



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODO DE CARBONO EM SUBSTRATO
POLIMÉRICO PARA A DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE SARS-CoV-2**

Aluna: Iara Pereira Soares

Orientadora: Profa. Dra. Vivian Alonso Goulart

Co-Orientadora: Dra. Ana Flávia Oliveira Notário

**UBERLÂNDIA – MG
2022**



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODO DE CARBONO EM SUBSTRATO
POLIMÉRICO PARA A DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE SARS-CoV-2**

Aluna: Iara Pereira Soares

Orientadora: Profa. Dra. Vivian Alonso Goulart

Co-Orientadora: Dra. Ana Flávia Oliveira Notário

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Genética)**

**UBERLÂNDIA - MG
2022**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S676 Soares, Iara Pereira, 1997-
2022 DESENVOLVIMENTO DE ELETRODO DE CARBONO EM SUBSTRATO
POLIMÉRICO PARA A DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE SARS-CoV-2
[recurso eletrônico] / Iara Pereira Soares. - 2022.

Orientadora: Vivian Alonso Goulart.
Coorientadora: Ana Flávia Oliveira Notário.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.109>
Inclui bibliografia.

1. Genética. I. Goulart, Vivian Alonso, 1969-,
(Orient.). II. Notário, Ana Flávia Oliveira, 1991-,
(Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia.
Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico/PPGGB.				
Data:	Dezessete de fevereiro de dois mil e vinte e dois.	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	14:30h
Matrícula do Discente:	11922GBI002				
Nome do Discente:	Iara Pereira Soares				
Título do Trabalho:	Desenvolvimento de eletrodo de carbono em substrato polimérico para a detecção eletroquímica de SARS-CoV-2.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Nanobiotecnologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	INTC em Teranóstica e Nanobiotecnologia (INCT – TeraNano).				

Aos dezessete dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte e dois, às 14:00 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma *Cisco Webex*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Vivian Alonso Goulart (Orientadora), Mayara Ingrid Sousa Lima e Robinson Sabino da Silva. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Vivian Alonso Goulart apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor (a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(A) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a

tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Alonso Goulart, Professor(a) do Magistério Superior**, em 17/02/2022, às 15:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Robinson Sabino da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 17/02/2022, às 16:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mayara Ingrid Sousa Lima, Usuário Externo**, em 18/02/2022, às 11:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3329202** e o código CRC **D1AA67D4**.

Dedico este trabalho a minha família,
que muito me apoiou e incentivou a
realizá-lo.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por guiar o meu caminho, me dando saúde e forças para vencer essa etapa.

Aos meus pais, César e Vânia, por sempre me acompanharem, incentivarem e torcerem pelo meu sucesso, o apoio de vocês sempre foi fundamental! A Aline, minha irmã pelo apoio e carinho sempre.

Ao meu amor, Danilo, que a cada dia se torna mais importante na minha vida, pelo companheirismo e incentivo de todos os dias.

À Isabella, agradeço muito por sua amizade que começou na graduação e se fortaleceu ainda mais no mestrado. Os momentos de risadas e desabafos no apto. 102 sempre serão lembrados com muito carinho. Obrigada por todo incentivo.

Às minhas queridas amigas, Marielle, Ana Beatriz e Ana Paula, pela amizade de longa data e se fazerem sempre presente em minha vida. Obrigada pelo companheirismo e incentivo de sempre.

A todos os professores, técnicos e funcionários do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. Em especial, Lu e Natássia, obrigada pelo cuidado e atenção com o “laboratório do Luiz”.

Às “meninas da eletroquímica”, Ana Flávia e Fabi, obrigada pelo apoio, amizade e orientação. Sem vocês não conseguiria seguir com esse trabalho.

Ao professor Maurício, pela colaboração e participação no desenvolvimento desse trabalho.

À Thamye e Fabio, o trabalho em equipe de vocês foi essencial.

Aos amigos do Laboratório de Nanotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, em especial Luciana, Fabys, Ana, Fabi, Isa, Hebreia, Jessica, Lucas, Emília, Robson. Obrigada pelo acolhimento, palavras de incentivo e principalmente pelos momentos de oração, obrigada por terem sido o apoio no momento mais difícil dessa etapa.

Ao meu eterno orientador, Professor Dr. Luiz Ricardo Goulart, obrigada por me acolher e receber eu seu laboratório. Obrigada por me incentivar a acreditar na ciência e por todas as vezes que disse que tudo daria certo. A sua partida deixou um dor muito grande. Daqui, com muita dedicação, continuaremos batalhando para conquistar tudo aquilo que planejou.

À Professora Dra. Vivian Alonso Goulart, por me receber nessa etapa final do mestrado.

Agradeço também aos órgãos de fomento que permitiram a realização dessa pesquisa: CAPES e CNPq.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para esta minha conquista, muito obrigada!

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	1
2 CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	2
2.1 COVID-19.....	2
2.1.1 Diagnóstico da COVID-19	4
2.2 Biossensores.....	5
2.2.1 Biossensor eletroquímico.....	6
2.2.2 Imunossensores	7
2.2.3 Eletrodos de trabalho.....	8
2.2.4 Eletrodos modificados.....	9
2.2.5 Rodamina 6G.....	11
REFERÊNCIAS.....	13
3 CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO.....	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.1 Materiais	21
2.2 Análises eletroquímicas.....	21
2.3 Modificação dos eletrodos.....	21
2.4 Caracterização por MEV e Espectroscopia Raman.....	22
2.5 Imobilização do anticorpo e detecção da proteína Spike	22
2.6 Detecção da proteína Spike em saliva	23
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
3.1 Padrão de eletrodos.....	23
3.2 Velocidade de varredura	24
3.3 Caracterização MEV e Espectroscopia Raman	29
3.4 Modificação de eletrodos	31
3.5 Imobilização da anti-glicoproteína S em eletrodo modificado e detecção da proteína S33	
3.6 Detecção da proteína S de SARS-CoV 2 em saliva.....	35
4. CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	38

1 APRESENTAÇÃO

A pandemia da COVID-19 surgiu no final do ano de 2019 na província de Hubei, região central da China. É uma doença infecciosa causada pelo coronavírus de síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2). Tal situação levou pesquisadores do mundo todo a iniciarem estudos sobre esse novo tipo de vírus e sua fisiopatologia, possibilitando encontrar formas de diagnóstico, tratamento e prevenção.

Os diagnósticos mais comuns são feitos utilizando duas metodologias principais, RT-PCR (reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase) e ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática). Esses métodos são eficazes para identificar material genético e anticorpos em pacientes infectados, respectivamente, porém demandam o uso de reagentes e equipamentos caros, mão de obra especializada e um tempo elevado para o resultado.

A busca por biossensores para a detecção de patologias é crescente, por apresentarem vantagens como alta sensibilidade e seletividade, baixo custo, fácil manuseio, resposta rápida e baixa necessidade de preparo de amostra biológica, podendo ser utilizados como dispositivos “*point-of-care*”.

Este estudo é dividido em dois capítulos. O primeiro apresenta fundamentação teórica sobre a COVID-19 e o funcionamento dos biossensores e no segundo capítulo é apresentado o artigo do desenvolvimento de um biossensor para o diagnóstico de SARS-CoV-2 em amostra de saliva que será submetido à revista *Sensors and Actuators B: Chemical*.

2 CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 COVID-19

Os primeiros estudos referentes aos coronavírus foram realizados no final de 1960 e anos depois (2003), foi registrado na China um surto de um novo tipo pertencente à mesma família, chamado de SARS-CoV (sigla do inglês que significa coronavírus de síndrome respiratória aguda grave). Cerca de oito mil pessoas foram infectadas e mil mortes registradas. Um segundo surto aconteceu na Arábia Saudita algum tempo depois (2012), e o agente etiológico foi chamado de MERS-CoV (sigla do inglês que significa síndrome respiratória do Oriente Médio). Houveram mortes, mas não passou de um surto e se restringiu à região (RIBEIRO et al., 2020).

No fim de 2019, um novo surto, com origem relatada em uma província chinesa, se disseminou e foi declarado como pandemia em março do ano seguinte. A doença foi chamada de COVID-19 (*Coronavirus disease 2019*), causada pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) (RIBEIRO et al., 2020).

SARS-CoV e MERS-CoV são considerados vírus zoonóticos e têm como hospedeiros morcego, civeta e dromedário. Com base nisso, foi investigado o genoma do SARS-CoV-2 e uma homologia com esses vírus zoonóticos foi encontrada, com maior homologia para os vírus de morcegos. O estudo da função e estrutura de suas proteínas mais codificadas pelo genoma sugerem que o SARS-CoV-2 se originou em morcegos e que dromedários podem ser um hospedeiro intermediário do vírus, devido aos altos títulos de anticorpos neutralizantes específicos e RNA viral encontrados nesses animais (WU et al., 2020).

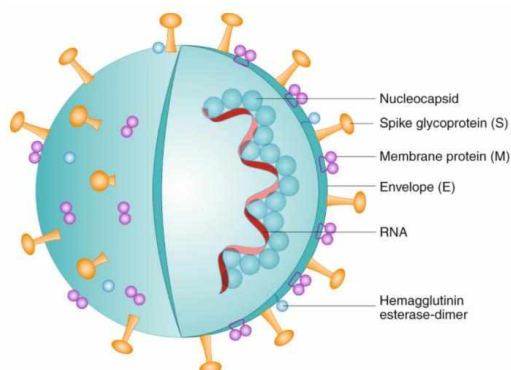
De maneira geral, os vírus entram no hospedeiro através das mucosas da boca, do trato respiratório superior e da conjuntiva. A replicação de um vírus se inicia pela ligação da proteína viral ao receptor da superfície da célula alvo. Após a fixação, o vírus penetra a membrana, e no citoplasma ocorre o desencapsulamento, liberando o material genético, permitindo a síntese das proteínas e formação de

novas partículas. Por fim, o vírus é liberado por diferentes mecanismos, como lise celular, brotamento ou exocitose (RIBEIRO et al., 2020).

Com o avanço das infecções por SARS-Cov-2 entender sua estrutura e o processo de infecção se tornaram necessários para desenvolvimento de diagnóstico, tratamento e prevenção da COVID-19. O vírus SARS-Cov-2 é composto pelo material genético (RNA), nucleocapsídeo e envelope viral. No nucleocapsídeo encontra-se a proteína N (proteína reguladora da replicação viral). Na superfície do envelope viral encontra-se a proteína S (Spike), responsável pela entrada do vírus na célula hospedeira. A proteína S é composta pelas subunidades S1 e S2. A S1 ainda é composta por uma subunidade chamada de RBD (sigla do inglês que significa domínio de ligação ao receptor). Por ser a proteína que fica exposta na superfície do vírus, a proteína S é o principal alvo de investigações para a produção de anticorpos monoclonais e terapias (WALLS et al., 2020).

O SARS-CoV-2 pertence ao gênero dos β -coronavírus e, de acordo com a classificação de Baltimore, fazem parte do grupo IV, seu material genético é o RNA de cadeia simples e de polaridade positiva (+ssRNA) (figura 1). A frequência de erros durante a síntese de RNA pela RNA polimerase é maior do que durante a síntese de DNA. Isso ocorre porque tal enzima não possui o mecanismo de correção de erros presente na DNA polimerase. A ausência desse mecanismo de reparo pode resultar em mais mutações nas sequências genômicas, o que possibilita o surgimento de novas cepas do vírus (POLZ-DACEWICZ, 2019).

Figura 1 – Representação da estrutura do vírus SARS-CoV-2. Este vírus é +ssRNA, envelopado e possui quatro proteínas principais em sua estrutura: spike (S) membrana (M), envelope (E) e nucleocapsídeo (N).



Fonte: (FLORINDO et al., 2020)

2.1.1 Diagnóstico da COVID-19

Atualmente, existem duas formas principais de diagnóstico para a detecção da COVID-19. O diagnóstico considerado padrão ouro é a reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), que usa amostras de *swab* nasal, aspirado traqueal ou lavado broncoalveolar. A especificidade do teste RT-PCR é elevada, mas resultados falso-negativo podem ocorrer, principalmente em pacientes com casos leves, tendo uma carga viral baixa ou até mesmo assintomáticos (PASCARELLA et al., 2020).

O diagnóstico da COVID19 por RT-PCR deve ocorrer até o 7º dia após o início dos sintomas, e estima-se que a soroconversão para SARS-CoV-2 ocorra do 7º ao 14º dia após o início dos sintomas. Sendo assim, a detecção de anticorpos anti-IgM ou IgG é uma ferramenta de diagnóstico adicional e a coleta da amostra deve acontecer após esse período. Os métodos sorológicos usados para a detecção de anticorpos é o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e o ensaio de fluxo lateral. O ELISA é um método bem conhecido e estabelecido para a detecção de anticorpos, que requer infraestrutura laboratorial e profissionais treinados para realizar o teste. Ao passo que o fluxo lateral pode ser usado no local de atendimento, fornece uma resposta confiável e leva apenas alguns minutos para apresentar o resultado (VAN ELSLANDE et al., 2020).

