

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia dos Materiais



Dissertação de Mestrado

**Biossensor eletroquímico a base de grafeno induzido a laser para diagnóstico
da COVID-19: detecção de anticorpos biomarcadores anti-SARS-CoV-2**

Marcelly Echeverria Oliveira

Pelotas, 2022

Marcelly Echeverria Oliveira

Biossensor eletroquímico a base de grafeno induzido a laser para diagnóstico da COVID-19: detecção de anticorpos biomarcadores anti-SARS-CoV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Neftalí Lenin Villarreal Carreño

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Tsuyama Escote

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

O48b Oliveira, Marcely Echeverria

Biossensor eletroquímico a base de grafeno induzido a laser para diagnóstico da Covid-19 : detecção de anticorpos biomarcadores anti-Sars-CoV-2 / Marcely Echeverria Oliveira ; Neftalí Lenin Villarreal Carreño, orientador ; Márcia Tsuyama Escote, coorientadora. – Pelotas, 2022.

102 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Biossensor eletroquímico. 2. Sars-CoV-2. 3. Covid-19. 4. anticorpos. 5. Grafeno induzido por laser.. I. Carreño, Neftalí Lenin Villarreal, orient. II. Escote, Márcia Tsuyama, coorient. III. Título.

CDD : 620.11063

Marcelly Echeverria Oliveira

Biossensor eletroquímico a base de grafeno induzido a laser para diagnóstico da
COVID-19: detecção de anticorpos biomarcadores anti-SARS-CoV-2

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em
Ciência e Engenharia de Materiais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade
Federal de Pelotas.

Data da Defesa: Pelotas, 29 de julho de 2022

Banca examinadora:

Prof. Dr. Neftalí Lenin Villarreal Carreño (Orientador)

Doutor em Química pela Universidade Federal de São Carlos

Prof^a. Dr^a. Márcia Tsuyama Escote (Coorientadora)

Doutora em física pela Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Antoninho Valentini

Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Fabiana Villela da Motta

Doutora em Química pela Universidade Federal de São Carlos

Prof^a. Dr^a. Amanda Dantas de Oliveira (Suplente)

Doutora em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de São
Carlos

Agradecimentos

Agradeço aos órgãos de fomento, CNPq (processo número PCI/302214/2021-6), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001, CAPES-PrInt (SWE, processo número 88887.310585 / 2018-00), FAPERGS 06/2020 - Ciência e Tecnologia no Combate à COVID-19 (processo número 20 / 2551-0000260-8), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Forense (processo número 465450 / 2014-8) e Universidade Federal do ABC -EDITAL 73/2020 (processo número 23006.002353 / 2020-41), os quais financiaram esta pesquisa.

Agradeço a Universidade Federal de Pelotas (UFPEl), Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Matérias (PPGCEM) e ao Grupo de pesquisa em Tecnologias Aplicadas em Materiais Avançados Novonano coordenado pelo Prof. Dr. Neftalí Lenin Villarreal Carreño, o qual faço parte e desenvolvo pesquisa. Ademais, agradeço aos professores e colegas com os quais tive a honra de conviver durante este período pelo companheirismo e conhecimentos compartilhados.

Agradeço aos grupos de pesquisa colaboradores: Grupo de Pesquisa de imunologia aplicada coordenado pelo Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição e Grupo de Pesquisa Bioprospecção de Moléculas Biologicamente Ativas coordenado pelo Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto ambos vinculados ao Programa de Pós-Graduação e Biotecnologia (PPGB) da UFPEl; ao grupo de Pesquisa Bioforense e Inovação da UFPEl coordenado pelo Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira; ao grupo de pesquisa de Materiais Avançados – Nanoestruturas e Dispositivos (MAND) coordenado pela Prof^a. Dr^a. Marcia Tsuyama Escote vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Materiais Avançados (PPG-NMA) do Centro de Modelagem de Engenharia e Ciências Sociais Aplicadas da Universidade Federal do ABC (UFABC) e as instalações centrais de multiusuário de mesma instituição. Os grupos de pesquisa supracitados e instalações foram fundamentais para o desenvolvimento deste projecto proporcionando a realização da pesquisa bem como troca e aquisição de saber.

Resumo

OLIVEIRA, Marcelly Echeverria. **Biossensor eletroquímico a base de grafeno induzido a laser para diagnóstico da COVID-19: detecção de anticorpos biomarcadores anti-SARS-CoV-2**. 2022. f. 102. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia dos Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia dos Materiais, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

A síndrome respiratória aguda grave originada pelo novo coronavírus ((nCoV) (SARS-CoV-2) e suas variantes genéticas que emergiu no final de 2019, conhecida por ser uma doença altamente transmissível e patogênica, causou o surto pandêmico global de COVID-19. São necessários dispositivos de diagnósticos que auxiliem em medidas epidemiológicas de segurança pública para redução de casos não detectados e isolamento de pacientes infectados, além de auxiliar significativamente no controle da resposta imunológica da população à vacina. Para abordar as questões negativas da pesquisa clínica, desenvolveu-se uma plataforma *Diagnostic on a Chip* baseada em um biossensor eletroquímico descartável contendo grafeno induzido à laser e uma proteína (antígeno QCoV-8 específico para SARS-CoV-2) para a detecção de biomarcadores (anticorpos anti-SARS-CoV-2). Os biossensores foram produzidos por meio do método de gravação direta a laser utilizando uma máquina de corte a laser de CO₂ em folhas comerciais de poliimida. A presença de anticorpos anti-SARS-CoV-2 reage com o antígeno e o indicador redox K₃[Fe(CN)₆] produzindo sinais eletroquímicos característicos e dependentes da concentração, com tempo estimado de processamento de análise de 3 min. A plataforma DoC acoplada a um potenciostato comercial, apresentou valores médios de corrente para testes realizados em amostras clínicas reativas e não reativas, chegando a 9,53 µA (desvio padrão de 0,32) e 7,96 µA (desvio padrão de 0,84), respectivamente. Enquanto a plataforma DoC acoplada ao potenciostato portátil microcontrolado exibiu sinais com valores médios de corrente de 9,6757 e 8,1812 µA em biofluidos séricos de pacientes reativos e não-reativos respectivamente para anticorpos anti-SARS-CoV-2. Dessa forma, a plataforma apresenta novas possibilidades para o diagnóstico da COVID-19, e está sendo otimizada para medidas em um potenciostato portátil microcontrolado para ser aplicada como ferramenta de monitoramento e mapeamento rápido e confiável, com o objetivo de avaliar a resposta imune vacinal da população.

Palavras-Chaves: Biossensor eletroquímico. SARS-CoV-2. COVID-19. Anticorpos. Grafeno induzido por laser.

Abstract

OLIVEIRA, Marcelly Echeverria. **Electrochemical biosensor based on laser-induced graphene for COVID-19 diagnosing: detection of anti-SARS-CoV-2 biomarker antibodies.** 2022. f. 102. Dissertation (master's degree in Materials Science and Engineering) - Postgraduate Program in Materials Science and Engineering, Technological Development Center, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2022.

The severe acute respiratory syndrome originated by the new coronavirus ((nCoV) (SARS-CoV-2) that emerged in late 2019, known to be a highly transmissible and pathogenic disease, has caused the COVID-19 global pandemic outbreak. Diagnostic devices that help epidemiological public safety measures to reduce undetected cases and isolation of infected patients, in addition to significantly help to control the population's immune response to vaccine, are required. To address the negative issues of clinical research, we developed a Diagnostic on a Chip platform based on a disposable electrochemical biosensor containing laser-induced graphene and a protein (SARS-CoV-2 specific QCoV-8 antigen) for the detection of biomarkers (anti-SARS-COV-2 antibodies). The biosensors were produced by means of the direct laser engraving method using a CO₂ laser cutting machine on commercial polyimide sheets. The presence of anti-SARS-CoV-2 antibodies reacts with the antigen and the redox indicator K₃[Fe(CN)₆] producing characteristic and concentration dependent electrochemical signals, with an estimated analysis processing time of 3 min. The DoC platform coupled to a commercial potentiostat showed average current values for tests performed on reactive and non-reactive clinical samples, reaching 9.53 μ A (standard deviation of 0.32) and 7.96 μ A (standard deviation of 0.84), respectively. While the DoC platform coupled to the portable microcontrolled potentiostat exhibited signals with average current values of 9.6757 and 8.1812 μ A in serum biofluids of reactive and non-reactive patients respectively for anti-SARS-CoV-2 antibodies. In this way, the platform presents new possibilities for the diagnosis of COVID-19 and is being optimized for measurements in a portable microcontrolled potentiostat to be applied as a rapid and reliable monitoring and mapping tool, with the objective of evaluating the vaccine immune response of the population.

Keywords: Electrochemical biosensor. SARS-CoV-2. COVID-19. Antibodies. Laser induced graphene.

Listas de Figuras

Figura 1: Ilustração da estrutura do vírus SARS-CoV-2. M: membrana lipídica; S: espícula de contato do vírus com receptores celulares; E: envoltório glicoproteico; RNA+: material genético viral; N: capsídeo proteico.	22
Figura 2: Ilustração do contexto geográfico e epidemiológico da COVID-19.	24
Figura 3: Ilustração das configurações e mecanismo de funcionamento de um biossensor.	28
Figura 4: Ilustração do processo DLW contendo alguns padrões normalmente utilizados como transdutores de plataformas DoC para biossensores.	36
Figura 5: Ilustração de um processo padrão de obtenção de plataforma DoC em LIG utilizando filme polimérico de PI.	39
Figura 6: Exemplo de curva corrente versus potencial para amostras com diferentes concentrações de analito.	42
Figura 7: Ilustração esquemática dos métodos de imobilização de elementos de biorreconhecimento.	50
Figura 8: Ilustração do processo de produção da plataforma DoC usando filme polimérico de PI.	57
Figura 9: Ilustração detalhada das dimensões do sistema de três eletrodos contidos na plataforma DoC produzidos utilizando filme polimérico de PI.	58
Figura 10: Plataforma Doc desenvolvida acoplada ao potenciostato portátil microcontrolado para PoCT aplicado a determinação de anticorpos biomarcadores da COVID-19.	63
Figura 11: Espectro Raman da amostra de LIG obtido por meio do método de DLW de CO ₂	65
Figura 12: Espectros FTIR da amostra de grafeno induzido a laser formada pela técnica LIG.	65
Figura 13: Espectro de difração de raios X da amostra de LIG formada pela técnica DLW.	66
Figura 14: (a) Espectros XPS da amostra LIG; (b) Espectro XPS de alta resolução C 1S da amostra LIG; (c) O 1s e (d) N 2s.	67

Figura 15: (a) Imagens de microscopia eletrônica de varredura exibindo a morfologia de superfície das amostras de LIG. (b) Mapeamento químico elementar (EDS) da amostra de LIG confirmando a presença dos elementos químicos C e O.	68
Figura 16: DPV com a plataforma DoC acoplada ao potenciostato comercial na presença de par redox $K_4[Fe(CN)_6]$ avaliando as etapas de funcionalização do imunossensor.	69
Figura 17: Análises DPV com a plataforma DoC acoplada ao potenciostato comercial em sonda de $(K_3[Fe(CN)_6])$. (a) Análises em amostras clínicas reativas (R) e não reativas (NR) contendo 10 μL de 200 $\mu g \cdot mL^{-1}$ de solução de antígeno QCoV-8. (b) Análises contendo 10 μL de 100, 200 3 400 $\mu g \cdot mL^{-1}$ de solução de antígeno QCoV-8, onde R representa amostras clínicas reativas e NR representa amostras clínicas não reativa.	72
Figura 18: Análises de amostra de soro sanguíneo humano reativo (R) e não-reativo (RN) para SARS-CoV-2 utilizando DPV com a plataforma de DoC acoplada a um potenciostato comercial (a), na faixa de potencial $-0,2$ e $0,3$ V, com taxa de varredura de 6 $mV \cdot s^{-1}$ a $0,19$ V; (b) Análise em triplicata de amostras clínicas de soro sanguíneo humano, onde o pico de corrente foi analisado com suas respectivas médias finais (Tabela 7).	73
Figura 19: Valores de corrente de oxidação para amostras clínicas reativas (R) e não-reativas (NR) com suas respectivas médias finais, obtidas pela técnica de CV aplicada a plataforma de DoC acoplado ao potenciostato portátil.	75
Figura 20: Imagem do potenciostato portátil desenvolvido pelo grupo de pesquisa NOVONANO. (a) Vista inferior do biossensor conectado ao potenciostato portátil, (b) Anti-aliasing do pré-filtro do potenciostato portátil; (c) Plataforma Microcontrolada; (d) filtro anti-aliasing.	98
Figura 21: Diagrama de bloco do potenciostato portátil desenvolvido pelo grupo de pesquisa Novonano para caracterizar eletroquimicamente os biossensores na presença e ausência de anticorpos biomarcadores SARS-CoV-2.	99

Listas de Tabelas

Tabela 1: Dados epidemiológicos das patologias causadas pelos vírus SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2.....	25
Tabela 2: Características ideais de um biossensor.	29
Tabela 3: Marcos e realizações relevantes para biossensores.....	31
Tabela 4: Processos para métodos de adsorção física.....	51
Tabela 5: Técnicas frequentemente utilizadas no método de aprisionamento físico.	52
Tabela 6: Processos para métodos de ligação covalente.	54
Tabela 7: Resumo de todos os dados relevantes de amostras clínicas reativas e não-reativas de soro sanguíneo humano para COVID-19 de acordo com os testes ELISA, qRT-PCR e o biossensor eletroquímico desenvolvido.	71

Listas de siglas e abreviaturas

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
Ab	Anticorpo
Ag	Antígeno
Ag-Ab	Complexo antígeno- anticorpo
AlphaCoV	Alfacoronavirus
ARDS	Síndrome do desconforto respiratório agudo (<i>Acute respiratory distress syndrome</i>)
BetaCoV	Betacoronavirus
BSA	Albumina sérica bovina
C ₃ H ₈ O ₁₀	Álcool Isopropílico
CDRs	Regiões determinadas por complementariedade (<i>Complementary – determining regions</i>)
CE	Contra eletrodo (<i>Counter electrode</i>)
CLIA	Imunoensaio de quimioluminescência (<i>Chemiluminescence immunoassay</i>)
CO ₂	Dióxido de Carbono
CoV	Coronavírus
COVID-19	Doença do Coronavírus – 19 (<i>Corona Virus Disease – 19</i>)
CV	Voltametria cíclica (<i>Cyclic voltammetry</i>)
DeltaCoV	Deltacoronavirus
DLW	Escrita direta a laser (<i>Direct laser writing</i>)
DO	Densidade de corrente
DoC	Diagnóstico em um chip (<i>Diagnostic on a Chip</i>)
DPV	Voltametria de pulso diferencia (<i>Differential Pulse Voltammetry</i>)
DRX	Difração de raios X
EDC	1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida
EDX	Espectroscopia de raios X por energia dispersiva
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)

FESEM	Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
GA	Glutaraldeído
GamaCoV	Gamacoronavirus
GO	Óxido de grafeno (<i>graphene oxide</i>)
IFA	Ensaio de imunofluorescência (<i>Immunofluorescence Assay</i>)
INCTForense	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Forense
IoT	Internet das Coisas (<i>Internet of Things</i>)
IP	Pico de corrente
K ₃ [Fe (CN) ₆]	Ferricianeto de potássio
LFIA	Imunoensaio de fluxo lateral (<i>Lateral Flow Immunoassay</i>)
LIG	Grafeno induzido por laser (<i>Laser induced graphene</i>)
MERS-CoV	Síndrome Respiratória do Oriente Médio CoV
nCoV	Novo Coronavírus
NHS	N-Hidroxissuccinimida
NIH	Institutos Nacionais de Saúde (<i>National Institutes of Health</i>)
NR	Não-reativo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS 1X	Tampão fosfato-salino 1X (<i>Phosphate buffered saline 1X</i>)
PI	Poliimida
PoCT	Teste no ponto de atendimento (<i>Point-of-Care Testing</i>)
PoNT	Teste no ponto de necessidade (<i>Point-of-need tests</i>)
PR	Pseudo-referência (<i>Pseudo-reference</i>)
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (<i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
R	Reativo
RE	Eletrodo referência (<i>Reference electrode</i>)
rGO	Óxido de grafeno reduzido (<i>Reduced graphene oxide</i>)

RNA	Ácido ribonucleico
Rs	Resistência média
RT-LAMP	Amplificação isotérmica mediada por loop de transcrição reversa (<i>Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>)
SARS	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV	Síndrome Respiratória Aguda Grave CoV
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave CoV - 2
TR	Teste rápido
UTI	Unidade de tratamento intensivo
VH	Cadeias variável pesadas (<i>Heavy-chain variable</i>)
VL	Cadeias variável leves (<i>Light-chain variable</i>)
VOCs	Variante preocupante do SARS-CoV-2 (<i>SARS-CoV-2 Variants of Concern</i>)
VOIs	Variante de interesse do SARS-CoV-2 (<i>SARS-CoV-2 Variants of Interest</i>)
WE	Eletrodo trabalho (<i>Working electrode</i>)
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

Sumário

1 Introdução.....	14
2 Objetivos.....	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 Revisão da Literatura.....	21
3.1 O vírus SARS-CoV-2.....	21
3.2 Biossensores.....	27
3.2.1 Breve Histórico	30
3.2.2 Classificação dos Biossensores	33
3.2.2.1 Elementos de Transdução	33
3.1.2.1.1 Materiais para transdutores de biossensores de DoC	34
3.1.2.1.1.1 Processo de fabricação de transdutores de plataformas DoC de biossensores.....	35
3.1.2.1.1.1.1 1. 1 Processo de gravação direta a Laser (DLW)	35
3.1.2.1.1.1.2 Grafeno induzido a Laser (LIG)	37
3.1.2.1.2 Biossensores eletroquímicos	40
3.1.2.1.2.1 Biossensores Eletroquímicos Amperométricos.....	41
3.1.2.2 Receptor: elemento de reconhecimento biológico	43
3.1.2.2.1 Elemento de reconhecimento biocatalítico	44
3.1.2.2.2. Elemento de reconhecimento de biocomplexação ou bioafinidade ...	44
3.1.2.2.2.1 Imunossensor de reação imunoquímica baseado em complexo Antígeno – Anticorpo (Ag-Ab)	45
3.1.2.2.2.1.1 Anticorpo (Ab)	46
3.1.2.2.2.1.2 Antígeno (Ag).....	47
3.1.2.2.3 Técnica de imobilização de biorreceptor.....	48
3.1.2.2.3.1 Imobilização física (reversível).....	50
3.1.2.2.3.1.1 Adsorção física	50
3.1.2.2.3.1.2 Aprisionamento físico.....	51
3.1.2.2.3.2 Imobilização química (irreversível)	53

3.1.2.2.3.2.1 Ligação covalente	53
3.1.2.2.3.2.2 Reticulação ou copolimerização	55
4 Metodologia	57
4.1 Preparação do Biossensor	57
4.1.1 Síntese dos transdutores da plataforma DoC	57
4.1.2 Modificação do eletrodo de referência da plataforma DoC	58
4.1.3 Biofuncionalização do eletrodo de trabalho da plataforma DoC	59
4.2 Detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 em soros humanos reais.....	59
4.3 Técnicas de Caracterizações	60
4.3.1 Caracterizações morfológicas e estruturais	60
4.3.1.1 Espectroscopia RAMAN	60
4.3.1.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	60
4.3.1.3 Espectroscopia de difração de raios X (DRX).....	61
4.3.1.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS).....	61
4.3.1.5 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FESEM)	61
4.3.2 Caracterizações eletroquímicas.....	62
4.4 Testes do Protótipo	62
4.4.1 Protótipo da plataforma <i>point-of-care</i> para determinação de imunoglobulinas anti-SARS-COV-2	62
5 Resultados e discussão	64
5.1 Caracterização morfológica e estrutural.....	64
5.2 Caracterização eletroquímica.....	68
5.2.1 Caracterização eletroquímica da biossensor no decorrer das etapas biofuncionalização	68
5.2.2 Caracterização eletroquímica do biossensor em amostras de biofluido utilizando potenciostato comercial	70
5.2.3 Caracterização eletroquímica da avaliação da eficiência do potenciostato portátil para detecção de anticorpos da COVID-19: anticorpos biomarcadores anti-SARS-CoV-2.....	74
6 Considerações finais	76

7 Perspectivas futuras	77
8. Produções científicas	78
8.1. Artigos científicos (Anexo B)	78
8.2. Patente (Anexo C).....	78
8.3. Divulgação da pesquisa por meios de comunicação.....	78
9 Referências.....	80
ANEXOS	97
ANEXO A - Potenciostato microcontrolado portátil para diagnóstico de anticorpos SARS-CoV-2	98
ANEXO B - Artigos publicados na área de sensores durante o período de mestrado.	100
ANEXO C – Patente depositada durante o período de mestrado.	102

1 Introdução

A Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS¹) originada pelo novo coronavírus ((nCoV) (SARS-CoV-2) e suas variantes genéticas denominada COVID-19 (anteriormente conhecido como 2019-nCov), emergiu no final de 2019 (LU et al., 2020; SINGH et al., 2021). Os primeiros relatos apontam que sua propagação se iniciou na cidade de Whuan, província de Hubei, na China ficou amplamente conhecida como uma doença altamente contagiosa e patogênica, que causou um surto pandêmico² global, ameaçando a saúde pública em mais de 200 países (HALLAL, 2020; LU et al., 2020; OMS, 2022a; SINGH et al., 2021). Em consequência vivenciamos tempos sem precedentes, que já causou milhões de mortes e custou à economia bilhões de dólares, embora segundo Hallal et al. (2020) o número estimado de casos não reflete a real magnitude que impacta a comunidade global gerando custos diretos, indiretos e intangíveis (HALLAL et al., 2020; ALI et al., 2021).

A COVID-19 é a terceira pandemia em larga escala causada por coronavírus (CoV) humano zoonótico nas últimas décadas, após a SARS em 2003 e da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS) em 2012 (QIU et al., 2020; PIRET; BOIVIN, 2021). Em proporções de magnitude, a patologia causada pelo vírus SARS-CoV-2 apresenta números alarmantes quando comparados aos dois CoV pregressos, os quais causaram cerca de 10.000 casos cumulativos (8.098 para SARS-CoV e 2.583 para MERS-CoV) (MAHASE, 2020; OMS, 2022b; OMS, 2022c). A taxa de mortalidade³ por infecção para SARS-CoV foi de 10% (774 mortes) enquanto para MERS-CoV ficou em 34,4% (888 mortes), valores extremamente menores quando confrontados aos atuais divulgados pela Organização Mundial da Saúde (OMS)⁴ que contabiliza mais de 557.917.904 casos com taxa de mortalidade de infecção de 2% (6.358.899 mortes) para SARS-CoV-2⁵ (MAHASE, 2020; QIU et al., 2020; OMS, 2022a; OMS, 2022b; OMS, 2022c). Segundo Mahase (2020) a COVID-19 matou mais

¹Sigla oriunda do Inglês Severe Acute Respiratory Syndrome

²Caracterizada por uma epidemia com larga distribuição geográfica, atingindo mais de um país ou de um continente (GOMES, 2015. p.51)

³Indicador que avalia o impacto de uma doença ou condição em toda a população de uma região, em outras palavras é definido como: número de pessoas que morreram por uma causa específica em relação ao número total de pessoas na população (OMS, 2020)

⁴Agência especializada em saúde, fundada em 7 de abril de 1948 e subordinada à Organização das Nações Unidas

⁵Os dados atualizados da pandemia da COVID-19 podem ser encontrados no site da [OMS](https://www.who.int)

seres humanos que a SARS e MERS agrupadas, e segundo Cascella et al. (2022), os óbitos foram influenciados por fatores que incluem idade, condições pré-existentes subjacentes e gravidade da doença variando significativamente entre os países.

Abordagens terapêuticas e preventivas eficazes, incluindo medicamentos e imunizantes, ainda encontram-se em desenvolvimento (WANG et al., 2020;). Poucos medicamentos estão disponíveis e aprovados pelas agências reguladoras de diversos países, e a imunização ainda está em andamento ao redor do globo (WANG et al., 2020 CASCELLA et al.,2022; OLIVEIRA et al., 2022). Até o momento segundo dados divulgados pela OMS, já foram administradas mais de 12.130.881.147 doses de imunizantes (OMS, 2022a). No entanto ainda são necessárias medidas de prevenção de contaminação e cuidados específicos, onde novas descobertas poderão responder as perguntas que se avolumam no decorrer desta pandemia em curso.

Atualmente os testes diagnósticos da COVID-19 consistem em ensaios sorológicos baseados no método de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA⁶), imunoensaio de quimioluminescência (CLIA⁷), imunoensaio de fluxo lateral (LFIA⁸) e ensaio de imunofluorescência (IFA⁹) (TRAUGOTT et al., 2020; GONG et al., 2021; LI; LÍLLEHOJ 2021). São utilizados com êxito como biomarcadores para infecção produzida pelo vírus SARS-CoV-2 em complemento ao método quantitativo de reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (qRT-PCR¹⁰) para detecção de RNA viral considerado o método padrão ouro para o diagnóstico da COVID-19 - especialmente após a segunda semana de infecção (GONG et al., 2021; SINGH et al., 2021; YAKOH et al., 2021). Além do teste molecular qRT-PCR há também o teste de amplificação isotérmica mediada por loop de transcrição reversa (RT-LAMP¹¹) utilizado para detecção de RNA viral (ZHANG et al., 2020; AOKI et al., 2021). Esses testes, no entanto, demandam centros especializados e profissionais qualificados, que são onerosos e possuem um alto custo atrelado a suprimentos, enquanto os testes rápidos (TR) disponíveis comercialmente possuem baixa

⁶Sigla oriunda do Inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

⁷Sigla oriunda do Inglês *Chemiluminescence Immunoassay*

⁸Sigla oriunda do Inglês *Lateral Flow Immunoassay*

⁹Sigla oriunda do Inglês *Immunofluorescence Assay*

¹⁰Sigla oriunda do Inglês *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

¹¹Sigla oriunda do Inglês *Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification*

sensibilidade (YAKOH et al., 2021; MORALES-NARVÁEZ; DINCER, 2020; HASHEMI et al., 2021).

A necessidade de sistemas de detecção mais versáteis para o monitoramento e gerenciamento da disseminação, antecipando assim, condutas terapêuticas, estimula a produção de uma grande variedade de métodos analíticos (OLIVEIRA et al., 2022). Na tentativa de superar as restrições supracitadas em face do exposto, e em decorrência do progresso nas ciências da vida, diversos dispositivos *Point-of-Care Testing* (PoCT) foram desenvolvidos, oferecendo um diagnóstico clínico rápido e descentralizado da COVID-19 por meio de plataformas de *Diagnostic on a Chip* (DoC) baseados em biossensores eletroquímicos (PARIHAR et al., 20220; PARUPUDI et al., 2020; LLIESCO et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2022). Assim, dispositivos de DoC para aplicação PoCT confiáveis são importantes ferramentas para o diagnóstico em massa, auxiliando a segurança pública epidemiológica na redução de casos não detectados, e desempenhando um papel crucial na tomada de decisões adequadas para o isolamento de pacientes infectados em políticas de saúde (IRAVANI, 2020; MARDIAN et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2022; OMS, 2022). Ademais, segundo Iravani (2020) esses dispositivos podem auxiliar significativamente no controle da resposta imune vacinal da população.

Biossensores eletroquímicos PoTC são capazes de associar, em uma única etapa, a preparação, reação e detecção de biomarcadores de patologias em um chip miniaturizado, necessitando-se volumes diminutos de amostras, com alta sensibilidade, baixo limite de detecção e análise rápida (LUPPA; JUNKER; LANGER, 2018 ZHANG et al., 2020; LLIESCO et al., 2021). Ademais, esses dispositivos são descritos como ferramentas eletroanalíticas que permitem a realização de ensaios no local (ou próximo ao paciente) e detectam agentes patológicos pelo emprego de um elemento de reconhecimento biologicamente derivado ou biomimético durante uma reação (bio) química. Este evento de ligação é convertido em um sinal elétrico mensurável, proporcional, gerado durante a reação dos compostos eletroquimicamente ativos (TRÉVENOT et al., 2001; SINGH et al., 2021; YAKOH et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2022).

Esta técnica possui excelente capacidade de discriminar pequenos eventos durante o processo de reconhecimento na superfície do sistema, reduzindo

significativamente o custo e o tempo dos procedimentos (SINGH et al., 2021; YAKOH et al., 2021, LLIESCO et al., 2021). As respostas de interações podem ser atreladas com os sistemas de Internet das coisas (IoT) e *m-health* em aplicativos de saúde inteligentes, para auxiliar os diagnósticos clínicos e estado de saúde, que coordenarão um conjunto vasto de objetos digitais (RAY, 2018; PATERAKI et al., 2020;). Isso permite o controle e acesso detalhado, possibilitando a criação de um sistema eficiente e robusto, que pode contribuir significativamente no monitoramento e gerenciamento da disseminação. Tais dispositivos vão possibilitar comunicar, coletar, compartilhar dados e detectar padrões em tempo real, beneficiando indivíduos e sistemas de saúde. Essas informações auxiliarão na tomada de decisões, e por consequência, gerarão implicações financeiras e sociais significativas, pois permitirão analisar, planejar e gerenciar eventos epidemiológicos (RAY, 2018; PATERAKI et al., 2020; LLIESCO et al., 2021).

Os materiais que compõe os biossensores eletroquímicos DoC devem ser bons condutores elétricos e quimicamente estáveis (GRIESHABER et al., 2008). Atualmente diversos nanomateriais como matriz para elementos de transdução elétrica estão sendo aplicados em plataformas emergentes de biossensoriamento eletroquímico (TYAGI et al., 2020). Para tal, devido as suas excelentes propriedades, o grafeno (G) e seus derivados estão sendo utilizados para desenvolver nanoestruturas diversificadas com sensibilidade otimizada para essas aplicações, pois a presença de grupos funcionais oxigenados e defeitos de superfície torna-os altamente hidrofílicos apresentando elevada área superficial, baixa densidade, boa condutividade elétrica e alta mobilidade eletrônica, facilitando a funcionalização química auxiliando sua interação com elementos de reconhecimento (KRISHNAN et al., 2019). Diversas modificações são relatadas, incluindo a combinação de nanopartículas de grafeno e seus derivados com polímeros orgânicos, biomoléculas e vários tipos de nanopartículas inorgânicas, garantindo especificidade e seletividade, auxiliando sua interação com o analito alvo, resultando em uma detecção precisa (KRISHNAN et al., 2019; SAINZ-URRUELA et al., 2021).

