudo voltamétrico.

### 3.8.1.2. Espectroscopia de impedância eletroquímica

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) consiste em uma ferramenta importante no estudo de sistemas eletroquímicos, inicialmente aplicada ao estudo da dupla camada elétrica para determinação de sua capacitância e em estudos polarográficos, hoje a técnica é muito utilizada no estudo de processos em eletrodos modificados e em interfaces complexas, como estudo de propriedades intrínsecas dos materiais ou processos que possam influenciar em suas propriedades elétricas, esta técnica fornece uma visão detalhada das características elétricas da superfície eletrodo/solução. (CARVALHO et al., 2006).

Nesta técnica o sistema estudado é excitado por um sinal de potencial de corrente alternada (AC) com caráter senoidal de pequena amplitude, em torno de um sinal de corrente contínua (DC) em diferentes valores de frequências, portanto o nome de espectroscopia de impedância eletroquímica foi adotado posteriormente, onde a resposta é medida em valores de corrente. O sinal utilizado na excitação é pequeno para que o

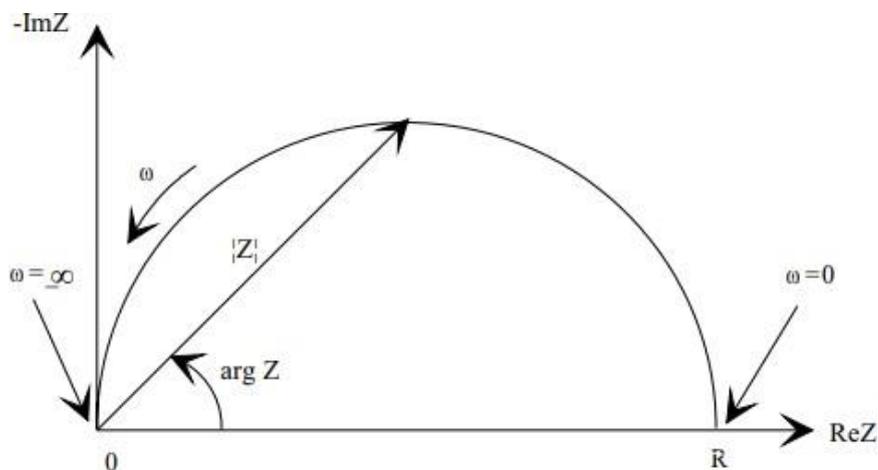
sistema estudado esteja muito próximo do equilíbrio, desta forma as propriedades do sistema podem ser analisadas sem provocar perturbações. A impedância é configurada como a medida da habilidade de um circuito elétrico tem em resistir ao fluxo de corrente elétrica ao percorrê-lo (PYUN et al., 2012).

O cálculo de impedância pode ser realizado por meio da impedância complexa ( $Z$ ) que consiste na soma dos componentes real ( $Z_r$ ) e imaginário ( $Z_i$ ) da impedância do sistema como função da frequência ( $\omega$ , frequência angular) (Eq. 1). A impedância é expressa em termos da magnitude,  $Z_o$ , a mudança de fase  $\phi$  (Eq. 2).

$$Z(\omega) = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_o \cos(\omega t)}{I_o \cos(\omega t - \Phi)} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$Z(\omega) = Z_o(\cos\phi + j\sin\phi) \quad (\text{Eq. 2})$$

Quando representada na forma gráfica, a parte real ( $Z_r$ ) é expressa no eixo X e a parte imaginária é plotada no eixo Y, desta forma é possível obter um “Gráfico de Nyquist”. Neste gráfico o eixo Y é negativo, e cada ponto do gráfico de Nyquist corresponde a uma medida de impedância em uma determinada frequência, onde os valores de frequências mais baixas estão sinalizados no lado direito do gráfico enquanto as frequências mais altas estão à esquerda, como pode ser observado na **Figura 3.12**.



**Figura 3. 12.** Gráfico de Nyquist com vetor de impedância (GAMRY, 2005).

No gráfico de Nyquist, a impedância pode ser representada como uma vetor  $|Z|$ . O ângulo entre este vetor e o eixo X, comumente chamado de “ângulo de fase”,  $\phi$  ( $= \arg Z$ ).

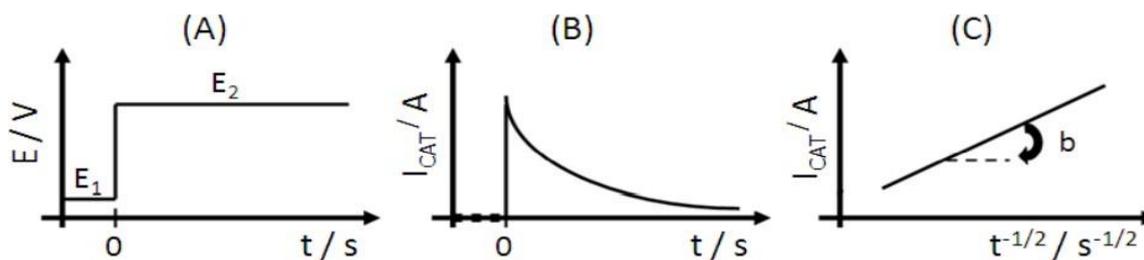
### 3.8.1.3. Cronoamperometria

A técnica de cronoamperometria consiste em um método eletroquímico, no qual o sinal elétrico (corrente) que flui através do eletrodo de trabalho, é mensurado em função de um determinado tempo, a um potencial constante. A magnitude do sinal elétrico mensurado é correlacionada com o grau de concentração das espécies eletroativas, presentes na superfície do eletrodo de trabalho, tal correlação é representada por meio da equação de Cottrell (**Eq.3**) (NECTOUX, 2012).

$$I_t = \frac{nFAc_0 D^{\frac{1}{2}}}{\pi^{1/2} t^{3/2}} = bt^{-\frac{1}{2}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde  $I_t$  é um sinal elétrico (corrente) a um tempo  $t$ (s),  $n$  corresponde a número de elétrons ( $\text{mol}^{-1}$ ),  $F$  é a constante de Faraday ( $96,458 \text{ C. mol}^{-1}$ ),  $A$  é equivalente a área geométrica do eletrodo ( $\text{cm}^2$ ),  $C$  é a concentração das espécies oxidadas e  $D$  é o coeficiente de difusão das espécies oxidadas.

Na cronoamperometria do tipo potencial-step são aplicados dois potenciais, onde o potencial inicial ( $E_1$ ) é aplicado em uma região em que não ocorre reação com as espécies eletroativas, nesta região não ocorrem processos faradáicos e este potencial inicial tem como objetivo carregar a dupla camada elétrica que está localizada na superfície do eletrodo. O segundo potencial ( $E_2$ ) é potencial responsável por reduzir ou oxidar (processo este controlado por difusão) a espécie a ser estudada (FERREIRA; AVACA, 2008), como pode ser observado na imagem **Figura 3.13**.



**Figura 3. 13.** (A) Aplicação dos potenciais ( $E_1$ ) e ( $E_2$ ) em um ensaio cronoamperometrico; (B) Comportamento da corrente em função do tempo na região de cada potencial aplicado; (C) Corrente com  $t^{-1/2}$  segundo a equação de Cottrell (FERREIRA; AVACA, 2008).

O tempo determinado para aplicação dos potenciais é comumente definido pelo tipo de informação que se deseja extrair do experimento, geralmente são utilizados tempos breves entre 1 milisssegundo e 10 segundos, dessa forma garantindo que nenhuma mudança significativa ocorrerá na concentração inicial da espécie eletroativa no meio da solução estudada.

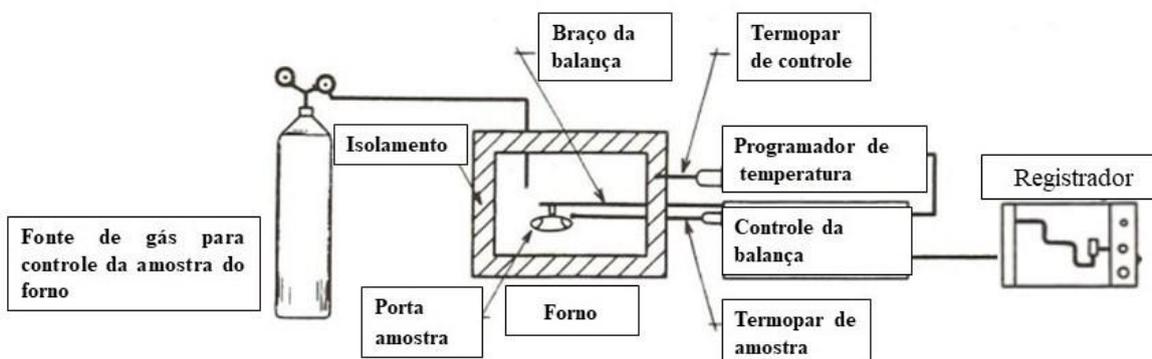
### 3.1.2. Análises térmicas

A análise térmica consiste em uma gama de técnicas capazes de medir a variação em uma determinada propriedade física de uma amostra quando submetida a uma programação controlada de temperatura (JÚNIA G. PEREIRA, 2009). Dentre as técnicas de análises térmicas mais utilizadas está a termogravimetria (TG), no qual monitora a variação da propriedade física massa, enquanto a amostra a ser estudada é aquecida.

Enquanto a Termogravimetria Derivada (DTG) é realizada a derivada da variação de massa em relação ao tempo em função da temperatura ou tempo, ou seja, a DTG consiste em um arranjo matemático da primeira análise térmica (TGA) (TAKAHASHI; MIURA; MIZUNO, 2011).

A variação de massa permite várias aplicações tais como, estudo de decomposição térmica de minerais, minérios, carvão, petróleo, madeira, polímeros, alimentos, materiais explosivos, estudos sobre corrosão de metais em atmosfera controlada em faixas amplas de temperatura, estudos sobre a velocidade de evaporação de líquidos e sublimação de

sólidos (JÚNIA G. PEREIRA, 2009). Na análise termogravimétrica, o equipamento utilizado é basicamente composto por uma termobalança (**Figura 3.14**).



**Figura 3. 14.** Diagrama de um equipamento genérico utilizado em termogravimetria (TAKAHASHI; MIURA; MIZUNO, 2011).

A termo balança permite a pesagem contínua de uma amostra à medida em que esta amostra é aquecida ou resfriada. Os principais elementos que compõe uma termobalança são, forno, balança registradora, suporte de amostra e sensor de temperatura, sistema registrador, controle da atmosfera do forno, e programador de temperatura.