As amostras biológicas geralmente utilizadas para o diagnóstico são sangue (soro) e *swab* nasal. Foi confirmada a existência de partículas virais na saliva, e que esta pode ser usada para o diagnóstico da COVID-19 nos primeiros dias da doença (AZZI et al., 2020). É importante ressaltar que a coleta do *swab* nasal necessita de um profissional, que corre risco de contaminação devido à proximidade com o paciente durante a coleta (SABINO-SILVA; JARDIM; SIQUEIRA, 2020). Diante disso, a utilização de saliva como amostra biológica, permitindo a auto coleta seria uma maneira de amenizar esse risco e o desconforto da coleta, além de eliminar a necessidade de mão de obra do profissional de saúde.

2.2 Biossensores








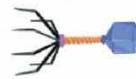


Métodos de detecção rápidos, simples e seletivos são necessários para a obtenção de diagnóstico eficiente de várias doenças. Dentro da rotina laboratorial, no geral, as técnicas requerem mão de obra especializada, alto custo de reagentes e elevado tempo para o resultado. Por isso, existe a busca de métodos bioanalíticos alternativos, como os biossensores, que podem apresentar um resultado rápido, barato, seletivo e sensível, além de não necessitar de preparo de amostras e mão de obra especializada (CESEWSKI; JOHNSON, 2020).

O biossensor é um dispositivo capaz de detectar reações biológicas ou químicas que podem ser mediadas por enzimas, organelas, DNA, RNA, aptâmero, células ou anticorpos. Ao se ligar ao analito de interesse, essas reações geram sinais elétricos, térmicos ou ópticos pela utilização de um transdutor (NAGEL; DELLWEG; GIERASCH, 1992).

Os biossensores podem ser utilizados em aplicações como detecção de fármacos, poluentes, microrganismos patógenos e marcadores em fluidos corporais como sangue, urina e saliva. Os componentes de um biossensor consiste em um analito (amostra de interesse), que se liga em um bioreceptor (material biológico como enzima, DNA, anticorpo com interação específica) e um transdutor (BHALLA et al., 2016).

O reconhecimento entre bioreceptor e analito pode gerar um sinal denominado bioreconhecimento, esse sinal pode ser na forma de calor, luz, alteração de pH, mudança de carga ou massa. O transdutor converte o sinal do bioreconhecimento em um sinal mensurável, que é processado por um sistema eletrônico e apresentado em um display para a interpretação do usuário (BHALLA et al., 2016).

Figura 2 - Componentes e formatos de detecção associados a biossensores eletroquímicos.

Analyte	Biorecognition Element	Transducer	Signal Readout/ Electrochemical Test
Protozoa (cyst)  ~10 μm	Antibodies 	Planar (mm–μm) -metals -ceramics	Potentiometry
Bacteria  ~1 μm	Proteins 	Polymer -conjugated -composite	Amperometry
Mycoplasma  ~200 nm	Oligonucleotides (DNA/RNA) 	Wires, Fibers	Impedance
Virus  ~100 nm	Phages 	Nanostructured -nanoparticles -nanoporosity	Capacitive
	Aptamers 	Arrays -patterned -interdigitated	Conductometry
	MIP/CIP 		
Form Factor		Usability	
Conformal	Flow-based	Single-use	Multiplex
Wearable	Droplet-based	Multiple-use	Smartphone capable
Paper-based	Dip-measure	Wireless	Sample preparation
			Label-based/Label-free

Fonte: (CESEWSKI; JOHNSON, 2020).

2.2.1 Biossensor eletroquímico

O biossensor eletroquímico é baseado em uma reação eletroquímica que ocorre entre bioreceptor e analito na superfície do transdutor, produzindo sinais elétricos detectáveis: tensão, corrente, impedância e capacitância (NARESH; LEE, 2021).

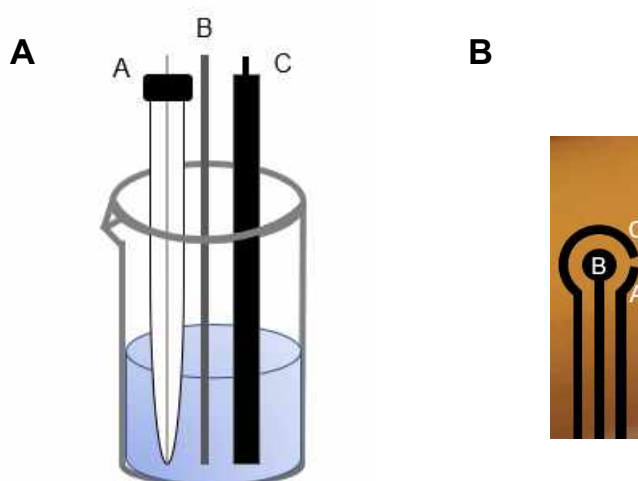
Dependendo do princípio de detecção, os biossensores eletroquímicos podem ser classificados como potenciométricos, amperométricos, condutométricos, voltamétricos, polarográficos, impedimétricos, capacitivos e piezoelétricos (KHAN et al., 2020). Os biossensores amperométricos detectam o analito durante a variação controlada de um potencial aplicado, medindo a corrente. Esses sensores apresentam medições sensíveis e a possibilidade de detecção simultânea de múltiplos analitos (NARESH; LEE, 2021).

O potencial é aplicado sobre o eletrodo, em uma velocidade constante em função do tempo, em uma região que desencadeia reações de oxidação ou redução, cineticamente favoráveis, da espécie eletroativa. A célula eletroquímica onde ocorre a eletrólise contém uma solução com a espécie eletroativa em um

eletrólito suporte onde são imersos os três eletrodos (trabalho, auxiliar e referência) (WANG, 2000).

O eletrodo de trabalho é o eletrodo no qual a reação de interesse ocorre. O contra eletrodo é um material inerte, na qual acontece a reação inversa a que está ocorrendo no eletrodo de trabalho, por isso também é chamado de eletrodo auxiliar (figura 3). E o eletrodo de referência fornece um potencial estável, contra o qual o potencial do eletrodo de trabalho é comparado (WANG, 2006). Se forem utilizados apenas dois eletrodos, são utilizados os eletrodos de trabalho e auxiliar, assim, o eletrodo auxiliar atua como um eletrodo de referência para aplicar um potencial estável e como um eletrodo auxiliar para fechar o circuito elétrico (COSTA-RAMA; FERNÁNDEZ-ABEDUL, 2021).

Figura 3 – Esquema de (A) célula eletroquímica convencional e (B) eletrodo de carbono impresso. Ambos, compostos por três eletrodos: (a) eletrodo de referência, (b) eletrodo de trabalho, (c) contra eletrodo.



Fonte: Própria (2022).

2.2.2 Imunossensores

Ainda dentro da classificação dos biossensores, está aquela relacionada ao receptor, responsável pelo reconhecimento do analito. Os imunossensores, são os sensores que utilizam anticorpos para o biorreconhecimento, baseado na interação antígeno-anticorpo e podem ser chamados de rotulados e não rotulados. Os imunossensores não rotulados detectam a interação antígeno-anticorpo pelas mudanças físicas causadas pela formação do complexo antígeno-anticorpo. Os

imunossensores rotulados, usam uma “molécula repórter” que tem alta afinidade com o alvo e que permitem a detecção do alvo de maneira indireta (NARESH; LEE, 2021).

Detectar diretamente os alvos biológicos de acordo com suas propriedades físicas (tamanho, massa, carga) sem utilizar uma molécula repórter é desafiador, principalmente em concentrações baixas. No entanto, o uso de marcadores fluorescentes ou enzimáticos podem interferir na especificidade dos processos de ligação, aumentando os efeitos de ligação não-específicas. Portanto, a busca por imunossensores não rotulados é fundamental, isso pode ser realizado usando técnicas impedimétricas que medem as transferências de elétrons (ZHANG; MILLER, 2019).

2.2.3 Eletrodos de trabalho

A escolha do material do eletrodo de trabalho é fundamental para a reação eletroquímica, ele deve oferecer uma resposta reprodutível e um comportamento redox na região do elemento em análise. Outros fatores a serem analisados são o custo do material, disponibilidade, janela de potencial, condutividade elétrica e se há toxicidade (WANG, 2006). Os materiais mais comuns são (QIAN et al., 2004), carbono (SOARES et al., 2019) e metais como ouro (CORDEIRO et al., 2019) e platina (CUNHA-SILVA; JULIA ARCOS-MARTINEZ, 2019).

Dentre os materiais citados, o carbono vem se destacando na eletroquímica ao longo dos anos, devido ao seu baixo custo, grande área ativa na superfície, uma ampla janela de potencial de trabalho, alta atividade eletrocatalítica para diferentes sistemas bioquímicos redox-ativos e inércia química. Além disso, o carbono permite a sua funcionalização por meio de métodos covalentes e não covalentes, melhorando ainda mais o seu desempenho eletroquímico (SEQUEIRA, 2020).

Os eletrodos à base de carbono mais comuns são os eletrodos de pasta de carbono, eletrodos de carbono vítreo e eletrodos de carbono impressos. Os eletrodos de carbono impressos surgiram como uma nova tecnologia alternativa à célula eletroquímica convencional com os três eletrodos, usando um sistema de tintas condutoras que permitiram uma plataforma com os três eletrodos em um mesmo plano, produzindo um sistema miniaturizado. Os eletrodos impressos se

destacam por serem eletrodos descartáveis, com portabilidade, além da baixíssima demanda de volume de reagentes, o que o torna uma plataforma ideal para a detecção *point-of-care* (BOUMYA et al., 2021).

Os eletrodos impressos podem ser confeccionados utilizando diferentes superfícies, dentre elas: polímero, plástico, papel, cerâmica e alumina (FRITEA et al., 2021). Os eletrodos impressos que utilizam a cerâmica como base são os mais comuns, no entanto, cresce a busca por materiais que sejam ainda mais baratos, amplamente disponíveis, além de possibilitarem diferentes configurações de design de impressão (COSTA-RAMA; FERNÁNDEZ-ABEDUL, 2021).

Eletrodos condutores flexíveis desempenham um papel importante na fabricação de dispositivos fotoeletrônicos como diodos orgânicos emissores de luz e telas sensíveis ao toque (GUO; REN, 2015). Na eletroquímica, polímeros como polietileno tereftalato (PET) (DE SÁ et al., 2020; MANJAKKAL; SHAKTHIVEL; DAHIYA, 2018), Bio-PET (OLIVEIRA et al., 2020), polipirrol (PPy) (GAO et al., 2021) e poliimida (PI) (PANDHI et al., 2020) são utilizados para a produção de eletrodos flexíveis.

Poliimidias (PI) são polímeros bem conhecidos na engenharia por sua alta resistência a variação de temperaturas, resistência química e à radiação, flexibilidade e excelentes propriedades dielétricas. As PI apresentam a estrutura de imida ao longo da cadeia do polímero, podendo ser uma cadeia linear ou heterocíclica. Além disso, durante a síntese por policondensação ou mecanismos de adição, várias combinações podem ser utilizadas, apresentando diversas relações estrutura-propriedade em uma enorme gama de aplicações. Dentre elas, adesivos, filmes, recobrimentos e membranas, com utilização nas indústrias elétrica, eletrônica, automotiva e aeroespacial (GOUZMAN et al., 2019). Devido às suas propriedades e a infinidade de aplicações, a PI também pode ser usada como uma plataforma robusta e barata para a produção em massa de eletrodos eletroquímicos.

2.2.4 Eletrodos modificados

Para auxiliar a detecção eletroquímica do analito, a superfície do eletrodo de trabalho pode ser modificada, gerando um sensor com novas propriedades.

Assim, é possível obter maior seletividade, sensibilidade, estabilidade, uma janela de potencial maior para ser utilizada, além da resistência a incrustação. Os eletrodos quimicamente modificados são definidos como um material condutor ou semicondutor, modificado com filme monomolecular, multimolecular, iônico ou polimérico; que pode resultar na formação de filmes eletroativos, monocamadas ou revestimentos espessos na superfície do eletrodo (EDWARDS; BERGREN; PORTER, 2007; SHARMA et al., 2018).

A modificação química auxilia na principal etapa de preparação dos eletrodos: a imobilização do elemento de reconhecimento. Dentre os materiais usados para a modificação química de eletrodos, temos os nanomateriais de metal e óxido de metal, nanomateriais de carbono e polímeros.

Os nanomateriais de carbono incluem o grafeno, nanotubos de carbono e nanofibras de carbono. Pela organização da hibridização sp^2 dos átomos de carbono, as nanoestruturas facilitam a transferência de elétrons através do plano, tornando-os excelentes condutores elétricos. Além disso, uma grande variedade de moléculas contendo grupos aromáticos pode ser ligada de forma não covalente ao plano do grafeno puro, ou de forma covalente aos nanotubos de carbono (FENG et al., 2012).

Outro nanomaterial que pode ser utilizado são as nanopartículas de metal, capazes de realizar a transferência de elétrons e podem ser obtidas de várias maneiras: automontagem e encapsulação em polímero são as mais utilizadas, monocamadas e multicamadas de nanomateriais também podem ser preparadas a partir de sais simples dos precursores por meio da eletroquímica (MORRIN, 2019). A forma de obtenção e/ou preparo do material é importante, pois está diretamente relacionada com a viabilidade de construção do biossensor.