Diversas tem sido as técnicas empregadas para se produzir componentes eletrônicos padronizados com base em grafeno e seus derivados, como fotolitografia

(FRUNCILLO et al., 2021), *ink printing*¹² (GAO et al., 2017), *screen printing*¹³ (TALEAT; KHOSHROO; MAZLOUM-ARDAKANI, 2014), *plasma etching*¹⁴ (XU et al., 2019), processo de deposição química/eletroquímica (SINGH et al., 2022), impressões bidimensionais (2D) e 3D (HAN et al., 2019) e a mais amplamente empregada, escrita direta a laser (DLW)¹⁵ (HONG et al., 2018). A DLW é um método de etapa única, de elevada resolução, baixo custo e que não necessita de ambiente controlado, o qual tem sido empregado para a produção de grafeno induzido por laser (LIG¹⁶). Esse, trata-se de um material de grafeno tridimensional (3D) de alta área superficial para aplicação em componentes eletrônicos como dispositivo flexíveis miniaturizados de biossensoriamento, que tem atraído significativa atenção. Isso porque pode produzir grafeno de alta qualidade e padroniza diversos designs de eletrodos simultaneamente com uma grande variedade de substratos sintéticos e/ou naturais (LI, 2020; HUANG et al., 2020; VIVALDI et al., 2021; WAN et al. 2021). Além disso, o LIG pode ser facilmente produzido a partir de filmes poliméricos comerciais de poliimida (PI) por meio da irradiação de laser de CO₂, resultando em um filme de grafeno altamente poroso com excelentes propriedades elétricas e físico-químicas, tornando-se uma excelente alternativa para o desenvolvimento de biossensores (LIN et al., 2014; WAN et al., 2020; BEHRENT et al., 2021).

Nesse contexto, considerando a necessidade de constantes inovações no âmbito biomédico e biotecnológico para novos dispositivos e materiais, visando atender as demandas da população global por sistemas mais eficazes e expandir o acesso a diagnóstico, este trabalho descreve a utilização de uma plataforma DoC baseada em um biossensor eletroquímico descartável, por meio do método de DLW de CO₂ utilizando um antígeno quimérico (QCOV-8) específico não marcado para vírus SARS-CoV-2. O dispositivo permitiu a detecção de imunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 por meio de uma resposta eletroquímica. Os resultados demonstraram desempenho de análise satisfatório, exibiu sinais característicos e dependente da concentração com tempo de processamento de análise de 3 min. Os ensaios foram realizados com amostras clínicas (soro sanguíneo de pacientes reativos e não-

¹²Termo oriundo do Inglês que em tradução livre significa impressão por tinta

¹³Termo oriundo do Inglês que em tradução livre significa impressão de tela ou serigrafia

¹⁴Termo oriundo do Inglês que em tradução livre significa gravação por plasma

¹⁵Sigla oriunda do Inglês *direct laser writing*

¹⁶Sigla oriunda do Inglês *laser induced graphene*

reativos para SARS-CoV-2). Para validar o potencial dessa abordagem, os resultados foram confrontados tanto com o método ELISA, desenvolvido pela UFPel (sob o número de registro de depósito de patente BR1020210020105), quanto com o método qRT-PCR. Ademais, foi desenvolvido um dispositivo potenciostato portátil pelo grupo de pesquisa de Tecnologias Aplicadas em Materiais Avançados - Novonano e acoplado ao biossensor eletroquímico, exibindo uma excelente adaptabilidade para detecção da COVID-19 por meio de PoCT

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Tendo em vista os desafios ainda existentes em tempos sem precedentes que assolou a comunidade global e juntando-se aos incontáveis esforços que a comunidade científica vem exercendo, o presente trabalho tem como escopo o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico amperométrico PoCT para o diagnóstico da COVID-19, por meio da detecção de anticorpos biomarcadores anti-SARS-CoV-2, rápido, simples, eficiente e de baixo custo.

2.2 Objetivos Específicos

- Obtenção de um sistema de três (3) eletrodos flexíveis (RE, WE e CE) por intermédio do método de DLW de CO₂ utilizando filme polimérico de PI para obtenção de LIG.
- Biofuncionalização de eletrodo de trabalho para detectar imunoglobulinas específicas anti-SARS-CoV-2; Modificação do eletrodo RE;
- Caracterizar quimicamente, estruturalmente, morfologicamente e eletroquimicamente as nanoestruturas desenvolvidas, a fim de serem passíveis de utilização no protótipo biossensor proposto;
- Avaliar o desempenho do protótipo do biossensor para detectar imunoglobulinas específicas anti-SARS-CoV-2 em amostras de biofluido de soro sanguíneo reativos e não-reativos para SARS-CoV-2 por meio de medidas eletroquímicas, como DPV e CV em um potenciostato / galvanostato comercial.
- Avaliar o protótipo biossensor desenvolvido acoplado ao potenciostato portátil desenvolvido pelo grupo de pesquisa Novonano.

3 Revisão da Literatura

3.1 O vírus SARS-CoV-2

Os coronavírus (CoV) são vírus de ácido ribonucleico (RNA) de fita positiva (+ssRNA) devido à sua direção no sentido 5'-3', conhecidos desde meados dos anos de 1960, que causam infecções respiratórias em seres humanos e animais (UZUNIAN, 2020; LAUXMANN; SANTUCCI; AUTRÁN-GÓMEZ, 2020). A subfamília Orthocoronavirinae da família *Coronaviridae* (ordem *Nidovirales*) classificam-se em quatro gênero de CoV: Alfacoronavirus (AlphaCoV), Betacoronavirus (BetaCoV), Deltacoronavirus (DeltaCoV) e Gamacoronavirus (GamaCoV), o qual o gênero BetaCoV é dividido em cinco subgêneros ou linhagens (CERAOLO; GIORGI, 2020; WANG et al., 2020; ALHALAJLI et al., 2020; CASCELLA et al., 2022).

O SARS-CoV-2 também denominado de novo coronavírus (nCoV) pertence betaCoVs da linhagem B e C, devido possuir elevada homologia com o vírus causador SARS (SARS-CoV) e MERS (MERS-CoV) respectivamente (UZUNIAN, 2020; CASCELLA et al., 2022). O genoma desse vírus possui dois tipos principais de proteínas, as quais são: as proteínas de pico (S), responsáveis pela entrada do vírus na célula, e a proteína do nucleocapsídeo viral (N), responsável pela replicação do vírus quando este já está na célula devido à facilitação proporcionada pela proteína S (CERAOLO; GIORGI, 2020; WANG et al., 2020; ALHALAJLI et al., 2020; CAMPOS et al. 2021; HU et al., 2021; CASCELLA et al., 2022).

Na Figura 1 pode ser observada a estrutura do vírus SARS-CoV-2. As estruturas proeminentes são denominadas espículas, nas quais se encontram as proteínas de pico (S) (BASSO, 2014, UZUNIAN, 2020). Estas proteínas acoplam-se à proteína ACE2, que é uma transmembrana presente nos seres humanos, e sofre uma divisão para que haja a fusão viral com a célula e consequentemente a liberação do RNA que está no interior do vírus promovendo a infecção (CERAOLO; GIORGI, 2020; UZUNIAN, 2020; ALHALAJLI et al., 2020; HUANG et al., 2020; HU et al., 2021; CASCELLA et al., 2022).

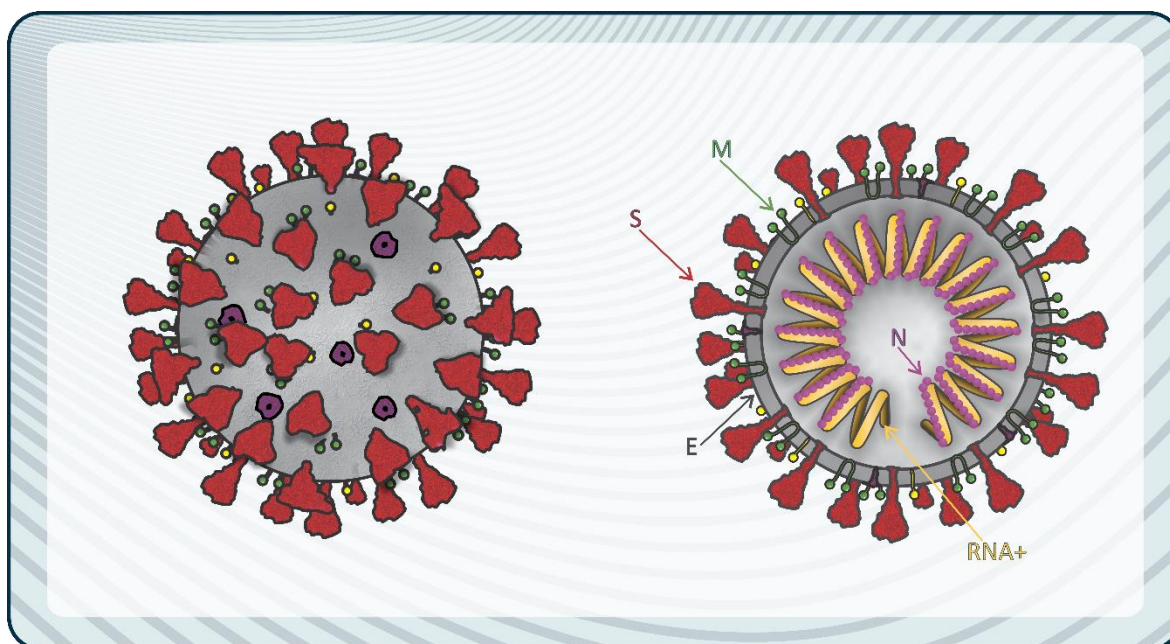


Figura 1: Ilustração da estrutura do vírus SARS-CoV-2. M: membrana lipídica; S: espícula de contato do vírus com receptores celulares; E: envoltório glicoproteico; RNA+: material genético viral; N: capsídeo proteico.

Fonte: OLIVEIRA, 2022.

O SARS-CoV-2, como demais vírus de RNA, embora se adapte aos seus novos hospedeiros humanos, é passível à evolução genética com o desenvolvimento de mutações ao longo do tempo, resultando em variantes que podem possuir características distintas de suas cepas ancestrais (ALEEM; AKBAR SAMAD; SLENKER, 2022; CASCELLA et al., 2022; MILLER; ELENBERG; DUBRAWISKI, 2022). Com o sequenciamento genômico periódico no decorrer de 2020 a 2022 foi possível detectar novas variantes genéticas do SARS-CoV-2, entre as quais foram classificadas em variantes preocupantes (VOCs) e Variantes de interesse (VOIs) pela OMS, devido ao seu impacto na saúde pública global (PAHO, 2021; ALEEM; AKBAR SAMAD; SLENKER, 2022; CASCELLA et al., 2022). Com base na recente atualização epidemiológica da OMS, cinco COVs de SARS-CoV-2 foram identificados desde o início da pandemia (Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gama (P.1), Delta (B.1.617.2), Omicron (B.1.1.529)) e oito VOIs (Epsilon (B.1.427 e B 1.429) Zeta (P.2); Eta (B.1.525); Teta (P.3); Iota (B.1.526); Capa (b.1.617.1); Lambda (C.37) e Um (B.1.621) (PAHO, 2021; ALEEM; AKBAR SAMAD; SLENKER, 2022; CASCELLA et al., 2022).

3.1.2 COVID-19

O agente responsável pela COVID- 19 (anteriormente conhecido como 2019-nCov), a SARS, é o vírus denominado SARS-CoV-2 (nCoV) e suas variantes genéticas, que emergiu no final de 2019 (LU et al., 2020; SINGH et al., 2021). Os primeiros relatos apontam que sua propagação se iniciou na cidade de Whuan, província de Hubei, na China, e ficou amplamente conhecida como uma doença altamente contagiosa e patogênica, que causou um surto de pandemico global, ameaçando a saúde pública em mais de 200 países (Figura 2) (HALLAL, 2020; LU et al., 2020; OMS, 2022a; SINGH et al., 2021). Em consequência vivenciamos tempos sem precedentes, que já causou milhões de mortes e custou à economia bilhões de dólares, embora segundo Hallal et al. (2020) o número estimado de casos não reflete a real magnitude que impacta a comunidade global gerando custos diretos, indiretos e intangíveis (HALLAL et al., 2020; ALI et al., 2021).

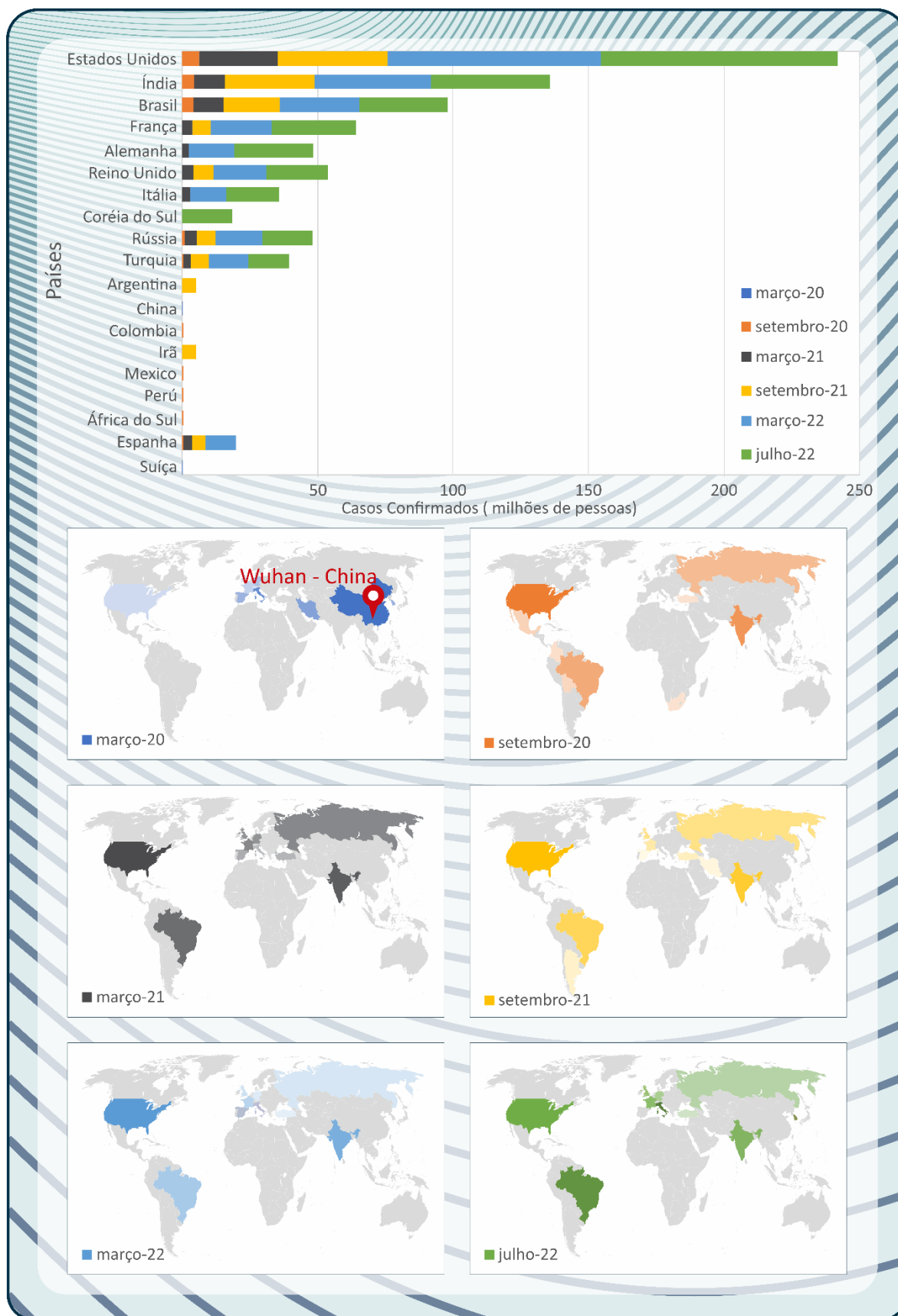


Figura 2: Ilustração do contexto geográfico e epidemiológico da COVID-19.

Fonte: OLIVEIRA, 2022 adaptado de OMS (2022a)

A COVID-19 é a terceira pandemia em larga escala causada por coronavírus (CoV) humano zoonótico nas últimas décadas, após a SARS em 2003 e da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS) em 2012 (QIU et al., 2020; PIRET; BOIVIN, 2021). Em proporções de magnitude, a patologia causada pelo vírus SARS-CoV-2 apresenta números alarmantes quando comparados aos dois CoV pregressos, os quais causaram cerca de 10.000 casos cumulativos como pode ser observado na Tabela 1, valores extremamente menores quando confrontados aos atuais divulgados pela OMS (MAHASE, 2020; 2020; QIU et al., 2020; OMS, 2022a; OMS, 2022c). Segundo Mahase (2020) a covid-19 matou mais seres humanos do que SARS e MERS agrupadas, apesar de menor taxa de letalidade, e segundo Cascella et al. (2022), os óbitos foram influenciados por fatores que incluem idade, condições pré-existentes subjacentes e gravidade da doença variando significativamente entre os países.

Tabela 1: Dados epidemiológicos das patologias causadas pelos vírus SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2.

Patologia	Vírus	Casos Cumulativos	Número de Mortes	Taxa de mortalidade (%)
SARS	SARS-CoV	8.098	774	10
MERS	MERS-CoV	2.583	888	34,4
COVID-19 ¹	SARS-CoV-2	557.917.904	6.358.899	2

Nota: ¹Números atualizados até o dia 18 de julho de 2022.

Fonte: OLIVEIRA, 2022 adaptado da OMS, 2022, e OMS, 2022b.

Abordagens terapêuticas e preventivas eficazes, incluindo medicamentos e imunizantes, ainda encontram-se em desenvolvimento (WANG et al., 2020;). Poucos medicamentos estão disponíveis e aprovados pelas agências reguladoras de diversos países, e a imunização ainda está em andamento ao redor do globo (WANG et al., 2020 CASCELLA et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2022). Até o momento segundo dados divulgados pela OMS, já foram administradas mais de 12.130.881.147 doses de imunizantes (OMS, 2022a). No entanto ainda são necessárias medidas de prevenção de contaminação e cuidados específicos, onde novas descobertas poderão responder as perguntas que se avolumam no decorrer desta pandemia em curso.

3.1.3 Testes diagnóstico da COVID-19

O diagnóstico da COVID-19 é realizado por meio de testes sorológicos baseados no ELISA, CLIA, LFIA e IFA (TRAUGOTT et al., 2020; GONG et al., 2021; LI; LILLEHOJ 2021). Esses testes permitem a determinação de anticorpos específicos da patologia que induz a produção de imunoglobulinas (IgA, IgM e IgG), produzidas em resposta a infecção causada pelo vírus SARS-CoV-2 durante o período inicial da doença e de convalescência (4º dia até 6º dia é possível a detecção das imunoglobulinas IgA e IgM; 7º dia e além é possível a detecção da imunoglobulina IgG, a qual atinge seu pico no 14º dia - permanece detectável no organismo por um longo período, contudo sua taxa decai no decorrer do tempo e sua presença significa que em determinado momento o vírus já foi contraído ou já houve imunização) ou antígeno (LIU et al., 2020; LIN et al., 2020; VEDOVA-COSTA et al., 2021). Estes testes são utilizados com êxito como biomarcadores para infecção produzida por o vírus SARS-CoV-2 como complemento ao teste molecular qRT-PCR para detecção de RNA viral considerado o método padrão ouro para o diagnóstico da COVID-19 - especialmente após a segunda semana de infecção (SINGH et al., 2021; YAKOH et al., 2021). Além do teste molecular qRT-PCR há também o teste RT-LAMP utilizado para detecção de RNA viral, que deve ser utilizado durante a fase precoce da doença, ou seja, até o término da primeira semana desde o aparecimento dos sintomas. (ZHANG et al., 2020; AOKI et al., 2021). Ambos os tipos de testes diagnósticos (sorológicos ou moleculares), no entanto, demandam centros especializados, profissionais qualificados, são onerosos e possuem um alto custo atrelado a equipamentos e suprimentos, enquanto os testes rápidos (TR) disponíveis comercialmente, que consistem em detectar a presença da resposta imunológica do organismo à infecção pelo vírus SARS-CoV-2 por meio da reação antígeno-anticorpo, possuem baixa sensibilidade (YAKOH et al., 2021; MORALES-NARVÁEZ; DINCER, 2020; HASHEMI et al., 2021).

A necessidade de sistemas de detecção mais versáteis para o monitoramento e gerenciamento da disseminação, antecipando assim, condutas terapêuticas, estimula a produção de uma grande variedade de métodos analíticos (OLIVEIRA et al., 2022). Na tentativa de superar as restrições supracitadas em face do exposto, e em decorrência do progresso nas ciências da vida, diversos dispositivos PoCT foram

desenvolvidos, oferecendo um diagnóstico clínico rápido e descentralizado da COVID-19 por meio de plataformas de DoC baseados em biossensores eletroquímicos (PARIHAR et al., 20220; PARUPUDI et al., 2020; LLIESCO et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2022). Assim, dispositivos de DoC para aplicação PoCT confiáveis são importantes ferramentas para o diagnóstico em massa, auxiliando a segurança pública epidemiológica na redução de casos não detectados, e desempenhando um papel crucial na tomada de decisões adequadas para o isolamento de pacientes infectados em sistemas de saúde (IRAVANI, 2020; MARDIAN et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2022; OMS, 2022). Ademais, segundo Iravani (2020) esses dispositivos podem auxiliar significativamente no controle da resposta imune vacinal da população.

3.2 Biossensores

Sensores são dispositivos que responde a estímulo físico/químico de forma específica, produzindo um sinal que pode ser convertido em uma grandeza física para fins de mensuração e/ou monitoramento (RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010). Essencialmente, são compostos por um sistema de reconhecimento químico, ou receptor, e por um transdutor físico-químico. Nos casos em que o receptor se trata de um elemento de natureza biológica, os sensores passam a ser denominados de biossensores (PARKHEY; MOHAN, 2019; NARESH; LEE, 2021).

Como ilustrado na Figura 3, esses dispositivos são descritos como ferramentas eletrônicas analíticas que detecta agentes patológicos por meio do emprego de um elemento de reconhecimento biologicamente derivado ou biomimético durante uma reação (bio) química, o qual é denominado biorreceptor, interage seletivamente com o analito / biomarcador de interesse presente em solução. Este evento de ligação é convertido em um sinal físico/químico mensurável proporcional gerado durante a reação de compostos eletroquimicamente ativos, uma vez que sua função é produzir um sinal eletrônico digital diretamente proporcional à concentração de um biomarcador (TRÉVENOT et al., 2001; SINGH et al., 2021; YAKOH et al., 2021). De acordo com a definição da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) Malhotra e Azahar (2018) descreve um biossensor como “dispositivo integrado

independente, o qual é capaz de fornecer informações analíticas quantitativas ou semiquantitativas específicas utilizando um elemento de biorreconhecimento que está em contato espacial direto com um elemento transdutor”.

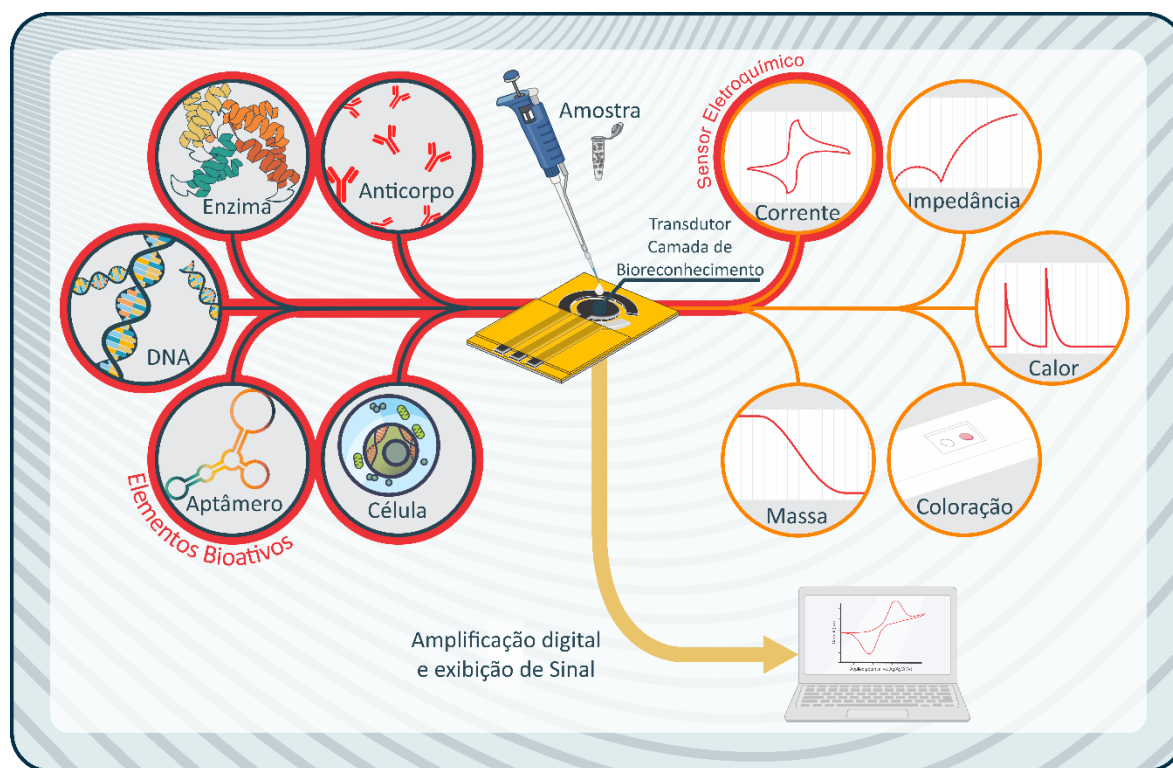


Figura 3: Ilustração das configurações e mecanismo de funcionamento de um biossensor.

Fonte: OLIVEIRA, 2022.

Estes dispositivos no decorrer dos anos estão adquirindo destaque e importância nos mais diversos campos de aplicações, como diagnósticos clínico de patologias de seres humanos (HALEEM et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2022) e demais animais (VIDIC et al., 2017; DU; ZHOU; 2018), detecção de substâncias químicas e bioquímicas ilícitas de âmbito forense (YÁÑEZ-SEDEÑO et al., 2014 KARLSSON et al., 2019) e nocivas ao homem e ao meio ambiente (TYAGI et al., 2020) ou ainda controle de qualidade e segurança de fármacos (QIAN et al., 2021;) e alimentos (YASMIN; HAMED; CHO, 2016; BOBRINETSKIY; KNEZEVIC, 2018). Os biossensores são particularmente promissores para essas aplicações supracitadas decorrentes de diversas características singulares combinadas como: simplicidade inerente, baixo custo, conveniência de operação e dispositivos miniaturizados, além de ser capaz de fornecer informações das análises em tempo real, tornando-se uma alternativa viável aos métodos analíticos convencionais (Cromatografia, espectrometria, espectrofotometria, eletroforese, etc.) que por sua natureza são mais

robustos, lentos e que possuem um custo mais elevado (RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010; HAMMOND et al., 2016; CHAUHAN et al, 2019).

Outra vantagem dos biossensores quando comparados com os métodos analíticos convencionais é a possibilidade de realizar análises diretas em amostras complexas, sem a necessidade de pré-tratamentos, utilizando apenas uma pequena quantidade de amostra sendo altamente específicos e seletivos, devido à alta especificidade atrelada ao elemento biológico que interage com o substrato, evitando interferências de outras substâncias da matriz da amostra (MUGURUMA, 2018). Além disso, os biossensores são portáteis e de fácil utilização, não demandando profissional qualificado para seu manuseio (HAMMOND et al., 2016). Todavia, os biossensores apresentam certos inconvenientes, como a baixa estabilidade do material biológico, pouca disponibilidade comercial e falta de padronização o que incentiva estudos que busquem a otimização desses dispositivos. Para tal busca-se atender algumas características descritas na literatura científica de um biossensor ideal as quais podem ser encontradas na Tabela 2 (HASAN et al., 2014; SECCHI, 2017).

Tabela 2: Características ideais de um biossensor.

Características	Descrição
Tempo de análise	Análise rápidas com respostas para o analito-alvo em tempo real.
Sensibilidade	Alta sensibilidade permitindo a detecção de baixas concentrações do analito-alvo e baixas quantidade de resultados falso-negativos.
Seletividade	A análise específica permite a discriminação entre o analito-alvo e outras espécies relacionadas e minimiza análises falso-negativas.
Reprodutibilidade	A análise deve ser altamente reprodutível, a fim de fornecer uma análise confiável e de fácil calibração.
Limite de detecção	A menor quantidade de uma substância que pode ser determinada a partir da ausência dessa substância (sinal em branco) pelo biossensor. Pode ser calculado a partir da média do branco e seu desvio padrão.
Precisão	O dispositivo deve ser altamente preciso, ou seja, resultados falso-positivos e falsos-negativos minimizados.

Robustez	O biossensor deve ser insensível às condições ambientais (temperatura, pH, interferências eletrônicas, e outros).
Linearidade	o sinal máximo de saída do biossensor que pode ser detectado por um sensor. Deve ser alto para um biossensor detectar a concentração do substrato.
Custo unitário e operacional	Baixo custo unitário e operacional para reagentes e outros materiais, permite uma aplicação mais ampla dos sistemas de biossensores.
Tamanho e peso	Possibilidade de miniaturização.
Regeneração / Estabilidade	A capacidade de regeneração da superfície de ligação, permitindo múltiplas medições pelo mesmo elemento é ideal, embora plataformas de uso único é suficiente.
Detecção de multianálitos	Um biossensor que pode detectar vários analitos simultaneamente, é altamente desejável.
Interface com o usuário	Idealmente, são desejados sistemas totalmente automatizados, ou que exigem pouco conhecimento e habilidades do operador.

Fonte: OLIVEIRA, 2022 adaptado de GRIFFIN; STRATIS-CULLUM, 2009 e MALHOTRA, ALI, 2018.

3.2.1 Breve Histórico

O termo biossensor começou a figurar a literatura científica no final dos anos de 1970 (SECCHI, 2017). Entretanto a história dos biossensores remonta a 1906, quando Max Cremer demonstrou que a concentração de um ácido em um líquido é proporcional ao potencial elétrico que surge entre partes do fluido localizadas em lados opostos de uma membrana de vidro (CREMER, 1906). Todavia, foi somente em 1909 que o conceito de concentração de íons hidrogênio foi introduzido por Soren Peder Lauritz Sorensen e um eletrodo para aferição de pH foi obtido por Hughes no ano de 1922 (HUGHES, 1922). Entre os anos de 1909 e 1922, Griffin e Nelson demonstrou pela primeira vez a imobilização da enzima invertase em hidróxido de alumínio e carvão vegetal (GRIFFIN; NELSON, 1916; NELSON; GRIFFIN, 1916). O primeiro biossensor de fato foi desenvolvido por Leland C. Clark Jr em 1956 para detecção de oxigênio, o qual ficou conhecido como o “pai dos biossensores” e sua

invenção leva seu nome: eletrodo de Clark (HEINEMAN; JENSEN, 2006). A partir desse momento observa-se (Tabela 3) um crescimento exponencial no desenvolvimento desses dispositivos com o desenvolvimento dos processos de nanotecnologia e microeletrônica, a miniaturização dos dispositivos e a evolução dos transistores de efeito de campo sensível à íon, otimizando a seletividade e possibilitando a produção em larga escala destes sensores (FERNANDES; KUBOTA, 2001; BHALLA et al., 2016; MALHOTRA; ALI, Ali, 2018).