### 3.1.3. Espectroscopia Raman

O efeito Raman foi previsto teoricamente pelo Adolf Gustav Stephan Smekal, onde foi publicado em 1923 e tendo comprovação experimental em 1928, por Chandrasekhara Venkata Raman, consiste em um método óptico, de alta resolução espacial não invasivo, não destrutivo, muito utilizado para obter informações sobre compostos (GRASSI, 2021).

O fenômeno denominado espalhamento Raman consiste quando uma onda eletromagnética atinge a superfície de um meio, uma fração da luz é refletida enquanto que o resto é transmitido para dentro do material. Da parcela da radiação transmitida através da superfície, uma fração desta é absorvida na forma de calor e outra é retransmitida na forma de luz espalhada. A luz emergente apresenta em seu bojo uma pequena parcela composta de frequências diferentes daquele incidente (RODRIGUES; GALZERANI, 2012).

Os processos deste espalhamento inelástico podem ser classificados da seguinte forma: se a frequência da radiação espalhada for menor que a frequência da radiação incidente, o processo de espalhamento absorve energia, que é retirada do campo de radiação e transformada no meio espalhador, este espalhamento recebe o nome de espalhamento Stokes. Por outro lado, se a radiação espalhada tiver frequência maior que a da radiação incidente, o processo de espalhamento cedeu energia, que foi retirada do meio espalhador e transformada em energia do campo de radiação, este espalhamento recebe o nome de anti-Stokes (RODRIGUES; GALZERANI, 2012).

Um espectro Raman apresenta em seu eixo das abscissas, a diferença entre o número de onda da radiação incidente e espalhada – denominada de deslocamento Raman – onde a unidade é convencionalmente expressa em unidades de inverso de centímetros  $\text{cm}^{-1}$ . No eixo das ordenadas aparece a intensidade espectral, usualmente representada em unidades arbitrárias (u.a.) dependentes de parâmetros experimentais. Para se realizar medidas de espectroscopia Raman são necessários, basicamente, três componentes: uma fonte de luz excitadora, um sistema dispersivo capaz de decompor a radiação espalhada pela amostra e um fotodetector (RODRIGUES; GALZERANI, 2012).

#### **3.1.4. Espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier.**

A espectroscopia no infravermelho consiste em um método de caracterização física para análise qualitativa e determinações quantitativas quanto aos componentes do material a ser analisado, isto é possível devido ao fato de átomos que formam moléculas possuírem frequências específicas de vibração, que variam de acordo com sua estrutura, composição e o modo de vibração da amostra. A partir desta técnica é possível obter espectros de absorção (e/ou transmissão) por meio da incidência de um feixe de luz na região do infravermelho sobre uma amostra (DE OLIVEIRA LEITE; PRADO, 2012).

Consiste em uma análise não destrutiva (a amostra pode normalmente ser recuperada para novo uso), e é útil para micro amostras. Dentre os instrumentos utilizados para a espectroscopia no infravermelho, a técnica de FTIR é utilizada para colher o espectro infravermelho mais rapidamente, pois requer pouco preparo para as amostras e é facilmente encontrada em laboratórios. A luz infravermelha é guiada por meio de um

interferômetro. Depois de atravessar a amostra, obtém-se o interferograma, que é o sinal obtido. Realizando-se uma transformada de Fourier no sinal, obtém-se um espectro idêntico ao da espectroscopia de infravermelho convencional.

Uma das variantes FTIR é o modo de reflexão total atenuada (ATR) usada neste caso com espectros de varredura de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , tem como princípio o comportamento do feixe de radiação passar de um meio mais denso (cristal de ATR) para um meio menos denso (amostra), ocorrendo reflexão. A técnica de FTIR-ATR é principalmente utilizada para a análise de superfície em polímeros. Esta técnica apresenta uma vantagem quanto ao custo, visto que os espectrofotômetros são mais baratos do que os convencionais, já que é mais simples construir um interferômetro do que um monocromador (SKOOG, WEST, HOLLER, 2010).

E, ainda, a medida de um único espectro é bem mais rápida nessa técnica, pois as informações de todas as frequências são colhidas simultaneamente. Isso permite que sejam realizadas múltiplas leituras de uma mesma amostra, fazendo-se uma média, aumentando, assim, a sensibilidade da análise (DE SOUZA; POPPI, 2012)

## **4. MATERIAIS E METODOS**

### **4.1. Reagentes**

#### **4.1.1. Grafeno carboxilado (GC)**

Para realização da síntese do compósito de grafeno carboxilado foi utilizado o grafeno nanopalete (KNG-150 – Merk), o grafeno carboxilado (2mg/mL) obtido a partir da solução de Ácido sulfúrico 98% e Ácido Nítrico 70% PA (A.C.S. Neon), foi disperso em água Milli-Q®.

#### **4.1.2. Estudo das modificações dos eletrodos**

Para os estudos quanto as caracterizações eletroquímicas foram utilizadas, Ferricianeto de potássio 99% e Ferrocianeto de potássio 99%, KCl (PA, A.C.S), N-

hidroxissuccinimida- 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (NHS, EDC) e PBS (pH 7, 4) obtidos da Synth,

#### **4.1.3. Estudo cronoamperometrico**

Para estudo cronoamperometrico foi utilizado, TMB (1-Step Ultra TMB-ELISA Substrato solução.H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) da Thermo Scientific. A proteína do nucleocapsídeo (proteína - N) que atua como antígeno de reconhecimento para o SARS-CoV-2 (0.4 µg µL<sup>-1</sup>), o anticorpo marcado com enzima (IgG-HRP) e o soro humano foram cedidos pelo Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fiocruz Amazônia (LALWANI et al., 2021). Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico. As soluções foram preparadas com água Milli-Q® e com PBS (7,4).

#### **4.3. Equipamentos**

Para a realização das medidas eletroquímicas foram utilizados eletrodos impressos de carbono (Dropsens©) com diâmetro de 4 mm, contendo um sistema de três eletrodos, sendo eletrodo de trabalho e contra eletrodo em carbono, e eletrodo de referência de Ag/AgCl.

Para realização dos estudos eletroquímicos foi utilizado o potenciostatos/galvonostatos modelo PGSTAT204 (Autolab, Metrohm) acoplado a um computador, usando o programa NOVA versão 2.1. Todas as pesagens foram realizadas por meio de uma balança analítica de modelo AR2140BR (OHAUS) com precisão de ± 0,01 mg. A homogeneização das soluções foi realizada em banho ultrassom TS-218 (Dekel). Para realização da síntese do grafeno carboxilado foi utilizado sonicador de ponteira/ desruptor de célula ultrassônico digital 20 kHz, 500 W da marca UNIQUE, centrífuga com rotor 22000 rpm de modelo Eppendorf 5810R, para análise termogravimetrica foi utilizado um modelo da Shimadzu TGA-50H, com atmosfera de nitrogênio, quociente de vazão de 50 mL/min, célula de platina a 10 °C/ min.

Para as caracterizações por meio das técnicas de infravermelho com transformada de Fourier com modulo de ATR(ATR-FTIR) e espectroscopia Raman, foram utilizados os seguintes equipamentos, acessório ATR (MIRacle com ZnSe Crystal Plate Pike®)

instalado em um espectrômetro Nicolet® 6700 FT-IR equipado com um detector MCT resfriado com N<sub>2</sub> líquido e equipamento de espectroscopia Horiba Scientific MacroRam Raman com laser 785nm.

## **5. METODOLOGIA**

### **5.1. Síntese do grafeno carboxilado**

Para síntese deste material foi utilizada a técnica de sonicação, esta técnica consiste em expor materiais a ondas ultrassônicas, proporcionando alterações químicas e físicas ao material, desta forma viabilizando processos químicos de interesse (LOURENÇO et al., 2010). Para o início da síntese são adicionados 10 mg de grafeno nano paletes em uma solução de proporção 3:1 de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ HNO<sub>3</sub> e em seguida esta solução foi submetida a sonicação por 1h.

Após o processo de sonicação esta mistura foi submetida sucessivamente a centrifugação a 12.000 rotações por minuto (rpm) por 1h a fim de acelerar a decantação do material sólido, enquanto a solução sobrenadante foi descartada, em seguida foi adicionada água Milli-Q e feito o controle do pH da solução sobrenadante até a obtenção de um pH 7 (CHHABRA et al., 2012). Esta solução foi congelada a temperatura de -2 °C e em seguida foi submetida a técnica de liofilização, cujo funcionamento consiste em promover o processo de desidratação por sublimação, ao final o material obtido foi submetido as análises termogravimétrica (TGA), infravermelho com transformada de Fourier com módulo ATR (ATR-FTIR) e espectroscopia Raman.

### **5.2. Preparo dos eletrodos de carbono**

#### **5.2.1. Limpeza dos eletrodos de carbono dropsense©**

Antes de ser feita a montagem do imunossensor, é realizada inicialmente uma limpeza superficial nos eletrodos de trabalho, a fim de se remover a camada de óxido depositado na superfície por questões de ambiente de armazenamento dos eletrodos. Por se tratar de eletrodos impressos de carbono (EIC) (Dropsens©), não é realizada uma limpeza mecânica e sim um pré-tratamento da superfície por meio da limpeza

eletroquímica, como destacam (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ et al., 2019; HAYAT et al., 2011; STANKOVIĆ et al., 2020), a fim de obter uma superfície uniforme (KESKIN et al., 2021; REANPANG; CHAILAPAKUL; JAKMUNEE, 2018).