Outra forma de funcionalizar os eletrodos é utilizando polímeros, que podem ser condutores ou não. Polipirrol, politiofeno, polianilina e polinaftaleno são exemplos de polímeros condutores e são caracterizados pelas ligações π entre os carbonos conjugados da cadeia polimérica, o que aumenta a condutividade e a rapidez na transferência de elétrons (MORRIN, 2019). Os polímeros podem ainda apresentar grupos funcionais que se ligam a amostra biológica de interesse.

Os polímeros não condutores podem ser produzidos por eletropolimerização e formar um filme ainda mais fino; por isso, geralmente

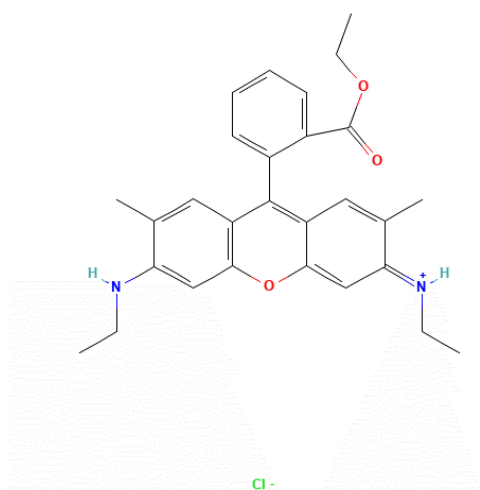
apresentam um tempo de resposta rápida, pois os substratos e produtos difundem facilmente, além de apresentar uma maior seletividade e resistência a incrustação (FRANCO et al., 2008).

2.2.5 Rodamina 6G

Como já mencionado, a modificação da superfície de eletrodos pode se dar de forma química e outros compostos que tenham reação com o carbono podem ser utilizados nesse processo. A rodamina 6G (R6G) é um corante que se caracteriza por uma banda de fluorescência em torno de 560nm (figura 4). É muito utilizada em aplicações como microscopia de fluorescência, espectroscopia de fluorescência, citometria de fluxo (TAHIR; OBEED; SHILTAGH, 2019), Espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS) (ZHANG et al., 2020) e biossensor de ressonância plasmônica de superfície (XUE et al., 2016).

Dentre as várias aplicações da R6G, o estudo de LIU et al. (2020) mostra que a R6G pode se ligar ao grafeno. A ligação é determinada pela interação cátion- π entre o NH^+ da rodamina e elétrons π do grafeno. E em sensores eletroquímicos, RIELLO (2019) apresenta que é possível modificar a superfície de eletrodos de carbono impressos com R6G. Por seu caráter lipofílico, a R6G é eficiente para o bioreconhecimento de biomoléculas que possuem lipídeos (WANG et al., 2005).

Figura 4 - Fórmula estrutural da Rodamina 6G ([9- (2-etoxicarbonilfenil) -6- (etilamino) -2,7-dimetilxanten-3-ilideno] -etilazânio; cloreto).



Fonte: ("Rhodamine 6G | C₂₈H₃₁CIN₂O₃ - PubChem," 2022)

Com a disseminação das infecções por SARS-CoV-2 pesquisadores do mundo todo se empenharam na busca por diagnósticos rápidos para a COVID-19 (PANG et al., 2021; ZHAO et al., 2021). Dentre eles, vários trabalhos com o uso de eletrodos flexíveis (ALAFEEF et al., 2020; AVELINO et al., 2021; KIEW et al., 2021; PERDOMO et al., 2021), devido as suas vantagens relatadas aqui. Assim, nesse estudo o nosso objetivo foi construir um imunossensor fabricado em substrato flexível de poliimida para a detecção do glicoproteína S de SARS-CoV-2.

REFERÊNCIAS

- Alafeef, M. *et al.* (2020) "Rapid, Ultrasensitive, and Quantitative Detection of SARS-CoV-2 Using Antisense Oligonucleotides Directed Electrochemical Biosensor Chip," **ACS Nano**, 14(12). doi:10.1021/acsnano.0c06392.
- Avelino, K.Y.P.S. *et al.* (2021) "Nanostructured sensor platform based on organic polymer conjugated to metallic nanoparticle for the impedimetric detection of SARS-CoV-2 at various stages of viral infection," **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 206. doi:10.1016/j.jpba.2021.114392.
- Azzi, L. *et al.* (2020) "Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2," **Journal of Infection**, 81(1), pp. e45–e50. doi:10.1016/J.JINF.2020.04.005.
- Bhalla, N. *et al.* (2016) "Introduction to biosensors," **Essays in Biochemistry**, 60(1), p. 1. doi:10.1042/EBC20150001.
- Boumya, W. *et al.* (2021) "Chemically modified carbon-based electrodes for the determination of paracetamol in drugs and biological samples," **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 11(2), p. 138. doi:10.1016/J.JPHA.2020.11.003.
- Cesewski, E. and Johnson, B.N. (2020) "Electrochemical biosensors for pathogen detection," **Biosensors and Bioelectronics**, 159, p. 112214. doi:10.1016/J.BIOS.2020.112214.
- Cordeiro, T.A.R. *et al.* (2019) "Label-free electrochemical impedance immunosensor based on modified screen-printed gold electrodes for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis.," **Talanta (Oxford)**, 195, pp. 327–332. doi:10.1016/j.talanta.2018.11.087.
- Costa-Rama, E. and Fernández-Abedul, M.T. (2021) "Paper-Based Screen-Printed Electrodes: A New Generation of Low-Cost Electroanalytical Platforms," **Biosensors**, 11(2). doi:10.3390/BIOS11020051.
- Cunha-Silva, H. and Julia Arcos-Martinez, M. (2019) "Development of a selective chloride sensing platform using a screen-printed platinum electrode," **Talanta**, 195, pp. 771–777. doi:10.1016/J.TALANTA.2018.12.008.
- Edwards, G.A., Bergren, A.J. and Porter, M.D. (2007) "Chemically Modified Electrodes," **Handbook of Electrochemistry**, pp. 295–327. doi:10.1016/B978-044451958-0.50021-5.
- van Elslande, J. *et al.* (2020) "Diagnostic performance of seven rapid IgG/IgM antibody tests and the Euroimmun IgA/IgG ELISA in COVID-19 patients," **Clinical Microbiology and Infection**, 26(8), pp. 1082–1087. doi:10.1016/J.CMI.2020.05.023.
- Feng, X. *et al.* (2012) "Application of novel carbon nanomaterials to electrochemistry," **Progress in Chemistry**, 24(11).

Florindo, H.F. *et al.* (2020) “Immune-mediated approaches against COVID-19,” ***Nature Nanotechnology*** 2020 15:8, 15(8), pp. 630–645. doi:10.1038/s41565-020-0732-3.

Franco, D.L. *et al.* (2008) “Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electric and morphologic properties,” ***Materials Chemistry and Physics***, 107(2–3), pp. 404–409. doi:10.1016/J.MATCHEMPHYS.2007.08.006.

Fritea, L. *et al.* (2021) “Metal Nanoparticles and Carbon-Based Nanomaterials for Improved Performances of Electrochemical (Bio)Sensors with Biomedical Applications,” ***Materials***, 14(21). doi:10.3390/MA14216319.

Gao, F. *et al.* (2021) “All-polymer free-standing electrodes for flexible electrochemical sensors,” ***Sensors and Actuators, B: Chemical***, 334. doi:10.1016/j.snb.2021.129675.

Gouzman, I. *et al.* (2019) “Advances in Polyimide-Based Materials for Space Applications,” ***Advanced Materials***, 31(18), p. 1807738. doi:10.1002/ADMA.201807738.

Guo, C.F. and Ren, Z. (2015) “Flexible transparent conductors based on metal nanowire networks,” ***Materials Today***, 18(3), pp. 143–154. doi:10.1016/J.MATTOD.2014.08.018.

Khan, M.Z.H. *et al.* (2020) “Ultrasensitive detection of pathogenic viruses with electrochemical biosensor: State of the art,” ***Biosensors & Bioelectronics***, 166, p. 112431. doi:10.1016/J.BIOS.2020.112431.

Kiew, L.V. *et al.* (2021) “Development of flexible electrochemical impedance spectroscopy-based biosensing platform for rapid screening of SARS-CoV-2 inhibitors,” ***Biosensors and Bioelectronics***, 183. doi:10.1016/j.bios.2021.113213.

Liu, B. *et al.* (2020) “Cation– π Interaction Assisted Molecule Attachment and Photocarrier Transfer in Rhodamine/Graphene Heterostructures,” ***Advanced Materials Interfaces***, 7(16), p. 2000796. doi:10.1002/ADMI.202000796.

Manjakkal, L., Shakthivel, D. and Dahiya, R. (2018) “Flexible Printed Reference Electrodes for Electrochemical Applications,” ***Advanced Materials Technologies***, 3(12). doi:10.1002/admt.201800252.

Morrin, A. (2019) “Sensors | Chemically Modified Electrodes,” ***Encyclopedia of Analytical Science***, pp. 161–171. doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14546-9.

Nagel, B., Dellweg, H. and Gierasch, L.M. (1992) “Glossary for chemists of terms used in biotechnology,” ***Pure and Applied Chemistry***, 64(1), pp. 143–168. doi:10.1351/PAC199264010143/MACHINEREADABLECITATION/RIS.

Naresh, V. and Lee, N. (2021) “A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors,” ***Sensors (Basel, Switzerland)***, 21(4), pp. 1–35. doi:10.3390/S21041109.

Oliveira, G.C.M. de *et al.* (2020) “Flexible platinum electrodes as electrochemical sensor and immunosensor for Parkinson’s disease biomarkers,” ***Biosensors and Bioelectronics***, 152. doi:10.1016/j.bios.2020.112016.

Pandhi, T. *et al.* (2020) “Fully inkjet-printed multilayered graphene-based flexible electrodes for repeatable electrochemical response,” ***RSC Advances***, 10(63), pp. 38205–38219. doi:10.1039/D0RA04786D.

Pang, S.N. *et al.* (2021) “An effective sars-cov-2 electrochemical biosensor with modifiable dual probes using a modified screen-printed carbon electrode,” ***Micromachines***, 12(10). doi:10.3390/mi12101171.

Pascarella, G. *et al.* (2020) “COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review,” ***Journal of Internal Medicine***, 288(2), pp. 192–206. doi:10.1111/JOIM.13091.

Perdomo, S.A. *et al.* (2021) “SenSARS: A Low-Cost Portable Electrochemical System for Ultra-Sensitive, near Real-Time, Diagnostics of SARS-CoV-2 Infections,” ***IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement***, 70. doi:10.1109/TIM.2021.3119147.

Polz-Dacewicz, M. (2019) “Novel coronavirus – SARS CoV-2,” ***Polish Journal of Public Health***, 129(4). doi:10.2478/pjph-2019-0026.

Qian, W. *et al.* (2004) “An electrochemical study on bovine erythrocyte superoxide dismutase – the novel electrochemical behaviors on mercury electrodes,” ***Journal of Electroanalytical Chemistry***, 568(1–2), pp. 143–149. doi:10.1016/J.JELECHEM.2004.01.014.

Rhodamine 6G | C28H31ClN2O3 - PubChem (2022). Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/13806#section=2D-Structure> (Accessed: January 2, 2022).

Ribeiro, B.V. *et al.* (2020) “Biosensors for the detection of respiratory viruses: A review,” ***Talanta Open***, 2, p. 100007. doi:10.1016/J.TALO.2020.100007.

RIELLO, F.N. (2019) *Desenvolvimento de biossensor eletroquímico funcionalizado com rodamina 6G para detecção de micobactérias.*

de Sá, A.C. *et al.* (2020) “Flexible carbon electrodes for electrochemical detection of bisphenol-a, hydroquinone and catechol in water samples,” ***Chemosensors***, 8(4). doi:10.3390/chemosensors8040103.

Sabino-Silva, R., Jardim, A.C.G. and Siqueira, W.L. (2020) “Coronavirus COVID-19 impacts to dentistry and potential salivary diagnosis,” ***Clinical Oral Investigations*** 2020 24:4, 24(4), pp. 1619–1621. doi:10.1007/S00784-020-03248-X.

Sequeira, C.A.C. (2020) “Carbon Anode in Carbon History,” ***Molecules***, 25(21). doi:10.3390/MOLECULES25214996.

Sharma, S. *et al.* (2018) "A review on electrochemical detection of serotonin based on surface modified electrodes," **Biosensors and Bioelectronics**, 107, pp. 76–93. doi:10.1016/J.BIOS.2018.02.013.

Soares, I.P. *et al.* (2019) "Electrochemical enzymatic biosensor for tyramine based on polymeric matrix derived from 4-mercaptophenylacetic acid," **Journal of Solid State Electrochemistry**, 23(3). doi:10.1007/s10008-019-04204-w.

Tahir, K.J., Obeed, H.H. and Shiltagh, N.M. (2019) "Study optical properties of R6G dye doped in polymer PVA," **Journal of Physics: Conference Series**, 1234(1), p. 012048. doi:10.1088/1742-6596/1234/1/012048.

Walls, A.C. *et al.* (2020) "Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein," **Cell**, 181(2). doi:10.1016/j.cell.2020.02.058.

Wang, J. (2000) **Analytical electrochemistry**. 2nd edn. Wiley-VCH.