Tabela 3: Marcos e realizações relevantes para biossensores.

Ano	Contribuição
1956	Leland C. Clark Jr. (1918–2005) apresentou seu primeiro artigo sobre o eletrodo de oxigênio. Em 1962, Clark e Ann Lyons do Hospital Infantil de Cincinnati desenvolveram o primeiro eletrodo de enzima de glicose.
1959	Rosalyn Sussman Yalow (nascida em 1921) e Solomon Aaron Berson (1918-1972) desenvolveram o radioimunoensaio (RIA) que permite a determinação muito sensível de hormônios como a insulina com base em uma reação antígeno-anticorpo. Hoje, a tecnologia RIA é superada pelo ensaio imunossorvente ligado a enzimas porque os princípios de detecção colorimétrica ou fluorescente são favorecidos em relação às tecnologias baseadas em radioatividade.
1963	Garry A. Rechnitz juntamente com S. Katz apresentou um dos primeiros trabalhos na área de biossensores com a determinação potenciométrica direta de uréia após hidrólise de urease. Naquela época, o termo “biossensor” ainda não havia sido cunhado. Assim, esses tipos de dispositivos foram chamados de eletrodos enzimáticos ou eletrodos de membrana biocatalítica.
1967	GP Hicks e SJ Updike introduziram o primeiro eletrodo de enzima prático imobilizando a enzima dentro de um gel. Bergveld introduziu o transistor de efeito de campo seletivo de íons.
1970	Bergveld introduziu o transistor de efeito de campo seletivo de íons.

1972	Betso et al. mostraram pela primeira vez que a transferência direta de elétrons do citocromo c poderia ser realizada em eletrodos de mercúrio.
1973	Ph. Racine e W. Mindt (Hoffmann La Roche) desenvolveram um eletrodo de lactato
1975	O primeiro biossensor comercial foi introduzido para pacientes diabéticos
1976	Primeiros biossensores baseados em micróbios
Década de 1980	Monocamadas automontadas começam a receber considerável atenção na comunidade científica e são empregadas em pesquisas de biossensores.
1981	A oxidação do dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NADH) em eletrodos de grafite é descrita pela primeira vez
1983	Primeiro imunossensor de ressonância plasmônica de superfície
1984	Primeiro biossensor amperométrico de glicose mediado por ferroceno por Cass et al.
1988	Adam Heller e Yinon Degani introduziram a conexão elétrica (“fiação”) de centros redox de enzimas a eletrodos através de hidrogéis redox condutores de elétrons. Também nesse mesmo ano a transferência de elétrons direta por meio de enzimas imobilizadas foi introduzida.
1990	Bartlett et al. introduzir enzimas modificadas por mediador.
1997	A IUPAC introduziu pela primeira vez uma definição de biossensores em analogia à definição de quimiossensores
2000	Schuhmann et al. introduziu o uso de tintas de eletrodeposição como matrizes de imobilização para biossensores.
2007	Um biossensor de glicose implantado operou por 5 dias.

Fonte: OLIVEIRA et al. 2022 adaptado de MALHOTRA; ALI, Ali, 2018.

Desde então, foram alcançados progressos notáveis no campo dos biossensores e tornou-se uma área multidisciplinar de pesquisa que une os princípios das ciências básicas (química, física e biologia) com os fundamentos da micro/nanotecnologia (BHALLA et al., 2016). Numerosos biossensores tem sido projetado

para determinar diversas biomoléculas, em diferentes amostras biológicas (sangue, soro, plasma, urina, saliva, suor, lagrimeira), para análises de toxicidade químicas e bioquímicas no que tange a ciência da vida (BHALLA et al., 2016; FALK et al., 2020; PARK et al., 2022). Atualmente, os PoCT e point-of-need tests (PoNT) ocupam a maior parcela no mercado de biossensores, impulsionando avanços nessa área, possibilitando o desenvolvimento de novos dispositivos para cuidados com saúde, segurança alimentar, monitoramento ambiental, e biossegurança, especialmente em áreas remotas (KIM et al., 2018; HANSEN; WARHED, 2020). Esses dispositivos têm sido explorados utilizando diferentes abordagens, ora utilizando os mesmos como detector ora utilizando como interface instrumental (ZHANG; LIU, 2016; HUANG et al., 2018; PARK et al., 2022).

3.2.2 Classificação dos Biossensores

Os Biossensores podem ser classificados de acordo com o método de transdução ou conforme o elemento de biorreconhecimento, Figura 3 (GRIFFIN; STRATIS-CULLUM, 2009; NARESH; LEE, 2021). A deliberação do biorreceptor e do método de transdução mais adequados deve ser realizada com base nas características de cada sistema específico. A determinação da técnica de imobilização do biorreceptor deve ser ponderada da mesma forma, pois influencia diretamente a performance do dispositivo (PARKHEY; MOHAN, 2019; MORALES; HALPEM, 2018; NARESH; LEE, 2021).

3.2.2.1 Elementos de Transdução

Os transdutores são parte fundamental dos dispositivos biossensores, pois são responsáveis por transformar e amplificar os sinais produzidos pela interação entre o elemento de reconhecimento e o analito em um sinal que será convertido em uma resposta equivalente à concentração do analito.

O transdutor é definido como um dispositivo que converte determinada energia (elétrica, som, luz, magnetismo, calor ou mecânica) em outra (geralmente óptica ou

elétrica), atuando como uma interface, mensurando as mudanças físico-químicas que ocorre ao se processar a reação com o biorreceptor (CALIL; DA SILVA, 2011). Em um biossensor, é imprescindível que o transdutor possua elevada sensibilidade, pois, à vista disso uma pequena variação da concentração do analito é suficiente para que ocorra uma modificação no sinal elétrico de saída (SECCHI, 2017).

Dependendo do sistema de transdução utilizado, os biossensores podem ser classificados de acordo com a Figura 3 em: eletroquímico (anemométrico, potenciométrico, impedimétrico etc.), óptico (absorção, reflexão, refração, transmissão, plasma de superfície, fluorescência etc.), colorimétrico, piezoelétrico (onda acústica, microbalança de quartzo etc.) e termoeletrico (calor) (MALHOTRA; AZAHAR, 2018)

3.1.2.1.1 Materiais para transdutores de biossensores de DoC

O desempenho do elemento de transdução de plataformas DoC é diretamente dependente dos materiais que o compõe impactando as propriedades do sistema e influenciando a performance do dispositivo. Diversos fatores como composição química, área superficial, porosidade, morfologia, condutividade elétrica, grau de hidrofobicidade e estabilidade química atuam significativamente nas características elétricas, mecânicas e térmicas e, por consequência, no mecanismo de transformação e amplificação dos sinais entre o elemento de biorreconhecimento e o analito (GRIESHABER et al., 2008; CALIL; DA SILVA, 2011; HAN et al., 2019).

Na literatura é relatado diversos potenciais materiais alternativos para utilização como transdutores de biossensores. Os materiais nanoestruturados baseado em carbono destacam-se devido a seus grupos funcionais e defeitos de superfície, uma vez que possibilita a combinação, nucleação e crescimento controlados de diversos tipos de nanopartículas inorgânicas, incluindo metais, óxidos metálicos, nanopartículas semicondutoras, pontos quânticos, polímeros orgânicos e biomoléculas, para criar biossensores com propriedades otimizadas (KRISHNAN et al., 2019; LIU; YU; 2019).

3.1.2.1.1.1 Processo de fabricação de transdutores de plataformas DoC de biossensores

A ascensão da indústria de microeletrônica impulsionou estudos e investimentos para o desenvolvimento de plataformas DoC, em consequência um elevado número de pesquisas descreve a utilização de diferentes materiais para compor matrizes para elementos de transdução dessas plataformas. Diversos processos de fabricação foram desenvolvidos, aperfeiçoados e empregados para produzir componentes eletrônicos padronizados. Dentre os principais, pode-se citar fotolitografia, *ink printing*, *screen printing*, *plasma etching*, processo de deposição química/eletroquímica, impressões bidimensionais (2D) e 3D, DLW, dentre outros (TALEAT; KHOSHROO; MAZLOUM-ARDAKANI, 2014; GAO et al., 2017; HONG et al., 2018; HAN et al., 2019; XU et al., 2019; FERRARI et al., 2021; FRUNCILLO et al., 2021; SINGH et al., 2022). Essas técnicas se caracterizam por produzir transdutores em formatos diversificados, contendo uma ampla gama de materiais como grafeno e seus derivados, polímeros orgânicos, materiais inorgânicos, óxidos e hidróxidos de metais de transição, dicalcogenetos de metais de transição, assim como a combinação destes resultando em propriedades aprimoradas (HAN et al., 2019; KRISHINAN et al., 2019; TYAGI et al., 2020; SAINZ-URRUELA et al., 2021).

3.1.2.1.1. 1. 1 Processo de gravação direta a Laser (DLW)

Dentre os processos supracitados como alternativa para a fabricação de transdutores para plataformas DoC de biossensoriamento, a técnica que é considerada promissora e que recentemente é uma das mais estudadas por diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo é o processo de DLW (WAN et al., 2020). A DLW é uma técnica emergente de etapa única de fabricação utilizada para projetar/demarcar desenhos padronizados na superfície de diferentes materiais sintéticos e naturais (LI, 2020, OLIVEIRA et al., 2022). O processo é baseado em um efeito térmico responsável por causar transições de estado físico localizadas, resultantes de alterações químicas e morfológicas na região onde o feixe de laser é irradiado, enquanto as zonas onde o laser não foi direcionado se mantem inalteradas,

sem quaisquer modificações químicas ou estruturais (ZHOU et al., 2010; LI, 2020; WAN et al., 2020).

A DLW caracteriza-se por ser uma técnica de alta precisão, simples operação e de baixo custo e que não necessita de ambiente controlado que vem sendo amplamente empregada na fabricação de transdutores para a aplicação em biossensores (WAN et al., 2020; VIVALDI et al., 2021; LIU et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2022). Ademais, se destaca por ser uma técnica rápida, visto que não necessita a utilização de máscaras e pós-tratamentos, tornando-se uma excelente alternativa para ser utilizada em produção de larga escala, garantindo padronização, reprodutibilidade e custo reduzido, uma vez que uma simples máquina de corte a laser de CO₂ acoplada a um computador possui os requisitos necessários para produção de transdutores (ARNOLD; SERRA; PIQUÉ 2007; YE et al., 2017; YE, 2018; HUANG et al., 2020; WAN et al., 2020; BEHRENT et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2022). Por se tratar de uma técnica de alta resolução, é capaz de produzir padrões simples até os mais complexos, com abundância de detalhes e de forma rápida, como ilustra a Figura 4.

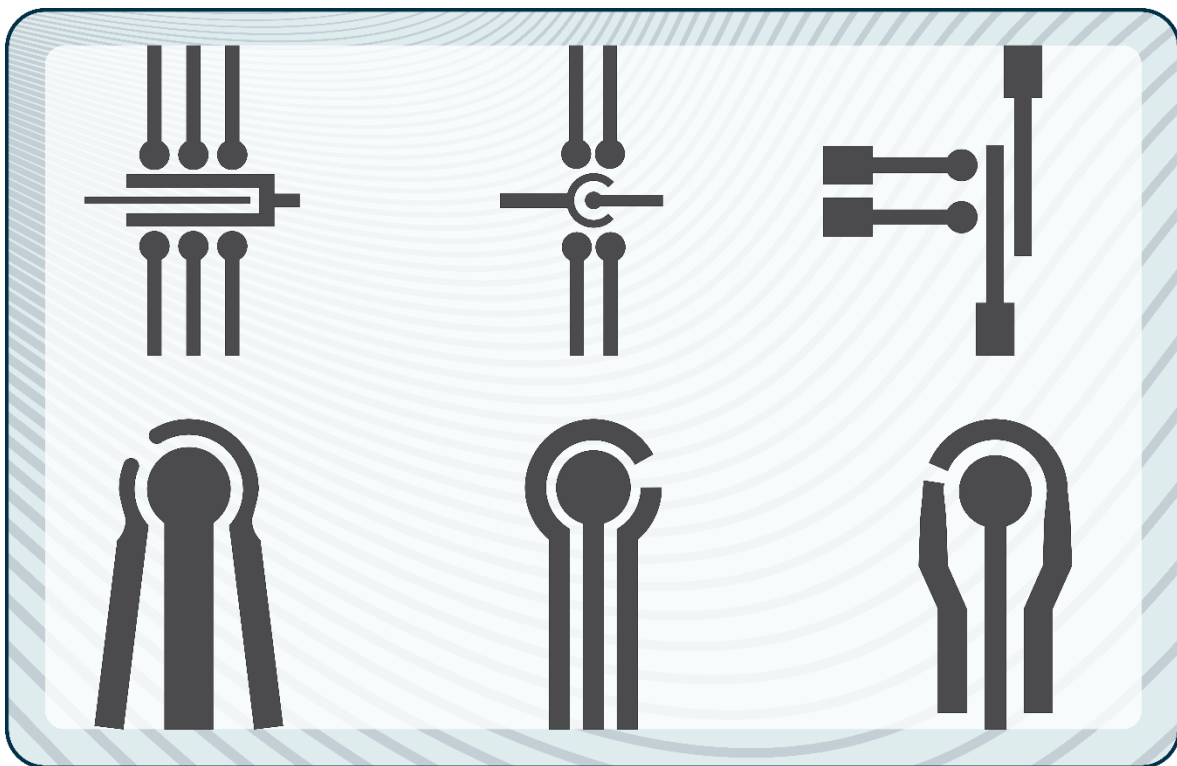


Figura 4: Ilustração do processo DLW contendo alguns padrões normalmente utilizados como transdutores de plataformas DoC para biossensores.

Fonte: OLIVEIRA, 2022.

Atualmente, a técnica de DLW destaca-se pela facilidade que possui para sintetizar transdutores de grafeno de alta qualidade e alta área superficial, a partir de diferentes tipos de substratos, naturais e sintéticos, produzindo uma classe de material denominada LIG (LIG et al.; 2014; YE, 2018; LI, 2020).

3.1.2.1.1. 1.2 Grafeno induzido a Laser (LIG)

Desde a descoberta do grafeno, realizada em 2004 pelos pesquisadores agraciados pelo prêmio Nobel de Física no ano de 2010, Andre Geim e Konstantin Novoselov, o qual foi produzido por exfoliação mecânica de grafite com auxílio de uma fita adesiva, passou a ser objeto de estudo em diversos seguimentos do conhecimento e inúmeros grupos de pesquisa ao redor do globo estudam continuamente novos processos de síntese, devido a suas excepcionais propriedades inerentes (NOVOSELOV et al., 2004; GEIM; NOVOSELOV, 2009; NOVOSELOV et al., 2012; YE et al., 2014; LIU; YU; 2019; VIVALDI et al., 2021). Significativos avanços tecnológicos foram realizados nos anos mais recentes, diversos métodos de síntese de grafeno foram desenvolvidos. Atualmente, os principais envolvem processamentos em altas temperaturas ou são compostos por rotas químicas que possuem diversas etapas, como o processo de deposição química de vapor (CVD¹⁷) em metais a partir de precursores de hidrocarbonetos gasosos e sínteses baseada em processos hidrotermais. Além destes, sínteses baseadas em processos de exfoliação mecânica e redução química de óxido de grafeno também são muito utilizadas. (NOVOSELOV et al., 2012; KAR; SARSWAT, 2019; HUANG et al., 2020; VIVALDI, et al., 2021)

O termo LIG ganhou notoriedade em 2014 figurando a literatura nos anos posteriores, quando o grupo de pesquisa liderado por James Tour divulgou o trabalho desenvolvido descrevendo a produção de grafeno de alta porosidade através do processo de DLW utilizando um laser de CO₂ em filmes poliméricos comerciais de PI (LIN et al., 2014; DUY et al., 2018; WAN et al., 2020). Consideráveis avanços nas pesquisas no que tange a obtenção de LIG foram relatados, desde sua descoberta. Segundo Behrent et al. (2021) e Wan et al. (2020), modificações em parâmetros de

¹⁷Sigla oriunda do Inglês *chemical vapor deposition*

laser e atmosfera no processo de produção, possibilita controlar de acordo com as necessidades de aplicação, a composição química e porosidade do material. Por exemplo, o aumento da potência utilizada do laser no processo resulta em uma maior geração de produtos gasosos oriundos da reação entre o laser e o substrato, originando materiais com maior grau de porosidade. No caso de uso de atmosferas controladas, processos de oxidação localizados nas regiões de incidência do laser podem ser controlados, resultando em materiais de maior qualidade, além de poder resultar em dopagens da estrutura LIG. Além disso, por meio de modificações no modo como o laser é irradiado, alterando sua distância para o substrato, ajustando seu foco ou ainda repetindo processos de irradiação, pesquisas descrevem que além da PI, filmes de LIG podem ser sintetizadas em diversos tipos de materiais sintéticos ou naturais. Segundo Lin et al. (2014), o mecanismo de formação de estruturas de LIG está diretamente relacionado com a composição química e estrutural dos substratos devendo-se possuir presença de grupos aromáticos e imida.

O processo de obtenção de LIG por DLW se caracteriza por ser realizado em temperatura ambiente, sem utilização de reagentes químicos ou solventes agressivos e sem a necessidade de atmosferas inertes ou pós-tratamentos, o que torna o processo extremamente interessante para produções industriais em larga escala. Além disso, é notável por ser capaz de produzir LIG enquanto padroniza diferentes formas geométricas e designs simultaneamente, o que torna esta técnica atraente para confecção de transdutor para biossensores, como exhibe a Figura 5. (LIN et al., 2014; YE et al., 2017; DUY, 2018;) Informações como dimensões e designs a serem produzidos podem ser facilmente ajustados em simples programas de desenho, enquanto parâmetros envolvendo potência do laser e velocidade de varredura da irradiação podem ser definidos no próprio equipamento (YE et al., 2017; WAN et al., 2020; BEHRENT et al., 2021). A figura 5 exemplifica a formação de LIG em substratos de PI através da técnica de DLW utilizando um laser de CO₂. Pode ser observado claramente a existência de duas regiões distintas, contendo o substrato de PI onde o laser de CO₂ não foi irradiado (área amarela) e os designs formados por LIG (área preta).

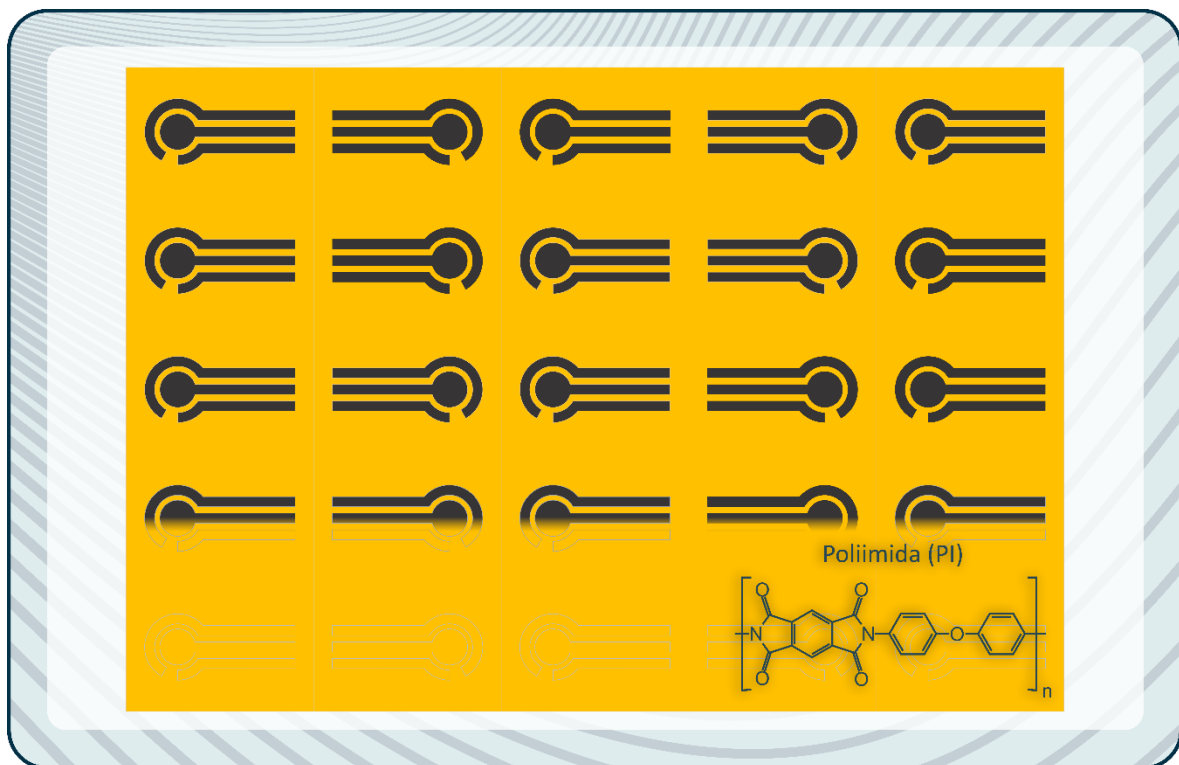


Figura 5: Ilustração de um processo padrão de obtenção de plataforma DoC em LIG utilizando filme polimérico de PI.

Fonte: OLIVEIRA, 2022.

Como supracitado, a PI foi o primeiro material utilizado como substrato precursor para obtenção de LIG. A PI, é um polímero emergente de monômero imida, de nome químico poli (4,4'-oxidifenileno-piromelitimida) também denominado por Kapton®, nome comercial do produto desenvolvido no final da década de 1960 pela DuPont™, e possui estrutura química contendo anéis aromáticos como ilustrado na Figura 5. O filme de PI opera com características adequada de resistência e permanece estável em uma ampla gama de temperaturas (-300 a 300 °C), apresenta excelente estabilidade química e alta resistência mecânica a esforços que causam delaminação e excelente resistência a desgaste sob uso contínuo em condições adversas de trabalho. Também apresenta condutividade térmica consideravelmente baixa, bem como exímias propriedades como isolante elétrico. Tais propriedades proporcionam à Kapton excelente performance e resultado, uma combinação que a torna ideal para uso no mascaramento de placas de circuito impresso flexíveis (microeletrônica flexível) (TOUR, 2019 HICYILMAZ; BEDELOGLU; 2021; VIVALDI, et al., 2021).

O mecanismo de formação de estruturas de LIG utilizando filmes de PI como substrato, é baseado no processo fototérmico oriundo da irradiação do feixe do laser incidido. As ligações C-O, C=O e N-C são rompidas, resultando na diminuição da quantidade de C e N. Os compostos aromáticos buscam se rearranjar por meio de reações de hibridização com átomos de carbono vizinho, formando estruturas grafíticas. Nesse processo, átomos de carbono sp^3 são convertidos em átomos de carbono sp^2 (LIN et al., 2014; HAN et al., 2019; YE; JAMES; TOUR, 2019; WAN et al., 2020; VIVALDI et al., 2021).

3.1.2.1.2 Biossensores eletroquímicos

Os biossensores eletroquímicos, uma subclasse de sensores químicos, combinam a sensibilidade dos métodos eletroanalíticos com a biosseletividade inerente do componente biológico (RONKAINEN; HALSALLB; HEINEMANB, 2010; NARESH; LEE, 2021). Esses dispositivos são baseados em transdutores eletroquímicos, os quais são os mais comuns e frequentemente citados na literatura, pois são simples, econômicos, sensíveis, estáveis, possuem baixos limites de detecção, *screening* rápido e facilidade de miniaturização (BAI; XU; ZHANG, 2020). Eles são compostos de três eletrodos: RE, WE e CE, que possui como princípio a detecção de um sinal eletroquímico produzido pelo consumo ou geração de espécies eletroativas durante o processo de bio-interação, como pode ser observado na Figura 3. Os biossensores eletroquímicos podem ser classificados de acordo com o princípio de mensuração, os quais podem ser subdivididos em amperométricos, voltamétricos, impedimétricos, potenciométricos e condutimétricos (CALIL; DA SILVA, 2011). E podem ser classificados quanto a natureza do processo de reconhecimento biológico, ou seja, dispositivos biocatalíticos e de afinidade (RONKAINEN; HALSALLB; HEINEMANB, 2010). Todavia é interessante ressaltar que na maioria dos trabalhos disponíveis, os autores optam por utilizar mais de uma técnica eletroquímica para caracterizar a sensibilidade, seletividade e estabilidade do biossensor eletroquímico e assim obter resultados robustos e confiáveis.

Esses dispositivos são capazes de associar, em uma única etapa, a preparação, reação e detecção de biomarcadores e/ou patologias em um chip

miniaturizado, necessitando-se volumes diminutos de amostras, com alta sensibilidade, baixo limite de detecção e análise rápida (RONKAINEN; HALSALLB; HEINEMANB, 2010; LUPPA; JUNKER; LANGER, 2018 ZHANG et al., 2020; LLIESCO et al., 2021). Ademais, são descritos como ferramentas eletroanalíticas que permitem a realização de ensaios no local (ou próximo ao paciente) e detectam agentes patológicos pelo emprego de um elemento de reconhecimento biologicamente derivado ou biomimético durante uma reação (bio) química. Este evento de ligação é convertido em um sinal elétrico mensurável, proporcional, gerado durante a reação dos compostos eletroquimicamente ativos (TRÉVENOT et al., 2001; SINGH et al., 2021; YAKOH et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2022).

Esta técnica possui excelente capacidade de discriminar pequenos eventos durante o processo de reconhecimento na superfície do sistema, reduzindo significativamente o custo e o tempo dos procedimentos (SINGH et al., 2021; YAKOH et al., 2021, LLIESCO et al., 2021). As respostas de interações podem ser atreladas com os sistemas de Internet das coisas (IoT) e *m-health* em aplicativos de saúde inteligentes, para auxiliar os diagnósticos clínicos e estado de saúde, que coordenarão um conjunto vasto de objetos digitais (RAY, 2018; PATERAKI et al., 2020;). Isso permite o controle e acesso detalhado, possibilitando a criação de um sistema eficiente e robusto, que pode contribuir significativamente no monitoramento e gerenciamento da disseminação. Tais dispositivos vão possibilitar comunicar, coletar, compartilhar dados e detectar padrões em tempo real, beneficiando indivíduos e sistemas de saúde. Essas informações auxiliarão na tomada de decisões, e por consequência, gerarão implicações financeiras e sociais significativas, pois permitirão analisar, planejar e gerenciar eventos epidemiológicos (RAY, 2018; PATERAKI et al., 2020; LLIESCO et al., 2021).

3.1.2.1.2.1 Biossensores Eletroquímicos Amperométricos

Os biossensores amperométricos são uma classe de biossensores eletroquímicos que segundo Sadeghi (2013) é descrito como dispositivos integrados autocontidos baseados na aferição da corrente ou potencial resultante de reações redox de espécies eletroativas provenientes de elemento biológico na superfície do

transdutor enquanto um potencial ou corrente constante é aplicado. Fornecendo informações analíticas quantitativas específicas de um analito dentro de uma matriz de amostra, o qual baseiam-se na mensuração da corrente elétrica resultante (tipicamente na faixa de nA a mA) pelas reações redox das espécies eletroativas de um mediador na interface, isto é, devido à conversão catalítica ou à absorção de proteínas que ocorre na superfície do eletrodo, sob a manutenção de um potencial constante entre o WE e o RE, em que o fluxo mensurado é proporcional à quantidade do analito de interesse presente na amostra (SADEGUI, 2013; MALHOTRA; AZAHAR, 2018). Os sinais de corrente elétrica são transmitidos pelo transdutor até o sistema de processamento de sinal (Figura 3), que transformam esses sinais em curvas de corrente versus potencial correlacionando com a concentração do analito, como pode ser observado na Figura 6 (HAMMOND et al., 2016). O eletrodo de trabalho (WE) do biossensor amperométrico é geralmente um metal nobre (ouro (Au), titânio (Ti), níquel (Ni), etc.), óxido de índio-estanho (ITO), ou carbono (C) e seus derivados recoberto pelos elementos biorreceptores (MALHOTRA; AZAHAR, 2018).

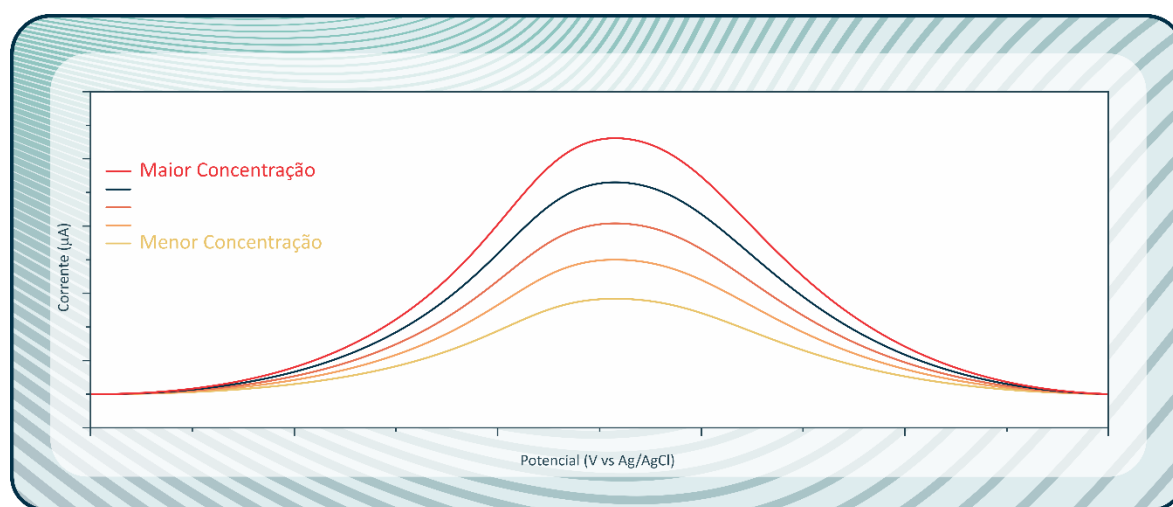


Figura 6: Exemplo de curva corrente versus potencial para amostras com diferentes concentrações de analito.

Fonte: OLIVEIRA, 2022.