A limpeza eletroquímica foi realizada por meio da técnica eletroquímica de voltametria cíclica que foi realizada na faixa de potencial (-1,5 a 1,0 V) em uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 mol/L), o procedimento foi realizado até a obtenção de um perfil voltamétrico sem alterações aos demais obtidos, este comportamento foi observado aproximadamente por volta de 5 ciclos. Para comprovação da eficácia do procedimento de limpeza dos eletrodos, é realizado mediante a técnica de voltametria cíclica (VC) por meio da solução de 0,005 mol/L K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub> /K<sub>4</sub>Fe (CN)<sub>6</sub> em KCl 0,2 mol/L. Pode se destacar que apesar dos perfis obtidos para os eletrodos não serem sobreponíveis, eles não apresentam grandes diferenças

#### **5.2.1.1. Montagem do imunossensor**

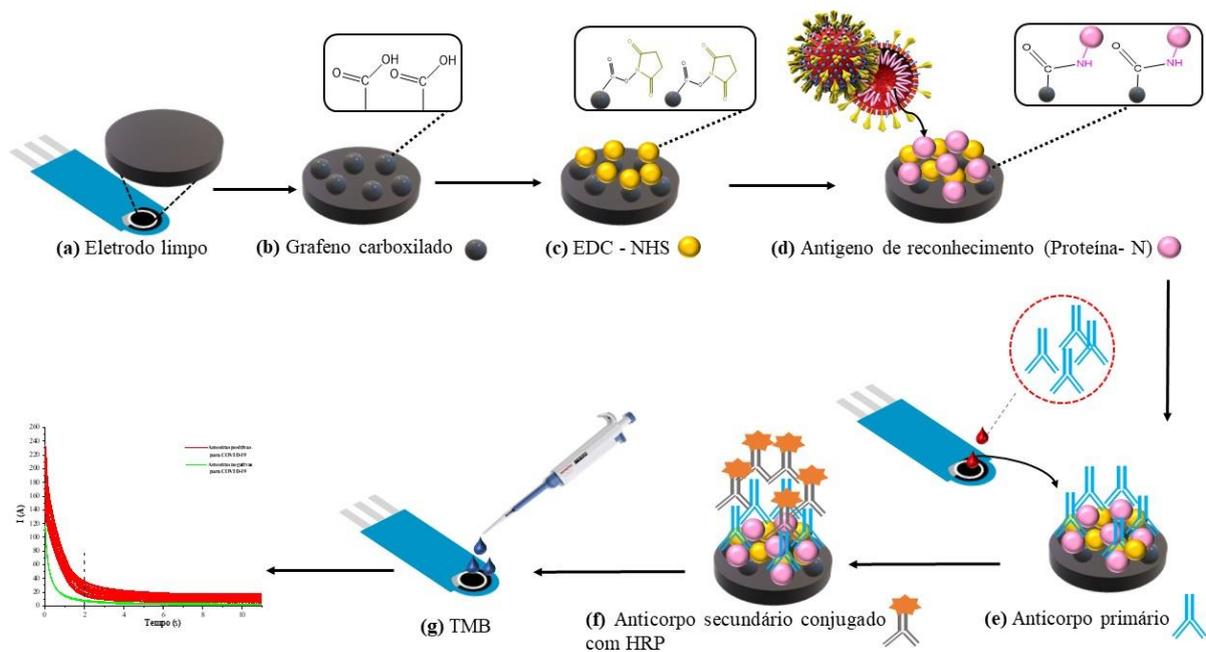
Para o estudo realizado foi desenvolvido um imunossensor do tipo marcado, em que consistiu no uso de um anticorpo secundário marcado com uma enzima que corresponde ao elemento responsável por gerar o sinal a ser detectado. Para este estudo foi utilizada o anticorpo (IgG) marcado com a enzima HRP (peroxidase de rábano), que consiste em uma glicoproteína que pertence à família das peroxidases nas quais são responsáveis por oxidar um grande número de moléculas orgânicas, apresenta grande estabilidade e facilidade quanto a conjugação com a imunoglobulina (IgG).

Após a limpeza eletroquímica (pré-tratamento) em solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (aq) por VC na faixa de potencial de (-1,5 a 1,0 V) a 0,05 V/s, o eletrodo de trabalho foi modificado via drop coating com 10 µL de grafeno carboxilado (2 mg mL<sup>-1</sup> dispersão em água), a fim de se obter grupos carboxilas em sua superfície, em seguida o eletrodo foi deixado para secar em uma secadora a vácuo em um ambiente de temperatura de 18 a 20°C, este procedimento foi realizado três vezes a fim de se revestir toda a área de trabalho do eletrodo.

Posteriormente foram adicionados a superfície do eletrodo 4 µL EDC (100 mmol L<sup>-1</sup>) e 4 µL NHS (50 mmol L<sup>-1</sup>) (0,1 mol·L<sup>-1</sup> de PBS (pH = 7,4)) em seguida o eletrodo foi posto para secar em condições semelhantes a etapa anterior no tempo de 1h.

A imobilização do antígeno se deu pela adição de 8  $\mu\text{L}$  da proteína N-SARS-CoV-2 ( $0,4 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ) a superfície do eletrodo, levada a incubação por 30 minutos a uma temperatura de  $4^\circ\text{C}$ . Após a deposição do antígeno, foi realizada a deposição de soro (plasma sanguíneo) sem diluição e levado a incubação a temperatura de  $4^\circ\text{C}$  por 15 minutos, em seguida foi feita a deposição do anticorpo marcado com a enzima HRP (peroxidase de rábano) e levado a incubação pelo tempo de 15 minutos em temperatura de  $4^\circ\text{C}$ , todas as etapas foram lavadas com uma solução tampão de PBS  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de PBS ( $\text{pH} = 7,4$ ).

Para a detecção foi utilizado o substrato cromogênio TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , onde foram depositados  $100 \mu\text{L}$  do substrato no eletrodo de trabalho para realização da medida. A metodologia abordada está expressa na **Figura 3.15**.



**Figura 3. 15.**Esquema da representação das etapas de obtenção do imunossensor para detecção de anticorpos Ig referentes a SARS-CoV-2.

### 5.2.2.2. Caracterização eletroquímica

As caracterizações eletroquímicas para as etapas de obtenção do imunossensor foram realizadas por meio das técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), usando as configurações convencionais empregada a um sistema de três eletrodos, utilizando o potenciostato AUTOLAB PGSTAT 204.

A investigação das etapas de imobilização sob o eletrodo de trabalho foram obtidas por meio de uma solução de  $0,005 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  como par redox em solução tampão de  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de PBS (pH = 7,4) com uma velocidade de varredura de  $0,05 \text{ V/s}$ . As observações foram realizadas em uma janela de potencial (-0,4 a +0,6) V, esta faixa de potencial foi determinada por meio de uma análise preliminar de um eletrodo limpo mediante a técnica de voltametria cíclica (VC).

Para caracterização por meio da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica foram utilizados os parâmetros de frequência de 0,1 até 100000 Hz, Amplitude de 0,01 V a 10 pontos por década, todas as medidas foram realizadas em solução de  $0,005 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  em PBS  $0,1 \text{ mol/L}$  e pH=7,4.

Para detecção de anticorpos específicos de SARS-CoV-2 foi utilizado um estudo do comportamento do substrato TMB utilizado para detecção dos mesmos, inicialmente foi realizado um estudo prévio por meio da técnica de VC na janela de potencial (-0,4 a +0,4) V com uma velocidade de varredura de  $0,05 \text{ V/s}$ , esta janela de potencial foi resultante de um estudo até a obtenção do perfil eletroquímico característico do substrato como relatado em outros trabalhos (ALVES-BALVEDI et al., 2016; LEE et al., 2018; VOLPE et al., 1998; YANG et al., 2020).

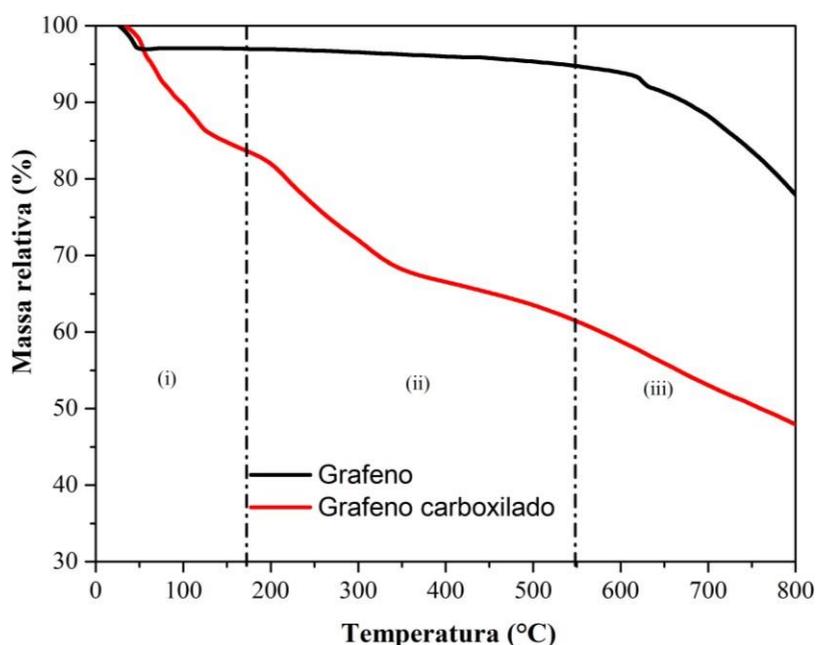
Após o estudo prévio do substrato, foi obtido um voltamograma característico do TMB e fora selecionado um potencial de -0,19V referente ao processo de redução do mesmo, a fim de se aplicar este potencial para estudo das amostras de soro por meio da técnica de cronoamperometria, desta forma foi aplicado este potencial fixo e monitorado no tempo de 10 segundos, todas as medidas para este estudo amperométrico foram realizadas em triplicatas.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1. Caracterização do grafeno carboxilado

#### 6.1.1. Análise termogravimétrica

A **Figura 3.16** apresenta as curvas obtidas para análises termogravimétrica realizadas para o grafeno carboxilado e para o grafeno. O processo de decomposição inclui três etapas principais: (i) evaporação da água, (ii) decomposição de grupos funcionais oxigenados (iii) formação de CO. Na etapa de evaporação de 0 °C a 170 °C, uma perda de peso de ~ 3% e 14% foi configurada para o grafeno e para o grafeno carboxilado, respectivamente. Essas perdas de massa estão associadas à evaporação do solvente e da água constitucional e à adsorção de gases na superfície do material durante o experimento. ((CHHABRA et al., 2012).