Wang, J. (2006) **Analytical electrochemistry**. 3rd edn. Wiley-VCH.

Wang, J.H. *et al.* (2005) "The use of rhodamine 6G and fluorescence microscopy in the evaluation of phospholipid-based polymeric biomaterials," **Journal of Microscopy**, 217(3). doi:10.1111/j.1365-2818.2005.01453.x.

Wu, C. *et al.* (2020) "Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods," **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 10(5). doi:10.1016/j.apsb.2020.02.008.

Xue, T. *et al.* (2016) "R6G molecule induced modulation of the optical properties of reduced graphene oxide nanosheets for use in ultrasensitive SPR sensing," **Scientific Reports**, 6. doi:10.1038/SREP21254.

Zhang, H. and Miller, B.L. (2019) "Immunosensor-based label-free and multiplex detection of influenza viruses: State of the art," **Biosensors and Bioelectronics**, 141, p. 111476. doi:10.1016/J.BIOS.2019.111476.

Zhang, J. *et al.* (2020) "Fabrication of nano/microstructures for SERS substrates using an electrochemical method," **Beilstein Journal of Nanotechnology**, 11, p. 1568. doi:10.3762/BJNANO.11.139.

Zhao, H. *et al.* (2021) "Ultrasensitive supersandwich-type electrochemical sensor for SARS-CoV-2 from the infected COVID-19 patients using a smartphone," **Sensors and Actuators, B: Chemical**, 327. doi:10.1016/j.snb.2020.128899.

3 CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO

Versão do artigo que será submetido em inglês à revista Sensors and Actuators B: Chemical. O periódico é classificado de acordo com WEBQUALIS CB I da CAPES como A1, e o fator de impacto é 7,460.

Imunosensor eletroquímico para detecção de proteína S do vírus SARS-CoV-2 em saliva baseado em eletrodos de grafite

Resumo

Com o avanço da pandemia de COVID-19, surgiu a necessidade de diagnósticos eficientes para a detecção do coronavírus de síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2). O método padrão-ouro para detecção do material genético é a reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR). No entanto, esse método requer vários reagentes, pessoas treinadas para a realização do diagnóstico, além de um alto custo e tempo elevado para o resultado. Aqui, relatamos a produção de um eletrodo de carbono impresso em poliimida para construção de um imunosensor eletroquímico para a detecção rápida do coronavírus de síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2). Ao contrário da maioria das abordagens relatadas que utilizam amostras coletadas com swab nasofaríngeo, aqui usamos amostras de saliva para a detecção de SARS-Cov-2. A saliva é facilmente coletada pelo próprio paciente e não precisa de um processamento para ser utilizada no biossensor. Utilizando eletrodos de carbono produzido em matriz polimérica, estes, foram caracterizados, e a seguir, modificados. Através da modificação do eletrodo com rodamina 6G, foi possível imobilizar o anticorpo (anti-glicoproteína S) e detectar a formação do complexo anticorpo-antígeno em amostras de saliva. A detecção foi realizada através da técnica de voltametria cíclica. Assim, o eletrodo de carbono impresso em poliimida se mostra como uma plataforma promissora para a detecção rápida de SARS-CoV-2

Palavras chave: biossensores; COVID-19; detecção rápida; SARS-CoV-2; eletrodo flexível

Abstract

With the advancement of the COVID-19 pandemic, the need for efficient diagnostics for the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has emerged. The gold standard method for detection of genetic material is the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). However, this method requires several reagents, people trained to perform the diagnosis, in addition to a high cost and high time for the result. Here, we report the production of a polyimide-printed carbon electrode for construction of an electrochemical immunosensor for the rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV-2). Unlike most reported approaches that use samples collected with a nasopharyngeal swab, here we use saliva samples for the detection of SARS-Cov-2. Saliva is easily collected by the patient and does not need processing to be used in the biosensor. Using carbon electrodes produced in a polymeric matrix, these were characterized, and then modified. By modifying the electrode with rhodamine 6G, it was possible to immobilize the antibody (anti-glycoprotein S) and detect the formation of the antibody-antigen complex in saliva samples. The detection was performed using the cyclic voltammetry technique. Thus, the polyimide-printed carbon electrode shows itself as a promising platform for the rapid detection of SARS-CoV-2.

Keywords: biosensors; COVID-19; rapid detection; SARS-CoV-2; flexible electrode

1. INTRODUÇÃO

No fim de 2019, um surto causado por um vírus respiratório foi relatado em uma província chinesa, se disseminou e foi declarado como pandemia em março do ano seguinte. A doença foi chamada de COVID-19 (*Coronavirus disease 2019*), causada pelo coronavírus da síndrome respiratório aguda grave 2 (SARS-CoV-2) [1]. Com o avanço das infecções por SARS-CoV-2, entender sua estrutura e o

processo de infecção se tornaram necessários para o desenvolvimento de diagnóstico, tratamento e prevenção da COVID-19.

O vírus SARS-CoV-2 é composto pelo material genético (RNA), nucleocapsídeo e envelope viral. Na superfície do envelope viral encontra-se a proteína S (Spike), responsável pela entrada do vírus na célula hospedeira. Por ser a proteína que fica exposta à superfície do vírus, a proteína S é o principal alvo de investigações para a produção de anticorpos monoclonais e terapias [2].

O diagnóstico considerado padrão ouro é a reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), que usa amostras de *swab* nasal, aspirado traqueal ou lavado broncoalveolar. É importante ressaltar que a coleta do *swab* nasal necessita de um profissional, que corre risco de contaminação devido à proximidade com o paciente durante a coleta [3]. Este método requer mão de obra especializada, alto custo de reagentes e elevado tempo para o resultado. Por isso, existe a busca de métodos bioanalíticos alternativos, como os biossensores, que podem apresentar um resultado rápido, barato, seletivo e sensível, além de não necessitar de preparo de amostras e mão de obra especializada [4].

Foi confirmada a existência de partículas virais na saliva, e que esta pode ser usada para o diagnóstico da COVID-19 nos primeiros dias da doença [5]. Diante disso, a utilização de saliva como amostra biológica, permitindo a auto coleta seria uma maneira de amenizar esse risco e o desconforto da coleta, além de eliminar a necessidade de mão de obra do profissional de saúde.

Biossensores de carbono vem se destacando na eletroquímica ao longo dos anos, devido ao seu baixo custo, grande área ativa na superfície, uma ampla janela de potencial de trabalho, alta atividade eletrocatalítica para diferentes sistemas bioquímicos redox-ativos e inércia química. Além disso, o carbono permite a sua funcionalização por meio de métodos covalentes e não covalentes, melhorando ainda mais o seu desempenho eletroquímico [6].

Biossensores de carbono podem ser construídos utilizando eletrodos impressos, que podem ser confeccionados utilizando diferentes superfícies, dentre elas: polímero, plástico, papel, cerâmica e alumina [7]. Na eletroquímica, polímeros como polietileno tereftalato (PET) [8,9], Bio-PET [10], polipirrol (PPy) [11] e poliimida (PI) [12] são utilizados para a produção de eletrodos flexíveis que

destacam-se por serem eletrodos descartáveis, com portabilidade, além da baixíssima demanda de volume de reagentes, o que o torna uma plataforma ideal para a detecção *point-of-care* [13].

Poliimidas (PI) são polímeros bem conhecidos na engenharia por sua alta resistência a variação de temperaturas, resistência química e à radiação, flexibilidade e excelentes propriedades dielétricas [14]. Devido às suas propriedades e a infinidade de aplicações, a PI também pode ser usada como uma plataforma robusta e barata para a produção em massa de eletrodos eletroquímicos.

Para auxiliar a detecção eletroquímica do analito, a superfície do eletrodo de trabalho pode ser modificada, gerando um sensor com novas propriedades. A rodamina 6G (R6G) é um corante que se caracteriza por uma banda de fluorescência em torno de 560nm. Dentre as várias aplicações da R6G, o estudo de LIU et al. [15], mostra que a R6G pode se ligar ao grafeno. A ligação é determinada pela interação cátion- π entre o NH^+ da rodamina e elétrons π do grafeno. Por seu caráter lipofílico, a R6G é eficiente para o bioreconhecimento de biomoléculas que possuem lipídeos [16].

Nesse estudo, o objetivo foi desenvolver um sensor capaz detectar a proteína Spike de SARS-CoV-2. Para isso, foi produzido um eletrodo de carbono impresso em poliimida (ECIPI), uma plataforma flexível e barata. Assim, o ECIPI modificado com ácido cítrico e R6G foi utilizado para a detecção rápida da proteína Spike de SARS-CoV-2 em amostra de saliva.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos eletroquímicos foram realizados no Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho do Instituto de Biotecnologia, as Microscopias eletrônicas de varredura (MEV) foram realizadas no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química, e a Espectroscopia Raman no Instituto de Física (INFIS). Todos os laboratórios pertencem à Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

2.1 Materiais

Soluções de ferricianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$) 5,0mM e ferrocianeto de potássio trihidratado ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) 5,0mM em meio de cloreto de potássio (KCl) 0,5M, rodamina 6G ($C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$) 4,16mM, ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) 0,1M foram diluídas em água destilada por osmose reversa.

Para o reconhecimento anticorpo-proteína, foi utilizado o anticorpo de glicoproteína Spike Anti-SARS-CoV-2, obtido comercialmente (Abcam, ab272504) $1 \times 10^{-3} \mu g/\mu l$, e glicoproteína Spike (SARS-CoV-2 Proteína Spike Trimérica (S1+S2), com His-Tag), obtida comercialmente (Startup BIOLINKER) $0,106 \mu g/\mu l$, ambos diluídos em água ultrapura (Direct-Q®).

2.2 Análises eletroquímicas

Os experimentos eletroquímicos foram realizados utilizando o potenciostato EmStat3 Blue e o software PSTrace 5.8, ambos da PalmSens (PalmSens, Compact Electrochemical Interfaces, Holanda).

Os ECIPI foram produzidos utilizando uma máquina Router Laser VS4040P de corte e gravação 50W da marca Visutec. Com o laser realizou-se a gravação em folhas de poliimida produzindo uma plataforma com os três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar) de carbono em um único plano. O eletrodo de trabalho possui um diâmetro de 3,0mm.

2.3 Modificação dos eletrodos

O pré-tratamento é um procedimento que visa aumentar a sensibilidade do sensor, baseado em alguns estudos que utilizam o pré-tratamento [17–20], aqui utilizamos o ácido cítrico para estabilizar a superfície do sensor. $2,0 \mu l$ da solução de ácido cítrico foram gotejados sobre a superfície do eletrodo de trabalho. Após a solução secar, foi aplicada um varredura em solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ em KCl na faixa de potencial de 0,3 à -0,3V à 75mV/s. Os eletrodos foram lavados com água destilada.

Em seguida, 2,0µl da solução de R6G foram gotejados sobre a superfície do eletrodo de trabalho, e após a secagem, cinco ciclos de VC em solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ em KCl foram realizadas para a ligação da R6G. Os eletrodos foram lavados, e uma nova leitura foi realizada em solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ em KCl para comparar os eletrodos modificados com os não modificados.

2.4 Caracterização por MEV e Espectroscopia Raman

Para comparar o ECIPI com o *screen-printed carbon electrode* (SPCE) (Metrohm, Suíça), eles foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando o microscópio Tescan, modelo VEGA 3 LMU e detector por microanálise EDS - marca Oxford, modelo INCA X-ACT.

O ECIPI também foi caracterizado por espectroscopia Raman utilizando o microscópio LabRAM HR Evolution – HORIBA (Software HORIBA Scientific's LabSpec - (LabSpec 6 Spectroscopy Suite) e detector OSD Sincerity).

2.5 Imobilização do anticorpo e detecção da proteína Spike

A partir da caracterização dos eletrodos modificados, 2,0µl da solução de anticorpo de glicoproteína anti-SARS-CoV-2 spike, foram gotejados sobre a superfície dos eletrodos modificados. Após a solução secar, os eletrodos foram lavados com água destilada para retirar o excesso dos anticorpos que não se ligaram. A ligação do anticorpo ao eletrodo modificado foi comprovada pela leitura por VC em solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ em KCl.

Sobre os eletrodos modificados com anticorpo foram gotejados 2,0µl da solução da glicoproteína spike. Após a solução secar, os eletrodos foram lavados com água destilada para retirar o excesso que não se ligou. A detecção da proteína Spike foi realizada pela leitura por VC em solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ em KCl.

2.6 Detecção da proteína Spike em saliva

Foram utilizadas cinco amostras de saliva negativa para SARS-CoV-2, previamente caracterizadas por RT-PCR. A coleta dessas amostras foi aprovada pelo comitê de ética (Número do CAAE: 30848620.1.0000.5704 – Número do parecer: 4.602.081). O pool das amostras foi diluído na proporção 1:10 de água ultrapura. A proteína Spike, na mesma concentração utilizada anteriormente, foi acrescentada à solução de saliva.