A Figura 6 aborda o comportamento desejado para este tipo de curva, o aumento da resposta, em termos de corrente (eixo Y, $I/\mu\text{A}$), conforme ocorre o aumento da concentração de analito no sistema. No exemplo acima, pode ser observado que na curva que existe ocorrência de reações de oxidação mais intensas gera por consequência um sinal de maior amplitude em termos de corrente.

3.1.2.2 Receptor: elemento de reconhecimento biológico

A imobilização do elemento de reconhecimento no transdutor é também outro fator essencial para o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico que apresente sensibilidade elevada, haja vista que estas bioespécies são responsáveis por interagir com o analito e repassar os sinais de reconhecimento para o transdutor.

O componente biológico proporciona a seletividade do biossensor, a qual é uma das características mais importante. A deliberação adequada do mesmo é de suma importância e deve ser realizada de acordo com cada sistema específico, necessitando assim considerar quanto à escolha do elemento de biorreconhecimento: a disponibilidade de um sítio ativo que possa reagir ou interagir com o analito; a estabilidade nas condições do meio; e possibilidade de modificação/imobilização sobre suporte por métodos físicos ou químicos sem afetar o desempenho do dispositivo (SECCHI, 2017). Diferentes metodologias são estudadas buscando obter uma boa interação entre este elemento e os transdutores, como a incorporação destas biomoléculas em diferentes matrizes ou ainda a utilização de reagente que propiciem a formação de ligações químicas mais fortes entre ambas as partes (MUGURUMA, 2018). É importante salientar que a imobilização do elemento de reconhecimento deve ser realizada sem que ocorra a perda de suas atividades biológicas.

Os receptores, na sua grande maioria são representados por elementos biológicos, e possuem boa afinidade com o analito a ser identificado. Portanto, torna-se importante à seleção adequada do elemento a ser utilizado para detecção de determinado analito. Diversas biomoléculas podem ser empregadas em biossensores, como enzimas, proteínas, anticorpos, ácidos nucleicos, microrganismos, células, tecidos, organelas, receptores de membrana e moléculas orgânicas de origem biológica (RONKAINEN; HALSALLB; HEINEMANB, 2010; PARKHEY; MOHAN, 2019). Os elementos de biorreconhecimento de acordo com o tipo de interação com o analito podem ser divididos em dois grupos de acordo com o item 3.1.2.2.1 e 3.1.2.2.2.

3.1.2.2.1 Elemento de reconhecimento biocatalítico

O elemento de reconhecimento biocatalítico possui como princípio a atividade específica de biocatálise, proporcionando interação com o biomarcador catalisando a reação em que resulta em um novo produto de processos bioquímicos, apresentando designs simples e não necessita de instrumentação de alto valor agregado (RONKAINEN; HALSALLB; HEINEMANB, 2010; SECCHI, 2017; NARESH; LEE, 2021). Segundo Thévenot et al. (2001) os dispositivos biocatalíticos incorporam enzimas (mono ou multi-enzima), Células inteiras (microrganismos, como bactérias, fungos, células eucarióticas ou leveduras), organelas, partículas celulares (mitocôndrias, paredes celulares) e tecido (fatia de tecido vegetal ou animal) que reconhecem o analito e produzem espécies eletroativas detectáveis de interesse.

3.1.2.2.2. Elemento de reconhecimento de biocomplexação ou bioafinidade

O elemento de reconhecimento de biocomplexação ou bioafinidade segundo Aizawa (1991) consiste na interação seletiva da macromolécula ou montagens moleculares organizadas, as quais são isoladas de seu ambiente biológico original ou manipuladas, com biomarcador de interesse de forma irreversível, e durante a interação nenhum novo produto de reação bioquímica é formado (THÉVENOT et al., 2001; NARESH; LEE, 2021). Tal bio-interação resulta em uma alteração conformacional da biomolécula e/ou mudança nas propriedades do meio, alcançando-se condição de equilíbrio (RONKAINEN; HALSALLB; HEINEMANB, 2010; SECCHI, 2017). Essas respostas de equilíbrio segundo Thévenot (2001), são monitoradas pelo detector integrado, que em alguns casos, esta reação de biocomplexação é monitorada utilizando uma reação biocatalítica complementar, uma vez que não há ocorrência de consumo do analito pelo agente biocomplexante imobilizado. Os dispositivos que possuem em sua composição elemento de reconhecimento de bioafinidade dependem de uma interação de ligação seletiva entre o analito e um componente biológico, como uma proteína, anticorpo, ácido nucleico ou um receptor celular como alvo para detecção (BUTNARIU; BUTU, 2019; NARESH; LEE, 2021).

Os mais desenvolvidos receptores biocomplexos são os imunossensores para aplicações qualitativas e quantitativa para detectar níveis traços (ppb, ppt) de vírus, bactérias, drogas, hormônios, pesticidas e diversos outros produtos químicos, que

possui como princípio básico a especificidade do reconhecimento molecular de formar um complexo estável de forma similar à metodologia de imunoensaios (RONKAINEN; HALSALLB; HEINEMANB, 2010; SECCHI, 2017; NARESH; LEE, 2021). Resultando em biosensores altamente seletivos baseados nos princípios de fase sólida de imunoensaios e nos eventos físicos-químicos resultantes da interação.

3.1.2.2.2.1 Imunossensor de reação imunoquímica baseado em complexo Antígeno – Anticorpo (Ag-Ab)

Segundo Wqng, Shen e Yu (2008) e Malhotra e Ali (2018), imunossensores são dispositivos biossensores constituídos por ligantes de bioafinidade que envolvem o acoplamento de reações imunoquímicas a transdutores. Segundo Naresh e Lee (2021), os imunossensores são classificados como marcados e não marcados. Os imunossensores marcados, possui introduzido um marcador sensivelmente detectável, o qual o complexo antígeno-anticorpo (Ag-Ab) é avaliado por meio de aferição do rotulo. Em contrapartida, os imunossensores não marcados são construídos para determinar especificamente o complexo estável Ag-Ab, estimando as alterações físicas-químicas provocadas pelo desenvolvimento do mesmo. A priori, o processo de complexação Ag-Ab é orientado por considerações termodinâmicas, que se baseiam no fato de que o reconhecimento imunoquímico de biorreceptores Ag (Ab) imobilizados em um transdutor para Ab (Ag) contidos na amostra pode produzir alterações na densidade de cargas nas estruturas do transdutor proporcionando identificações de sinais analíticos que variam dinamicamente com a concentração do biomarcador de interesse (WAN; SHEN; YU, 2008; RONKAINEN; HALSALLB; HEINEMANB, 2010; CRISTEA et al., 2015). A reação é altamente específica entre as regiões variáveis de um Ab e os epítomos de um Ag, devido ao alto grau de complementaridade entre o sítio de ligação, os quais envolve diferentes tipos de interações intermoleculares (interações hidrofóbicas e eletrostáticas, força de van der Waals e ligações de hidrogênio) (WAN; SHEN; YU, 2008; RONKAINEN; HALSALLB; HEINEMANB, 2010; MALHOTRA; ALI, 2018). A reação de complexação Ag-Ab é reversível e, devido às forças que sustentam o Ag e o Ab acoplados, o complexo formado se dissocia dependendo do ambiente da reação (por exemplo, pH e força do íon (K)) (WAN; SHEN; YU, 2008; RAMÍREZ; SALGADO; VALDMAN, 2009;

RONKAINEN; HALSALLB; HEINEMANB, 2010; RONKAINEN; HALSALLB; HEINEMANB, 2010). A alta afinidade e especificidade dessa reação de complexação Ag-Ab define as características únicas do imunossensor.

Os Ag e Ab são ferramentas essenciais para a pesquisa biológica com aplicações multidisciplinar devido ao seu reconhecimento e afinidade específicas, pois sua composição singular permite que eles se acoplem especificamente a assinaturas químicas complexas (Ab ou Ag), que são encontrados nas camadas externas de patógenos (CRISTEA et al., 2015). Isso não só levou ao uso no reconhecimento de componentes celulares específicos, mas também sua aplicação direta e indiretamente em análises clínicas para aplicações quantitativas e qualitativas de biomarcadores (RAMÍREZ; SALGADO; VALDMAN, 2009; RONKAINEN; HALSALLB; HEINEMANB, 2010; AZHAM et al., 2014; CRISTEA et al., 2015).

Atualmente diversas pesquisas estão sendo desenvolvidos acerca de diagnóstico empregando Ag e Ab devido as suas propriedades características, como reconhecimento, afinidade específica e possibilidade real de aplicação em consequência de processos eficientes, visando à confecção de imunossensor para determinação de biomarcadores (RONKAINEN; HALSALLB; HEINEMANB, 2010; AZHAM et al., 2014; CRISTEA et al., 2015). Isto se deve ao crescente aumento da utilização nos diagnósticos clínicos, prognóstico e avaliação de terapia de resposta.

3.1.2.2.1.1 Anticorpo (Ab)

Ab são biomarcadores ou elementos de reconhecimento de bioafinidade, empregado por décadas em diagnósticos clínicos, prognóstico e avaliação de terapia de resposta devido à sua especificidade (NARESH; LEE, 2021; CRISTEA et al., 2015). Os Ab pertencem a classe das glicoproteínas denominada imunoglobulinas, produzidos por um subconjunto de glóbulos brancos do sangue - os linfócitos B possuindo cinco isotipos (IgM, IgD, IgG, IgE e IgA), especializados para identificar e neutralizar substâncias estranhas por mecanismos efetores ao sistema imunológico nomeadas imunógenos ou Ag (RONKAINEN; HALSALLB; HEINEMANB, 2010; BLANCO; BLANCO, 2017; NARESH; LEE, 2021; MATHEW; SANKAR; VARACALLO, 2022).

A estrutura dos Abs consiste em duas cadeias idênticas polipeptídicas leves (VL¹⁸) e duas cadeias variável pesadas (VH¹⁹), na qual na extremidade do Ab está uma região hipervariável, que são determinantes de complementaridade (CDRs²⁰), que permite produzir diferentes tipos de Ab que responderão aos Ag que irão atacar o sistema imunológico (RONKAINEN; HALSALLB; HEINEMANB, 2010; NARESH; LEE, 2021). O local de Conexão do Ag é formado pela justaposição das regiões das VHs e VLS, as quais são interligadas covalentemente por ligações de dissulfeto estabelecidas entre resíduos de cistina na carboxila terminal da VL e domínio CH1 da VH (LEMO, 2014). Os Ab são encontrados em uma fração de proteína específica do sangue classificada gama-globulina ou fração de imunoglobulina (BLANCO; BLANCO, 2017; MATHEW; SANKAR; VARACALLO, 2022). Segundo Naresh e Lee (2021) as imunoglobulinas geralmente podem ser dosadas no soro sanguíneo, fluidos teciduais e membranas de vertebrados.

3.1.2.2.1.2 Antígeno (Ag)

Segundo McDuffie (1981) e Berzofsky, Howe e Olkhanud (2022), O termo Ag é designado para descrever qualquer molécula (substância) capaz de estimular uma resposta imune específica (humoral ou celular), ou pode ser reconhecida por produtos de uma resposta imunológica, como anticorpos ou linfócitos (glóbulos brancos que combatem as infecções do corpo humano) presentes naturalmente ou estimulados, é comumente denominado de antígeno. Segundo Berzofsky, Howe e Olkhanud (2022), os Ags podem existir em diversas formas como: moléculas simples, toxinas, produtos químicos, proteínas, carboidratos, lipídios ou ácidos nucleicos derivados de microrganismos invasores, como vírus, bactérias, protozoários e fungos, ou outras substâncias estranhas que pode se originar do interior do corpo (autoproteína) ou de ambiente externo (heteroantígeno).

Diversos receptores de antígenos são produzidos por células do sistema imune, e são ativados quando identificam Ags. Os Ags são reconhecidos por receptores denominados Ab, e quando complexo podem se acoplar em diferentes Ab.

¹⁸Sigla oriunda do Inglês *light-chain variable*

¹⁹Sigla oriunda do Inglês *heavy-chain variable*

²⁰Sigla oriunda do Inglês *complementarity-determining regions*

Todavia um Ag singulares possui uma estrutura molecular particular denominada de determinante antigênico e epítipo, que possibilita o acoplamento de um Ab específico e receptores de células T (McDuffie, 1981; VITORETI, 2014; BLANCO; BLANCO, 2017; BERZOFSKY; HOWE; OLKHANUD, 2022).

Os Ags possuem uma característica denominada especificidade antigênica, que é a capacidade das células hospedeiras de reconhecer um Ag especificamente como uma entidade molecular única e distingui-lo de outro com precisão requintada (McDuffie, 1981; BERZOFSKY; HOWE; OLKHANUD, 2022). Devido ao Ag possuir essa característica, ele é utilizado como elementos de reconhecimento de bioafinidade ou biomarcador, empregado por décadas em diagnósticos clínicos, prognóstico e avaliação de terapia de resposta.

3.1.2.2.1.1. 2.1 Antígeno QCOV-8

O antígeno QCOV-8, é um antígeno quimérico que possui uma fração da proteína S e outra fração da proteína N, específica para anticorpos anti-SARS-CoV-2 (IgA, IgM e IgG), o qual foi projetado e desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Departamento de Biotecnologia da UFPel, sob o número de registro de depósito de patente atribuído para uso BR1020210020105, armazenado a 4 °C em solução 1X PBS 0,1 mol.L⁻¹ em pH 7,4, como elemento receptor biocomplexo de imunossensores e imunoensaios.

3.1.2.2.3 Técnica de imobilização de biorreceptor

No desenvolvimento de um biossensor, outra etapa também crucial é a imobilização do componente biológico. A deliberação adequada da técnica de imobilização é um aspecto importante no que tange o desenvolvimento de dispositivos eficiente, que apresente um bom desempenho, estabilidade, sensibilidade, seletividade, rápida resposta e reprodutibilidade, pois fatores como por exemplo, a precisão das medidas e a repetibilidade são fortemente influenciados pela estabilidade das biomoléculas imobilizadas, devendo-se levá-los em consideração na escolha do melhor método a ser aplicado, pois a biomolécula necessita preservar

sua estrutura, função e atividade biológica na superfície do transdutor durante a utilização do biossensor (THÉVENOT et al., 2001; MALHOTRA; ALI, 2018). Isso ocorre pois posterior a imobilização há possibilidade do biorreceptor tornar-se inativado ou lixiviado (NERESH; LEE, 2021).

Há uma diversidade de diferentes elementos de biorreconhecimento, com características inerentes sendo essencial a compreensão das vantagens e desvantagens para a seleção da técnica e método mais adequados de imobilização escolhido, uma vez que podem ter efeitos determinantes e influenciar na performance do dispositivo (SASSOLAS et al., 2012; SAWANT, 2017; MORALES; HALPERN, 2018; NERESH; LEE, 2021). Ademais, outros parâmetros podem influenciar na estabilidade operacional do biossensor, como por exemplo, a estabilidade do suporte, espécie da amostra e as características do analito, pois um biossensor ideal como descrito na Tabela 1 e que possua viabilidade comercial deve manter sua estabilidade para uso a longo prazo.

Segundo Neresh e Lee (2021) dois importantes métodos de imobilização são amplamente aplicados na construção de biossensores: Físico (reversível) e químico (irreversível). Os métodos físicos (Figura 7) compreendem em adsorção física e aprisionamento físico. Enquanto os métodos químicos (Figura 7) compreende ligação covalente, ligações cruzadas, reticulação ou Copolimerização.

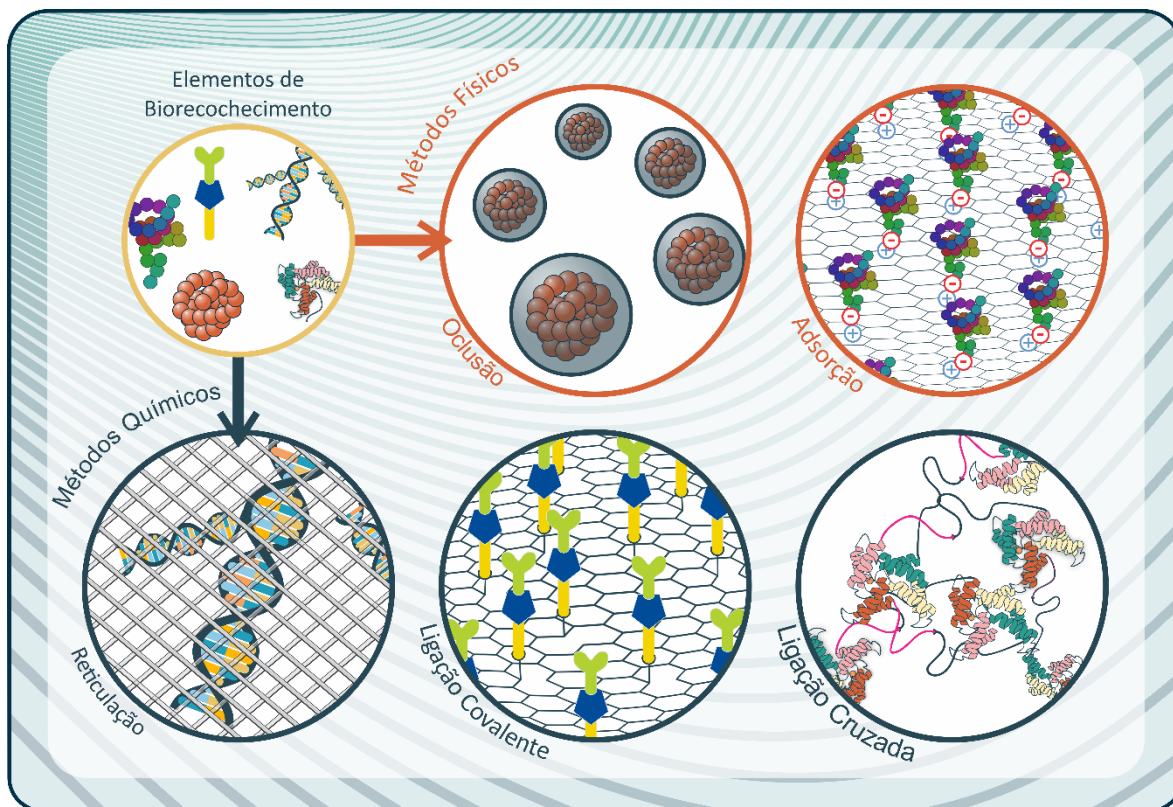


Figura 7: Ilustração esquemática dos métodos de imobilização de elementos de biorreconhecimento.

Fonte: OLIVEIRA, 2022.

3.1.2.2.3.1 Imobilização física (reversível)

Esta técnica consiste na fixação do elemento de biorreconhecimento à superfície do transdutor sem a formação de ligações químicas. A técnica de imobilização física inclui os métodos que são categorizados em 3.1.2.2.3.1.1. adsorção física e 3.1.2.2.3.1.2. aprisionamento físico (eletropolimerização, técnica sol-gel e microencapsulação).

3.1.2.2.3.1.1 Adsorção física

O método de adsorção física (Figura 7) fundamenta-se em interações físicas entre o biorreceptor e a superfície do suporte sólido (transdutor) ou transportador (materiais nanoestruturados) por interações eletrostáticas (interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações iônicas), o qual pode ser

realizado por meio de quatro processos descrito na Tabela 4 (SECCHI, 2017; NERESH; LEE, 2021). Este método não possui limitações de difusão de poros, uma vez que não envolve nenhuma funcionalização do suporte preservando a atividade biológica (SANTOS, 2012; NERESH; LEE, 2021). Todavia apesar da simplicidade deste método, pode conduzir a uma baixa estabilidade operacional devido os biorreceptores estar fracamente ligados ao suporte ou transportador e com o decorrer do tempo ocorre o fenômeno dessorção progressiva dessas biomoléculas devido a variações de temperatura, pH e força iônica (SECCHI, 2017).

Tabela 4: Processos para métodos de adsorção física.

Processo	Descrição
Estático	A imobilização de biorreceptores em suporte sólido ou transportador é realizada permitindo a solução de biorreceptores ser adicionada sem agitação.
Batch Dinâmico	Sob condições de agitação, o transportador é colocado na solução contendo moléculas de biorreceptores.
Carregamento do reator	Com agitação contínua, o carreador é colocado em um reator e transferido para a solução contendo biorreceptores.
Posicionamento do Eletrodo	um eletrodo é colocado em um banho de solução contendo biorreceptores com carreadores, e então sob o campo elétrico, as biomoléculas migrar para o carreador e se depositar em sua superfície.

Fonte: OLIVEIRA 2022 adaptado de MALHOTRA; ALI, 2018.

3.1.2.2.3.1.2 Aprisionamento físico

O aprisionamento físico é um método reversível que consiste no aprisionamento de elementos de bioreconhecimento em matrizes 3D porosa de

materiais orgânicos ou inorgânicos, por meio de ligações covalentes ou não covalentes (MALHOTRA; ALI, 2018; NERESH; LEE, 2021). O processo de imobilização por aprisionamento, como ilustrado na Figura 7, pode ocorrer por dois caminhos: i. O biorreceptor é misturado em uma solução de monômero, seguida pela polimerização da solução por uma reação química ou ii. pela alteração das condições experimentais NERESH; LEE, 2021). Segundo Neresh e Lee (2021) as técnicas (Tabela 5) frequentemente utilizadas neste processo são: eletropolimerização, sol-gel e microencapsulação.

Esse método protege o componente biológico do contato direto com o meio reacional, minimizando, assim, os efeitos de inativação ou distorção do sítio ativo, como frequentemente é observado na imobilização por ligação covalente (seção 3.1.2.2.3.2.1) (SAWANT, 2017). Além disso, esse é o método de imobilização que possui um menor grau de dificuldade de proceder e pode ser empregado para imobilizar um ou mais tipos de biorreceptores, além de não promover alterações estruturais nestes. Entretanto como desvantagens, têm-se as dificuldades associadas ao controle do tamanho dos poros do suporte, a dessorção do biorreceptor devido aos diferentes tamanhos de poros e inconvenientes de limitações de transferência de massa e difusão dos substratos pelos poros da matriz, além da possibilidade de ocorrer inativação do biorreceptor devido a muitos precursores utilizados para a polimerização (SECCHI, 2017; MALHOTRA; ALI, 2018; NERESH; LEE, 2021).

Tabela 5: Técnicas frequentemente utilizadas no método de aprisionamento físico.

Técnica	Descrição
Eletropolimerização	É um processo no qual uma corrente ou potencial é aplicado a uma solução aquosa ou eletrólito contendo tanto biomoléculas quanto moléculas de monômero. O processo de Oxirredução do monômero ocorrem na superfície do eletrodo no eletrólito, produzindo espécies radicais reativas que se unem e resultam na formação de um polímero, que retém os elementos de bioreconhecimento que estão próximos ao eletrodo no meio aquoso.

Sol-gel	Consiste em um material nanoporoso, sintetizado por hidrólise e condensação de alcóxidos metálicos. À medida que a síntese ocorre a rede cresce em função do tempo e a temperatura empregada, forma-se uma matriz 3D porosa na qual os bioelementos são encapsulados.
Microencapsulação	Baseia-se no aprisionamento de elementos de bioreconhecimento em uma membrana esférica semipermeável, por meio preferencialmente de dois métodos: i. separação de fases (coacervação) de microgotas de elementos biológicos em fases líquidas imiscíveis em água e ii. polimerização de um monômero na interface de duas substâncias imiscíveis (polimerização interfacial). Este processo resulta no obscurecimento do bioreceptor no interior da membrana polimérica.

Fonte: OLIVEIRA, 2022, adaptado de NERESH; LEE, 2021

3.1.2.2.3.2 Imobilização química (irreversível)

Esta técnica consiste na formação de ligações químicas fortes, entre grupos funcionais de elementos de bioreconhecimento e a superfície do transdutor. A técnica de imobilização química inclui os métodos que são categorizados em 3.1.2.2.3.2.1. ligação covalente, 3.1.2.2.3.2.2. Encapsulação/Confinamento 3.1.2.2.3.2.3 reticulação ou Copolimerização

3.1.2.2.3.2.1 Ligação covalente

O método de ligação covalente (Figura 7) é a técnica química mais amplamente utilizada para imobilização de receptores, na qual o elemento de bioreconhecimento

está firmemente ligado à superfície do eletrodo/transdutor ou à matriz inerte da membrana (MALHOTRA; ALI). Esse método fundamenta-se em interações químicas entre os grupos funcionais aminos (NH_2) do biorreceptor e os grupos funcionais carboxílicos (COOH), aldeídos (CHO) e hidroxilos (OH) da superfície do suporte sólido (transdutor) ou transportador (materiais nanoestruturados) por meio de ligações primarias entre grupos funcionais não ativos do elemento de reconhecimento e grupos funcionais presentes na superfície do suporte sólido (amino, imino, hidroxila, carboxila, tiol, metiltiol, guanidil, imidazol e anel fenolicos) proporcionando eficiência e estabilidade, o qual pode ser realizado por meio de quatro processos descrito na Tabela 6 (MACHADO, 2015; SAWANT, 2017; MALHOTRA; ALI, 2018; NERESH; LEE, 2021).

Esse método proporciona um aumento da estabilidade do elemento biológico, e evita perdas da biomolécula, já que a mesma encontra-se fortemente ligada ao suporte por meio dos diferentes grupos funcionais sem influência do meio por consequência de condições adversas (pH, força iônica). Entretanto, trata-se de uma técnica complexa e de alto custo que pode envolver produtos químicos agressivos/tóxicos que tornam a matriz não regenerável. Além disso, pode ocorrer prejuízo quanto a atividade biológica devido à imobilização gerada pela perda de conformação funcional do biorreceptor. (HOFFMAN; HUBBELL, 2013; SASSOLAS et al., 2012 MALHOTRA; ALI, 2018).

Tabela 6: Processos para métodos de ligação covalente.

Processo	Descrição
Diazoação	A ligação pode ocorrer entre os grupos NH_2 de suporte e os grupos tirosil ou histidil do biorreceptor
Ligação Peptídica	A ligação pode se formar entre os grupos NH_2 ou COOH do suporte e do biorreceptor.
Reagentes Polifuncionais	Para a formação de ligações covalentes entre os grupos NH_2 e o suporte, ativação de grupos COOH do suporte ou transportador por meio de reagente polifuncional (glutaraldeído (GA)).

Reagentes Multifuncionais	A ligação covalente pode ser criada pela ativação de grupos COOH em suporte sólido ou transportador que se ligará a grupos NH ₂ de proteínas por meio do reagente multifuncional (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS)).
---------------------------	--

Fonte: OLIVEIRA, 2022, adaptado de MACHADO, 2015; SAWANT, 2017; MALHOTRA; ALI, 2018.

3.1.2.2.3.2.2. Ligação cruzada

O método de imobilização por ligações cruzadas (Figura 7), consiste em uma técnica química, que promove a formação de ligações primárias (ligações covalentes) entre o elemento de biorreconhecimento ou entre elementos de bioreconhecimento e proteínas funcionalmente inertes, produzindo uma ampla rede 3D (NERESH; LEE, 2021). Nesse processo, as biomoléculas são adsorvidas na superfície do transdutor e, em seguida, são reticuladas pela utilização de reagentes poli ou multifuncionais. Esses reagentes atuam como um ligante para conectar moléculas em agregados reticulados 3D à superfície do suporte sólido ou transportador (SAWANT, 2017; NERESH; LEE, 2021). Quando condições ideais de reticulação são aplicadas (pH, temperatura, força iônica) torna esse método atrativo em razão da sua relativa simplicidade, curto tempo de resposta, maior atividade catalítica, fortes ligações químicas formadas entre as biomoléculas e a possibilidade de ajustar o ambiente para o elemento de bioreconhecimento utilizando agentes estabilizadores apropriados. Entretanto é possível ocorrer à perda de atividade biológica devido à distorção na conformação da biomolécula, em consequência de alterações químicas no sítio ativo causadas pelas ligações cruzadas (SASSOLAS et al., 2012; NERESH; LEE, 2021).

3.1.2.2.3.2.2 Reticulação ou copolimerização

O método de reticulação também denominado copolimerização (Figura 7) consiste em uma técnica química que não há matriz ou suporte envolvido, na qual as

moléculas bioreceptoras acoplam-se entre si por ligações intermoleculares, produzindo uma ampla rede 3D (MALHOTRA; ALI, 2018). Esta técnica envolve a formação de ligações covalentes entre o componente biológico e o biomarcador, utilizando reagentes poli ou multifuncionais (SAWANT, 2017; MALHOTRA; ALI, 2018). É uma abordagem atrativa devido sua atividade ser altamente concentrada no catalisador, alta estabilidade química alcançada pelas moléculas e baixo custo de produção decorrente da exclusão de um suporte sólido, sendo assim um método amplamente utilizado para preparações comerciais e aplicações industriais. Todavia possui a possibilidade de perda da atividade em razão de distorções na conformação do biorreceptor durante a formação das reticulações (MACHADO, 2015; MALHOTRA; ALI, 2018).

4 Metodologia

4.1 Preparação do Biossensor

4.1.1 Síntese dos transdutores da plataforma DoC

Os eletrodos de grafeno induzido a laser (LIG) foram produzidos pelo método descrito direta a laser (DLW) em uma máquina de gravação a laser de CO₂ (Visutec Router Laser VS3020) em folhas políimida (PI) Kapton, Dupont) previamente fixadas em substratos fino de poliéster transparente, com dimensões de 216x330 mm e espessura de 100 microns, lavado com álcool isopropílico (C₃H₈O, Synth). Os transdutores da plataforma DoC de biossensoriamento, foram fabricados na configuração de três eletrodos, com base em um padrão projetado no software de imagem vetorial Inkscape, em condições ambientais, conforme ilustrado na Figura 8 item 1.