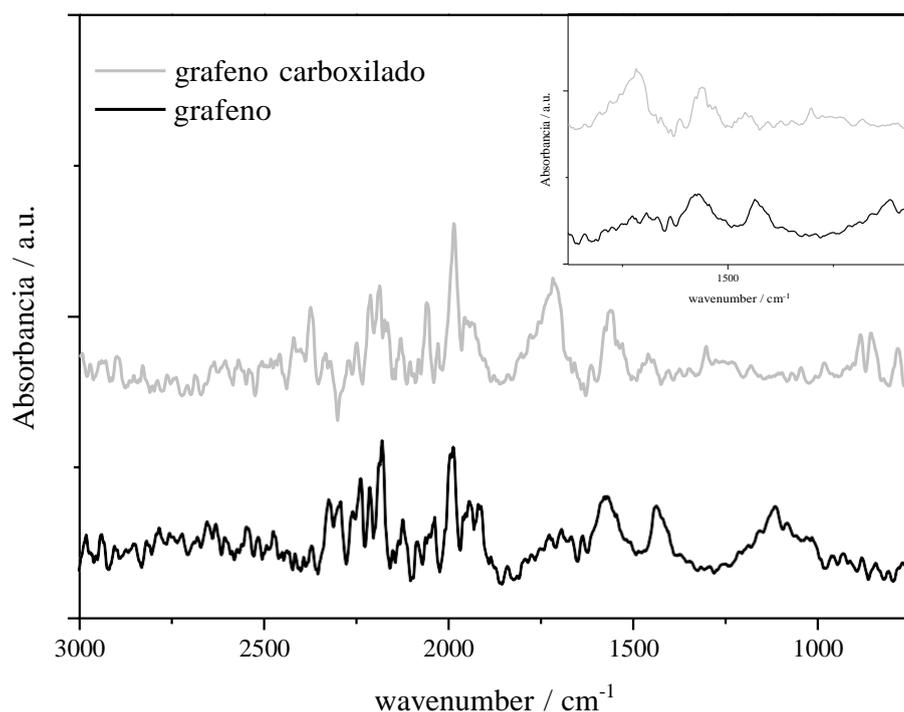
**Figura 3. 16.** Curvas termogravimétricas para decomposição do grafeno carboxilado e para o grafeno.

A próxima etapa registrou uma grande perda de peso (48%) para o grafeno carboxilado, na faixa de 170 ° C até 610 ° C. Nesta faixa de temperatura ocorre a decomposição dos materiais orgânicos em carbonatos. A carbonização dos cátions orgânicos pode ser considerada a principal reação de competição durante a decomposição

da matéria orgânica, devido à oxidação dos compostos orgânicos no ar. No terceiro estágio, ocorre uma pequena perda de peso na faixa de temperatura de 610 ° C – 800 ° C, aproximadamente 1% para o grafeno e 14% para o grafeno carboxilado, que pode estar associada à decomposição de espécies de CO (EIGLER et al., 2012).

### 6.1.2. Espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) e espectroscopia Raman

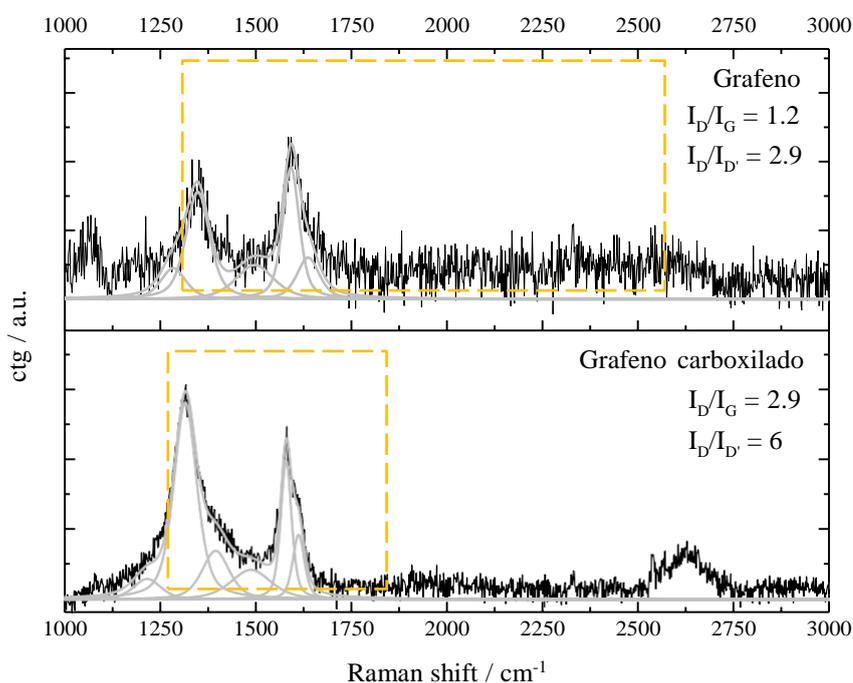
Na **Figura 3.17** são apresentadas bandas obtidas para as análises de ATR-FTIR. A carboxilação do grafeno foi observada e caracterizada por bandas centradas em 1718  $\text{cm}^{-1}$ , 1573  $\text{cm}^{-1}$  e 1240  $\text{cm}^{-1}$ , que correspondem à vibração de estiramento C=O dos grupos carboxílicos, de anéis da estrutura hexagonal e do estiramento HOC do grupo hidroxila respectivamente (VASILE et al., 2019)



**Figura 3. 17.** Espectros de FTIR para o grafeno e grafeno carboxilado.

Na **Figura 3.18** são apresentados os espectros Raman para o grafeno e grafeno carboxilado, onde é possível ver os três picos característicos do grafeno, correspondentes às bandas D, G e 2D centradas em  $\sim 1320$ , 1585 e 2640  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente. Para

materiais de grafeno as bandas D e G correspondem à convolução das bandas D, D', D3, D4, D5 e G, em  $\sim 1322, 1623, 1495, 1196, 1395$  e  $1587 \text{ cm}^{-1}$ . A razão de intensidade da banda D para a banda G ( $I_D/I_G$ ) caracteriza o grau de desordem do grafeno, e em ambos os casos foi característica dos nano flocos de grafeno com razão de 1,2 para o grafeno e 2,9 para o grafeno carboxilado. A razão de  $I_{D'}/I_D$  é usada para explorar os tipos de defeitos do produto gerados, para o grafeno é 2,9 indicando defeito nos limites e para o grafeno carboxilado 6 indicando vacâncias na estrutura hexagonal e (FERRARI; BASKO, 2013).



**Figura 3. 18.** Espectro Raman para o grafeno e o grafeno carboxilado com a deconvolução das bandas D, G.

### 6.1.3. Caracterização eletroquímica das etapas para obtenção do imunossensor

#### 6.1.3.1. Caracterização eletroquímica para o grafeno carboxilado

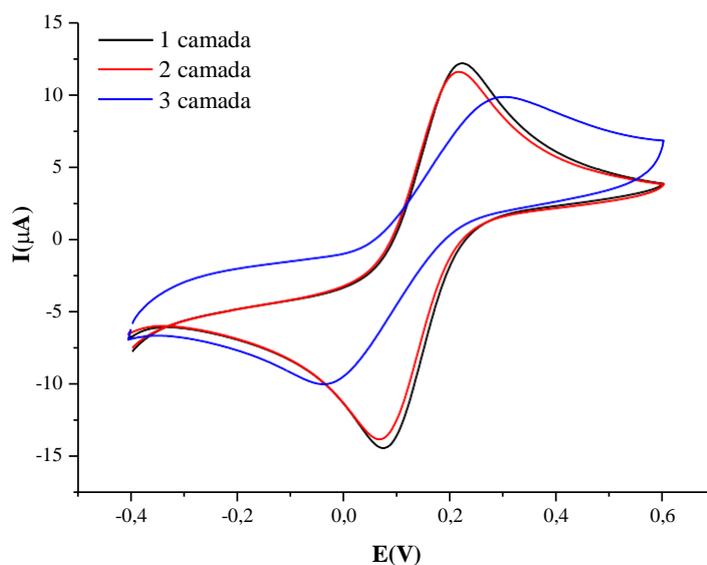
Para construção do imunossensor inicialmente foi feito um estudo eletroquímico a respeito do grafeno carboxilado, especificamente quanto a quantidade de camadas depositadas em superfície do eletrodo de carbono para a adição de grupos carboxílicos

que seriam utilizados como linkers para a imobilização do antígeno proteína N-SARS-CoV-2.

Foram realizados estudos a fim de se obter informações por meio quanto ao comportamento do processo faradaico referente a sonda eletroquímica ferri/ferrocianeto ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ ) de potássio frente a superfície modificada com grafeno carboxilado, foram feitas 3 deposições de grafeno carboxilado, entre cada deposição foram feitas observações por meio da técnica de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica.

Na **Figura 3.19** são apresentados os voltamogramas cíclicos para o processo faradaico referente a sonda eletroquímica ferri/ferrocianeto ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ ) de potássio nos eletrodos modificados com grafeno carboxilado, em ambos os estudos são apresentados os valores referentes aos voltamogramas de eletrodos não modificados (eletrodo limpo) como referências as modificações, para este eletrodo é exibido uma resposta bem definida e reversível das correntes faradaicas referentes ao processo redox do par ferri/ferrocianeto ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ ), indicando que a transferência de elétrons é controlada por difusão, quanto a diferença de potencial entre os picos anódicos e catódicos ( $\Delta E_p$ ) para este eletrodo é registrado o valor de (0,12 )V, o voltamograma não é exibido juntos aos demais por estar sobreponível ao voltamograma referente a primeira deposição de grafeno carboxilado.

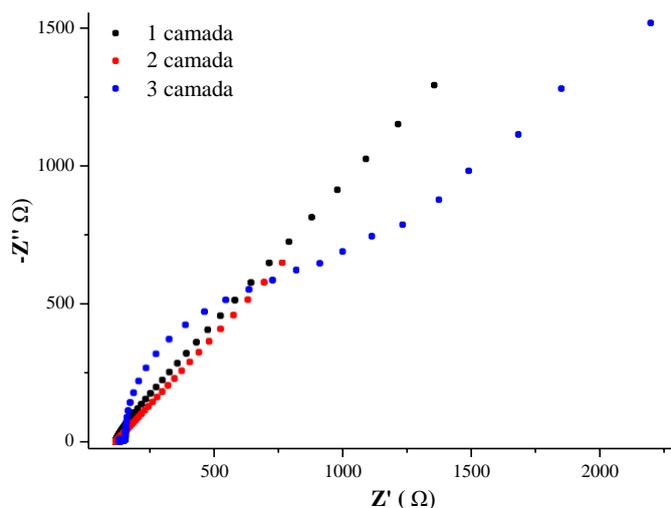
Com o crescimento das camadas de grafeno carboxilado é possível observar que os picos sofrem uma deslocação, com isso aumentando os valores para  $\Delta E_p$ , são apresentados valores de  $\Delta E_p$  (0,15, 0,17, 0,69) para camadas 1, 2 e 3 de grafeno respectivamente, este deslocamento pode ser explicado devido a proporção de grupos ( $\text{COO}^-$ ) na superfície, provocando uma interação repulsiva com os íons redox negativos pertencentes a sonda eletroquímica de ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ ). Foram apresentados os valores de  $i_p$  ( $\pm 1,16 \cdot 10^{-4}$ ,  $\pm 1,22 \cdot 10^{-4}$  e  $\pm 9,80 \cdot 10^{-5}$ ) referente a cada camada de grafeno.