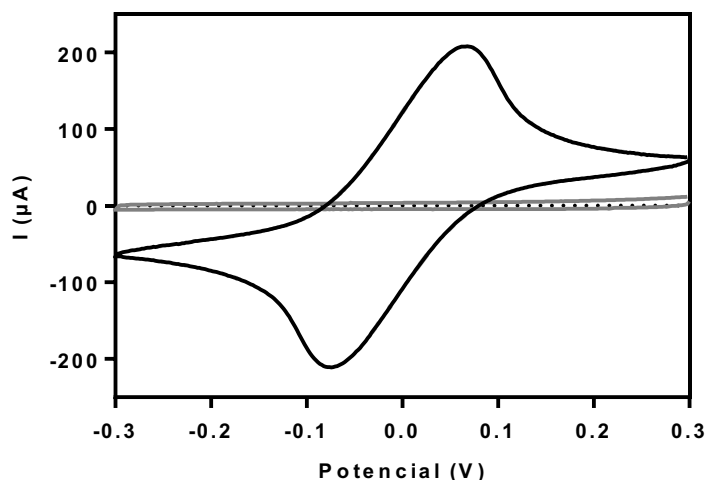
Sobre a superfície do eletrodo modificado com anticorpo foi gotejado 2,0µl da solução de saliva com proteína Spike. Após a solução secar, os eletrodos foram lavados com água destilada para retirar o excesso do que não se ligou. A detecção da proteína Spike em saliva foi realizada pela leitura por VC em solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ em KCl.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Padrão de eletrodos

Os estudos iniciaram comprovando a eficiência do ECIPI produzido pelo nosso grupo de pesquisa. O primeiro estudo consistiu em caracterizá-lo em solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ em KCl (figura 1). A voltametria cíclica (VC) utilizando $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ é muito comum para comprovar a eficiência do eletrodo de trabalho. O perfil eletroquímico é utilizado como um parâmetro de qualidade.

Figura 1 - Voltamogramas cíclicos de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl 0,5M (—) e KCl 0,5M (---) à 75mV/s sobre ECIPI virgem.



Na figura 1(—) é possível observar o voltamograma clássico da solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ em KCl. Além disso, na figura 1(---) é possível observar o voltamograma cíclico do eletrólito suporte (KCl) na mesma faixa de potencial da leitura de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$. A ausência de resposta faradaica indica que não há presença de interferentes no KCl; na água utilizada como solvente da solução e no eletrodo utilizado.

Assim, o comportamento apresentado na figura 1 é o indicativo de que o eletrodo produzido apresenta uma boa resposta eletroquímica para o estudo. Estudos complementares da resposta eletroquímica são realizados no tópico 3.2.

3.2 Velocidade de varredura

A partir dos voltamogramas cíclicos de $K_3Fe(CN)_6$ realizados em ECIPI e SPCE em diferentes velocidades de varredura (figura 2 A e B), vários pontos podem ser analisados para verificar a reversibilidade do processo [21]. Esses dados são analisados na figura 2 C, D, E e F e na tabela 1. O ECIPI desenvolvido foi baseado na geometria do SPCE que é amplamente comercializado e utilizado para produção de biossensores, por isso aqui, fazemos uma comparação dos dois eletrodos.

Figura 2 - Voltamogramas cíclicos de $K_3Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl 0,5M (—) sobre ECIPI (A) e SPCE (B). A velocidade de varredura foi realizada a: 20; 50; 75; 100; 150 e 200mV/s. A partir dos voltamogramas realizados, é apresentado o perfil de corrente de pico *versus* raiz da velocidade de varredura ECIPI (C) e SPCE (D); e perfil de log da corrente de pico *versus* log da velocidade de varredura ECIPI (E) e SPCE (F). (—●—) picos anódicos e (—■—) picos catódicos.

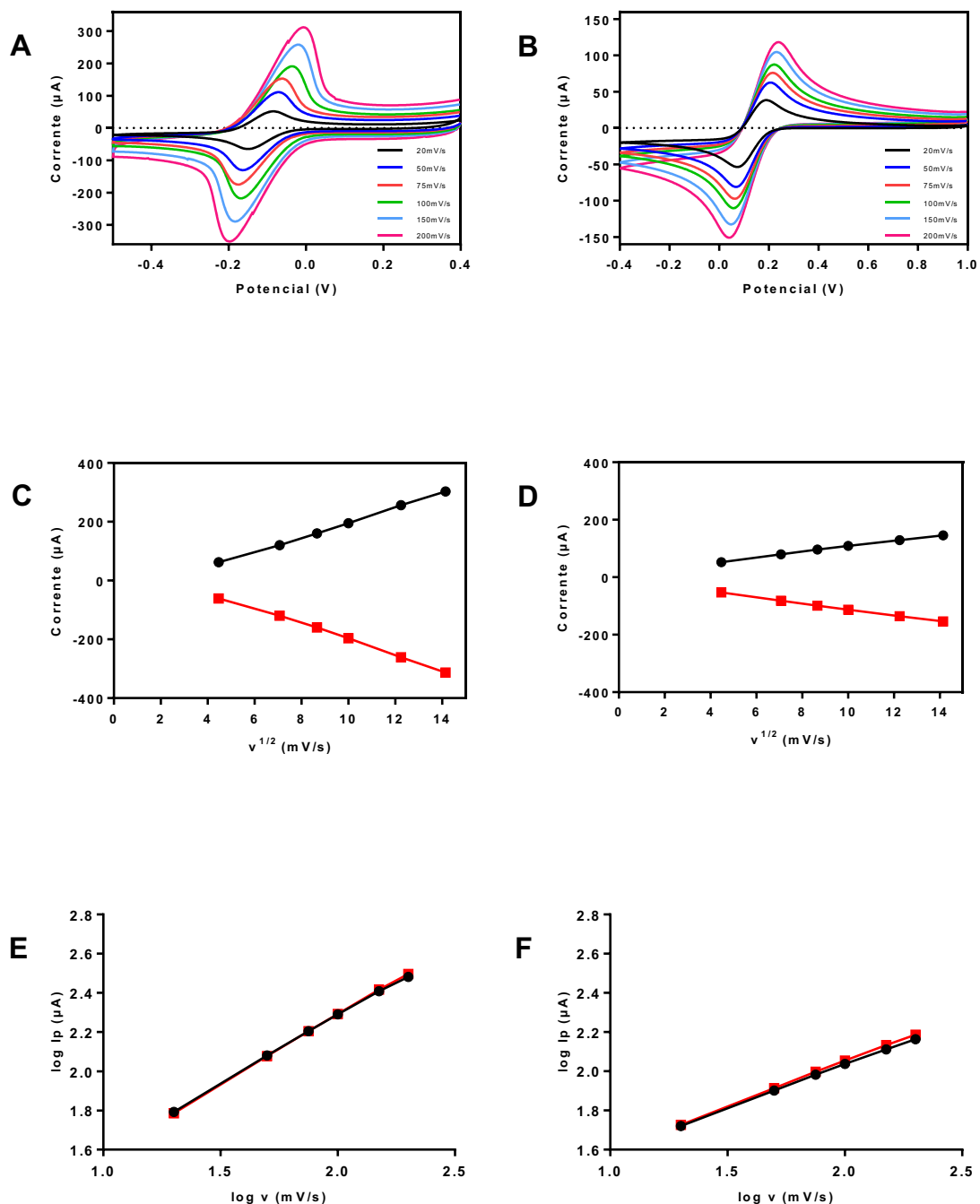


Tabela 1 - Parâmetros obtidos a partir dos resultados apresentados na figura 2.

	ECIPI	SPCE
Regressão linear obtida da figura 2C e 2D (Ipa)	$I(\mu A) = 25,261 v^{1/2}(mV/s) - 55,379$ $R^2 = 0,9987$	$I(\mu A) = 9,627 v^{1/2}(mV/s) + 11,24$ $R^2 = 0,9982$
Regressão linear obtida da figura 2C e 2D (Ipc)	$I(\mu A) = -26,361 v^{1/2}(mV/s) + 63,423$ $R^2 = 0,9974$	$I(\mu A) = -10,4 v^{1/2}(mV/s) - 8,188$ $R^2 = 0,9989$
Regressão linear obtida da figura 2E e 2F (Ipa)	$\text{Log } I(\mu A) = 0,6935 \log v (mV/s) + 0,8976$ $R^2 = 0,9991$	$\text{Log } I(\mu A) = 0,444 \log v (mV/s) + 1,146$ $R^2 = 0,9996$
Regressão linear obtida da figura 2E e 2F (Ipc)	$\text{Log } I(\mu A) = 0,7134 \log v (mV/s) + 0,8624$ $R^2 = 0,9996$	$\text{Log } i(\mu A) = 0,4616 \log v (mV/s) + 1,129$ $R^2 = 0,9997$
Área geométrica	0,071 cm ²	0,126 cm ²
Área efetiva	0,117 cm ²	0,103 cm ²

Os sistemas eletroquímicos podem ser classificados em reversíveis, irreversíveis e quasi-reversíveis [22]. A reversibilidade do sistema analisado por voltametria cíclica considera dois processos que podem ocorrer no eletrodo: transferência difusional de massa do analito e transferência de carga entre analito e eletrodo. É possível observar tanto no ECIPI quanto no SPCE que ocorreu um aumento de corrente à medida que a velocidade de varredura aumenta, esse processo é previsto para sistemas reversíveis (figura 2 A e B). Um processo totalmente reversível obedece a equação de Randles-Sevcik, apresentada na equação 1 [23].

$$I_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad \text{Equação 1}$$

Sendo: I_p = corrente de pico em Amperes; n = número de elétrons; A = área do eletrodo em cm²; D = coeficiente de difusão em cm² * s⁻¹; C = concentração em mol * cm⁻³; v = velocidade de varredura de potencial em V * s⁻¹.

De acordo com a equação 1, a velocidade de varredura altera I_p , é então esperada uma linearidade entre I_p e $v^{1/2}$. A partir da regressão linear da curva de I_p em função de $v^{1/2}$, o coeficiente linear é igual a zero para a varredura anódica e catódica em processos reversíveis. Quando isso não acontece, indicam que processos adsorptivos estão ocorrendo no eletrodo [23].

Como visto na figura 2B, 2C e na tabela 1 tanto ECIPI quanto SPCE apresentam uma linearidade entre I_p e $v^{1/2}$. Os coeficientes lineares de SPCE foram de 9,63 e -10,40 mV/s para a curva de oxidação e redução respectivamente, e de ECIPI foram de 25,26 e -26,36 mV/s.

Outra forma de analisar processos reversíveis, é pela função obtida de log de I_{pa} e I_{pc} versus log da velocidade de varredura. A partir da regressão linear, novamente é analisado o valor do coeficiente linear, valores próximos a 0,5 indicam processos controlados por difusão, valores entre 0,5 e 1,0 são processos de difusão e adsorção, e valores próximos a 1,0 indicam processos controlados por adsorção. É possível observar que em ambos os eletrodos, os coeficientes lineares são próximos de 0,5 (figura 2 E e D, e tabela 1).

Desta maneira, todos os dados indicam a presença de processos reversíveis, e pode-se utilizar a equação 1 para estimar a área efetiva dos eletrodos. Observa-se na tabela 1 que a área efetiva do SPCE é menor do que a área geométrica, e que no ECIPI o contrário acontece, a área efetiva é maior que a área geométrica.

Para indicar a reversibilidade do processo redox, alguns critérios podem ser estudados: ΔE_p , diferença entre E_p e $E_p/2$, e razão entre I_{pa}/I_{pc} . A análise desses dados são apresentados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Parâmetros voltamétricos obtidos da leitura de $K_3Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl 0,5M sobre ECIPI em diferentes velocidades de varredura a partir da Figura 2A.

v (mV/s)	ΔE_p (mV)		I_{pa}/I_{pc}			$E_{pc}-E_{pc/2}$ (mV)	
20	64,00	± 2,00	1,02	±	0,00	57,89	± 0,65
50	96,00	± 3,06	1,01	±	0,00	68,70	± 3,56
75	116,00	± 5,03	1,00	±	0,01	83,31	± 1,57
100	134,00	± 5,03	0,99	±	0,01	88,97	± 1,27
150	168,00	± 4,00	0,98	±	0,01	100,86	± 0,63
200	196,00	± 6,11	0,97	±	0,00	112,91	± 1,53

Tabela 3 – Parâmetros voltamétricos obtidos da leitura de $K_3Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl 0,5M sobre SPCE em diferentes velocidades de varredura a partir da Figura 2B.

v (mV/s)	ΔE_p (mV)		I_{pa}/I_{pc}			$E_{pc}-E_{pc/2}$ (mV)	
20	117,67	± 3,06	0,99	±	0,01	71,57	± 1,42
50	139,67	± 6,43	0,97	±	0,01	78,67	± 2,80
75	155,00	± 3,46	0,97	±	0,01	83,57	± 0,70
100	166,33	± 4,16	0,96	±	0,01	87,20	± 2,14
150	185,67	± 7,02	0,95	±	0,00	93,10	± 2,13
200	201,67	± 7,02	0,95	±	0,00	98,20	± 1,95

Através da equação de Nernst [24] apresentada na equação 2; o valor de ΔE_p pode ser usado para calcular o número de elétrons em um processo reversível. O mínimo de diferença de potencial (ΔE_p) a ser observado é de 59,2mV, para um sistema reversível com transferência de 1,0 elétron.

$$\Delta E_p = |E_{pc} - E_{pa}| = 2,3 \frac{RT}{nF} = \frac{0,0592}{n} V \text{ (a } 25^\circ C) \text{ Equação 2}$$

Sendo: R = constante dos gases em J * K⁻¹ * mol⁻¹; T = temperatura termodinâmica; n = número de elétrons; F = constante de Faraday (95465) em C * mol⁻¹.