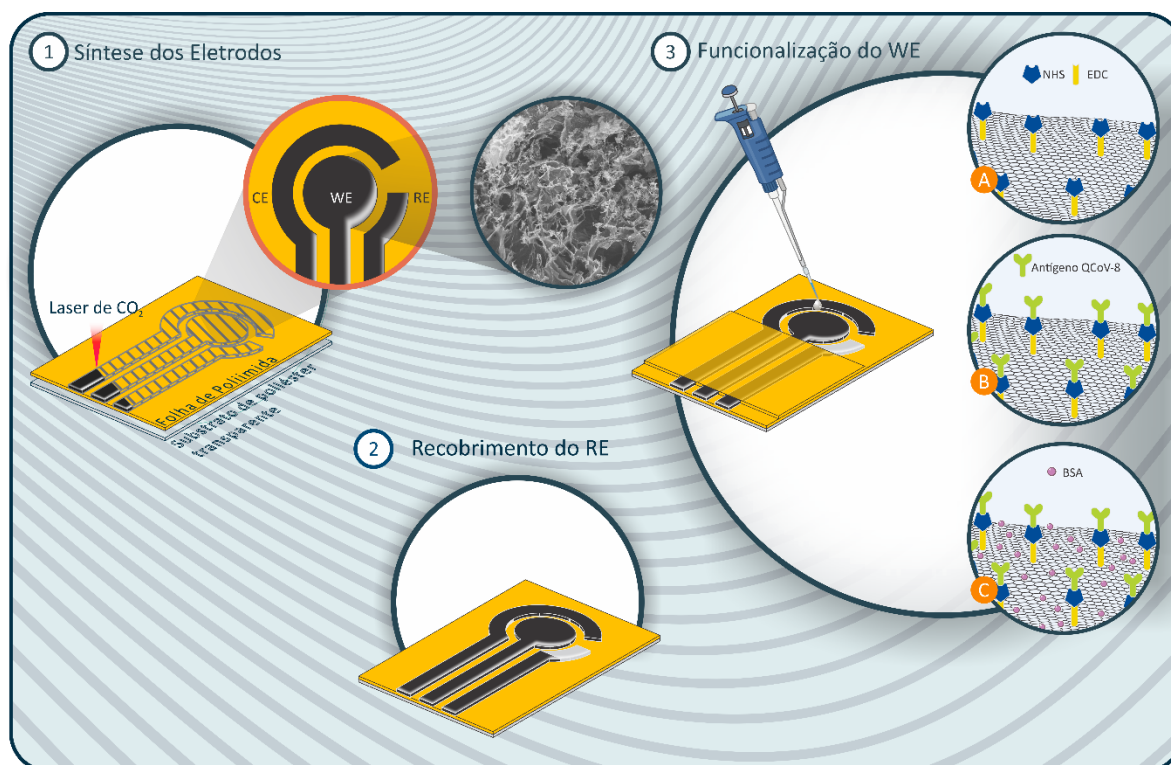


Figura 8: Ilustração do processo de produção da plataforma DoC usando filme polimérico de PI.

Fonte: OLIVEIRA, 2022 adaptado de OLIVEIRA et al., 2022.

A resistência do LIG tem impacto direto na taxa de transferência de carga do transdutor e, conseqüentemente, na sensibilidade do biossensor. A priori, a intensidade da potência do laser foi otimizada e ajustada em 3,9 W e a distância entre

o feixe do laser e o substrato ajustada em 51 mm, com base em estudos anteriores desenvolvido pelo grupo de pesquisa Novonano (HAWES et al., 2019; MARON, 2021). Os eletrodos possuem uma resistência média (R_s) de $12 \Omega \cdot \text{sq}^{-1}$ quando produzidos para uso como plataforma de detecção.

Para evitar o transbordamento do eletrólito, a área de ação dos sensores é delimitada com o uso de fita Kapton e ao final do processo, são obtidos os três eletrodos (Figura 9): WE (área delimitada de $7,07 \text{ mm}^2$), RE (área de $6,00 \text{ mm}^2$) e CE (área de $15,60 \text{ mm}^2$). Este último não necessita de nenhum processo complementar de modificação, permanecendo em LIG, enquanto os demais passam por outros processos de otimização para o uso adequado de cada um.

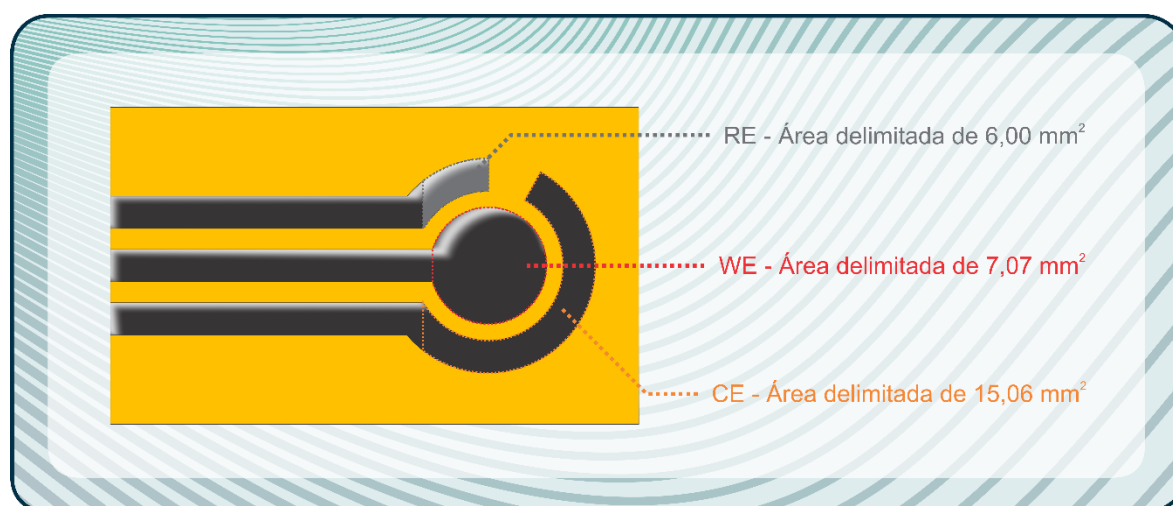


Figura 9: Ilustração detalhada das dimensões do sistema de três eletrodos contidos na plataforma DoC produzidos utilizando filme polimérico de PI.

Fonte: OLIVEIRA, 2022.

4.1.2 Modificação do eletrodo de referência da plataforma DoC

O eletrodo de referência passa por um processo de modificação para fornecer um potencial elétrico fixo e definido, garantindo a aquisição correta dos dados do eletrodo de trabalho durante a análise. O processo é baseado na cobertura de uma área de $6,00 \text{ mm}^2$ do eletrodo com uma tinta especial de cloreto de prata (Ag / AgCl) (ALS N°.011464, distribuída pela BAS Inc. Tokyo Japão), como ilustrado na Figura 8 item 2, estabelecendo um equilíbrio dinâmico, formando o sistema de pseudo-referência (PR).

4.1.3 Biofuncionalização do eletrodo de trabalho da plataforma DoC

A biofuncionalização do WE é realizada visando a obtenção de um imunoeletrodo sem marcação (Figura 8 item 3). 5,0 μL de uma solução contendo 0,5 mmol.mL^{-1} de NHS (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 0,25 mmol.mL^{-1} de EDC (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) dissolvida em solução tampão fosfato-salino 1X (PBS 1X, 0,1 mol.L^{-1} em pH 7,4) são depositados no eletrodo pelo método *drop casting*, o qual é deixado em repouso por 5 horas a uma temperatura de 4 °C. Posteriormente, 5,0 μL de uma solução contendo o antígeno quimérico QCOV-8 (concentração variando de 20 a 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) dissolvido em solução PBS 1X, 0,1 mol.L^{-1} em pH 7,4 e depositada pelo método *drop casting* no eletrodo e este é deixado em repouso por 12 horas para secagem a uma temperatura de 4 °C. Posteriormente, o eletrodo foi lavado com a solução PBS 1X, 0,1 mol.L^{-1} em pH 7,4 para remover as espécies bioativas não reagidas e 5,0 μL de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) com uma concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em solução PBS 1X, 0,1 mol.L^{-1} em pH 7,4 depositada na superfície do imunoeletrodo para bloquear grupos funcionais disponíveis. Após 4 horas a uma temperatura de 4 °C, o imunoeletrodo foi lavado novamente com a solução PBS 1X, 0,1 mol.L^{-1} em pH 7,4.

4.2 Detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 em soros humanos reais

Quinze amostras clínicas de soro sanguíneo (sete reativas e oito não-reativas para SARS-CoV-2) foram obtidas no Departamento de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e aprovadas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) IRB nº 242/63 com parecer nº 4.043.628. Todas as amostras de soro sanguíneo foram confirmadas clinicamente com a proteína QCOV-8 por um kit de teste ELISA, com especificidade de 98%, para avaliar anticorpos IgA, IgM e IgG (sob o número de registro de depósito de patente BR1020210020105, para uso de utilidade) e por testes de qRT-PCR.

4.3 Técnicas de Caracterizações

Os biossensores DoC desenvolvido foram avaliados e caracterizados quimicamente, estruturalmente, morfologicamente e eletroquimicamente, na qual partes dessas caracterizações foram realizadas nas facilidades do laboratório pertencente ao grupo de pesquisa em Tecnologias Aplicadas em Materiais Avançados Novonano (eletroquimicamente) e parte em laboratórios da Central multiusuário da UFABC por meio do grupo de pesquisa LMAND (quimicamente, estruturalmente e morfologicamente). As caracterizações dos materiais prospectados foram realizadas de acordo com descrição abaixo:

4.3.1 Caracterizações morfológicas e estruturais

4.3.1.1 Espectroscopia RAMAN

A espectroscopia RAMAN foi utilizada para fornecer informações referente a estrutura eletrônica e vibracional da amostra de LIG. Informações sobre as relações das intensidades das bandas I_D/I_G e I_{2D}/I_G também foram calculadas e forneceram informações sobre o grau de grafitização e quantidade de defeitos presentes na amostra. Os espectros Raman do LIG foram obtidos fazendo-se uso de um espectrômetro Raman triplo T64000 Horiba Jobin-Yvon. O laser de excitação utilizado foi o Verdi G5 Laser (Coherent Inc., Santa Clara, California, USA) operando a 532 nm (verde) com potência de 2 mW em objetiva de 50x.

4.3.1.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi realizada para obter informações quanto a identificar os grupos funcionais e as fases presentes na amostra de LIG. O espectro foi registrado usando um modo de reflexão especular em um espectrômetro 640-IR Varian, com resolução de 4 cm^{-1} e uma média de 60 varreduras. As medições foram realizadas na superfície das amostras na faixa de 500 a 4000 cm^{-1} .

4.3.1.3 Espectroscopia de difração de raios X (DRX)

A análise da composição das fases cristalinas da superfície da amostra de LIG foi realizada por meio da técnica de DRX pelo método de pó utilizando a radiação $\text{CuK}\alpha$, permitindo obter informações a respeito do ordenamento atômico do material à longa distância, comprovando a eficiência da confecção dos eletrodos. O difratograma foi adquirido em um difratômetro D8 Focus da Bruker AXS, com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) 30kV e 30 mA, faixa angular de 15 a 75°, passo angular de 0,02° e tempo de exposição de 0,5 s/ passo.

4.3.1.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)

A análise de composição química elementar da superfície da amostra de LIG foi realizada por meio da análise de XPS usando um espectrômetro de fóton excitado por raios X convencional (ScientaOmicron ESCA +) com um analisador hemisférico de alto desempenho (EAC2000) com $\text{Al K}\alpha$ monocromático ($h\nu = 1486,6 \text{ eV}$) como fonte de excitação. A pressão operacional na câmara de ultra-alto vácuo (UHV) durante a análise foi de 10^{-9} Pa . Os espectros de alta resolução foram adquiridos com uma energia de passagem constante de 20 eV e 0,05 eV por etapa. As energias de ligação foram aferidas em circovizinhaça do pico C 1s em 284,8 eV. A quantificação do pico foi realizada utilizando a função Voigt (70% Gaussiana e 30% Lorentziana) por meio do software Casa XPS.

4.3.1.5 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FESEM)

As características morfológicas do LIG foram examinadas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FESEM JMS-6701F, JEOL) para observar caraterísticas morfológicas da amostra de LIG, bem como homogeneidade e existência de defeitos microscópicos.

Também analisar qualitativamente a composição química da amostra por meio da microscopia eletrônica de varredura convencional (JSM-610LA, JEOL) equipado com espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS).

4.3.2 Caracterizações eletroquímicas

Para avaliar o processo de funcionalização do imunossensor descrito na seção 4.1, os biossensores foram caracterizados eletroquimicamente para quantificar o fluxo de corrente elétrica do biossensor na presença do par redox de ferricianeto de potássio de fórmula química $K_3[Fe(CN)_6]$ em uma concentração de 5 mmol.L^{-1} . O comportamento eletroquímico intrínseco do imunossensor foi avaliado por voltametria de pulso diferencial (DPV) utilizando uma faixa de potencial entre -0,3 e 0,35 V, com taxa de varredura de 6 mV.s^{-1} e pulso de 0,19 V.

Os imunossensores também foram caracterizados eletroquimicamente para identificar e quantificar o fluxo de corrente elétrica do biossensor na sonda de $K_3[Fe(CN)_6]$ em PBS 1X, $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em pH 7,4 na presença e ausência de anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2. Para isso, foram utilizados 100 μL de uma solução contendo 90% de solução sonda de $5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ $K_3[Fe(CN)_6]$ - que possui um par mediador redox - e 10% de soro sanguíneo humano. O comportamento eletroquímico intrínseco foi avaliado por voltametria de pulso diferencial (DPV) utilizando uma faixa de potencial entre -0,3 e 0,35 V, com taxa de varredura de 6 mV.s^{-1} e pulso de 0,19 V. Todos os experimentos eletroquímicos foram realizados em um potenciostato / galvanostato Metrohm AUTOLAB - PGSTAT 302N, à temperatura ambiente (25°C).

4.4 Testes do Protótipo

4.4.1 Protótipo da plataforma *point-of-care* para determinação de imunoglobulinas anti-SARS-COV-2

O Biossensor desenvolvido na presente proposta destinado ao diagnóstico da COVID-19 por meio da determinação de imunoglobulinas específicas anti-SARS-

COV-2, na qual visa a aplicação PoCT em formato de DoC composto por um sistema de três eletrodos flexível descartável contendo os RE, WE e CE em uma única célula (descrito no item 4.1), foi acoplado em uma portátil plataforma microcontrolada que realiza análise eletroquímica por meio de voltametria cíclica (CV), com potenciais de -0,2 à 0,65 V e taxa de varredura de 20 mV.s^{-1} o qual é conectado a um dispositivo móvel com tempo estimado de processamento de análise de 3 min. (mais informações Anexo A). Esse sistema condiciona o sinal de corrente elétrica responsivo do eletrodo (WE) convertendo-o em um sinal de tensão elétrica, o sinal passa por processos de amplificação, filtragem e amostragem do sinal para um formato digital adquirindo dados por um computador. Isso possibilita que quando o biossensor é posto em contato com a amostra de soro sanguíneo humano, é excitado por CV, o próprio responde a estímulos causado por tal biofluido disponibilizando um sinal capaz de responder a estímulos causados por tal fluido disponibilizando um sinal característico e representativo das respostas apresentadas pelo elemento químico convertido por meio do processo de oxidação. A Figura 10 apresenta um diagrama em bloco ilustrativo que representa o dispositivo proposto supracitado.

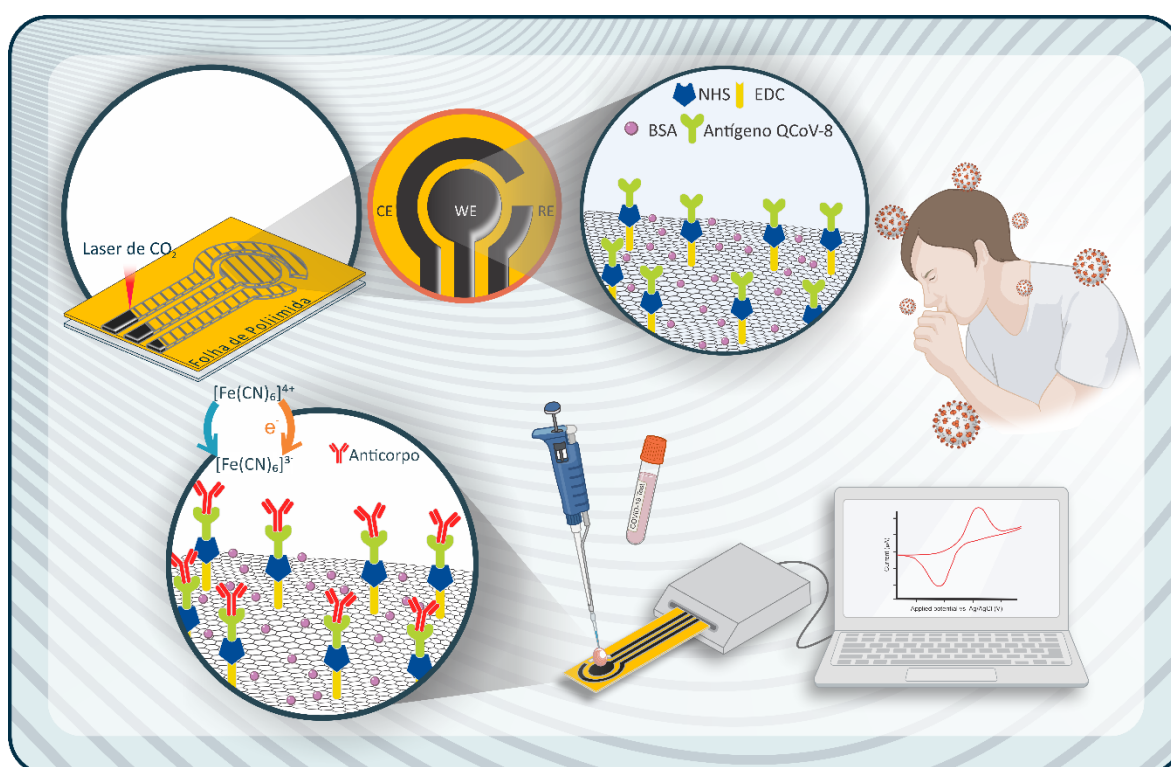


Figura 10: Plataforma Doc desenvolvida acoplada ao potenciostato portátil microcontrolado para PoCT aplicado a determinação de anticorpos biomarcadores da COVID-19.

Fonte: OLIVEIRA, 2022 adaptado de OLIVEIRA et al.2022.

5 Resultados e discussão

5.1 Caracterização morfológica e estrutural

A espectroscopia Raman foi realizada para estudar as características estruturais do LIG e o resultado é exibido na Figura 11. As duas bandas típicas de estruturas baseadas em carbono podem ser observadas próximas a 1349 cm^{-1} e 1583 cm^{-1} , que são atribuídas à banda D e banda G, respectivamente. A banda D está relacionada a defeitos estruturais (que ocorre através da conversão de carbono hibridizado sp^3 em carbono hibridizado sp^2) e as inúmeras bordas de grafeno devido ao processo DLW, enquanto a banda G corresponde à vibração de espalhamento de primeira ordem de carbono hibridizado sp^2 , o que resulta em uma área superficial mais acessível e o que é atribuído ao esclarecimento do desempenho eletroquímico apresentado pelo biossensor (LIN et al., 2014; SONG et al., 2018). Ademais, o espectro apresenta uma banda 2D observada próximo de 2.704 cm^{-1} , que corresponde à segunda ordem da banda D resultante de dois processos de vibração da rede do fônon (FERRARI et al., 2006). A presença dessas bandas confirma a conversão do polímero PI em LIG (LIN et al., 2014; TEHRANI; BAVARIAN, 2016). Além disso, a amostra LIG, apresentou uma relação I_D/I_G em torno de 0,88 indicando a geração de defeitos provenientes do processo de sua síntese. Ademais, a razão I_{2D}/I_G da amostra LIG calculada exibiu um valor de 0,18 que sugere que o material é composto por uma estrutura multicamada de grafeno, corroborando com o que foi observado no resultado da FESEM (DOSI et al., 2019; TESING, et al., 2019; VIVALDI et al., 2021).

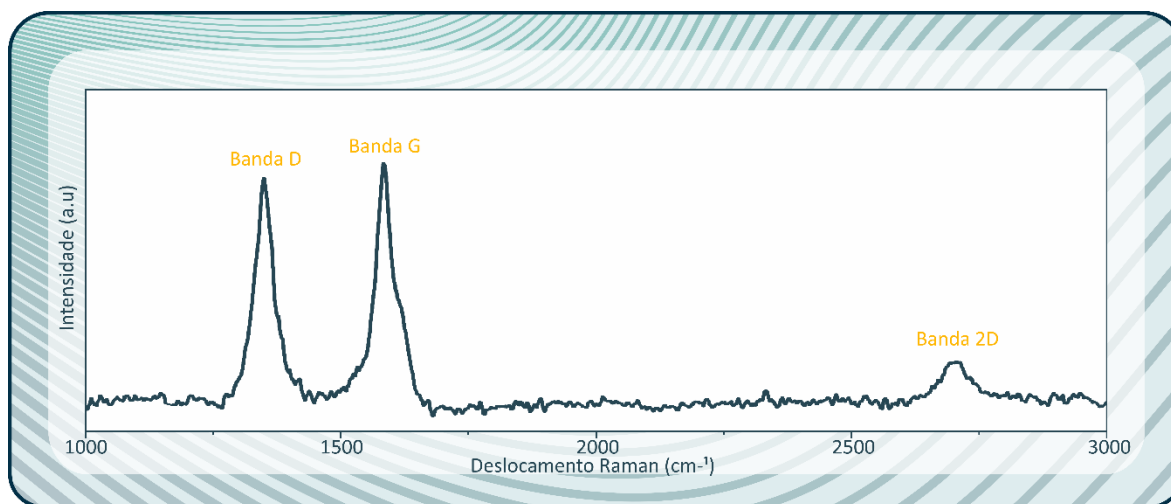


Figura 11: Espectro Raman da amostra de LIG obtido por meio do método de DLW de CO₂.

Fonte: OLIVEIRA, 2022 adaptado de OLIVEIRA et al.2022.

Para investigar e identificar os grupos funcionais na superfície da amostra de LIG, a análise de FTIR foi realizada e o resultado é exibido na Figura 12. Os modos vibracionais presentes na amostra de LIG no espectro de absorção registrado na faixa de 500 a 4000 cm⁻¹ revelam os modos vibracionais, os quais podem ser atribuídos ao filme polimérico PI, com as bandas em aproximadamente 868 cm⁻¹ (ligação C-H aromática); em 1282 cm⁻¹ (C-O-C), em 1400 cm⁻¹ (imida C-N); em 1520 cm⁻¹ (C-C aromático); em 1736 e 1765 cm⁻¹ (carbonila); e em 2963 cm⁻¹ (modo de vibração C-H) (PLIS et al., 2017; WANG et al., 2018; MARON, 2021).

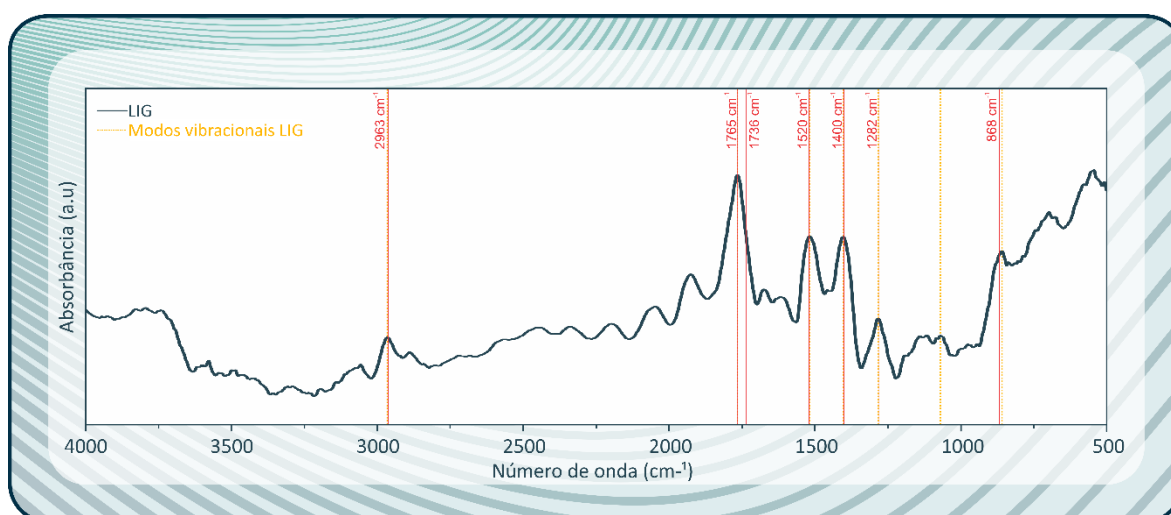


Figura 12: Espectros FTIR da amostra de grafeno induzido a laser formada pela técnica LIG.

Fonte: OLIVEIRA, 2022.

A análise de DRX foi realizada a fim de investigar a formação de fases na superfície da amostra LIG, o resultado é exibido na Figura 13. O padrão do difratograma de raios X, apresenta pico proeminente em $2\theta = 25,8^\circ$ de (002) planos com espaçamento entre camadas de $\sim 3,44 \text{ \AA}$, o que indica o alto grau de grafitização. Todavia, é possível observar um ombro no pico intenso de plano 002 que é proveniente do porta-amostra em que foi realizada a análise. Ademais, o pico a $44,1^\circ$ está relacionado ao plano (100) que é atribuído a reflexão da estrutura do LIG (TEHRANI, BAVARIAN, 2016).

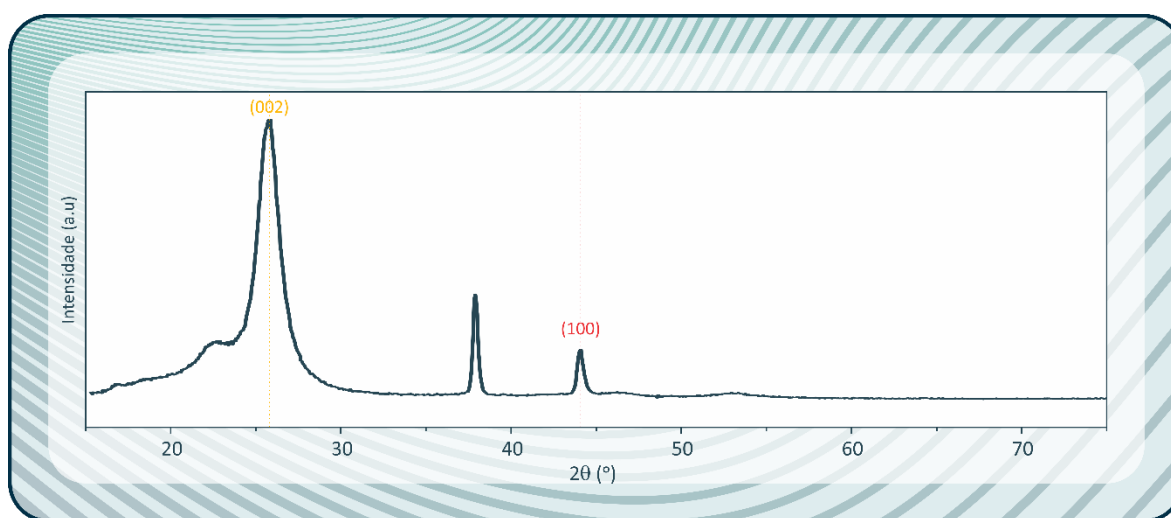


Figura 13: Espectro de difração de raios X da amostra de LIG formada pela técnica DLW.

Fonte: OLIVEIRA, 2022.

Para compreender melhor a composição química da amostra, foi procedida a análise de XPS e a Figura 14 mostra os resultados. De acordo com o espectro XPS, a amostra de LIG é constituída por C, O e N. O espectro XPS de alta resolução do elemento C 1S (Figura 14b) possui cinco componentes que foram indexadas as ligações C–C (284,8 eV), C–N, (285,5 eV), C–O, C=N (286,2 eV), C–O–C (286,9 eV) e C=O (287,8 eV), possibilitando constatar dominância do pico C–C enquanto os demais picos são suprimidos sugerindo que a amostra de LIG obtida por meio do método DLW possui predominantemente carbonos sp^2 , proveniente do processo denominado grafitização em que os átomos de carbono sp^3 são convertidos para sp^2 quando ocorre a quebra das ligações C–O, C=O e C–N em decorrência do efeito do processo fototérmico leva à recombinação da ligação C–C, convergindo com os resultados de Raman, FTIR e XRD (LIN et al, 2014; TEHRANI; BAVARIAN, 2016; VIVALDI et al., 2021; WANG et al., 2022).

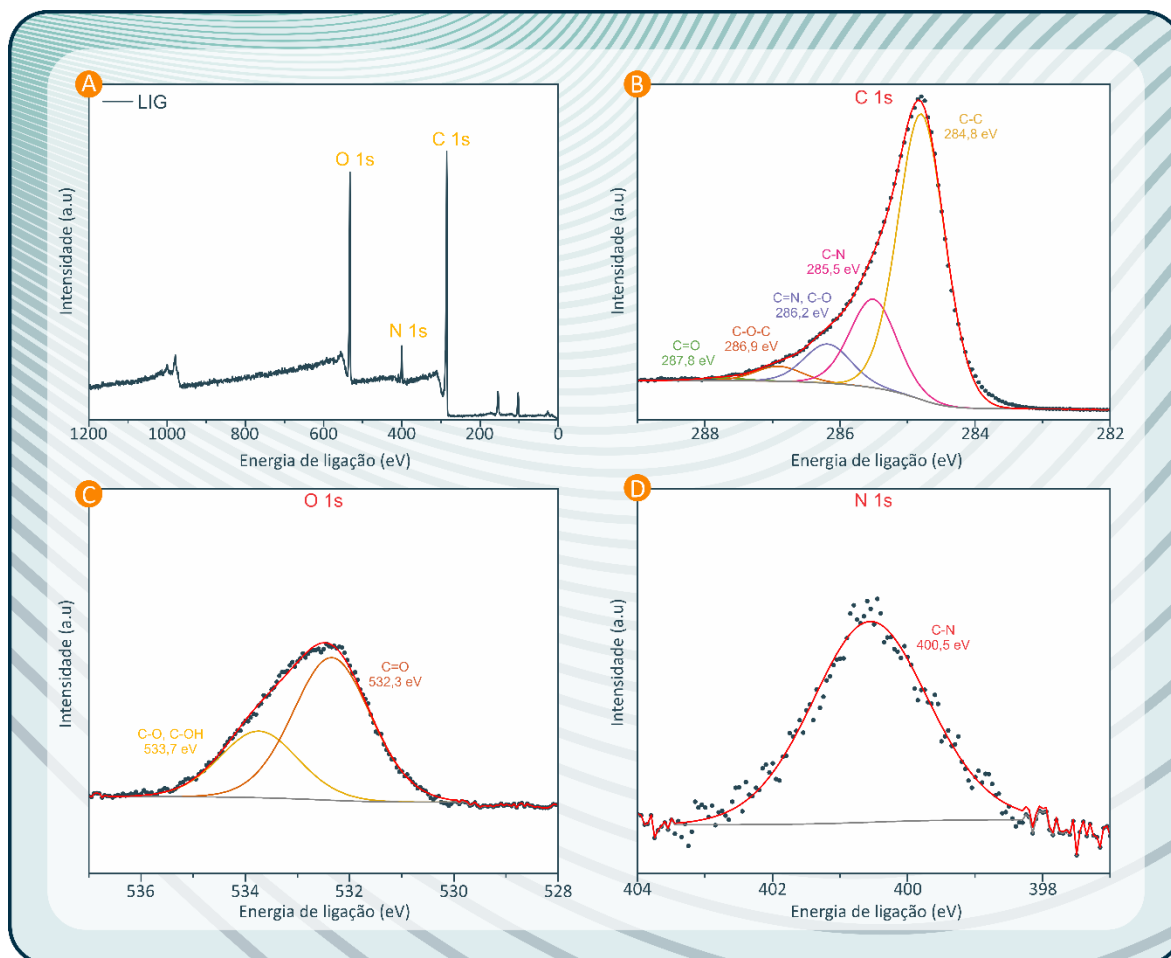


Figura 14: (a) Espectros XPS da amostra LIG; (b) Espectro XPS de alta resolução C 1S da amostra LIG; (c) O 1s e (d) N 2s.