**Figura 3. 19.** Voltamogramas cíclicos para o processo faradaico referente a sonda eletroquímica ferri/ferrocianeto ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ ) de potássio nos eletrodos modificados com grafeno carboxilado.

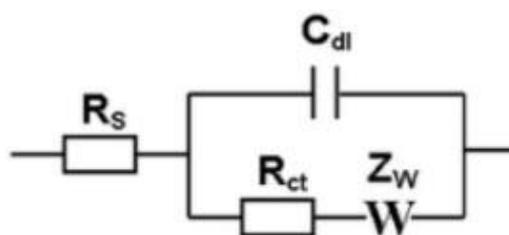
Como estudo complementar as observações feitas através da técnica de VC, foram realizados estudos por meio da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) através dos gráficos de Nyquist (**Figura 3.20**), no espectro de impedância, os semicírculos que apresentam altas frequências representam a resistência a transferência de elétrons, desta forma evidenciando o comportamento de bloqueio referente a superfície do eletrodo seja ela modificada ou sem modificação em direção a sonda eletroquímica ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ ), na parte linear do Nyquist, que apresentam as frequências mais baixas quanto ao processo de resistência a transferência de elétrons (processo de difusão).

É possível observar no espectro de impedância os perfis referentes aos eletrodos modificados com grafeno carboxilado, onde os valores mais baixos quanto a resistência a transferência de elétrons foram obtidas para os eletrodos modificados com 1 e 2 camadas de grafeno, enquanto foi possível observar o aumento do semicírculo significativamente para o eletrodo modificado com 3 camadas de grafeno carboxilado, evidenciando o efeito de bloqueio das camadas sobre o processo de difusão para  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ .



**Figura 3. 20.** Espectros de impedância eletroquímica para o processo faradaico referente a sonda eletroquímica ferri/ferrocianeto ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ ) de potássio nos eletrodos modificados com grafeno carboxilado.

A partir da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica também foi realizado um estudo quanto comportamento da célula eletroquímica utilizada por meio de um estudo representado por um modelo de circuito equivalente, desta forma é possível observar o comportamento do sistema eletroquímico em questão, onde é apresentado parâmetros quanto a resistência a transferência de carga (íons/elétrons) (**Rct**), em serie com o parâmetro de difusão das espécies redox presentes na solução (**Zw**), em paralelo com um capacitor, (**Cdl**) que representa a dupla camada elétrica que funciona como um capacitor, parâmetro este que simula a interação da interface do eletrodo com a solução, e esta por sua vez, em serie com outro resistor (**RS**) onde este parâmetro representa a resistência ôhmica entre o eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho, além da resistência do eletrólito e resistência dos componentes utilizados para conectar ao sistema utilizado (célula eletroquímica), circuito este proposto por Randles (**Figura 3.21**), onde é possível através dele explicar na maioria dos casos os sistemas eletroquímicos.



**Figura 3. 21.** Circuito proposto por Randles para simulação quanto ao comportamento da célula eletroquímica. ((TICIANELLI; ERNESTO RAFAEL GONZALEZ, 2005).

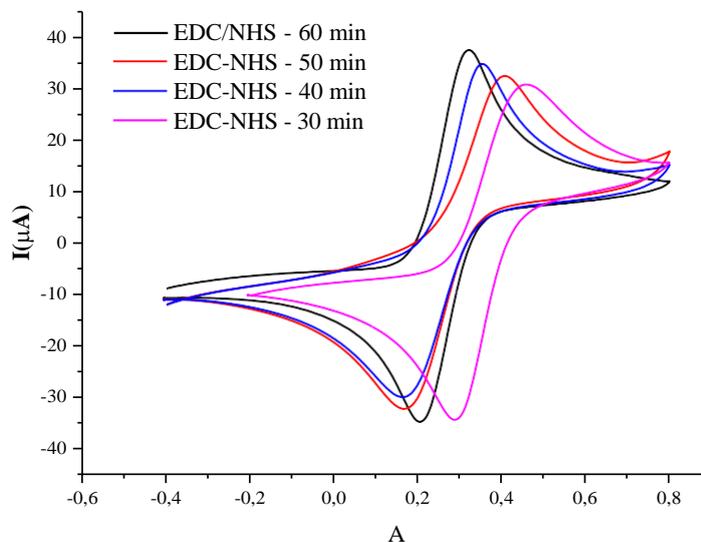
Os valores obtidos para  $R_{ct}(\Omega)$  para as etapas de modificação do eletrodo com grafeno carboxilado corroboram com os dados observados na técnica de VC, é possível observar o aumento a resistência a transferência de carga (íons/elétrons) ao longo das deposições, evidenciando o efeito de bloqueio quanto a transferência de carga provocada pela deposição das camadas de grafeno carboxilado, como pode ser observado na tabela

<b>Eletrodo</b>	<b><math>R_{ct} (\Omega)</math></b>
Eletrodo limpo	82
1 camada de grafeno carboxilado	87,5
2 camadas de grafeno carboxilado	110
3 camadas de grafeno carboxilado	430

**Tabela 3. 2.** Valores de  $R_{ct}$  a partir do circuito de Randles para as etapas referentes a deposição de grafeno carboxilado.

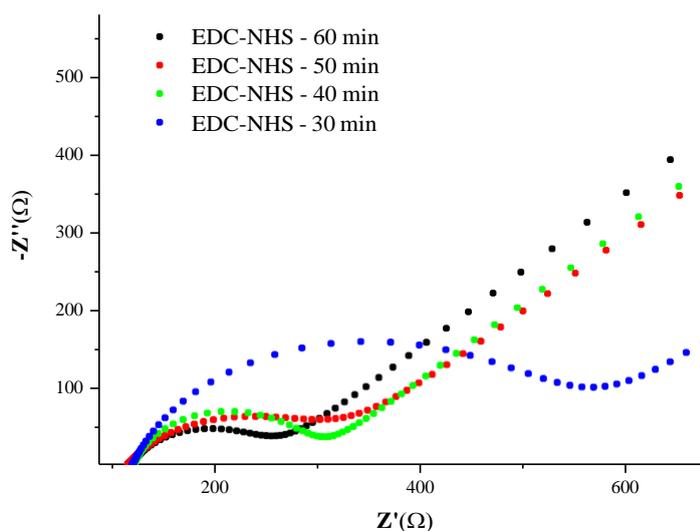
### 6.1.3.3. Caracterização eletroquímica para o agente de acoplamento EDC/NHS e as etapas de obtenção para o imunossensor

Foi realizado um estudo eletroquímico quanto ao tempo de imobilização do sistema EDC/NHS, que atua quanto a ativação de grupos carboxílicos para o recebimento do antígeno. Foram determinados os tempos de 30, 40, 50 e 60 minutos para incubação do sistema, após a etapa de estudo quanto ao grafeno carboxilado, e após isso foi feito um estudo por meio das técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica.



**Figura 3. 22.** Voltamograma cíclico para o processo faradaico referente a sonda eletroquímica ferri/ferrocianeto ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ ) de potássio para o estudo tempo de imobilização do agente de acoplamento EDC-NHS.

A **Figura 3.22** apresenta os voltamogramas cíclicos para a etapa de imobilização do sistema EDC/NHS, é possível observar o comportamento quanto aos valores de  $i_{pa}$  e  $\Delta E_p$  para cada etapa, são apresentados os valores de  $(\pm 3,79 \cdot 10^{-5}, \pm 3,76 \cdot 10^{-5}, \pm 3,46 \cdot 10^{-5}, \pm 3,24 \cdot 10^{-5})$  para os tempos de 60, 50, 40 e 30 minutos respectivamente, desta forma apresentando uma um aumento nos valores de  $i_{pa}$ , este aumento na magnitude de corrente pode ser explicada devida a presença de grupos  $\text{NH}_3$  no meio, desta forma provocando o efeito atrativo com os íons da sonda eletroquímica, tendo uma diminuição quanto aos valores de  $R_{tc}$  e  $\Delta E_p$ .



**Figura 3. 23.** Espectros de impedância eletroquímica para o processo faradaico referente a sonda eletroquímica ferri/ferrocianeto ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ ) de potássio para o estudo tempo de imobilização do agente de acoplamento EDC-NHS.

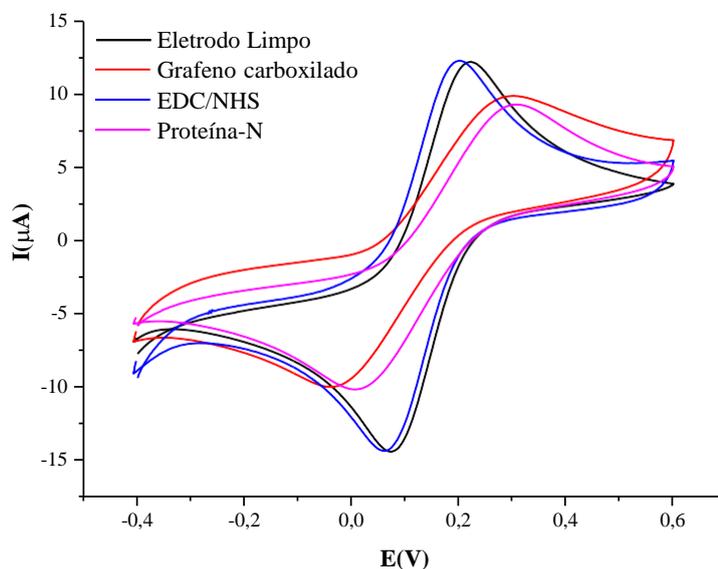
Os resultados obtidos para os espectros de impedância eletroquímica corroboram com os dados obtidos por meio da voltametria cíclica, é possível observar a diminuição do semicírculo ao longo dos tempos de imobilização, indicando os valores mais baixos quanto a resistência a transferência de elétrons, tendo a diminuição quanto ao processo de difusão para  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ , este comportamento pode ser expresso através dos valores de  $R_{ct}$  para cada tempo de imobilização.