Quando existe uma limitação cinética na transferência eletrônica ΔE_p aumenta à medida que a velocidade de varredura também aumenta. Esse comportamento é observado em sistemas quase-irreversíveis onde ocorrem reações de transferência de massa e transferência de carga, que se aproximam do resultado esperado pela equação de Nernst. Geralmente, em menores velocidades se comportam como reversíveis e em maiores se aproxima de irreversíveis. As tabelas 1 e 2 apresentam esse comportamento descrito, onde há o aumento de ΔE_p nos eletrodos ECIPI e SPCE respectivamente à medida que aumenta a velocidade de varredura.

Como a concentração do analito é diretamente proporcional à corrente observada, a divisão da corrente de pico anódica pela corrente de pico catódica igual a 1,0; indica que todo o material inicialmente reduzido foi oxidado na varredura. É possível observar que nos eletrodos ECIPI e SPCE (tabelas 2 e 3), que a razão de corrente anódica e catódica (I_{pa}/I_{pc}) permaneceu próxima a 1,0 e com desvios baixos.

A diferença entre E_p e $E_p/2$ é outra forma de analisar a reversibilidade do processo redox principalmente em processos que consomem a espécie eletrogerada e o pico reverso não é observado. De acordo com a equação 3, espera-se que a diferença entre E_p e $E_p/2$ seja de 56,6 mV para processos totalmente reversíveis.

$$|E_{pc} - E_{pc/2}| = 2,2 \frac{RT}{nF} = \frac{56,6}{n} mV \text{ (a } 25^\circ C) \text{ Equação 3}$$

O comportamento observado em ΔE_p , é novamente observado em $E_p - E_p/2$: em menores velocidades se comportam como reversíveis e em maiores velocidades se distanciam um pouco dos processos reversíveis.

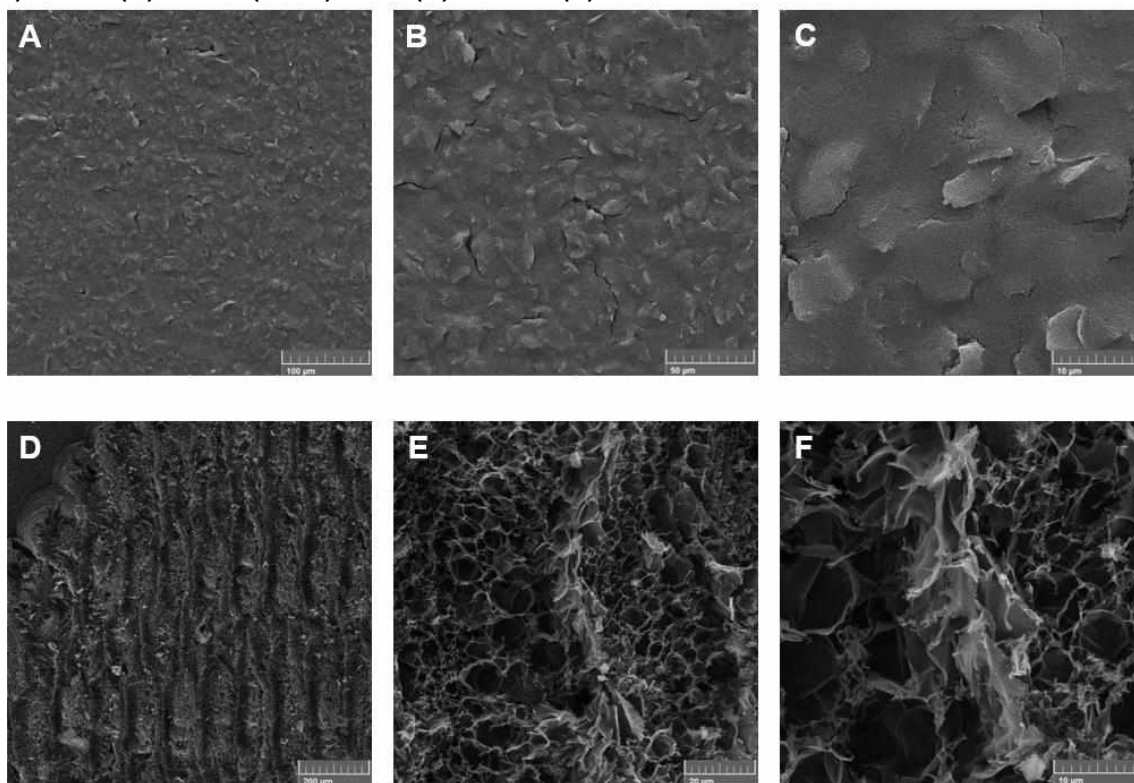
Apesar de alguns valores experimentais serem maiores do que o esperado para processos totalmente reversíveis, o ECIPI pode ser classificado como reversível ou quasi-reversível, produzindo respostas eletroquímicas satisfatórias comparado ao SPCE, e torna-se uma plataforma ideal para o trabalho a ser realizado em velocidade de varredura menor que 100mV/s.

3.3 Caracterização MEV e Espectroscopia Raman

A ampliação 500x e 200x para SPCE (figura 3A) e ECIPI (figura 3D) respectivamente, mostra em termos visuais a diferença entre a superfície dos eletrodos SPCE e ECIPI. O SPCE é plano, em comparação com o ECIPI que apresenta ranhuras derivadas do movimento do laser para a gravação. Com as ampliações de 1000x (figura 3B) e 5000x (figura 3C) é possível visualizar a presença de algumas granulosidades na superfície do SPCE. Já nas ampliações de 2000x (figura 2E) e 5000x (figura F) de ECIPI, mais deformidades são observadas

A análise de MEV corrobora com os valores observados na tabela 1. A área efetiva de ECIPI maior do que a área geométrica pode ser explicada pela deformidade observadas na figura 2F, essas deformidades são obtidas pelo laser que incide no material polimérico, o laser realiza um processo de queima em altas temperaturas para a formação do grafite. Por isso quanto mais rugosa a superfície do eletrodo mais área fica disponível para as reações de oxirredução.

Figura 3 – Imagens obtidas por MEV para: SPCE (**A, B e C**) e ECIPI (**D, E e F**). Ampliação de 500x (**A**); 1000x (**B**); 5000x (**C e F**); 200x (**D**) e 2000x (**E**).



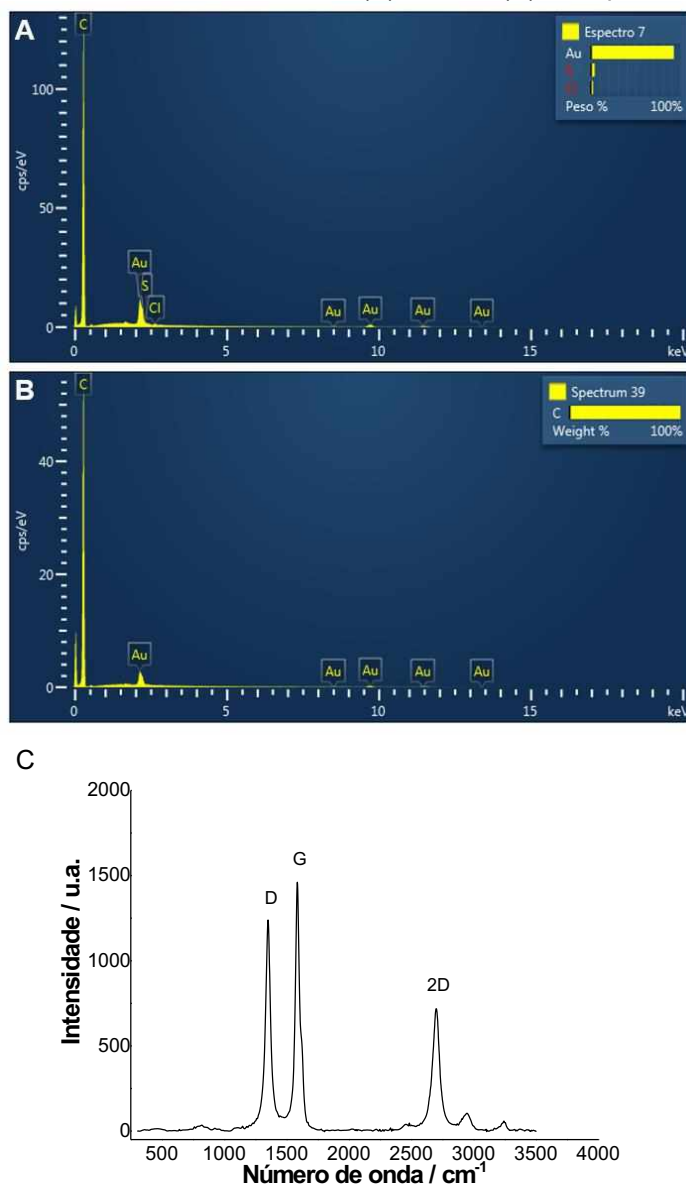
A partir da análise de MEV, foi analisado o espectro de EDS, que indica a presença de outros átomos além de carbono (S e Cl) para o SPCE (Figura 4A). Já no ECIPI, observa-se que o único material presente é o carbono (Figura 4B). Sabendo então da pureza do material formado, fez-se a análise da espectroscopia Raman para o ECIPI.

O espalhamento de Raman provou ser uma ferramenta eficiente para o ECIPI, detectando o conjunto de picos presentes em materiais carbonáceos: D, G, 2D [25]. A figura 4C apresenta o espectro Raman para o material de carbono formado. São observadas duas vibrações principais em 1347 cm^{-1} (banda D) e 1590 cm^{-1} (banda G), que correspondem ao espalhamento de carbono sp^2 desordenados, que induzem defeitos (heteroátomos, vacâncias, bordas) e/ou grupos funcionais oxigenados, e vibrações do domínio de carbono sp^2 ($\text{C}=\text{C}$), respectivamente [26,27].

A razão da intensidade da banda D para a banda G é uma medida de desordem/defeitos [26]. A razão apresentada aqui é de $I_D/I_G = 0,847$. Esse valor

indica uma maior desordem, e conseqüentemente mais sítios ativos presentes na interface do eletrodo.

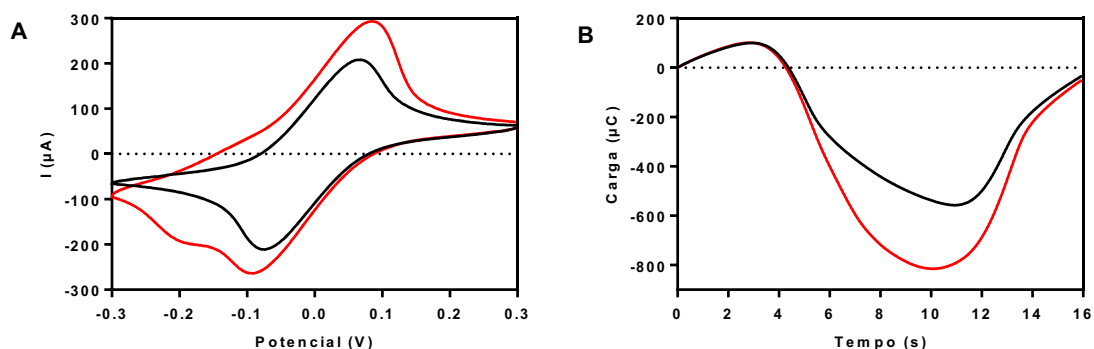
Figura 4 – Espectro de EDS dos eletrodos: SPCE (A) e ECIPI (B). E Espectro Raman de ECIPI (C).



3.4 Modificação de eletrodos

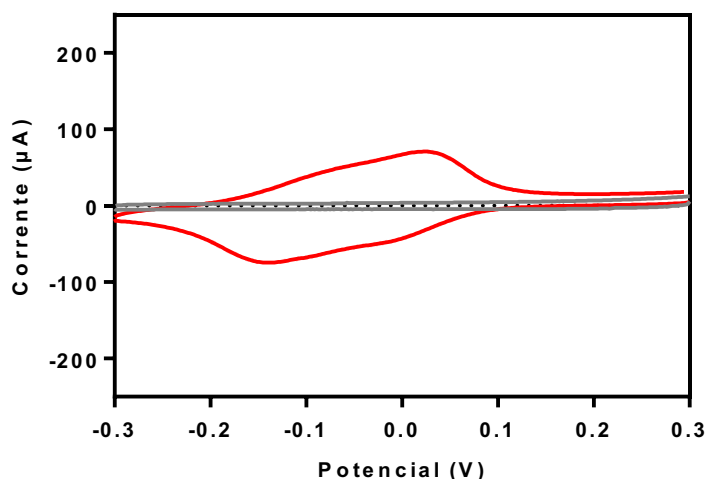
Com a caracterização do ECIPI, o próximo passo foi modificar a superfície do eletrodo de trabalho a fim de auxiliar a imobilização da molécula de biorreconhecimento. Os eletrodos foram modificados com rodamina 6G (figura 5).