Fonte: OLIVEIRA, 2022.

A morfologia e microestrutura da amostra de LIG foram examinadas via FESEM, e as micrografias são exibidas na Figura 15a. A imagem FESEM da amostra LIG (Figura 15a) exibe claramente a existência de uma estrutura porosa altamente interconectada contendo nanofolhas tridimensionais de grafeno, característica relatada como ideal para fornecer caminhos de transporte de elétrons através dos eletrodos, o que resulta na melhoria da difusão de carga e aumenta sua área de superfície ativa oferecendo um fácil acesso aos íons do eletrólito para difundir através de toda a nanofolha, que está associado o desempenho eletroquímico de dispositivos, tornando-se uma plataforma ideal para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos (LIN et al., 2014; TEHRANI; BAVARIAN, 2016). Este

resultado é confirmado pela análise de mapeamento químico elementar realizado por espectroscopia de dispersão de energia (EDS) apresentada na Figura 15b. Os resultados de EDS revelam a presença de elementos C e O, o qual o elemento C é dominante da razão de peso de cada elemento na amostra, confirmando a eficácia do processo de aquisição de LIG por meio do método DLW.

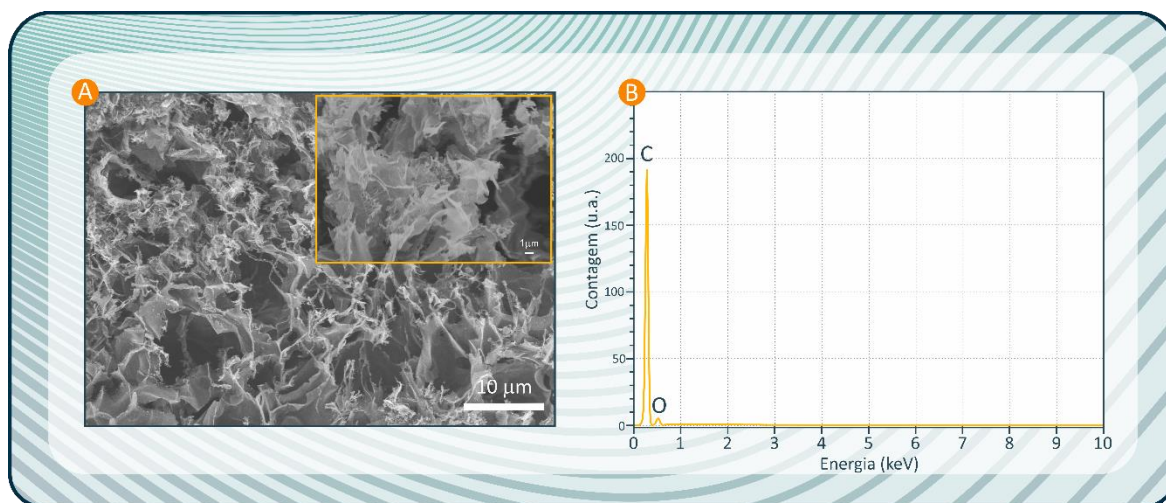


Figura 15: (a) Imagens de microscopia eletrônica de varredura exibindo a morfologia de superfície das amostras de LIG. (b) Mapeamento químico elementar (EDS) da amostra de LIG confirmando a presença dos elementos químicos C e O.

Fonte: OLIVEIRA, 2022 adaptado de OLIVEIRA et al.2022.

5.2 Caracterização eletroquímica

5.2.1 Caracterização eletroquímica do biossensor no decorrer das etapas biofuncionalização

Para avaliar eletroquimicamente o biossensor desenvolvido, após cada etapa do processo de biofuncionalização do eletrodo de trabalho (WE), realizou-se a caracterização por meio da técnica de voltametria de pulso diferencia (DPV), e os resultados são apresentados na Figura 16. Observa-se que a corrente aumenta e, posteriormente, diminui conforme a sequência do processo de biofuncionalização é realizada. O transdutor de material LIG possui uma grande difusão de carga devido aos seus inúmeros canais de transporte iônico, bem como uma alta área de superfície ativa, o que proporciona uma boa interação com o eletrólito, resultando em boa resposta eletroquímica (LIN et al., 2014; YANG et al., 2020; TORRENT-RODRIGUEZ et al., 2020). A utilização de reagente multifuncionais EDC e NHS visa auxiliar o processo de acoplamento de ligações químicas entre antígenos e grupos funcionais

do LIG através da imobilização de biomoléculas com ligações covalentes, otimizando a sensibilidade do biossensor e aumentando a corrente de oxidação. Esses compostos ativam os grupos carboxila ($-\text{COOH}$) por reação direta com aminas primárias ($-\text{NH}_2$) através da formação de ligações amida que potencializam a conjugação covalente entre a proteína QCoV-8 específica do vírus SARS-CoV-2 (antígeno) e o substrato LIG, o que promove uma diminuição da corrente devido à interação entre antígeno e reagente de acoplamento (HERMANSON, 2013; LIU et al., 2018; ALI et al., 2021). Todavia, alguns sítios ativos permanecem disponíveis, o que pode reduzir a estabilidade do imunossensor durante a determinação do analito, tornando necessário o uso de um reagente bloqueador. O uso de BSA como reagente bloqueador converteu os sítios disponíveis para conexões em sítios inespecíficos, diminuindo a corrente e proporcionando estabilização, uma vez que a possibilidade da ocorrência de reações cruzadas no sistema foi bloqueada (ALI et al., 2021). Esse processo aumenta a especificidade e a estabilidade do imunoeletrodo, semelhante ao descrito por Yakho et al. (2020) e Torrente-Rodrigues et al. (2020), que relataram o uso de agentes de acoplamento e bloqueio para produzir biossensores eletroquímicos (LIU et al., 2018; YAKHO et al, 2021).

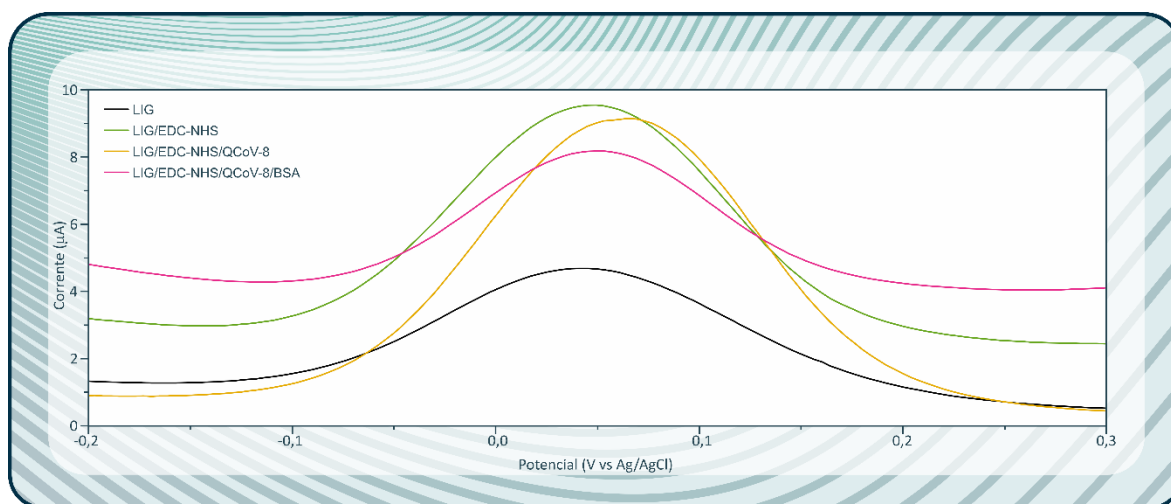


Figura 16: DPV com a plataforma DoC acoplada ao potenciostato comercial na presença de par redox $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ avaliando as etapas de funcionalização do imunossensor.

Fonte: OLIVEIRA, 2022 adaptado de OLIVEIRA et al.2022.

5.2.2 Caracterização eletroquímica do biossensor em amostras de biofluido utilizando potenciostato comercial

Para avaliar eletroquimicamente o biossensor desenvolvido realizou-se a caracterização por meio da técnica de DPV avaliando imunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 em amostras clínicas de soro sanguíneo humano reativo e não-reativo para COVID-19 e os resultados são apresentados na Figura 17. As curvas DPV de amostras de soro sanguíneo reativo e não-reativo para anticorpos COVID-19 exibem um pico de oxidação em torno de 0,08 V. No entanto, pode-se observar claramente que a corrente produzida durante a oxidação é maior para as amostras reativas (Tabela 7), devido à presença de aminoácidos aromáticos de anticorpos anti-SARS-CoV-2 reagindo com o par redox $K_3[Fe(CN)_6]$, que são compostos organometálicos de ferro comumente utilizados como mediador para oxidar aminoácidos com compostos aromáticos localizados na estrutura tridimensional de anticorpos. Portanto, isso pode causar uma perturbação no sistema, com a transferência de carga que ocorre no momento da interação em que um complexo antígeno-anticorpo é formado, que é tipicamente sustentado por ligações de hidrogênio e forças eletrodinâmicas hidrofóbicas (FARIA et al., 2019; MARTÍNEZ-FLETA et al., 2020; CASTRO et al., 2020). Da mesma forma, Torrente-Rodríguez et al. (2020) descreveram um imunossensor baseado em grafeno para identificação de anticorpos COVID-19 por meio de medidas de DPV, apresentando um comportamento semelhante, com picos de corrente mais altos para amostras contendo anticorpos SARS-CoV-2. Este comportamento pode estar correlacionado com a adsorção e interação de grupos funcionais amina e hidroxila de glicoproteínas com interação de grupos funcionais hidroxila à base de hidrogênio ligáveis e hidrogênio ativados por NHS na superfície do eletrodo. Esses resultados concordam com o mecanismo eletroquímico apresentado por Hashemi et al. (2021), que relatou a detecção de glicoproteína viral ultrasensível NanoSystem para triagem precisa de anticorpos SARS-CoV-2 em meios biológicos / não biológicos. Nesse trabalho, o mecanismo de detecção ocorre pela ativação de ligações de hidrogênio em pH fisiológico utilizando NHS, que fornece grupos funcionais hidroxila mais reativos, resultando em maior interação eletrostática entre a hidroxila e a amina das glicoproteínas com as do antígeno QCoV-8 previamente depositado na superfície do eletrodo.

Tabela 7: Resumo de todos os dados relevantes de amostras clínicas reativas e não-reativas de soro sanguíneo humano para COVID-19 de acordo com os testes ELISA, qRT-PCR e o biossensor eletroquímico desenvolvido.

Código amostras	Condições	Diagnóstico ELISA-ECLIA			qRT-PCR Diagnostico	IP ² (mA)
		(DO ¹ / resultados)				
		IgG	IgM	IgA		
NR302	Pré-pandemia	> 0.3 (NR)	> 0.2 (NR)	> 0.2 (NR)	-	8.3390
NR303	Pré-pandemia	> 0.7 (NR)	> 0.5 (NR)	> 0.2 (NR)	-	7.6060
NR324	Pré-pandemia	> 0.2 (NR)	> 0.2 (NR)	< 0.1 (NR)	-	9.0160
NR 327	Pré-pandemia	> 1.0 (FP)	< 0.5 (NR)	>1.0 (FP)	-	8.4171
NR 328	Pré-pandemia	> 2.0 (FP)	< 0.5 (NR)	< 0.1 (NR)	-	8.5651
NR 336	Pré-pandemia	> 1.0 (FP)	< 0.5 (NR)	< 0.1 (NR)	-	7.3086
NR 394	Pré-pandemia	< 0.1 (NR)	< 0.5 (NR)	< 0.1 (NR)	-	7.2891
R 106	Assintomático	> 2.4 (R)	-	-	Positivo	9.4739
R 109	Assintomático	> 2.8 (R)	-	-	Positivo	9.8447
R907B	Hospitalizado	> 2.9 (R)	1.9 (R)	> 3.5 (R)	Positivo	10.0650
R908B	Hospitalizado	> 2.0 (R)	1.8 (R)	> 2.9 (R)	Positivo	10.0300
R909	Hospitalizado	> 2.9 (R)	> 0.6 (FN)	> 1.4 (R)	Positivo	9.2733
R 911	Hospitalizado	> 3.5 (R)	> 3.0 (R)	> 3.5 (R)	Positivo	9.8346
R 123	Assintomático	> 3.1 (R)	-	-	Positivo	9.6368
R1039	Sintomas leves	> 3.5 (R)	> 1.7 (R)	> 2.9 (R)	positivo	9.3750

Nota: FP: falso positivo; NR: não reativo; R: reativo; ¹Densidade óptica; ²Pico de corrente.

Fonte: OLIVEIRA, 2022 adaptado de OLIVEIRA et al.2022.

As propriedades eletroquímicas dos imunossensores são diretamente dependentes de inúmeros fatores. Dentre eles, um dos mais importantes é a quantidade de elemento de reconhecimento biológico ancorado na superfície do eletrodo, pois em um determinado potencial promoverá a interação com o biomarcador, promovendo um aumento ou diminuição da corrente. Layqah e Eissa (2019) desenvolveram um biossensor para detectar MERS-CoV fazendo-se uso de soluções de anticorpos variando em uma faixa de concentração de 0,5 a 60 µg.mL⁻¹; Torrente-Rodriguez et al. (2020) produziram sensores baseados em LIG para identificar anticorpos COVID-19 adicionando a concentração de 250 µg.mL⁻¹ de antígeno específico. Com base nesses dados, para investigar a resposta dos

imunossensores para determinação de biomarcadores da COVID-19 sob diferentes concentrações de antígeno específico, medidas de DPV em eletrodos contendo 10 μL de concentrações de 20, 200 e 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de soluções de antígeno QCoV-8 foram submetidos a análises em amostras clínicas reativas e não-reativas, e a Figura 17b exibe os resultados obtidos. É perceptível que o aumento da concentração do antígeno aumenta significativamente a intensidade dos picos de DPV para amostras clínicas reativas, mantendo resposta semelhante para amostras não-reativas. Além disso, pode-se observar que para as menores concentrações de antígeno, não há diferença significativa nas curvas de DPV entre amostras clínicas reativas e não-reativas. Assim, amostras produzidas com concentração de 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de antígeno específico para SARS-CoV-2 foram selecionadas para outros testes eletroquímicos.

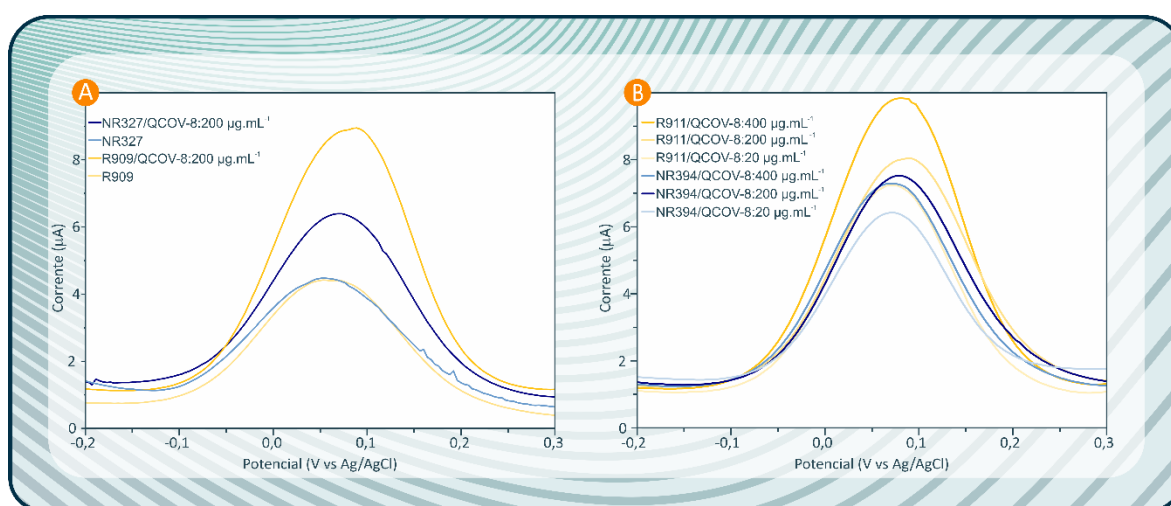


Figura 17: Análises DPV com a plataforma DoC acoplada ao potenciostato comercial em sonda de $(\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6])$. (a) Análises em amostras clínicas reativas (R) e não reativas (NR) contendo 10 μL de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de solução de antígeno QCoV-8. (b) Análises contendo 10 μL de 100,200 3 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de solução de antígeno QCoV-8, onde R representa amostras clínicas reativas e NR representa amostras clínicas não reativa.

Fonte: OLIVEIRA, 2022 adaptado de OLIVEIRA et al.2022.

Após selecionar os melhores parâmetros para produzir os imunossensores para determinar imunoglobulinas anti-SARS-CoV-2, diferentes amostras clínicas reativas e não-reativas de soro sanguíneo humano foram analisadas. Todas as amostras foram previamente submetidas a análise por testes ELISA e qRT-PCR, conforme descrito na Tabela 7. Mediante a Figura 18a é possível constatar que todas as amostras reativas exibiram picos de corrente mais elevados do que os soros sanguíneos não-reativo, o que está diretamente relacionado à existência de

reatividade ao antígeno Q-CoV-8 com os anticorpos anti-SARS-CoV-2 presentes nas amostras clínicas. Embora a reatividade do teste ELISA com imunossensores eletroquímicos não tenha apresentado relação linear com o aumento do pico de corrente, esses resultados sugerem que o imunossensor eletroquímico é capaz de diferenciar as amostras clínicas reativas das não-reativas. Ademais, foi obtida uma boa reprodutibilidade para os testes realizados em triplicata, conforme mostrado na Figura 18b, principalmente para as amostras clínicas reativas com anticorpos anti-SARS-CoV-2. A plataforma DoC, acoplada ao potenciostato comercial, apresentou desempenho similar com os testes atualmente aprovados pelas agências reguladoras quanto ao tempo estimado de processamento de análise, o qual é de 3 min. (CARTER et al., 2020; MARDIAN et al., 2021). A Figura 18b apresenta os valores médios de corrente para testes realizados em amostras clínicas reativas e não-reativas, atingindo 9,53 μA (desvio padrão de 0,32) e 7,96 μA (desvio padrão de 0,84).

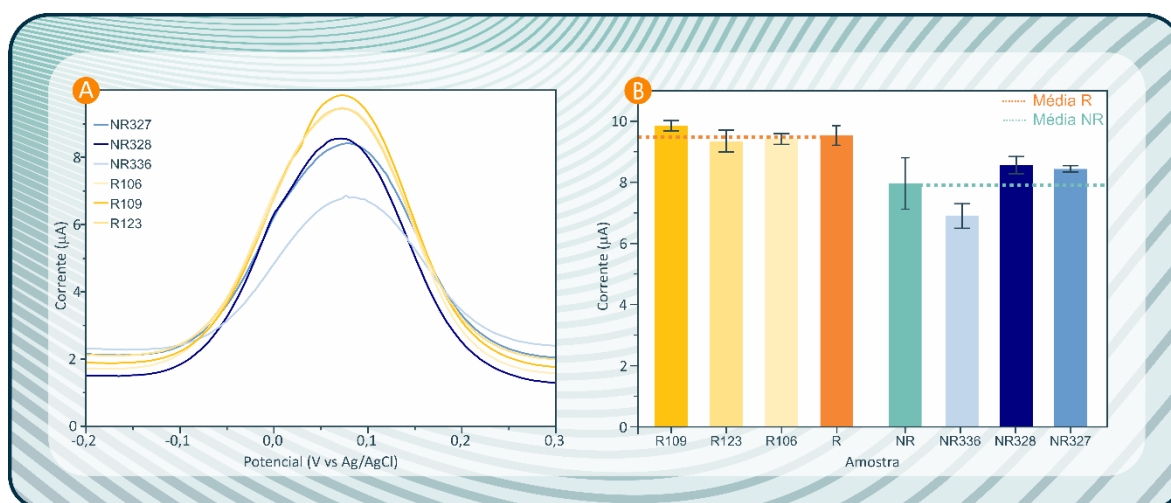


Figura 18: Análises de amostra de soro sanguíneo humano reativo (R) e não-reativo (RN) para SARS-CoV-2 utilizando DPV com a plataforma de DoC acoplada a um potenciostato comercial (a), na faixa de potencial $-0,2$ e $0,3$ V, com taxa de varredura de $6 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ a $0,19$ V; (b) Análise em triplicata de amostras clínicas de soro sanguíneo humano, onde o pico de corrente foi analisado com suas respectivas médias finais (Tabela 7).

Fonte: OLIVEIRA, 2022 adaptado de OLIVEIRA et al.2022.

Para avaliar estatisticamente os dados das amostras reativas e não reativas, observado nas análises descritivas apresentadas na Figuras 18b, o valor máximo do intervalo de confiança do grupo não reativo é menor que o valor mínimo do intervalo de confiança do grupo reagente, indicando diferenças evidentes nos dados amostrados. Para confirmar as diferenças estatísticas entre amostras reativas e não-reativas, foi realizada a análise do teste t de Student, avaliando o valor de p. Para um

teste t de Student com intervalo de confiança de 95%, o valor de p obtidos foi de 0,0004 para o potenciostato comercial. O valor de p é inferior ao nível de significância (0,05), o que confirma a divergência estatística entre os grupos analisados, ou seja, as populações amostrais de reativos e não reativos apresentam médias de pico diferentes, confirmando que o dispositivo é capaz de detectar eletroquimicamente anticorpos anti-SARS-CoV-2 em amostras reais de soro sanguíneo (BEDUK et al., 2021; SALMAN et al., 2021).

5.2.3 Caracterização eletroquímica da avaliação da eficiência do potenciostato portátil para detecção de anticorpos da COVID-19: anticorpos biomarcadores anti-SARS-CoV-2

Para avaliar a eficácia da plataforma de potenciostato portátil microcontrolado, desenvolvido pelo grupo de pesquisa de Tecnologias Aplicadas em Materiais Avançados – Novonano, acoplado a plataforma DoC, amostras clínicas de soro sanguíneo humano reativas e não-reativas foram submetidas a análise para avaliar a o potencial dessas plataformas para detectar anticorpos COVID-19 em resposta à infecção por SARS-CoV-2. Os resultados foram adquiridos após análises CV (de acordo com a Seção 4.5 sub-seção 4.5.1). A Figura 19 exibe os resultados em termos de detecção de corrente para cada amostra testada. Esses resultados indicam que o analito não-reativo teve uma resposta de corrente menor quando comparado aos analitos reativos, o que está de acordo com os resultados anteriores observados para testes realizados no potenciostato comercial. A plataforma DoC, acoplada ao potenciostato portátil microcontrolado, também apresentou desempenho similar com os testes atualmente aprovados pelas agências reguladoras quanto ao tempo estimado de processamento de análise, o qual é de 3 min. (CARTER et al., 2020; MARDIAN et al., 2021).

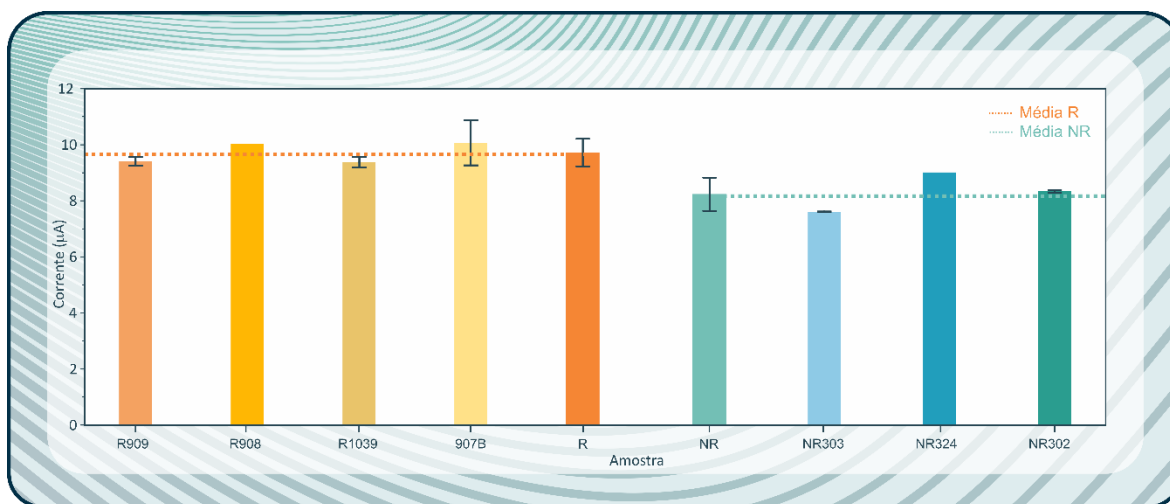


Figura 19: Valores de corrente de oxidação para amostras clínicas reativas (R) e não-reativas (NR) com suas respectivas médias finais, obtidas pela técnica de CV aplicada a plataforma de DoC acoplado ao potenciostato portátil.

Fonte: OLIVEIRA, 2022 adaptado de OLIVEIRA et al.2022.

Para avaliar estatisticamente os dados das amostras reativas e não reativas, observado nas análises descritivas apresentadas nas Figuras 19, é possível constatar que o valor máximo do intervalo de confiança do grupo não-reativo é menor que o valor mínimo do intervalo de confiança do grupo reagente, indicando diferenças evidentes nos dados amostrados. Para confirmar as diferenças estatísticas entre amostras reativas e não-reativas, foi realizada a análise do teste t de Student, avaliando o valor de p. Para um teste t de Student com intervalo de confiança de 95%, o valor de p obtidos foi de 0,002 para o potenciostato portátil desenvolvido. O valor de p é inferior ao nível de significância (0,05), o que confirma a divergência estatística entre os grupos analisados, ou seja, as populações amostrais de reativos e não reativos apresentam médias de pico diferentes, confirmando que o dispositivo é capaz de detectar eletroquimicamente anticorpos anti-SARS-CoV-2 em amostras reais de soro sanguíneo, tornando-se uma ferramenta de diagnóstico promissora para monitoramento da infecção induzida por SARS-CoV-2 (BEDUK et al., 2021; SALMAN et al., 2021).

6 Considerações finais

A plataforma de DoC, baseada em um biossensor eletroquímico descartável, desenvolvida para diagnóstico da COVID-19 para a detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 acoplada a um potenciostato comercial, exibiu sinais característicos e dependente da concentração, em amostras clínicas de soro sanguíneo humano. Apresentou valores médios de corrente para testes realizados em amostras clínicas reativas e não reativas, chegando a 9,53 μA (desvio padrão de 0,32) e 7,96 μA (desvio padrão de 0,84), respectivamente com divergência estatística significativa com valor de p de 0,0004 inferior ao nível de significância (0,05), com o intervalo de confiança de 95% do teste de Student avaliando p.

A plataforma DoC acoplada ao potenciostato portátil microcontrolado, desenvolvido pelo grupo de pesquisa de Tecnologias Aplicadas em Materiais Avançados – Novonano, exibiu sinais característicos e dependente da concentração, com valores médios de corrente de 9,67 e 8,18 μA em biofluidos séricos de pacientes reativos e não-reativos respectivamente para anticorpos anti-SARS-CoV-2. Possuindo divergência estatística significativa para o teste de Student avaliando p, com valor de p de 0,002 inferior ao nível de significância (0,05), com o intervalo de confiança de 95%.

A plataforma DoC apresentou desempenho similar com os testes atualmente aprovados pelas agências reguladoras quanto ao tempo estimado de processamento de análise, o qual é de 3 min. com boa reprodutibilidade, tornando-se uma ferramenta de diagnóstico promissora para monitoramento da infecção induzida por SARS-CoV-2. O protótipo dos dispositivos apresenta elevado potencial para implementação em dispositivos PoCT para triagem de pacientes, bem como para uso em atendimento de telemedicina e monitoramento remoto, possibilitando a notificação aos órgãos competentes, contribuindo para o mapeamento epidemiológico e planejamento de políticas públicas de saúde.

7 Perspectivas futuras

Em virtude do evento pandêmico que assola nossa sociedade desde março de 2020, vivenciamos tempos sem precedentes, uma série de trabalhos que estavam programados não puderam ser concluídos ou foram protelados em decorrência da suspensão de atividades presenciais na UFPel e instituições parceiras. Ademais, em decorrência houve redirecionamento de pesquisas e esforços foram realocados para o enfrentamento da COVID-19.

Como explanado anteriormente, as etapas previstas e não executadas ficaram em aberto para trabalhos futuros destacam-se:

- Otimização do dispositivo;
- transferência de conhecimento para o setor produtivo;
- Divulgação na comunidade científica por meio de congressos nacionais e internacionais na área de novos materiais e eletroanalítica.

Além das atividades de fechamento, propõem -se:

- Otimização do dispositivo para identificação do vírus SARS-CoV-2;
- Aplicação do dispositivo in loco;
- Avaliação epidemiológica da vacinação;
- Avaliação epidemiológica das demais variantes genéticas da SARS-CoV-2.

O desenvolvimento dessas atividades proporcionará aprofundar conhecimento epidemiológico acerca da COVID-19, pois aspectos genéticos, socioeconômicos e ambientais do Brasil poderão ser estudados. Possibilitará avaliar o desempenho dos testes, apresentando novas possibilidades para o diagnóstico da COVID-19 e de outras patologias, uma vez a plataforma desenvolvida permite adaptações.