<b>Eletrodo</b>	<b><math>R_{ct}</math> (<math>\Omega</math>)</b>
EDC-NHS – 30 minutos	430
EDC-NHS – 40 minutos	270
EDC-NHS – 50 minutos	127
EDC-NHS – 60 minutos	85,5

**Tabela 3. 3.** Valores de  $R_{ct}$  a partir do circuito de Randles para as etapas referentes aos tempos de imobilização do agente de acoplamento EDC-NHS.

Os parâmetros adotados quanto a imobilização de antígenos e anticorpos são descritos nos seguintes trabalhos, (HAYAT et al., 2011; JAROCKA et al., 2014, 2014; KESKIN et al., 2021; REANPANG; CHAILAPAKUL; JAKMUNEE, 2018;

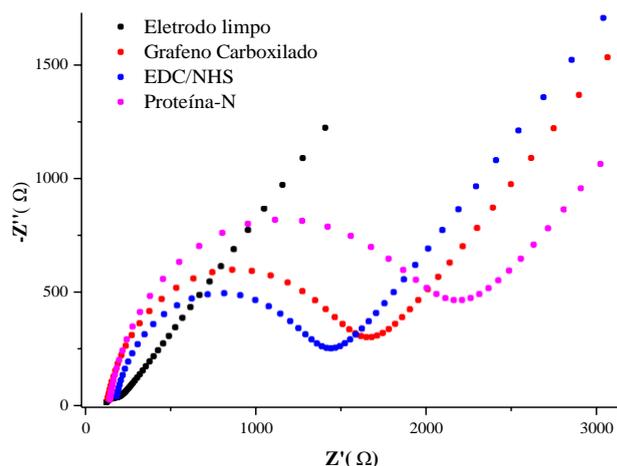
STANKOVIĆ et al., 2020; WICKRAMATHILAKA; TAO, 2019). Foram realizadas análises quanto as etapas de imobilização para construção do imunossensor **Figura 3.24** e **Figura 3.25**.



**Figura 3. 24.** Voltamograma cíclico para as etapas de construção do imunossensor (PBS (0,1 mol/L, pH 7,4) ) contendo 5 mM de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  .

São apresentados na **Figura 3.24** os voltamogramas cíclicos e na **Figura 3.25** espectros obtidos a partir da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica. Por meio da análise dos parâmetros obtidos de ipa e  $\Delta E_p$  a partir dos voltamogramas cíclicos é possível constatar as etapas de imobilização características para cada componentes.

Para o eletrodo não modificado é exibido uma resposta bem definida e reversível para as correntes faradaicas referentes ao comportamento redox para a sonda eletroquímica em questão, indicando que os efeitos de difusão são predominantes aos efeitos resistivos.



**Figura 3. 25.** Espectro de impedância eletroquímica para as etapas de construção do imunossensor (PBS (0,1 mol/L, pH 7,4) ) contendo 5 mM de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ .

A etapa seguinte corresponde a adição de grupos carboxílicos por meio da adição do grafeno carboxílico, como constatado anteriormente foi utilizada as três adições de grafeno carboxilado a superfície, para o ipa foi constatado o valor de  $\pm 9,8 \cdot 10^{-5}$  com o aumento de 31% referente ao valor de  $R_{tc}$  para a etapa do eletrodo não modificado, mostrando que há deslocamento de potencial, conseqüentemente aumento na variação de potencial, para etapa seguinte é possível observar o aumento na magnitude de corrente, devido a presença de grupos  $\text{NH}_3$  no meio e desta forma provocando o efeito atrativo com os íons da sonda eletroquímica, tendo uma diminuição quanto aos valores de  $R_{tc}$  e  $\Delta E_p$  (0,14)V em relação a etapa anterior, mostrando que os fenômenos de difusão são prevaletentes nesta etapa.

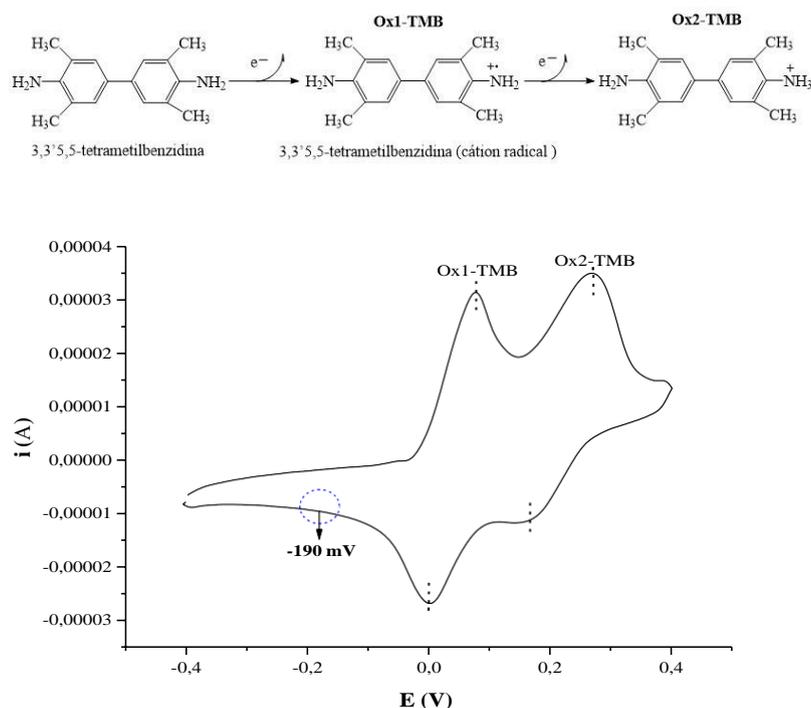
Quanto a etapa para imobilização da proteína, é constatado um aumento de 69% quanto ao valor de  $\Delta E_p$  em relação a etapa anterior, em função do deslocamento dos potenciais, efeito este provocado pelo tamanho da proteína, desta forma provocando um efeito resistivo, a partir dos resultados obtidos por meio das caracterizações eletroquímicas é possível constatar que a metodologia adotada para as imobilizações foi satisfatória.

#### 6.1.3.4. Determinação analítica de anticorpos de SARS-CoV-2

A partir do estudo realizado por meio da técnica de voltametria cíclica foi possível constatar o perfil característico para o substrato TMB como relatado nos seguintes trabalhos, (ALVES-BALVEDI et al., 2016; LEE et al., 2018, 2018; VOLPE et al., 1998; YANG et al., 2020) o perfil característico para o TMB apresenta de dois picos anódicos referentes ao processo de oxidação ox1-TMB (azul,  $\lambda_{\text{max}} = 650 \text{ nm}$ ) e ox2-TMB (amarelo,  $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$ ) e dois picos catódicos.

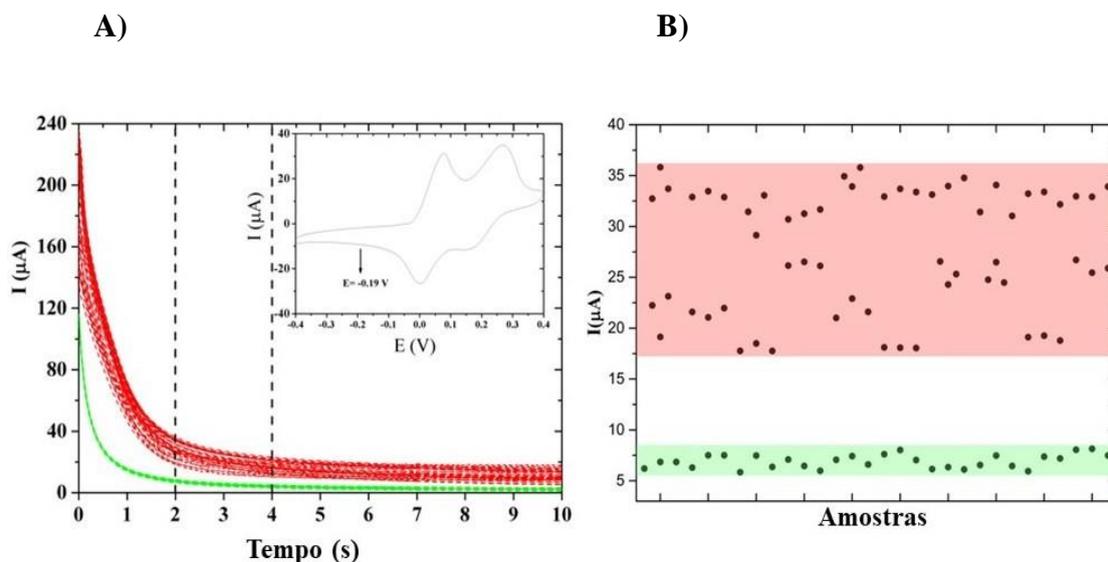
Desta forma foi possível observar através do voltamograma obtido a presença de dois potenciais de pico anódico (**Epa**) referentes as duas etapas de oxidação do TMB que tem início em +90mV (*vs* Ag/AgCl) dando início a formação do cátion radical, seguido por um segundo (**Epa**) na faixa de +295 mV, após o processo de oxidação do TMB.

É observado dois potenciais de picos catódicos (**Epc**) referentes ao processo de redução do mesmo, tendo início na faixa de +173 mV (*vs* Ag/AgCl ), tendo o segundo (**Epc**) em -9mV (*vs* Ag/AgCl), a partir da investigação do perfil do TMB por VC, foi possível determinar o potencial adequado para realizar o processo de redução do mesmo, desta forma, foi selecionado o potencial de -190 mV para o estudo amperométrico, o potencial escolhido se deu antes da reação de redução do substrato, como pode ser observado na **Figura 3.26**.



**Figura 3. 26.** Voltamograma cíclico para o TMB (1-Step Ultra TMB-ELISA.  $H_2O_2$ ), com o indicativo para os potenciais de pico anodico ( $E_{pa}$ ) e potenciais de pico catodico ( $E_{pc}$ ), juntamente com o potencial para redução do TMB,  $pH=7$ , a 0,01 V/s.