Figura 5 – Voltamogramas cíclicos de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl 0,5M à 75mV/s **(A)** e conversão do voltamograma em carga *versus* tempo **(B)**. Sobre: ECIPI (–) virgem e (–) modificado com R6G.



É notável a diferença entre os voltamogramas do eletrodo virgem e modificado. A área da curva de carga *versus* tempo (figura complementar 1) nos mostra que o eletrodo virgem ($3.988,75 \pm 183,14\mu C$) passa a ter uma área maior ($6.073,67 \pm 165,78\mu C$) após a eletrodeposição da R6G, indicando assim a modificação da superfície de trabalho. Sobre os eletrodos modificados, novamente foi realizada a leitura no eletrólito suporte (KCl) (figura 6).

Figura 6 – Voltamogramas cíclicos de KCl 0,5M à 75mV/s. Sobre: ECIPI (–) virgem e (–) modificado com ácido cítrico e R6G.



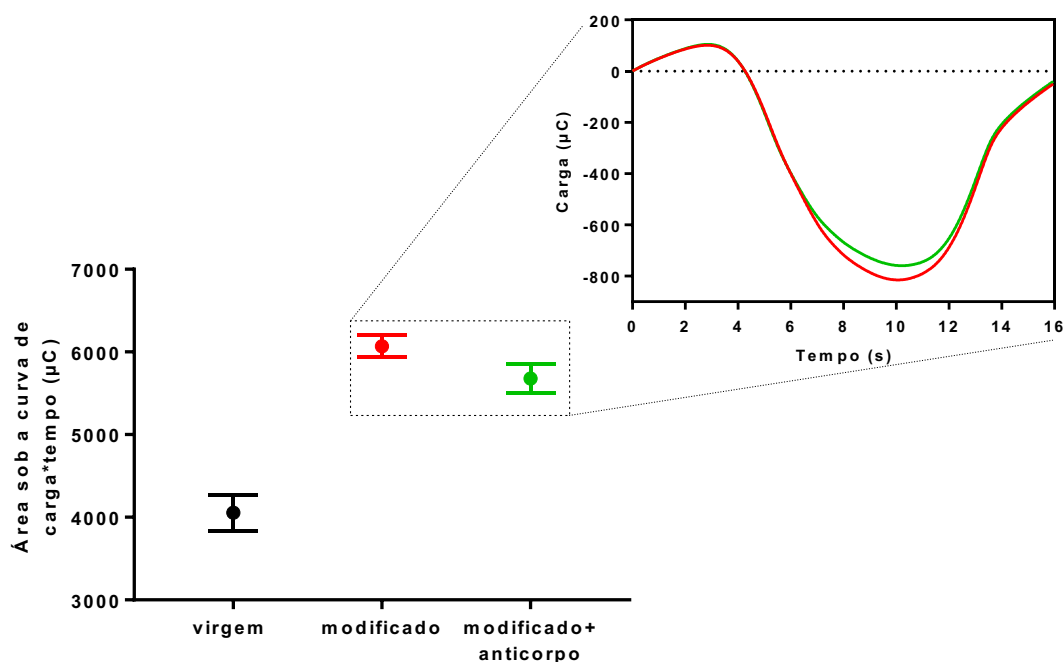
A ausência de resposta faradaica na leitura do eletrólito suporte sobre eletrodos virgens na figura 6 (–) já não é mais observada sobre os eletrodos modificados como mostrado na figura 6 (–). O que corrobora com a leitura do

$K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ realizada na figura 5 (-), indicando a modificação da superfície do eletrodo de trabalho.

3.5 Imobilização da anti-glicoproteína S em eletrodo modificado e detecção da proteína S

A modificação do eletrodo de trabalho permite o principal passo da preparação de um biossensor: a imobilização da molécula de biorreconhecimento. Assim, é apresentado na Figura 7 a ligação do anticorpo (Anti-glicoproteína S de SARS-CoV-2).

Figura 7 – Perfil de área da curva carga *versus* tempo de ECIPI: virgem; modificado e modificado + anticorpo. Dados obtidos a partir da conversão de voltamogramas cíclicos de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl 0,5M à 75mV/s em gráficos de carga *versus* tempo. O *inset* apresenta o gráfico de carga *versus* tempo de ECIPI: modificado (-) e modificado + anticorpo (-).

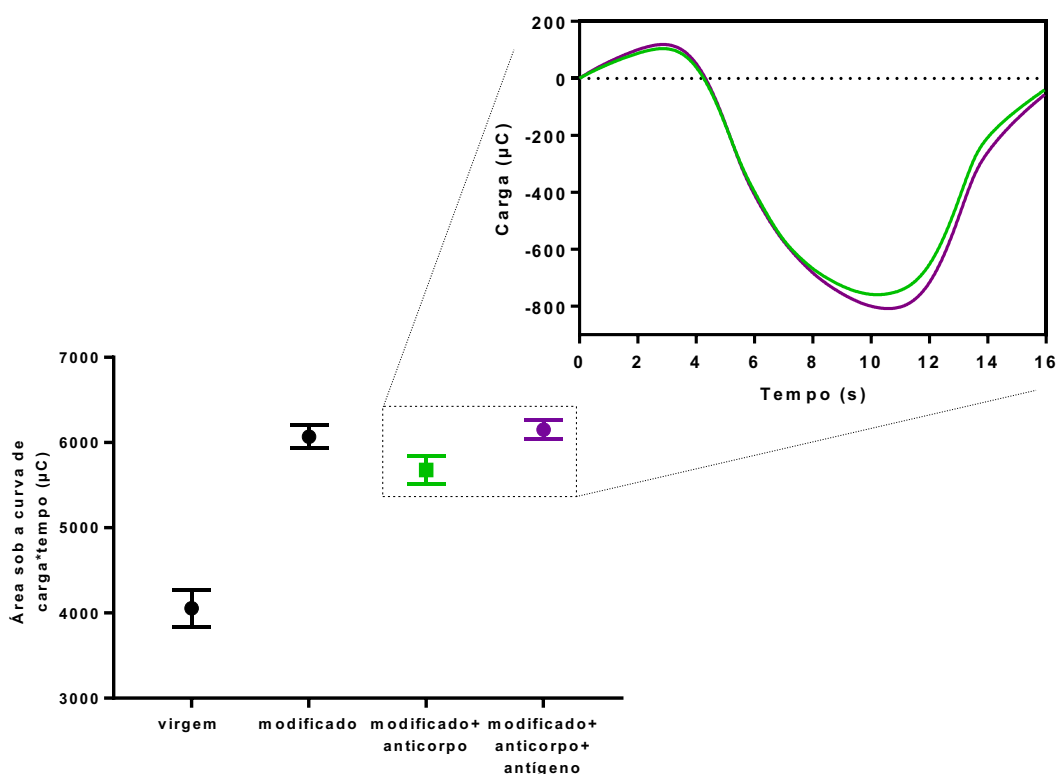


É visível na figura 7 que a área da curva de carga *versus* tempo fica menor ao imobilizar o anticorpo. Área da curva do eletrodo modificado de 6.073,67 \pm 165,78 μC ; cai para 5.678,25 \pm 169,07 μC ao adicionar o anticorpo. No capítulo complementar é apresentado a leitura controle (figura complementar 1), em que o

gráfico da área sob a curva de carga *versus* tempo, demonstra que apenas o eletrodo em que foi adicionado anticorpo, apresenta uma área menor, comprovando assim a sua imobilização.

Sabendo que é possível realizar a imobilização do anticorpo, analisamos a seguir a detecção da proteína S através da formação do complexo antígeno-anticorpo. A figura 8 apresenta o gráfico da área sob a curva de carga *versus* tempo.

Figura 8 – Perfil de área da curva carga *versus* tempo de ECIPI: virgem; modificado; modificado + anticorpo e modificado + anticorpo + antígeno. Dados obtidos a partir da conversão de voltamogramas cíclicos de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl 0,5M à 75mV/s em gráficos de carga *versus* tempo. O *inset* apresenta o gráfico de carga *versus* tempo de ECIPI: modificado + anticorpo (-) e modificado + anticorpo + antígeno (-).



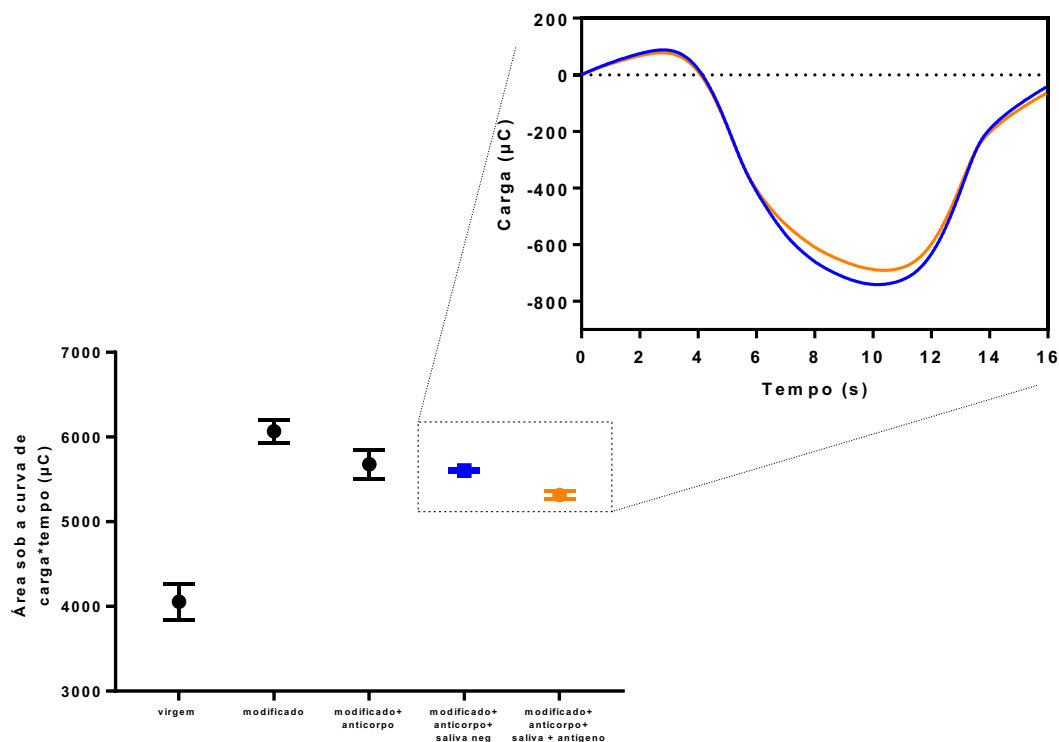
A figura 8 mostra o aumento da área da curva ao acrescentar o antígeno (6.153,00 ± 114,06 µC), comparado a leitura do eletrodo modificado com anticorpo (5.678,25 ± 169,07 µC). Novamente, no capítulo complementar é apresentado a leitura controle (figura complementar 1), em que o gráfico da área sob a curva de carga *versus* tempo, demonstra que apenas nos eletrodos em que foi adicionado

antígeno, a área da curva é maior, sendo assim, é possível afirmar que detectamos a formação do complexo antígeno-anticorpo.

3.6 Detecção da proteína S de SARS-CoV 2 em saliva

A partir da detecção do complexo antígeno-anticorpo, foi analisado se é possível detecção desse mesmo complexo em amostras de saliva, apresentado na figura 9.

Figura 9 – Perfil de área da curva carga *versus* tempo de ECIPI: virgem; modificado; modificado + anticorpo; modificado + anticorpo + saliva negativa e modificado + anticorpo + saliva + antígeno. Dados obtidos a partir da conversão de voltamogramas cíclicos em gráficos de carga *versus* tempo. Voltametria cíclica de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl 0,5M à 75mV/s. O *inset* apresenta o gráfico de carga *versus* tempo de ECIPI: modificado + anticorpo + saliva negativa (–) e modificado + anticorpo + saliva + antígeno (–).



A figura 9 mostra que a área da curva ao acrescentar o antígeno em amostra de saliva é menor ($5.316,25 \pm 46,43 \mu C$), comparado a leitura do eletrodo com saliva negativa ($5.604,33 \pm 19,65 \mu C$), demonstrando assim a detecção da formação do complexo antígeno-anticorpo em amostras de saliva.