8. Produções científicas

8.1. Artigos científicos (Anexo B)

- OLIVEIRA, M. E. LOPES, B. V.; ROSSATO, J. H. H.; MARON, G. G.; GALLO, B. B.; ROSA, A. B. L.; BALBONI, R. D. C.; ALVES, M. L. F.; FERREIRA, M. R. A.; PINTO, L.S.; CONCEIÇÃO, F. R.; PIVA, E.; PEREIRA, C. M. P.; ESCOTE, M. T.; CARREÑO, N; L.V. Electrochemical Biosensor Based on Laser-Induced Graphene for COVID-19 Diagnosing: Rapid and Low-Cost Detection of SARS-CoV-2 Biomarker Antibodies. **Surfaces**, v. 5, n. 1, p.187-201, 2022. DOI: 10.3390/surfaces5010012
- ROSSATO, J.; OLIVEIRA, M.; LOPES, B.; GALLO, B.; LA ROSA, A.; PIVA, E.; BARBA, D.; ROSEI, F.; CARREÑO, N.; ESCOTE, M. Flexible Electrochemical Biosensor Based on NdNiO₃ Nanotubes for Ascorbic Acid Detection. **ACS Appl. Nano Mate.**, v. 5, n. 3, p. 3394-3405, 2022. DOI: 10.1021/acsanm.1c03992

8.2. Patente (Anexo C)

- Biossensor eletroquímico de grafeno funcionalizado com nanopartículas de Pt para o imunodiagnóstico da COVID-19 - Privilégio de Inovação. Número do registro: BR 10 2021 009120 7, 2021.
-

8.3. Divulgação da pesquisa por meios de comunicação

- CARRENO, N. L. V.; OLIVEIRA, M. E; LOPES, B. V.; MARON, G. K.; ROSA, A. B. L.; GALLO, B. B.; BALBONI, R.D.C.; RODRIGUES, L. S.; PEREIRA, C. M. P. PINTO, L. S.; CONCEIÇÃO, F. R. Diagnóstico em tempo real. Diário Popular, Pelotas, 16 dez. 2020. Disponível em: <https://mla.bs/8313f689>
- CARRENO, N. L. V.; OLIVEIRA, M. E; LOPES, B. V.; MARON, G. K.; ROSA, A. B. L.; GALLO, B. B.; BALBONI, R.D.C.; RODRIGUES, L. S.; PEREIRA, C.

M. P. PINTO, L. S.; CONCEIÇÃO, F. R. UFPel trabalha na criação de teste que detecta vírus ativo e anticorpos da Covid-19. Jornal do Almoço, RBS TV, BS TV e G1 RS, Rio Grande do Sul, 08 jan. 2021. Disponível em: <https://globoplay.globo.com/v/9159403/>

- CARRENO, N. L. V.; OLIVEIRA, M. E; LOPES, B. V.; MARON, G. K.; ROSA, A. B. L.; GALLO, B. B.; BALBONI, R.D.C.; RODRIGUES, L. S.; PEREIRA, C. M. P. PINTO, L. S.; CONCEIÇÃO, F. R. Pesquisadores da Ufpel desenvolvem biossensor para testagem da covid-19. TVE RS, Rio Grande do Sul, 27 fev. 2021. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=HDXBshpwy6A>

9 Referências

AIZAWA, M. Principles and applications of electrochemical and optical biosensors. *Analytica Chimica Acta*. v. 250, p. 249-256. DOI: 10.1016/0003-2670(91)85073-2

ALEEM, A.; AKBAR SAMAD, A.B.; SLENKER, A.K. Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19). 2022 May 12. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 34033342.

ALHALAILI, Badriyah, et al. Nanobiosensors for the Detection of Novel Coronavirus 2019-mCoV and Other Pandemic/Epidemic Respiratory Viruses: A Review. *Sensors*, n. 20, p. 1 – 45, 2020. DOI: 10.3390/s20226591

ALI, M.A.; HU, C.; JAHAN, S.; YUAN, B.; SALEH, M.S.; JU, e.; GAO, S-J.; PANAT, R. Sensing of COVID-19 Antibodies in Seconds via Aerosol Jet Nanoprinted Reduced-Graphene-Oxide-Coated 3D Electrodes. **Adv. Mater.**, v. 33, n. 7, p. 2006647, 2018. DOI: 10.1002/adma.202006647

AOKI, M.N. DE OLIVEIRA COELHO, B. GÓES, L.G.B. MINOPRIO, P.; DURINGON, E.L.; MORELLO, L.G.; MARCHINI, F.K.; RIEDIGER, I.N.; DEBUR, M.C.; NAKAVA, H.I.; BLANES. L. Colorimetric RT-LAMP SARS-CoV-2 diagnostic sensitivity relies on color interpretation and viral load. **Sci Rep**, v. 11, n. 9026, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-88506-y

ARNOLD, C.B.; SERRA, P.; PIQUÉ, A. Laser Direct-Write Techniques for Printing of Complex Materials. **MRS Bulletin**, v. 32, n.01, p.23–32, 2007. doi:10.1557/mrs2007.11

AZHAM, S.; RAHMAN, R.T.; LOU, Z.; TANG, Y.; RAQIB, S.M.; JOTHI, J.S. Review: Advancements and application of immunosensors in the analysis of food contaminants. **Nausantara Bioscience**, V.6, n. 2, p. 186 – 195, 2014. DOI: 10.13057/nusbiosci/n060212

BASSO, L.G.M; Interações com membranas de peptídeos de fusão de glicoproteínas S do SARS-COV. 165 f. Tese (Doutorado em ciências) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2014.

BAUER, M., WUNDERLICH, L., WEINZIERL, F. LEI, Y.; DUERKOP, A.; ALSHAREEF, H. N.; BAEUMNER, A. J. Electrochemical multi-analyte point-of-care perspiration sensors using on-chip three-dimensional graphene electrodes. **Anal Bioanal Chem.**, v. 413, p. 763–777, 2021. DOI: 10.1007/s00216-020-02939-4

BEDUK, T.; BEDUK, B.; FILHO, J.I.O.; ZIHNIUGLU, F.; CICEK, C.; SERTOZ, R.; ARDA, B.; GOKSEL, T.; TURHAN, K.; SALAMA, K.N.; TIMUR, S. Rapid Point-of-Care COVID-19 Diagnosis with a Gold-Nanoarchitecture-Assisted Laser-Scribed Graphene Biosensor. **Anal. Chem.**, v. 93, n. 24, p. 8585–8594, 2021. DOI: 10.1021/acs.analchem.1c01444

BEHRENT, A., GRIESCHE, C., SIPPEL, P. BAEUMNER, A.J. Process-property correlations in laser-induced graphene electrodes for electrochemical sensing. **Microchim Acta**, v. 188, n. 159, 2021. DOI: 10.1007/s00604-021-04792-3

BERZOFISKY, J.A.; HOWE, S.B.; OLKHANUD, P.B. Antigens. In: RAZAEI, N. **Encyclopedia of Infection and Immunity**. v. 1, Elsevier, 2022, p.76-89. DOI: 10.1016/B978-0-12-818731-9.00211-1

BHALLA, N.; JOLLY, P.; FORMISANO, N.; ESTRELA, P. Introduction to biosensors. **Essays Biochem.**, v. 60, n. 1 p. 1- 8, 2016. DOI: 10.1042/EBC20150001

BLANCO, A.; BLANCO, G. Chapter 30 - Molecular Basis of Immunity. In: BLANCO, A.; BLANCO, G. **Medical Biochemistry**. Academic Press, 2017, p. 745-780. DOI: 10.1016/B978-0-12-803550-4.00030-6.

BOBRINETSKIY, I.I.; KNEZEVIC, N.Z. Graphene-based biosensors for on-site detection of contaminants in food. **Anal. Methods**, v. 10, 5061–5070, 2018. DOI: 10.1039/C8AY01913D

BUTNARIU, M., BUTU, A. Plant Nanobionics: Application of Nanobiosensors in Plant Biology. In: PRASAD, R. **Plant Nanobionics. Nanotechnology in the Life Sciences**. 1. Ed. Springer, Cham., 2019, p. 337-376. DOI:10.1007/978-3-030-16379-2_12

CALIL, S. S.; DA SILVA, P.R.Q. Biossensores : estrutura, funcionamento e aplicabilidade. 6a Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu da PUC Goiás, p. 1–20, 2011.

CAMPOS, J.H.; MARICATO, J.T.; BRACONI, C.T.; ANTONELI, F.; JANINI, L.M.R.; BRIONES, M.R.S. Direct RNA sequencing reveals SARS-CoV-2 m6A sites and possible differential DRACH motif methylation among variants. **bioRxiv**, 2021. DOI: doi.org/10.1101/2021.08.24.457397

CARTER, L.J.; GARNER, L.V.; SMOOT, J.W.; LI, Y.; ZHOU, Q., SAVESON, C.J.; SASSO, J.M.; GREGG, A.C.; SOARES, D.J.; BESKID, T.R.; JERVEY, S.R., LIU, C. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. **ACS Cent. Sci.**, v. 6, n. 5, p. 591–605, 2020. DOI: 10.1021/acscentsci.0c00501

CASCELLA, M.; RAJNIK, M.; ALEEM, A.; DULEBOHN, S.C.; NAPOLI, R.D. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19) [Updated 2022 Feb 5]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>

CASTRO, A.C.H.; ALVESA, L.M.; SIQUIEROLIA, A.C.S.; MADURROB, J.M.; BRITO-MADURROA, AG. Label-free electrochemical immunosensor for detection of oncomarker CA125 in serum. **Microchemical Journal**, v. 155, p. 104746, 2020. DOI: 10.1016/j.microc.2020.104746

CERAOLO, C.; GIORGI, F.M. Genomic variance of the 2019-nCoV coronavírus. **J Med Virol.**, v. 92, p. 522–528, 2020. DOI: doi.org/10.1002/jmv.25700

CREMER, M. Über die Ursache der elektromotorischen Eigenschaften der Gewebe, zugleich ein Beitrag zur Lehre von den polyphasischen **Elektrolytketten. Z. Biol.** v. 47, p.562-608, 1906.

CRISTEA, C.; FLOREA, A.; TERTIS, M.; SĂNDULESCU, R. Immunosensors. In: RINKEN, T. **Biosensors - Micro and Nanoscale Applications** [Internet]. Londres: IntechOpen; 2015. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/48359>> DOI: 10.5772/60524

DOSI, M.; LAU, I.; ZHUANG, Y.; SIMAKOV, D.S.A.; FOWLWR, M.W.; POPE, M.A. Ultrasensitive Electrochemical Methane Sensors Based on Solid Polymer Electrolyte-Infused Laser-Induced Graphene. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 11, n. 6, p. 6166–6173, 2019. DOI: 10.1021/acsami.8b22310

DU, X.; ZHOU, J.; Application of biosensors to detection of epidemic diseases in animals. **Res Vet Sci.** v. 118, p. 444-448, 2018. DOI: 10.1016/j.rvsc.2018.04.011

DUY, L.X.; PENG, Z.; LI, Y.; ZHANG, Z.; JI, Y.; TOUR, J.M. Laser-induced graphene fibers. **Carbon**, v. 126, p. 472-479, 2018. DOI: 10.1016/j.carbon.2017.10.036

FALK, M.; PSOTTA, C.; CIROVIC, S.; SHLEEV, S. Non-Invasive Electrochemical Biosensors Operating in Human Physiological Fluids. **Sensors**, v.20, n. 21, p. 6352, 2020. DOI: 10.3390/s20216352

FARIA, A.M.; MAZON, T. Early diagnosis of Zika infection using a ZnO nanostructures-based rapid electrochemical biosensor. *Talanta*, v. 203, p. 153-160, 2019. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.04.080

FERNANDES, J.C.B.; KUBOTA, L.T. Eletrodos íon-seletivos: Histórico, Mecanismo de Resposta, Seletividade e Revisão dos Conceitos. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p.120-130, 2001.DOI: 10.1590/S0100-40422001000100020

FERRARI, A. G-M.; ROWLEY-NEALE, S.J.; BANKS, C.E. Screen-printed electrodes: Transitioning the laboratory in-to-the field. **Talanta open**, v. 3, n. 100032, 2021. DOI: 10.1016/j.talo.2021.100032

FRUNCILLO, S.; SU, X.; LIU, H.; WONG, L.S. Lithographic Processes for the Scalable Fabrication of Micro- and Nanostructures for Biochips and Biosensors. **ACS Sens.**, v. 6, n. 6, p. 2002–2024, 2021. DOI: 10.1021/acssensors.0c02704

GAO, M.; LI, L.; SONG, Y.; Inkjet printing wearable electronic devices. **J. Mater. Chem. C**, v. 5, n. 12, p. 2971-2993, 2017. DOI: 10.1039/C7TC00038C

GEIM, A.K.; NOVOSELOV, K.S.A ascensão do grafeno. **Nat Mater** v.6, p. 183-191, 2007. DOI:10.1142/9789814287005_0002

GOMES, E.C.S. Conceitos e ferramentas de epidemiologia. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2015. 83 p.

GONG, F.; WEI, H.X.; LI, Q.; LIU, L.; LI, B. Evaluation and Comparison of Serological Methods for COVID-19 Diagnosis. *Front. Mol. Biosci.* v.8, n. 682405, 2021. DOI: 10.3389/fmolb.2021.682405

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors (Basel)*, v. 8, n. 3, p. 1400 – 1458, 2008. DOI: 0.3390/s80314000

GRIFFIN, E.G.; NELSON, J.M. The influence of certain substances on the activity of invertase. **J. Am. Chem. Soc.** v. 38, n. 3p. 722–730, 1916. DOI: 10.1021/ja02260a027.

GRIFFIN, G.; STRATIS-CULLUM, D. Biosensors. In: SCHAECHTER, M. *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*. 3. ed. Academic Press, 2009, p. 88- 103.

HALEEM, A.; JAVAID, M.; SINGH, R.P.; SUMAN, R.; RAB, S. Biosensors applications in medical field: A brief review. *Sensors International*. v. 2, n. 100100, 2021. DOI: 10.1016/j.sintl.2021.100100

HALLAL, P.C. Worldwide differences in COVID-19-related mortality. **Cien Saude Colet.**, v. 1, p. 2403-2410, 2020. DOI: 10.1590/1413-81232020256.1.11112020

HALLAL, P.C.; BARROS, F.C.; SILVEIRA, M.F.; BARROS, A.J.D.; DELLAGOSTIN, O.A.; PELLANDA, L.C.; STRUCHINER, C.J.; BURATTIBI, M.N.; HARTWIG, F.P.; MENEZES, A.M.B., HORTA, B.L.; VICTORA, C.G. EPICOVID19 protocol: repeated serological surveys on SARS-CoV-2 antibodies in Brazil. **Cien Saude Colet.**, v. 25, n.9, p. 3573-3578, 2020. DOI: 10.1590/1413-81232020259.25532020

HAMMOND, J. L.; FORMISANO, N.; ESTRELA, P.; CARRARA, S.; TKAC, J. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. **Essays in biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 69–80, 2016. 10.1042/EBC20150008

HAN, T.; KUNDU, S.; NAG, A.; XU, Y. 3D Printed Sensors for Biomedical Applications: A Review. **Sensors (Basel)**. V.19, n.7, p.1706, 2019. DOI:10.3390/s19071706

HANSEN, S.; WAHED, A.A.E. Point-Of-Care or Point-Of-Need Diagnostic Tests: Time to Change Outbreak Investigation and Pathogen Detection. **Trop. Med. Infect. Dis.**, v. 5, n. 4, p. 151, 2020. DOI: 10.3390/tropicalmed5040151

HASHEMI, S.A.; BEHBAHAN, N.G.G.; BAHRANI, S.; MOUSAVI, S.M.; GHOLAMI A.; RAMAKRISHNA , S.; FIROOZSANI, M.; MOGHADAMI, M.; LANKARANI, K.B.; OMIDIFAR, N. Ultra-sensitive viral glycoprotein detection NanoSystem toward

accurate tracing SARS-CoV-2 in biological/non-biological media. **Biosensors and Bioelectronics**, v.171, p, 112731, 2021. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112731

HAWES, G.F.; YIMAN, D.; NOREMBERG, B.S.; POPE, M.A. Supercapacitors Fabricated via Laser-Induced Carbonization of Biomass-Derived Poly (furfuryl alcohol)/Graphene Oxide Composites. **ACS Appl. Nano Mater.**, v. 2, n.10 p. 6312–6324, 2019. DOI: 10.1021/acsanm.9b01284

HEINEMAN, W.R.; JENSEN, W.B.; CLARK JR, L.C. (1918–2005) **Biosens. Bioelectron.** v. 21, n. 8, p. 1403–1404, 2006. DOI: 10.1016/j.bios.2005.12.005.

Hermanson, G. Bioconjugate Techniques. 3rd ed.; Academic Press, 2013; p. 259 273.

HICYILMAZ, A. S.; BEDELOGLU, A.C. Applications of polyimide coatings: a review. **SN Appl. Sci.**, V. 3, n.363, p. 1-23, 2021. DOI:10.1007/s42452-021-04362-5

HOFFMAN, A. S.; HUBBELL, J. A.; Surface-Immobilized Biomolecules. In: RATNER, B. D.; SCHOEN, F. J.; HOFFMAN, A. S.; LIMÕES, J. E. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. 3. ed. Academic Press, 2019. p. 339 – 349.

HONG, Q.; YANG, L.; GE, L.; LIU, Z.; LI, F. Direct-laser-writing of three-dimensional porous graphene frameworks on indium-tin oxide for sensitive electrochemical biosensing. **Analyst**, v. 143, n. 14, p. 3327-3334, 2018. DOI: 10.1039/C8AN00888D

HU, B.; GUO, H.; ZHOU, P.; SHI, Z-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nat Rev Microbiol**, v. 19, p.141–154, 2021. DOI: doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7

HUANG, L.; SU, J.; SONG, Y.; YE, R. Laser-Induced Graphene: En Route to Smart Sensing. **Nano-Micro Lett.**, v. 12, n. 157, 2020. DOI:10.1007/s40820-020-00496-0

HUANG, X.; XU, D.; CHEN, J.; LIU, J.; LI, Y.; SONG, J.; MA, X.; GUO, J. Smartphone-based analytical biosensors. **Analyst**, v. 143, p. 5339 – 535, 2018. DOI: 10.1039/C8AN01269E

HUANG, Y.; YANG, C.; XU, X.F.; WEI, X.; LIU, S.W Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. **Acta Pharmacol Sin**, v. 41, p. 1141-1149, 2020. DOI: 10.1038/s41401-020-0485-4

HUGHES, W.S. The potential difference between glass and electrolytes in contact with the glass. **J. Am. Chem. Soc.** v. 44, n. 12, p. 2860–2867, 1922. DOI: 10.1021/ja01433a021.

IRAVANI, S. Nano- and biosensors for the detection of SARS-CoV-2: challenges and opportunities. **Mater. Adv.**, v. 1, n. 9, p. 3092-3103, 2020. DOI: 10.1039 / D0MA00702A

KAR, S.; SARSWAT, P.K. Graphene-Based Biosensor: Fundamental Concept, Outline of Utility, and Future Scope. In: PALYS, B. Handbook of Graphene. **Volume 6: Biosensors and Advanced Sensors**. 1. ed. Wiley, 2019. p. 828.

KARLSSON, M.; STRANDQVIST, C.; JUSSI, J.; ÖBERG, O.; PETERMANN, I.; ELMLUND, L.; DUNNE, S.; FU, Y.; WANG, Q. Chemical Sensors Generated on Wafer-Scale Epitaxial Graphene for Application to Front-Line Drug Detection. **Sensors**, v. 19, n. 10, p.2214, 2019. DOI: 10.3390/s19102214

KRISHNAN, S.K.; SINGH, E.; SINGUH, P.; MEYYAPPAN, M.; NALWA, H.S. A review on graphene-based nanocomposites for electrochemical and fluorescent biosensors. **RSC Adv.** v. 9, p. 8778 – 8881, 2019. DOI: 10.1039/C8RA09577A

LATHI, B.P. Signals and lineares systems. 2nd ed.; Bookman, 2007.

LAUXMANN, M.A.; SANTUCCI, N.E.; AUTRÁN-GÓMEZ, A.M. The SARS-CoV-2 Coronavirus and the COVID-19 Outbreak. *Int Braz J Urol.*, v.46, n. 1, p. 6-18, 2020. DOI: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2020.S101

LAYQAH, L.A.; EISSA, S. An electrochemical immunosensor for the corona virus associated with the Middle East respiratory syndrome using an array of gold nanoparticle-modified carbon electrodes. **Mikrochim Acta.**, v. 186, n. 4, p.224, 2019. DOI: 10.1007/s00604-019-3345-5

LEMOES, A.J.G. Desenvolvimento de um Imunossensor para Detecção de Proteína C Reativa. 40 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2014.

LI, G. Direct laser writing of graphene electrodes. **J. Appl. Phys.**, v. 127, n.1, p. 010901, 2020. DOI:10.1063/1.5120056

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

LIN, J.; PENG, Z.; LIU, Y.; RUIZ-ZEPEDA, F.Y.E, R.; SAMUEL, E.L.G.; YACAMAN, M.J.; YAKOBSON, B.I.; TOUR, J.M. Laser-induced porous graphene films from commercial polymers. **Nat Commun.**, v. 5, n. 5714, 2014. DOI: 10.1038/ncomms6714

LIN, Q.; WEN, D.; WU, J.; LIU, L.; WU, W.; FANG, X.; KONG, J. Microfluidic Immunoassays for Sensitive and Simultaneous Detection of IgG/IgM/Antigen of SARS-CoV-2 within 15 min. **Anal. Chem.** v. 92, n. 14, p. 9454 – 9458, 2020. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c01635

LIU, E.Y.; JUNG, S.; WEITZ, D.A.; Yli, H.; CHOI, C-H. High-throughput double emulsion-based microfluidic production of hydrogel microspheres with tunable chemical functionalities toward biomolecular conjugation. **Lab Chip**, v. 18, n. 2 p.323-334, 2018. DOI: 10.1039/C7LC01088E

LIU, H.; YU, J. Grapheno for Eletrochemical Biosensors in Biomedical Applications. In:PALYS, B. Handbook of Graphene. **Volume 6: Biosensors and Advanced Sensors**. 1. ed. Wiley ,2019. p. 828.

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

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

LUPPA, P.B.; JUNKER, R.; LANGER, C. Definitions and areas of application. In: LUPPA, P.B.; JUNKER, R. (eds) Point-of-Care Testing. Springer, Berlin, Heidelberg, 2018. p. 3-7. DOI: 10.1007/978-3-662-54497-6_1

MACHADO, D. F. Garcia. Biossensor impresso baseado em peroxidase imobilizada em nanofios de titanato. 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2015.

MAHASE, E. Coronavirus: covid-19 has killed more people than SARS and MERS combined, despite lower case fatality rate. **BMJ.**, v. 368, p. 641, 2020. DOI: 10.1136/bmj.m641

MALHOTRA, B.D.; ALI, A. Chapter 1 - Nanomaterials in Biosensors: Fundamentals and Applications. In: MALHOTRA, B.D.; ALI, A. **Nanomaterials for Biosensors Fundamentals and Applications**. 1. ed. Elsevier, 2018. p 1-74. DOI: 10.1016/B978-0-323-44923-6.00001-7

MARDIAN, Y.; KOSASIH, H.; KARYANA, M.; NEAL, A.; LAU, C.Y. Review of Current COVID-19 Diagnostics and Opportunities for Further Development. **Front. Med.** v. 8, n. 615099. DOI: 10.3389/fmed.2021.615099

MARON, G.K. Desenvolvimento de microsupercapacitores de grafeno induzido por laser recobertos com sulfeto de níquel cobalto pelo método de eletrodeposição. 102f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2021.

MARTÍNEZ-FLETA, P.; ALFRANCA, A.; GONZÁLEZ-ÁLVARO, I.; CASANOVAS, J.M.; FERNÁNDEZ-Soto, D.; ESTESO, G.; CÁCERES-MARTELL, Y.; GARDETA, S.; LÓPEZ-SANZ, C.; PRAT, S.; MATEU-ALBERO, T.; GABRIEL, L.; LÓPEZ-GRANADOS, E.; SÁNCHEZ-MADRID, F.; REYBURN, H.T.; FRADE, J.M.R.; VALÉS-GÓMEZ, M. SARS-Cov-2 cysteine-like protease (Mpro) is immunogenic and can be detected in serum and saliva of COVID-19-seropositive individuals. **J Immunol**, v. 205, p. 3130-3140, 2020. DOI: 10.1101/2020.07.16.20155853

MATHEW, J.; SANKAR, P.; VARACALLO, M. Physiology, Blood Plasma. [Updated 2022 Apr 28]. In: STATPEARLS [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearlS, 2022. Disponível em: ><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531504/><

MCDUFFIE, F.C. (1981). Antígenos e Imunógenos. In: SAFAI, B.; GOOD, R.A. (eds) Immunodermatology. **Comprehensive Immunology**, v. 7, Springer, Boston, MA. 1981, p. 35-45. DOI: 10.1007/978-1-4615-7228-2_2

MILLER, J.K.; ELEMBERG, K.; DUBRAWSKI, A. Forecasting emergence of COVID-19 variants of concern. **PLOS ONE**, v. 17, n. 2, p. e0264198 2022. DOI:doi.org/10.1371/journal.pone.0264198

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

MORALES-NAVÁREZ, E.; DINCER, C. The impact of biosensing in a pandemic outbreak: COVID-19. **Biosens. Bioeléttron.**, v.163, n.112274, 2020. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112274

NARESH, V.; LEE, N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. **Sensors (Basel)**. v. 21, n. 4, p.1109, 2021. DOI:doi:10.3390/s21041109

NELSON, J.M.; GRIFFIN, E.G. Adsorption of invertase. **J. Am. Chem. Soc.** v.38, n. 5, p. 1109–1115, 1916. DOI: 10.1021/ja02262a018.

NOVOSELOV, K.; FA`LKO, V.I; COLOMBO L.; GELLERT, P.R.; SCHWAB, M.G.; KIM, K. A roadmap for graphene. **Nature**, v. 490, p. 192–200, 2012.DOI: 10.1038/nature11458

NOVOSELOV, K.S.; GEIM, A.K.; MOROZOV, S.V.; JIANG, D.; ZHANG, Y.; DUBONOS, S.V.; GRIGORIEVA, I.V.; FIRSOV, I.V. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. **Science**, v. 306, n. 5696, p. 666 – 669, 2004. DOI: 10.1126/science.110289

OLIVEIRA, M. E. LOPES, B. V.; ROSSATO, J. H. H.; MARON, G. G.; GALLO, B. B.; ROSA, A. B. L.; BALBONI, R. D. C.; ALVES, M. L. F.; FERREIRA, M. R. A.; PINTO, L.S.; CONCEIÇÃO, F. R.; PIVA, E.; PEREIRA, C. M. P.; ESCOTE, M. T.; CARREÑO, N; L.V. Electrochemical Biosensor Based on Laser-Induced Graphene for COVID-19 Diagnosing: Rapid and Low-Cost Detection of SARS-CoV-2 Biomarker Antibodies. **Surfaces**, v. 5, n. 1, p.187-201, 2022. DOI: 10.3390/surfaces5010012

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE [OMS]. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>>. Acessado em: fev de 2022.a

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE [OMS]. Estimating mortality from COVID-19: scientific brief, 4 August 2020. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/333642>> Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Acessado em: 18 fev 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE [OMS]. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) – United Arab Emirates. Disponível em: <[https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-\(mers-cov\)-united-arab-emirates](https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-(mers-cov)-united-arab-emirates)>. Acessado em: 04 de jan. 2022c.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE [OMS]. Modes of transmission of virus causing COVID-19: implications for IPC precaution recommendations, 9 July 2021. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/modes-of-transmission-of-virus-causing-covid-19-implications-for-ipc-precaution-recommendations>> Licença: WHO/2019-nCoV/Sci_Brief/Transmission_modes/2020.2. Acessado em: 18 mar 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE [OMS]. Severe acute respiratory syndrome (SARS) pandemic. Disponível em: < https://www.who.int/health-topics/severe-acute-respiratory-syndrome#tab=tab_1>. Acessado em: mai de 2022.b

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE [PAHO]. Como estimar a mortalidade pela doença do novo coronavírus (COVID-19). Informe científico. 04 de Agosto de 2020. Disponível em: < <https://iris.paho.org/handle/10665.2/52650>> Licença: OPAS-W/BRA/COVID-19/20-110. Acessado em 18 de fev. 2022

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE [PAHO]. OMS anuncia nomenclaturas simples e faceis de pronunciar para variants de interesse e de preocupação do SARS-CoV-201 de Junho de 2021 Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/1-6-2021-oms-anuncia-nomenclaturas-simples-e-faceis-pronunciar-para-variantes-interesse-e>>. Acessado em 18 de Mar. 2022

PARAPUDI, T.; PANCHAGNULA, N.; MUTHUKUMAR, S.; PRASAD, S. Evidence-based point-of-care technology development during the COVID-19 pandemic. BioTechniques. v. 70, n.1, p., 2020. DOI: 10.2144/btn-2020-0096 .

PARIHAR, A.; RANJAN, p.; SANGHI, S.K.; SRIVASTAVA, A.K.; KHAN, R. Point-of-Care Biosensor-Based Diagnosis of COVID-19 Holds Promise to Combat Current and Future Pandemics. *ACS Appl. Bio Mater.* v. 3, n. 11, p. 7326–7343, 2020. DOI: 10.1021/acsabm.0c01083

PARK, R.; JEON, S.; JEONG, J.; PARK, S.Y.; HAN, D.W.; HONG, S.W. Recent Advances of Point-of-Care Devices Integrated with Molecularly Imprinted Polymers-Based Biosensors: From Biomolecule Sensing Design to Intraoral Fluid Testing. *Biosensors*, v.12, n. 3, p. 136, 2022. DOI: 10.3390/bios12030136

PARKLEY, P.; MOHAN, S.V. Chapter 6.1 - Biosensing Applications of Microbial Fuel Cell: Approach Toward Miniaturization. In: MOHAN, S.V.; PANDEY, A.; VARJANI, S. **Microbial Electrochemical Technology: Sustainable Platform for Fuels, Chemicals and Remediation**. 1. ed. Elsevier, 2019. p 977-997. DOI: 10.1016/B978-0-444-64052-9.00040-6

PATERAKI, M.; FYSARAKIS, K.; SAKKALIS, V.; SPANOUDAKIS, G.; VARLAMIS, I.; MANIADAKIS, M.; LOURAKIS, M.; LOANNIDIS, S.; CUMMINSS, N.; Schuller, B.; LOUTSETIS, E.; KOUTSOURIS, D. Biosensors and Internet of Things in smart healthcare applications: challenges and opportunities. *Wearable and Implantable Medical Devices*, 1sted.; Day, N.; Fong, S.J.; Ashour, A.S.; Bhatt, C. Eds.; Academic Press; v. 7, p. 25-53. 2020. DOI: 10.1016/B978-0-12-815369-7.00002-1

PIRET, J.; BOIVIN, G. Pandemics Throughout History. *Front. Microbiol.*, v.11, p. 631736, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2020.631736

PLIS, E.; ENGELHART, D. P.; BARTON, D.; COOPER, R.; FERGUSON, D.; HOFFMANN, R. Degradation of polyimide under exposure to 90 keV electrons. *Phys. Status Solidi B*, v. 254, n. 7, p. 1–7, 2017. DOI: 10.1002/pssb.201600819

QIAN, L.; DURAIRAJ, S.; PRINS, S.; CHEN, A. Nanomaterial-based electrochemical sensors and biosensors for the detection of pharmaceutical compounds. *Biosensors and Bioelectronics*. v. 175, n. 112836, 2021. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112836

QIU, G.; GAI, Z.; TAO, Y.; SCHMITT, j.; KULLAK-UBLICK, G.A.; WANG, J. Dual-Functional Plasmonic Photothermal Biosensors for Highly Accurate Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Detection. *ACS Nano.*, v. 14, n. 5, p. 5268–5277, 2020. DOI: 10.1021/acsnano.0c02439

RAMÍREZ, N.B.; SALGADO, M.; VALDMAN, B. The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: problems and perspectives. **Braz. J. Chem. Eng.**, v.26, n.2, p. 227-249, 2009. DOI: 10.1590/S0104-66322009000200001

RAY, P.P. A survey on Internet of Things architectures. **Journal of King Saud University - Computer and Information Sciences**, v. 30, n. 3, p. 291-319, 2018. DOI: 10.1016/j.jksuci.2016.10.003

RONKAINEN, N.J.; HALSALL, H.B.; HEINEMAN, W.R. Electrochemical biosensors. **Chem. Soc. Rev.**, v. 39, p. 1747 - 1763, 2010. DOI:10.1039/B714449K

SADEGHI, S.J. Amperometric Biosensors. In: Roberts G.C.K. (eds) Encyclopedia of Biophysics. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. DOI: 10.1007/978-3-642-16712-6_713

SAINZ-URRUELA, C.; VERA-LÓPEZ, S.; SAN ANDRÉS, M.P.; DÍEZ-PASCUAL, A.M. Graphene-Based Sensors for the Detection of Bioactive Compounds: A Review. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 7, p. 3316, 2021. DOI: 10.3390/ijms22073316

SALMAN, N.; KHAN, M.W.; LIM, M.; KHAN, A.; KEMP, A.H.; NOAKES, C.J. Use of Multiple LowCost Carbon Dioxide Sensors to Measure Exhaled Breath Distribution with Face Mask Type and Wearing Behaviour. **Sensors.**, v. 21, n. 18, p. 6204, 2021. DOI: 10.3390/s21186204

SASSOLAS, A., BLUM, L.J., BOUVIER, B.D.L. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensorsll, **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489 - 511, 2012.