As amostras de soro foram submetidas a um estudo cronoamperometrico, inicialmente é feita a aplicação de um potencial fixo (*vs* Ag/AgCl) de -190 mV por um tempo determinado de 10 segundos (10s), a fim de provocar a redução do substrato TMB, esta reação é catalisada pela enzima HRP conjugada ao anticorpo IgG. As amostras submetidas aos ensaios amperometricos compreendiam dois grupos, pacientes que apresentaram COVID-19 (CVD e PCQ) ou aqueles que não apresentaram indicativo para COVID-19 (SAU) quanto aos resultados obtidos por meio da técnica de ELISA.



**Figura 3. 27.** A) Cronoamperogramas referentes as amostras de soro B) Representação gráfica dos valores de corrente observadas nos cronoamperogramas quanto ao tempo de 2 segundos.

Na **Figura 3.27** são apresentadas as curvas obtidas por meio do estudo cronoamperométrico para as amostras de soro por meio da reação redox para o TMB catalisada pela enzima HRP, e valores relacionados a magnitude de corrente observadas nos cronoamperogramas quanto ao tempo de 2 segundos. É constatado uma diferença de  $(2,115 \cdot 10^{-5})$  A entre os grupos de amostras de pacientes saudáveis e pacientes positivos para COVID-19, os resultados obtidos por meio do estudo cronoamperométrico corroboram com os valores quanto ao ensaio imune enzimático indireto (ELISA).

A detecção para anticorpos IgG para COVID-19 foi realizada de forma indireta, desta forma a magnitude de corrente observada no cronoamperograma é equivalente a concentração de espécies IgG presentes no soro depositado na etapa anterior a imobilização do anticorpo marcado. As medidas foram realizadas em triplicata, os resultados obtidos quanto aos valores de correntes para as amostras e os seus índices de reatividade foram expressos na **tabela 3.4**.

Código da amostra	IR (Índice de reatividade)	Média das correntes (µA)	Corrente 1 (µA)	Corrente 2 (µA)	Corrente 3 (µA)
CVD010190	11,6	31,738	34,160	27,602	31,738
MET010132	10,47	31,738	33,837	27,267	31,738
MET010129	9,54	33,275	33,275	29,348	35,254
CVD010279	9,41	31,654	34,031	29,418	31,654
CVD010290	8,96	29,786	34,206	29,609	29,786
CVD010093	8,68	34,004	34,004	29,389	35,017
CVD010101	6,09	29,143	34,285	29,050	29,143
CVD010139	6,04	31,772	34,418	31,772	31,386
CVD010154	4,88	29,204	33,797	29,204	28,545
CVD010277	1,23	34,394	34,394	27,178	36,006
PCQ010115	12,09	31,738	31,738	31,738	31,738
PCQ010131	8,3	31,738	31,738	31,738	31,738
PCQ010177	6,99	34,017	34,265	33,770	34,017
PCQ010215	5,59	31,654	31,654	31,654	31,654
PCQ010165	5,22	29,786	29,786	29,786	29,786
PCQ010210	4,32	34,384	34,511	34,257	34,384
PCQ010253	3,35	29,143	29,143	29,143	29,143
PCQ010148	2,17	31,627	31,579	31,676	31,627
PCQ010010	0,92	28,957	28,875	29,039	28,957
PCQ010203	0,6	34,998	35,200	34,797	34,998
SAU14	1,56	6,994	7,064	6,994	6,994
SAU19	1,17	7,654	7,725	7,654	7,654
SAU01	1,09	7,627	7,697	7,627	6,512
SAU02	1,08	7,739	7,739	7,669	8,204
SAU03	1,06	7,639	7,709	7,639	6,813
SAU04	1,04	7,642	7,712	7,642	7,255
SAU15	1,04	7,730	7,730	7,660	7,952
SAU04	0,96	7,697	7,697	7,627	8,597
SAU05	0,67	7,658	7,658	7,588	8,414
SAU07	0,6	7,615	7,685	7,615	7,129

**Tabela 3. 4.** Informações referentes as amostras de soro, índices de reatividade (IR) e valores de corrente obtidos a partir da seleção do tempo de 2 segundos e suas triplicatas.

Na **tabela 3.4** é possível observar a relação entre os sintomas dos pacientes e os valores de corrente obtidos a partir do estudo cronoamperométrico, as amostras de soro que apresentam em sua descrição SAU são de pacientes saudáveis, aqueles que apresentam o código PCQ são referentes a pacientes que apresentaram sintomas leves e os códigos CVD e MET consistem em pacientes que apresentaram sintomas graves quanto ao quadro de COVID-19. Nesta perspectiva é possível observar o aumento nos valores de corrente com a mudança do quadro clínico do paciente.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi realizado um estudo eletroquímico referente as modificações em eletrodo de carbono para obtenção do imunossensor eletroquímico marcado, inicialmente foi realizada a síntese para o grafeno carboxilado pela técnica de sonicação e em seguida foi caracterizado via TG, espectroscopia Raman e ART-FTIR. Foi realizado o estudo para as camadas de grafeno carboxilado depositado em superfície do eletrodo de carbono, foram obtidos os valores de  $i_{pa}$  ( $\pm 1,16 \cdot 10^{-4}$ ,  $\pm 1,22 \cdot 10^{-4}$  e  $\pm 9,80 \cdot 10^{-5}$ ) referentes as camadas (1, 2 e 3) de grafeno carboxilado com o crescimento das camadas de grafeno carboxilado é possível observar o deslocamento dos picos anódicos com isso aumentando os valores para  $\Delta E_p$ , são apresentados valores de  $\Delta E_p$  (0,15, 0,17, 0,69), a partir deste valores foi adotada o uso de 3 camadas de grafeno carboxilado. Foi constatado a partir dos estudos eletroquímicos o melhor tempo para imobilização do agente de acoplamento EDC-NHS, visto que este apresenta papel crucial para imobilização do antígeno de reconhecimento (proteína- N).

Por meio das caracterizações eletroquímicas para as etapas de imobilização em eletrodo de carbono possível constatar que a metodologia adotada foi satisfatória. O estudo cronoamperométrico realizado para as amostras de soro indicaram uma diferença de ( $2,115 \cdot 10^{-5}$ ) A entre os grupos da amostras para pacientes saudáveis e pacientes positivos para COVID-19, os resultados obtidos por meio do estudo ampemométrico corroboram com os valores quanto ao ensaio imune enzimático indireto (ELISA).

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular E Molecular* 7a Edição. [s.d.].

ALVES-BALVEDI, R. P. et al. Use of 3,3',5,5' tetramethylbenzidine as new electrochemical indicator of DNA hybridization and its application in genosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 226–231, 2016.

AN WONG, C. H. Synthetic routes contaminate graphene materials with a whole spectrum of unanticipated metallic elements. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 38, p. 13774–13779, 2014.

ANDREESCU, S. et al. Screen-printed electrode based on ache for the detection of pesticides in presence of organic solvents. **Talanta**, v. 57, n. 1, p. 169–176, 2002.

ANJORIN, A. A. The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: A review and an update on cases in Africa. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 13, n. 5, p. 199–203, 2020.

ARAÚJO F. *Imunossensores potenciométricos para a detecção da proteína NS1 do vírus da dengue*. 2013.

BARBOSA, E. F. Universidade de Brasília Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal Prospecção e análises de superfícies para imobilização de biomoléculas Universidade de Brasília Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal Prospecção e análises de superfícies para im. 2014.

BCHETNIA, M. et al. The outbreak of the novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): A review of the current global status. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 11, p. 1601–1610, 2020.

BOCKRIS, J. O.; REDDY, A. K. N. **Modern Electrochemistry Vol 2B**. [s.l: s.n.].

BRASIL (C). Acurácia dos testes diagnósticos registrados na ANVISA para a COVID-19 ANVISA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. p. 1–35, 2020.

CARVALHO, L. A. DE et al. **ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA**

ELETROQUÍMICA APLICADA AO ESTUDO DAS REAÇÕES HETEROGÊNEAS EM ÂNODOS DIMENSIONALMENTE ESTÁVEIS. v. 29, n. 4, p. 796–804, 2006.

CESEWSKI, E.; JOHNSON, B. N. Electrochemical biosensors for pathogen detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 159, n. 540, 2020.

CHAN-YEUNG, M. et al. SARS : epidemiology CUMULATIVE NUMBER OF CASES AND DEATHS IN VARIOUS COUNTRIES IN. **Respirology**, v. 8, p. S9–S14, 2003.

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

CHO, I. H. et al. Current technologies of electrochemical immunosensors: Perspective on signal amplification. **Sensors (Switzerland)**, v. 18, n. 1, p. 1–18, 2018.

DE OLIVEIRA LEITE, D.; PRADO, R. J. Espectroscopia no infravermelho: Uma apresentação para o Ensino Médio. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, n. 2, 2012.

DE OLIVEIRA LIMA, C. M. A. Information about the new coronavirus disease (COVID-19). **Radiologia Brasileira**, v. 53, n. 2, p. v–vi, 2020.

DE, P. M. et al. Universidade Federal Do Amazonas Humano ( Tnf- A ) Luana Kelly Lima Santana Manaus – Am Manaus – Am. 2016.

DE SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: UM tutorial, parte I. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 223–229, 2012.

DOMÉNECH-CARBÓ, A.; LABUDA, J.; SCHOLZ, F. Electroanalytical chemistry for the analysis of solids: Characterization and classification (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 609–631, 2013.

DOS SANTOS RICCARDI, C.; DA COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Amperometric immunosensor. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 316–320, 2002.

EIGLER, S. et al. Formation and decomposition of CO<sub>2</sub> intercalated graphene oxide. **Chemistry of Materials**, v. 24, n. 7, p. 1276–1282, 2012.

ESTEVIÃO, A. COVID-19: v. 32, p. 5–6, 2020.

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

FERRARI, A. C.; BASKO, D. M. Raman spectroscopy as a versatile tool for studying the properties of graphene. **Nature Nanotechnology**, v. 8, n. 4, p. 235–246, 2013.

FERREIRA, R. D. Q.; AVACA, L. A. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante de sucos de frutas industrializados usando o CRAC assay. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2169–2173, 2008.

GOGOLA, J. L. IMUNOSSENSOR LABEL-FREE PARA DETECÇÃO DE SÍNDROME CARDIOPULMONAR POR HANTAVÍRUS. 2018.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, M. I. et al. Electrochemical performance of activated screen printed carbon electrodes for hydrogen peroxide and phenol derivatives sensing. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 839, n. March, p. 75–82, 2019.

GRAÇA, J. S.; FERREIRA, M. Liposome-encapsulated biomolecules: Application in enzymatic biosensors and immunosensors. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1552–1564, 2015.