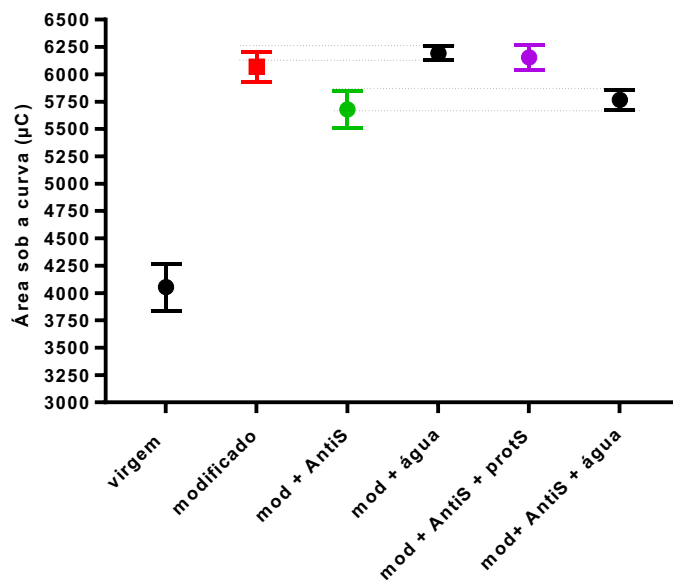
Vários sensores fabricados em substratos flexíveis são relatados na literatura para a detecção de SARS-CoV-2 [28–31]. E até o momento, dois eletrodos fabricados em substrato de poliimida são relatados: um biossensor de efeito de campo (FET) baseado em nanotubos de carbono [32], e um sensor multiplex que detecta antígenos de SARS-CoV-2, anticorpos e proteína C-reativa [33]. Apesar de eficiente, a preparação do sensor multiplex é demorada devido aos longos tempos de incubação das amostras. Sendo assim, o nosso trabalho é o primeiro estudo relatado de sensores eletroquímicos fabricados em substrato de poliimida que demanda pouco tempo de preparação e detecção.

4. CONCLUSÃO

Foi possível nesse trabalho caracterizar o eletrodo gravado em poliimida por técnicas eletroquímicas que demonstram ser um eletrodo satisfatório para a construção de um biossensor comparado ao eletrodo comercial (SPCE). Através da análise de MEV e Raman é possível comprovar que o material formado pela gravação do laser em poliimida trata-se de um grafite de alta pureza.

A rodamina é eficiente na modificação do ECIPI, e através dessa modificação é possível imobilizar o anti-glicoproteína S e promover a detecção da glicoproteína S. Além disso também é possível detectar a formação do complexo anticorpo-proteína em amostras de saliva. Assim, podemos afirmar que o eletrodo proposto é uma plataforma eficiente para a construção de um biossensor par SARS-CoV-2. Mais estudos são necessários para verificar o limite de detecção do sistema proposto.

Figura complementar 1 – Perfil de área da curva carga *versus* tempo de ECIPI: virgem; modificado; modificado + anticorpo; modificado + água; modificado + anticorpo + antígeno e modificado + anticorpo + água. Dados obtidos a partir da conversão de voltamogramas cíclicos de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5,0mM + KCl 0,5M à 75mV/s em gráficos de carga *versus* tempo.



REFERÊNCIAS

- [1] B.V. Ribeiro, T.A.R. Cordeiro, G.R. Oliveira e Freitas, L.F. Ferreira, D.L. Franco, Biosensors for the detection of respiratory viruses: A review, *Talanta Open*. 2 (2020) 100007. <https://doi.org/10.1016/J.TALO.2020.100007>.
- [2] A.C. Walls, Y.J. Park, M.A. Tortorici, A. Wall, A.T. McGuire, D. Veessler, Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein, *Cell*. 181 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>.
- [3] R. Sabino-Silva, A.C.G. Jardim, W.L. Siqueira, Coronavirus COVID-19 impacts to dentistry and potential salivary diagnosis, *Clinical Oral Investigations* 2020 24:4. 24 (2020) 1619–1621. <https://doi.org/10.1007/S00784-020-03248-X>.
- [4] E. Cesewski, B.N. Johnson, Electrochemical biosensors for pathogen detection, *Biosensors and Bioelectronics*. 159 (2020) 112214. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2020.112214>.
- [5] L. Azzi, G. Carcano, F. Gianfagna, P. Grossi, D.D. Gasperina, A. Genoni, M. Fasano, F. Sessa, L. Tettamanti, F. Carinci, V. Maurino, A. Rossi, A. Tagliabue, A. Baj, Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2, *Journal of Infection*. 81 (2020) e45–e50. <https://doi.org/10.1016/J.JINF.2020.04.005>.
- [6] C.A.C. Sequeira, Carbon Anode in Carbon History, *Molecules*. 25 (2020). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25214996>.
- [7] L. Fritea, F. Banica, T.O. Costea, L. Moldovan, L. Dobjanschi, M. Muresan, S. Cavalu, Metal Nanoparticles and Carbon-Based Nanomaterials for Improved Performances of Electrochemical (Bio)Sensors with Biomedical Applications, *Materials*. 14 (2021). <https://doi.org/10.3390/MA14216319>.
- [8] A.C. de Sá, S.C. Barbosa, P.A. Raymundo-Pereira, D. Wilson, F.M. Shimizu, M. Raposo, O.N. Oliveira, Flexible carbon electrodes for electrochemical detection of bisphenol-a, hydroquinone and catechol in water samples, *Chemosensors*. 8 (2020). <https://doi.org/10.3390/chemosensors8040103>.
- [9] L. Manjakkal, D. Shakthivel, R. Dahiya, Flexible Printed Reference Electrodes for Electrochemical Applications, *Advanced Materials Technologies*. 3 (2018). <https://doi.org/10.1002/admt.201800252>.
- [10] G.C.M. de Oliveira, J.H. de S. Carvalho, L.C. Brazaca, N.C.S. Vieira, B.C. Janegitz, Flexible platinum electrodes as electrochemical sensor and immunosensor for Parkinson's disease biomarkers, *Biosensors and Bioelectronics*. 152 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112016>.

- [11] F. Gao, J. Song, Z. Xu, L. Xu, Y. Guo, L. Miao, X. Luo, All-polymer free-standing electrodes for flexible electrochemical sensors, *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 334 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129675>.
- [12] T. Pandhi, C. Cornwell, K. Fujimoto, P. Barnes, J. Cox, H. Xiong, P.H. Davis, H. Subbaraman, J.E. Koehne, D. Estrada, Fully inkjet-printed multilayered graphene-based flexible electrodes for repeatable electrochemical response, *RSC Advances*. 10 (2020) 38205–38219. <https://doi.org/10.1039/D0RA04786D>.
- [13] W. Boumya, N. Taoufik, M. Achak, N. Barka, Chemically modified carbon-based electrodes for the determination of paracetamol in drugs and biological samples, *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 11 (2021) 138. <https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2020.11.003>.
- [14] I. Gouzman, E. Grossman, R. Verker, N. Atar, A. Bolker, N. Eliaz, Advances in Polyimide-Based Materials for Space Applications, *Advanced Materials*. 31 (2019) 1807738. <https://doi.org/10.1002/ADMA.201807738>.
- [15] B. Liu, L.E. López-González, M. Alamri, E.F. Velázquez-Contrera, H. Santacruz-Ortega, J.Z. Wu, Cation– π Interaction Assisted Molecule Attachment and Photocarrier Transfer in Rhodamine/Graphene Heterostructures, *Advanced Materials Interfaces*. 7 (2020) 2000796. <https://doi.org/10.1002/ADMI.202000796>.
- [16] J.H. Wang, J.D. Bartlett, A.C. Dunn, S. Small, S.L. Willis, M.J. Driver, A.L. Lewis, The use of rhodamine 6G and fluorescence microscopy in the evaluation of phospholipid-based polymeric biomaterials, *Journal of Microscopy*. 217 (2005). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2005.01453.x>.
- [17] A. Nezhadali, L. Mehri, R. Shadmehri, Determination of methimazole based on electropolymerized-molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite sensor, *Materials Science and Engineering C*. 85 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.099>.
- [18] C. Pellicer, A. Gomez-Caballero, N. Unceta, M.A. Goicolea, R.J. Barrio, Using a portable device based on a screen-printed sensor modified with a molecularly imprinted polymer for the determination of the insecticide fenitrothion in forest samples, *Analytical Methods*. 2 (2010). <https://doi.org/10.1039/c0ay00329h>.
- [19] A. Vasilescu, S. Andreescu, C. Bala, S.C. Litescu, T. Noguier, J.L. Marty, Screen-printed electrodes with electropolymerized Meldola Blue as versatile detectors in biosensors, in: *Biosensors and Bioelectronics*, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00044-7](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00044-7).
- [20] T. Stéfanne e Silva, I.P. Soares, L.R. Gonçalves Lacerda, T.A. Reis Cordeiro, L.F. Ferreira, D.L. Franco, Electrochemical modification of electrodes with polymers derived from of hydroxybenzoic acid isomers:

Optimized platforms for an alkaline phosphatase biosensor for pesticide detection, *Materials Chemistry and Physics*. 252 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.123221>.

- [21] I.F.; Paiola, A.C.A.; Faria, D.A.G.; Araújo, R.M.; Takeuchi, A.L. Santos, Miniaturização de uma Célula Eletroquímica em um Experimento Didático de Voltametria Cíclica: Economizando Reagentes e Minimizando a Geração de Resíduos Miniaturizing an Electrochemical Cell on a Cyclic Voltammetry Didactic Experiment: Saving Chemicals and Minimizing Waste Generation, *Revista Virtual de Química*. 9 (2017) 953–973.
<https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170062>.
- [22] H. Matsuda, Y. Ayabe, Theoretical Analysis of Polarographic Waves. I. Reduction of Simple Metal Ions, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 28 (1955). <https://doi.org/10.1246/bcsj.28.422>.
- [23] T.R.L.C. Paixão, Measuring Electrochemical Surface Area of Nanomaterials versus the Randles–Ševčík Equation, *ChemElectroChem*. 7 (2020).
<https://doi.org/10.1002/celec.202000633>.
- [24] J.C. de Andrade, Química analítica básica, *Revista Chemkeys*. 2 (2020).
<https://doi.org/10.20396/chemkeys.v2i..14771>.
- [25] H. Budde, N. Nicolás Coca-Lópezlópez, X. Shi, R. Ciesielski, A. Lombardo, D. Yoon, A.C. Ferrari, A. Hartschuh, Raman Radiation Patterns of Graphene, *ACS Nano*. 10 (2016) 54.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.5b06631>.
- [26] Z. Feng, C. Zhang, J. Chen, Y. Wang, X. Jin, R. Zhang, J. Hu, An easy and eco-friendly method to prepare reduced graphene oxide with Fe(OH)₂ for use as a conductive additive for LiFePO₄ cathode materials, *RSC Advances*. 3 (2013). <https://doi.org/10.1039/c3ra22744h>.
- [27] L. Sun, G. Wang, R. Hao, D. Han, S. Cao, Solvothermal fabrication and enhanced visible light photocatalytic activity of Cu₂O-reduced graphene oxide composite microspheres for photodegradation of Rhodamine B, *Applied Surface Science*. 358 (2015) 91–99.
<https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2015.08.128>.
- [28] M. Alafeef, K. Dighe, P. Moitra, D. Pan, Rapid, Ultrasensitive, and Quantitative Detection of SARS-CoV-2 Using Antisense Oligonucleotides Directed Electrochemical Biosensor Chip, *ACS Nano*. 14 (2020).
<https://doi.org/10.1021/acsnano.0c06392>.
- [29] K.Y.P.S. Avelino, G.S. dos Santos, I.A.M. Frías, A.G. Silva-Junior, M.C. Pereira, M.G.R. Pitta, B.C. de Araújo, A. Errachid, M.D.L. Oliveira, C.A.S. Andrade, Nanostructured sensor platform based on organic polymer conjugated to metallic nanoparticle for the impedimetric detection of SARS-CoV-2 at various stages of viral infection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 206 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114392>.

- [30] L.V. Kiew, C.Y. Chang, S.Y. Huang, P.W. Wang, C.H. Heh, C. te Liu, C.H. Cheng, Y.X. Lu, Y.C. Chen, Y.X. Huang, S.Y. Chang, H.Y. Tsai, Y.A. Kung, P.N. Huang, M.H. Hsu, B.F. Leo, Y.Y. Foo, C.H. Su, K.C. Hsu, P.H. Huang, C.J. Ng, A. Kamarulzaman, C.J. Yuan, D. bin Shieh, S.R. Shih, L.Y. Chung, C.C. Chang, Development of flexible electrochemical impedance spectroscopy-based biosensing platform for rapid screening of SARS-CoV-2 inhibitors, *Biosensors and Bioelectronics*. 183 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113213>.
- [31] S.A. Perdomo, V. Ortega, A. Jaramillo-Botero, N. Mancilla, J.H. Mosquera-Delacruz, D.P. Valencia, M. Quimbaya, J.D. Contreras, G.E. Velez, O.A. Loaiza, A. Gomez, J. de La Roche, SenSARS: A Low-Cost Portable Electrochemical System for Ultra-Sensitive, near Real-Time, Diagnostics of SARS-CoV-2 Infections, *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*. 70 (2021). <https://doi.org/10.1109/TIM.2021.3119147>.
- [32] M. Thanishaichelvan, S.N. Surendran, T. Kumanan, U. Sutharsini, P. Ravirajan, R. Valluvan, T. Tharsika, Selective and electronic detection of COVID-19 (Coronavirus) using carbon nanotube field effect transistor-based biosensor: A proof-of-concept study, *Materials Today: Proceedings*. 49 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.05.011>.
- [33] R.M. Torrente-Rodríguez, H. Lukas, J. Tu, J. Min, Y. Yang, C. Xu, H.B. Rossiter, W. Gao, SARS-CoV-2 RapidPlex: A Graphene-Based Multiplexed Telemedicine Platform for Rapid and Low-Cost COVID-19 Diagnosis and Monitoring, *Matter*. 3 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.matt.2020.09.027>.