SAWANT, S.N. 13 - Development of Biosensors From Biopolymer Composites. In: SADASIVUNI, K.K.; CABIBIHAN, J.J.; PONNAMMA, P.; ALMAADEED, M. A.; KIM, J. **Biopolymer Composites in Electronics**. 1. ed. Elsevier, 2016.p. 353-383.

SECCHI, G.G. Modelagem, Análises e Otimização de Biossensores Eletrquímicos Baseados em Enzimas. 102f. Tese (Doutorado em Coência e Engenharia de Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2017.

SEGURA, B.; JIMENEZ, F.N.; GIRALDO, LR. Prototipo de potenciostato con aplicaciones en procesos electroquímicos. **Entre Ciencia e Ingenieria**, v. 10, n 19, p.61-69, 2016. ISSN 1909-8367

SINGH, B.; DATTA, B.; ASHISH, A.; DUTTA, G. A comprehensive review on current COVID-19 detection methods: From lab care to point of care diagnosis. **Sensors International**, v. 2, n.100119, 2021. DOI: 10.1016/j.sintl.2021.100119

SONG, W.; ZHU, J.; GAN, B.; ZHAO, S.; WANG, H.; LI, C.; WANG, J. Flexible, Stretchable, and Transparent Planar Microsupercapacitors Based on 3D Porous Laser-Induced Graphene. **Small**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2018. DOI: 0.1002/sml.201702249

TALEAT, Z.; KHOSHROO, A.; MAZLOUM-ARDAKANI, M. Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013). **Microchim Acta**. v. 181, p. 865–891, 2014. DOI: 10.1007/s00604-014-1181-1

TEHRANI, F., BAVARIAN, B. Facile and scalable disposable sensor based on laser engraved graphene for electrochemical detection of glucose. **Sci Rep.**, v. 6, n. 27975, 2016. DOI:10.1038/srep27975

TESING, A.; LOGUERCIO, L.F.; NOREMBERG, B.S.; ALANO, J.H.; SILVA, R.M.; ORLANDI, M.O.; MARIN, G.; SANTOS, J.F.L.; CARREÑO, N.L.V. Tunable graphene oxide inter-sheet distance to obtain graphene oxide–silver nanoparticle hybrids. **New J. Chem.**, v. 43, p. 1285–1290, 2019. DOI: 10.1039/C8NJ04316G.

THÉVENOT, D.; TOTH, K.; DURTS, R.A.; WILSON, G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*. v.16, n. 1-2, 121-131, 2001. DOI: 10.1016/S0956-5663(01)00115-4

TORRENT-RODRIGUES, R.; LUKAS, H.; TU, J.; MIN, J.; YANG, Y.; XU, C.; ROSSITER, H.R.; GAO, W. SARS-CoV-2 RapidPlex: A Graphene-Based Multiplexed Telemedicine Platform for Rapid and Low-Cost COVID-19 Diagnosis and Monitoring. **Matter**, v. 3, p. 1981-1998, 2020. DOI: 10.1016 / j.matt.2020.09.027

TRAUGOTT, M.; ABERLE, S.W.; ABERLE, J.H.; GRIEBLER, H.; KAROLYI, M.; PAWELKA, E.; Puchhammer-Stöckl, E.; Zoufaly, A.; Weseslindtner, L. Performance of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Antibody Assays in Different Stages of Infection: Comparison of Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Rapid Tests. **J. Infect. Dis.**, v. 222, p. 362-366, 2020. DOI: 10.1093 / infdis / jiaa305

TYAGI, D.; WNG, H.; HUANG, W.; HU, L.; TANG, Y.; GUO, Z.; OUYANG, Z.; ZHANG, H. Recent Advances in Two-Dimensional Materials based Sensing Technology towards Health and Environmental Applications. **Nanoescala**, v. 12, n. 6, p. 3535-3559, 2020. DOI: 10.1039/C9NR10178K

UZUNIAN, A. Coronavírus SARS-CoV-2 e Covid-19. **J Bras Patol Med Lab.**, v. 56, p. 1-4, 2020. DOI: doi.org/10.5935/1676-2444.20200053

VEDOVA-COSTA, J.M.D.; RAMOS, E.L.P.; BOSCHERO, R.A.; FERREIRA, G.N.; SOCCOL, V.T.; SANTIANI, M.H.; PACCE, V.D.; LUSTOSA, BP.R.; VICENTE, V.A.; SOCCOL, C.R. A Review on COVID-19 Diagnosis Tests Approved for Use in Brazil and the Impact on Pandemic Control. *Braz. arch. biol. Technol.* v.64, n. e21200147, 2021. DOI: 10.1590/1678-4324-75years-2021200147

VIDIC, J.; MANZANO, M.; CHANG, C-M.; JAFFREZIC-RENAULT, N. Advanced biosensors for detection of pathogens related to livestock and poultry. **Vet Res.** V. 48, n. 11, 2017. DOI:10.1186/s13567-017-0418-5VIVALDI, F.M.; DALLINGER, A.; BININI, A.; POMA, N.; SEMBRANTI, L.; BIAGINI, D.; SALVO, P.; GRECO, F.; FRANCESCO, F.D. Three-Dimensional (3D) Laser-Induced Graphene: Structure, Properties, and Application to Chemical Sensing. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 13, n. 26, p. 30245–30260, 2021. DOI: 10.1021/acsami.1c05614

VITORETI, A.B.F. Diversos receptores de antígenos são produzidos por células do sistema imune. 55 f. Dissertação (Metrado em ciências) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

VIVALDI, F.M.; DALLINGER, A.; BONINI, A.; POMA, N.; SEMBRATINI, L.; BIAGINI, D.; SALVO, P.; GRECO, F.; FRANCESCO, F.D. Three-Dimensional (3D) Laser-Induced Graphene: Structure, Properties, and Application to Chemical Sensing. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 13, p.30245–30260, 2021. DOI:10.1021/acsami.1c05614

WAN, Z.; NGUYEN, N-T.; GAO, Y.; LI, Q. Laser induced graphene for biosensors. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 25, n. e00205, 2020. DOI: 10.1016/j.susmat.2020.e00205

WANG, H.; SHEN, G.; YU, R. Aspects of recent development of immunosensors. *Electrochemical Sensors*. In: ZHANG, X.; JU, H.; WANG, W.

Biosensors and their Biomedical Applications. 1 ed., Academic Press, 2008, p. 237-260. DOI:10.1016/B978-012373738-0.50011-8

WANG, H.; ZHAO, Z.; LIU, P.; GUO, X. Laser-Induced Graphene Based Flexible Electronic Devices. **Biosensors.** v.12, n. 2, p. 55, 2022. DOI: 10.3390/bios12020055

WANG, M-Y.; ZHAO, R.; GAO, L-J.; GAO, X-F.; WANG, D-P.; CAO, J-M. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** V. 10 p.587269, 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.587269

WANG, S. YO, Y.; LI, R.; FENG, G.; WU, Z.; COMPAGNINI, G.; GULINO, A.; FENG, Z.; HU, A. High-performance stacked in-plane supercapacitors and supercapacitor array fabricated by femtosecond laser 3D direct writing on polyimide sheets. **Electrochimica Acta,** v. 241, p. 153–161, 2017. DOI: 10.1016/j.electacta.2017.04.138

XU, T.; XU, L.P; ZHANG, X.; WANG, S. Bioinspired superwetable micropatterns for biosensing. **Chem. Soc. Rev.,** v. 48, n. 12, p. 3153-3165, 2019. DOI: 10.1039/C8CS00915E

YAKOH, A.; PIMPITAK, U.; RENGPIPAT, S.; HIRANKARN, N.; CHAILAPAKUL, O.; CHAIYO, S. Paper-based electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: Detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen. **Biosensors and Bioelectronics,** v. 171, n. 112912, 2021. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112912

YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; AGÜÍR, L.; VILLALONGA, R.; PINGARRÓN, J.M. Biosensors in forensic analysis. A review. *Analytica Chimica Acta.* v.823, p.1-19, 2014. DOI: 10.1016/j.aca.2014.03.011

YANG, Y.; SONG, Y.; BO, X.; MIN, J.; PAK, O, S.; ZHU, L.; WANG, M.; TU, J.; KOGAN, A.; ZHANG, H.; HSIAI, T.K.; LI, Z.; GAO, W. A laser-engraved wearable sensor for sensitive detection of uric acid and tyrosine in sweat. **Nature Biotechnology,** v. 38, p. 217–224, 2020. DOI: 10.1038/s41587-019-0321-x

YASMIN, J.; HAMED, M.R.; CHO, B.K. Biosensors and their Applications in Food Safety: A Review. *Journal of Biosistem Engineering.* v. 41, n. 3, p. 240-254, 2016. DOI: 10.5307/JBE.2016.41.3.240

YE, R.; CHYAN, Y.; ZHANG, J.; LI, Y.; HAN, X.; KITTRELL, C.; TOUR, J.M. Laser-Induced Graphene Formation on Wood. **Advanced Materials**, v. 29, n. 37, p. 1–7, 2017. DOI: 10.1002/adma.201702211

YE, R.; JAMES, D.K.; TOUR, J.M. Laser-Induced Graphene. **Acc. Chem. Res.**, v.51, n. 7, p. 1609–1620, 2018. DOI: 10.1021/acs.accounts.8b00084

ZHANG, D.; LIU, Q. Biosensors and bioelectronics on smartphone for portable biochemical detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 75, p. 273 - 284, 2016. DOI: 10.1016/j.bios.2015.08.037

ZHANG, Y.; LI, N.; XIANG, Y.; WANG, D.; ZHANG, P.; WANG, Y.; LU, S.; XU, R.; ZHAO, H. A flexible non-enzymatic glucose sensor based on copper nanoparticles anchored on laser-induced graphene, **Carbon.**, v. 156, p. 506-513, 2020. DOI: 10.1016/j.carbon.2019.10.006

ZHANG, Y.; ODIWUOR, N.; XIONG, J.; SUN, L.; NYARUABA, R.O.; WEI, H.; TANNER, N.A. Rapid molecular detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) Virus RNA Using Colorimetric LAMP. **medRxiv**. DOI: 10.1101/2020.02.26.20028373

ANEXOS

ANEXO A - Potenciostato microcontrolado portátil para diagnóstico de anticorpos SARS-CoV-2

Desenvolvimento do potenciostato microcontrolado portátil para diagnóstico de anticorpos SARS-CoV-2

Foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa Novonano, pelos discentes pesquisadores Msc. Andrei Borges La Rosa e Msc. Betty Braga Gallo, uma pequena e portátil plataforma microcontrolada (Figura 20) capaz de varrer os potenciais desejados e caracterizar eletroquimicamente os biossensores desenvolvidos, relatado nesse estudo e no artigo intitulado “*Electrochemical biosensor based on laser-induced graphene for COVID-19 diagnosing: rapid and low-cost detection of SARS-CoV-2 biomarker antibodies*” de Oliveira et al. (2022) que relata a pesquisa à comunidade científica, na presença e ausência de anticorpos biomarcadores anti-SARS-CoV-2, com tempo estimado de processamento de análise de 3 min. (OLIVEIRA et al., 2022)

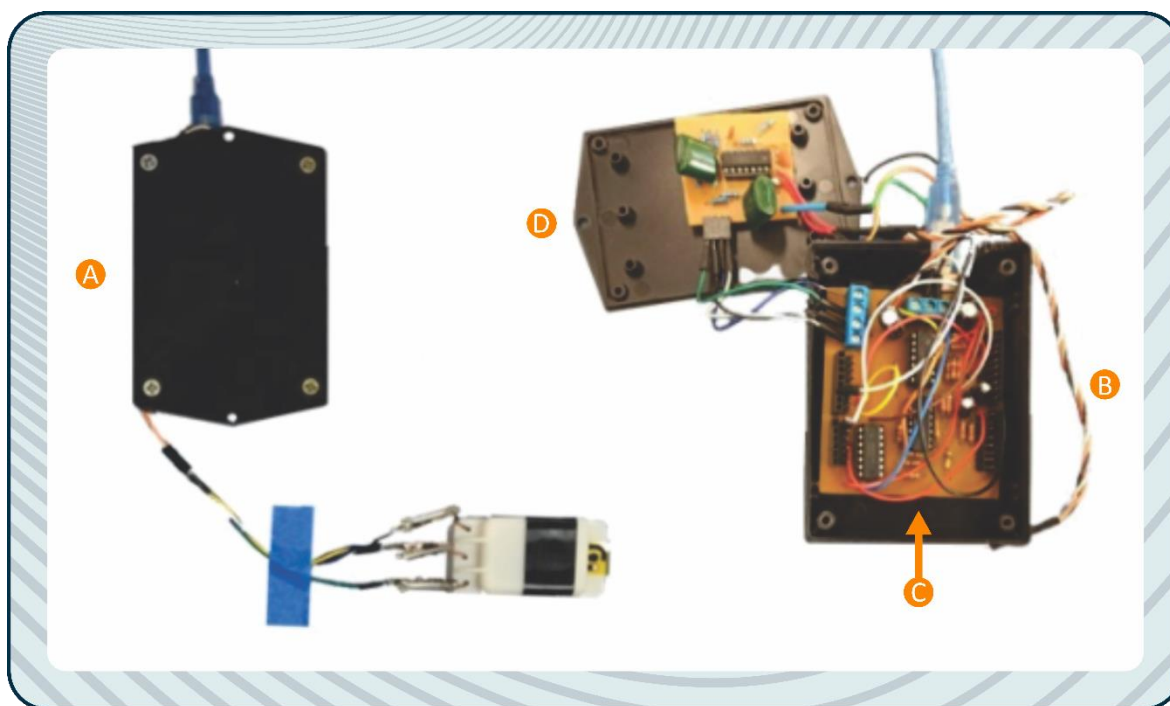


Figura 20: Imagem do potenciostato portátil desenvolvido pelo grupo de pesquisa NOVONANO. (a) Vista inferior do biossensor conectado ao potenciostato portátil; (b) Anti-aliasing do pré-filtro do potenciostato portátil; (c) Plataforma Microcontrolada; (d) filtro anti-aliasing.

Fonte: OLIVEIRA, 2022 adaptado de OLIVEIRA et al., 2022.

O potenciostato portátil realiza aferições de CV e é constituído por duas plataformas principais: uma plataforma microcontrolada e um hardware de engenharia conectado a um computador, conforme ilustrado na Figura 20. O potenciostato é responsável por excitar o biossensor entre os detectores, eletrodo (CE) e eletrodo pseudo-referência (RE). Em seguida, o dispositivo transforma a corrente elétrica que passa pelo eletrodo de trabalho (WE) em uma tensão mensurável, que é registrada para processamento de dados. O computador é responsável por processar os dados, transformando-os em informações úteis para a compreensão do fenômeno envolvido na análise por meio do software MATLAB R2016b. A partir da tensão medida pelo dispositivo, a corrente do biossensor é obtida através de uma equação matemática que representa a modelagem inversa do hardware. A Figura 21 mostra uma representação esquemática detalhada do sistema microcontrolado em diagrama de bloco e mais detalhes sobre o dispositivo pode ser encontrado no trabalho publicado por Oliveira et al. (2022).

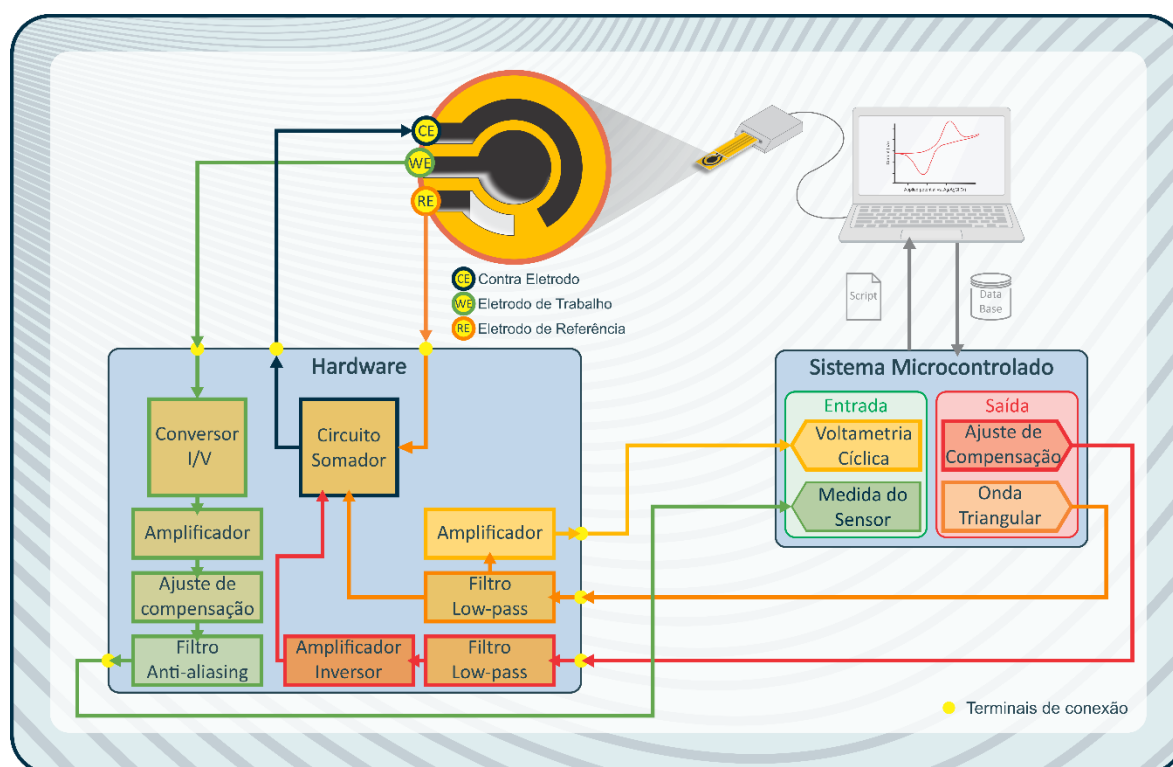


Figura 21: Diagrama de bloco do potenciostato portátil desenvolvido pelo grupo de pesquisa Novonano para caracterizar eletroquimicamente os biossensores na presença e ausência de anticorpos biomarcadores SARS-CoV-2.

Fonte: OLIVEIRA, 2022 adaptado de OLIVEIRA et al., 2022.

Article

Electrochemical Biosensor Based on Laser-Induced Graphene for COVID-19 Diagnosing: Rapid and Low-Cost Detection of SARS-CoV-2 Biomarker Antibodies

Marcely Echeverria Oliveira ¹, Bruno Vasconcellos Lopes ¹, Jéssica Helisa Hautrive Rossato ²,
Guilherme Kurz Maron ^{1,3}, Betty Braga Gallo ¹, Andrei Borges La Rosa ¹, Raphael Dorneles Caldeira Balboni ¹,
Mariliana Luiza Ferreira Alves ³, Marcos Roberto Alves Ferreira ³, Luciano da Silva Pinto ³,
Fabricio Rochedo Conceição ³, Evandro Piva ⁴, Claudio Martin Pereira de Pereira ³, Marcia Tsuyama Escote ²,
and Neftali Lenin Villarreal Carreño ^{1,*}



Citation: Oliveira, M.E.; Lopes, B.V.; Rossato, J.H.H.; Maron, G.K.; Gallo, B.B.; La Rosa, A.B.; Balboni, R.D.C.; Alves, M.L.F.; Ferreira, M.R.A.; da Silva Pinto, L.; et al. Electrochemical Biosensor Based on Laser-Induced Graphene for COVID-19 Diagnosing: Rapid and Low-Cost Detection of SARS-CoV-2 Biomarker Antibodies. *Surfaces* **2022**, *5*, 187–201. <https://doi.org/10.3390/surfaces5010012>

Academic Editors: Marcelo Omaghi Orlandi, Anderson A. Felix and Gaetano Graciosi

Received: 26 November 2021

Accepted: 9 February 2022

Published: 1 March 2022

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



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

- ¹ Graduate Program in Materials Science and Engineering, Technology Development Center, Federal University of Pelotas (UFPEL), Rua Gomes Carneiro 1, Pelotas 96010-00, RS, Brazil; marcely.echeverria@ufpel.edu.br (M.E.O.); lopesbruno13@gmail.com (B.V.L.); g_marcos@hotmail.com (G.K.M.); bettybraga@yahoo.com.br (B.B.G.); andrei.rosa@ufpel.edu.br (A.B.L.R.); raphael.balboni@gmail.com (R.D.C.B.)
- ² Center for Engineering Modeling and Applied Social Science, Federal University of ABC (UFABC), Santo André 09210-580, SP, Brazil; jessica.helisa@ufabc.edu.br (J.H.H.R.); marcia.escote@ufabc.edu.br (M.T.E.)
- ³ Postgraduate Program in Biotechnology, Technology Development Center, Federal University of Pelotas, Av. Eliseu Maciel, Capão do Leão 96010-900, RS, Brazil; luizamariliana@gmail.com (M.L.F.A.); marcosferreiraufpel@gmail.com (M.R.A.F.); ls_pinto@hotmail.com (L.d.S.P.); fabricio.rochedo@ufpel.edu.br (F.R.C.)
- ⁴ Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Rua Gonçalves Chaves 457, Pelotas 96015-560, RS, Brazil; evpiva@gmail.com
- ⁵ Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Lipidomic and Bio-Organic Laboratory, Bioforensic Research Group, Federal University of Pelotas, Eliseu Maciel Av., s/n, Pelotas 96900-010, RS, Brazil; claudiochemistry@gmail.com

* Correspondence: neftali@ufpel.edu.br; Tel.: +55-5332843880

Abstract: The severe acute respiratory syndrome originated by the new coronavirus (SARS-CoV-2) that emerged in late 2019, known to be a highly transmissible and pathogenic disease, has caused the COVID-19 global pandemic outbreak. Thus, diagnostic devices that help epidemiological public safety measures to reduce undetected cases and isolation of infected patients, in addition to significantly help to control the population's immune response to vaccine, are required. To address the negative issues of clinical research, we developed a Diagnostic on a Chip platform based on a disposable electrochemical biosensor containing laser-induced graphene and a protein (SARS-CoV-2 specific antigen) for the detection of SARS-CoV-2 antibodies. The biosensors were produced via direct laser writing using a CO₂ infrared laser cutting machine on commercial polyimide sheets. The presence of specific antibodies reacting with the protein and the K₃[Fe(CN)₆] redox indicator produced characteristic and concentration-dependent electrochemical signals, with mean current values of 9.6757 and 8.1812 μ A for reactive and non-reactive samples, respectively, proving the effectiveness of testing in clinical samples of serum from patients. Thus, the platform is being expanded to be measured in a portable microcontrolled potentiostat to be applied as a fast and reliable monitoring and mapping tool, aiming to assess the vaccinal immune response of the population.

Keywords: electrochemical biosensor; SARS-CoV-2; COVID-19 antibodies; laser-induced graphene

1. Introduction

Severe Acute Respiratory Syndrome originated by the new coronavirus (SARS-CoV-2), which emerged at the end of 2019, is widely known as a highly contagious and pathogenic disease, causing a global pandemic outbreak and threatening the public health in more than

A Flexible Electrochemical Biosensor Based on NdNiO₃ Nanotubes for Ascorbic Acid Detection

Jéssica H. H. Rossato, Marcelly E. Oliveira, Bruno V. Lopes, Betty B. Gallo, Andrei B. La Rosa, Evandro Piva, David Barba, Federico Rosei, Neftali L. V. Carreño, and Marcia T. Escote*

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c03992>

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Flexible and wearable electrochemical biosensors are considered a non-invasive tool for monitoring biological substances, thus attracting attention due to the simple assembly, fast response, ultra-sensitivity, and low cost. Among the substances detected by electrochemical methods, ascorbic acid (AA) stands out, as its presence in the body promotes adequate physiological functions of the immune, central nervous, and circulatory systems, thus preventing and treating various diseases. Herein, this work focuses on the use of nanostructured NdNiO₃ compounds in an alternative flexible biosensor for AA detection by electrochemical sensing. Here, 1D nanostructures of NdNiO₃ were obtained by wet pore filling of a mesoporous aluminum oxide template. To the best of our knowledge, no electrochemical biosensors using NdNiO₃ nanotubes supported onto GO flexible electrodes have been reported for AA or other bioanalyte detection. Next, an electrochemical biosensor for AA was built using a laser-induced graphene (GO) electrode and two different NdNiO₃ (NNO) nanotubes, one with an external diameter of 20 nm (NNO20) and the other with 100 nm (NNO100). The size effect and Ni³⁺/Ni²⁺ ratio influence on the sensing properties can be verified through electrochemical characterization. The GO/NNO20 and GO/NNO100 biosensors presented a detection range of 30 to 1100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, but the minimum detectable limit (3.8 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and sensitivity (0.031 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-2}$) are significantly better for the GO/NNO100 device. These outstanding results make both devices competitive with other AA devices listed in the literature. We also simulated the biosensors' real application and verified that these biosensors could detect AA in synthetic sweat and under application of mechanical deformations. Thus, the GO/NNO biosensors showed a promising alternative to the development of real-time monitoring, POC devices, and flexible wearable electrochemical devices to use in AA detection. Future works should address the potential to detect other bioanalytes.

KEYWORDS: NdNiO₃, nanotubes, laser-induced graphene, electrochemical biosensor, acid ascorbic detection

1. INTRODUCTION

Ascorbic acid (AA), a water-soluble vitamin also known as vitamin C, plays a significant role in the human body's metabolism by supporting proper physiological functions of the immune, central nervous, and circulatory systems.^{1,2} AA acts as an antioxidant that protects the body from oxidative stress and diseases induced by free radicals.^{1,2} This vital function makes the AA determination essential for the prevention and treatment of several illnesses such as the common cold, cancer, mental illness, renal problems, hepatic diseases, and infertility.^{3,4}

Several methods have been developed for AA detection including chromatography, fluorescence analyses, spectrophotometry, capillary electrophoresis, and electrochemical methods.^{5,6} Among these methods, the electrochemical one has attracted more specific attention due to its simplicity, easy use, non-invasiveness, fast response, a wider range of calibration, excellent sensitivity, and low cost.^{1,2,7}

However, the electrochemical detection of AA can be affected by interference species (such as lactic acid, glucose,

dopamine, and uric acid) and contaminations, which results in poor reproducibility and electrode fouling when common electrode materials are used.^{8,9} To overcome these drawbacks, several nanomaterial-based modified electrodes have been developed.^{1,2,8} They have been modified with graphene,^{3,10,11} carbon nanotubes,^{12,13} nanostructured oxides,^{1,4,14} conductive polymers,^{2,6,15} noble metal nanoparticles,^{1,6,16} and composites.²⁰

Rare-earth nickelates (RNiO₃, R = rare-earth lanthanide elements) are a promising candidate to improve the performance of AA detection by electrochemical methods. These oxides (R ≠ La) are strongly correlated quantum materials and present an orthorhombic-distorted perovskite structure with

Received: November 22, 2021

Accepted: February 15, 2022

ANEXO C – Patente depositada durante o período de mestrado.

 BRASIL	Acesso à informação	Participe	Serviços	Legislação	Canais
---	----------------------------	------------------	-----------------	-------------------	---------------

Instituto Nacional da Propriedade Industrial
 Ministério da Economia

Consulta à Base de Dados do INPI

[Início | Ajuda?]

» Consultar por: [Base Patentes](#) | [Finalizar Sessão](#) 1/1

Depósito de pedido nacional de Patente

(21) Nº do Pedido: **BR 10 2021 009120 7**

(22) Data do Depósito: 11/05/2021

(43) Data da Publicação: -

(47) Data da Concessão: -

(71) Nome do Depositante: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS (BR/RS)

Anuidades ?

Petições ?

Serviço	Pgo	Protocolo	Data	Imagens	Cliente	Delivery	Data
Serviços							
206	✓	870210079245	27/08/2021	- - -	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS		-
260	✓	870210046563	24/05/2021	- - -	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS		-
200	✓	870210042811	11/05/2021	- - -	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS		-

Anuidade

Outros

Publicações ?

RPI	Data RPI	Despacho	Img	Complemento do Despacho
2653	09/11/2021	2.1		-
2640	10/08/2021	2.5		Teor da exigência disponível no parecer (pdf) - acesse: Buscaweb no Portal do INPI. Prazo para cumprimento - 30 (Trinta) dias corridos contados do 1º dia útil após essa publicação (não confunda o prazo de 30 dias, com 1 mês ou com 31 dias). Protocole a petição de cumprimento - Guia de Recolhimento da União (GRU) de código 206 (Cumprimento de exigência formal preliminar) + documentos corrigidos, de acordo com o parecer. O pedido com exigência não cumprida ou cumprida fora do prazo não será aceito e terá sua numeração anulada.
2629	25/05/2021	2.10	-	- Número de Protocolo '870210042811' em 11/05/2021 15:08 (WB)

Dados atualizados até **03/05/2022** - Nº da Revista: **2678**

Documentos Publicados

Rua Mayrink Veiga, 9 - Centro - RJ - CEP: 20090-910