GRASSI, L. T. V. M. T. G. Espectroscopia de Raman e os efeitos do óleo em fibra capilar Raman spectroscopy and the effects of oil on hair fiber. p. 50478–50484, 2021.

GREEN, K. et al. What tests could potentially be used for the screening , diagnosis and monitoring of COVID-19 and what are their advantages and disadvantages ? **Centre for Evidence-Based Medicine**, p. 1–13, 2020.

HAYAT, A. et al. An electrochemical immunosensor based on covalent immobilization of okadaic acid onto screen printed carbon electrode via diazotization-coupling reaction. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 513–518, 2011.

HOCK, B. Antibodies for immunosensors. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 347,

n. 1–2, p. 177–186, 1997.

HUANG, L. et al. Rapid asymptomatic transmission of COVID-19 during the incubation period demonstrating strong infectivity in a cluster of youngsters aged 16-23 years outside Wuhan and characteristics of young patients with COVID-19: A prospective contact-tracing study. **Journal of Infection**, v. 80, n. 6, p. e1–e13, 2020.

IMAI, K. et al. Clinical evaluation of an immunochromatographic IgM/IgG antibody assay and chest computed tomography for the diagnosis of COVID-19. **Journal of Clinical Virology**, v. 128, p. 10–11, 2020.

JAROCKA, U. et al. Electrochemical immunosensor for detection of antibodies against influenza A virus H5N1 in hen serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 55, p. 301–306, 2014.

JOSE, D. SARS-Cov-2 Systems Biology. **Annals of Systems Biology**, v. 2, p. 029–032, 2020.

JÚNIA G. PEREIRA, F. O. Educação. v. 32, n. 6, p. 1661–1666, 2009.

KAWANA, A.; MIKASA, K.; IZUMIKAWA, K. Novel Coronavirus Disease (COVID-19). **Nihon Naika Gakkai Zasshi**, v. 109, n. 3, p. 392–395, 2020.

KESKIN, E. et al. Voltammetric quantification of the anesthetic drug propofol (2,6-diisopropylphenol) in the pharmaceutical formulations on a boron-doped diamond electrode. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 86, n. 7–8, p. 711–724, 2021.

LALWANI, P. et al. High anti-SARS-CoV-2 antibody seroconversion rates before the second wave in Manaus, Brazil, and the protective effect of social behavior measures: Results from the DETECTCoV-19 cohort. **Research Square**, 2021.

LEE, G. Y. et al. Chronoamperometry-Based Redox Cycling for Application to Immunoassays. **ACS Sensors**, v. 3, n. 1, p. 106–112, 2018.

LI, J. et al. Clinical features of familial clustering in patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Virus Research**, v. 286, n. May, p. 198043, 2020.

LIM, S. A.; AHMED, M. U. Electrochemical immunosensors and their recent

nanomaterial-based signal amplification strategies: A review. **RSC Advances**, v. 6, n. 30, p. 24995–25014, 2016.

LIMA, L. N. G. C.; DE SOUSA, M. S.; LIMA, K. V. B. As descobertas genômicas do SARS-CoV-2 e suas implicações na pandemia de COVID-19. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1, 2020.

LOEFFELHOLZ, M. J.; TANG, Y. W. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections—the state of the art. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, n. 1, p. 747–756, 2020.

LOURENÇO, R. R. et al. Ação sonoquímica e influência das condições de tratamento térmico na preparação de cimentos do sistema binário CaO-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. **Cerâmica**, v. 56, n. 337, p. 28–38, 2010.

MAGALHAES, G. S. et al. Activation of Ang-(1-7)/Mas Receptor Is a Possible Strategy to Treat Coronavirus (SARS-CoV-2) Infection. **Frontiers in Physiology**, v. 11, n. June, p. 1–5, 2020.

MAGNO, L. et al. Challenges and proposals for scaling up COVID-19 testing and diagnosis in Brazil. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 25, n. 9, p. 3355–3364, 2020.

MAKARAVICIUTE, A.; RAMANAVICIENE, A. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 50, p. 460–471, 2013.

MALAVÉ, M. M. Testes para a Covid-19: como são e quando devem ser feitos Publicado pelo Portal. p. 4–7, 2021.

MEHROTRA, P. Biosensors and their applications - A review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, n. 2, p. 153–159, 2016.

MILAZZO, G. et al. Electrochemistry of Biomolecules. **Electroanalytical Chemistry**, v. 9, 2001.

MIYAZAKI, C. M. et al. Surface plasmon resonance biosensor for enzymatic detection of small analytes. **Nanotechnology**, v. 28, n. 14, 2017.

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

NECTOUX, A. DA S. DESENVOLVIMENTO DO SENSOR ELETROQUÍMICO ACeI/TiO<sub>2</sub>/Sb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/BQ E APLICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO NA PRESENÇA DE INTERFERENTES. **עלון הנוטע**, v. 66, p. 37–39, 2012.

NUNES DE CASTRO, L. Cap. 2: O Sistema Imunológico. [s.d.].

OKUNO, J. et al. Label-free immunosensor for prostate-specific antigen based on single-walled carbon nanotube array-modified microelectrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 9–10, p. 2377–2381, 2007.

OLIVEIRA, G. C. M. DE. Desenvolvimento De Sensores E Imunossensor Eletroquímico Para Detecção De Analitos Relacionados À Doença De Parkinson. 2019.

PACHECO, W. F. et al. Voltammetry: A brief review about concepts. **Revista Virtual de Quimica**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PEI, X. et al. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 758, p. 1–18, 2013.

PYUN, S.-I. et al. Abnormal Behaviors in Hydrogen Transport: Importance of Interfacial Reactions. p. 149–172, 2012.

RABCHINSKII, M. K. et al. Graphene oxide conversion into controllably carboxylated graphene layers via photoreduction process in the inert atmosphere. **Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures**, v. 28, n. 3, p. 221–225, 2020.

RAJ, V. S. et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. **Nature**, v. 495, n. 7440, p. 251–254, 2013.

REANPANG, P.; CHAILAPAKUL, O.; JAKMUNEE, J. Fabrication of a home-made SPCE modified with thionine for determination of hydrogen peroxide. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 45, n. 3, p. 1449–1459, 2018.

RICCI, F.; ADORNETTO, G.; PALLESCHI, G. A review of experimental aspects of

- electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 74–83, 2012.
- RICCÒ, M. et al. Point-of-Care Diagnostic Tests for Detecting SARS-CoV-2 Antibodies: A Systematic Review and Meta-Analysis of Real-World Data. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 5, p. 1515, 2020.
- RODRIGUES, A. D. G.; GALZERANI, J. C. Espectroscopia de IV, UV e Raman. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, n. 4, p. 4309, 2012.
- ROSA, T. A. DA S. Imobilização E Detecção De Biomoléculas Em Matrizes De Poli ( Ácido Desenvolvimento De Genossensores Biomoléculas Em Matrizes De Poli ( Ácido 4-Hidroxifenilacético ): Aplicações No. 2008.
- SHEN, M.; RUSLING, J. F.; DIXIT, C. K. Site-selective orientated immobilization of antibodies and conjugates for immunodiagnostics development. **Methods**, v. 116, p. 95–111, 2017.
- SILVA, A. S. Síntese, caracterização e aplicação do alfa-hidróxido de níquel associado a óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido como sensor voltamétrico. p. 1–127, 2018.
- SINGHAL, T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). **Indian Journal of Pediatrics**, v. 87, n. 4, p. 281–286, 2020.
- SKOOG, WEST, HOLLER, C. Fundamentos de Química Analítica. v. 8º edição, p. 1226, 2010.
- SOHRABI, C. et al. World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19). **International Journal of Surgery**, v. 76, n. February, p. 71–76, 2020.
- SOUZA, F. C. B. DE; Protocolos utilizados para diagnostico de COVID-19. v. 4, p. 35–39, 2020.
- STANKOVIĆ, V. et al. Anti-human albumin monoclonal antibody immobilized on EDC-NHS functionalized carboxylic graphene/AuNPs composite as promising electrochemical HSA immunosensor. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 860, 2020.
- TAIPALE, J.; ROMER, P.; LINNARSSON, S. Population-scale testing can suppress the

spread of COVID-19. **medRxiv**, p. 1–20, 2020.

TAKAHASHI, K.; MIURA, Y.; MIZUNO, T. Antibiotics feeding accelerate functional maturation of intestinal immune-related cells of male broiler chicks after hatch. **Journal of Poultry Science**, v. 48, n. 3, p. 187–193, 2011.

THÉVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 1–2, p. 121–131, 2001.

TICIANELLI, E. A.; ERNESTO RAFAEL GONZALEZ. **Eletroquímica: Princípios e Aplicações Vol. 17**. [s.l: s.n.].

VASILE, E. et al. Hema-Functionalized Graphene Oxide: a Versatile Nanofiller for Poly(Propylene Fumarate)-Based Hybrid Materials. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2019.

VOLPE, G. et al. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as electrochemical substrate for horseradish peroxidase based enzyme immunoassays. A comparative study. **Analyst**, v. 123, n. 6, p. 1303–1307, 1998.

WANG, L. et al. Review of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) based on current evidence. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 6, p. 105948, 2020.

WEI, S. et al. A label-free immunosensor based on graphene oxide/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Prussian blue nanocomposites for the electrochemical determination of HBsAg. **Biosensors**, v. 10, n. 3, 2020.

WEISS, S. R.; LEIBOWITZ, J. L. **Coronavirus pathogenesis**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. v. 81

WELCH, N. G. et al. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review). **Biointerphases**, v. 12, n. 2, p. 02D301, 2017.

WICKRAMATHILAKA, M. P.; TAO, B. Y. Characterization of covalent crosslinking strategies for synthesizing DNA-based bioconjugates. **Journal of Biological Engineering**, v. 13, n. 1, p. 8–17, 2019.

WU, D. et al. The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. **International Journal of**

**Infectious Diseases**, v. 94, p. 44–48, 2020.

WUJCIK, E. K. et al. Antibody nanosensors: A detailed review. **RSC Advances**, v. 4, n. 82, p. 43725–43745, 2014.

YANG, H. et al. Antibody-biotin-streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) sensor for rapid and ultra-sensitive detection of fumonisins. **Food Chemistry**, v. 316, n. December 2019, p. 126356, 2020.

ZHU, N. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 2020.