



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



GENOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE SARS-CoV-2

Aluno: José Augusto Leoncio Gomide

Orientadora: Ana Graci Brito Madurro

Co-Orientador: João Marcos Madurro

**UBERLÂNDIA - MG
2023**



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



GENOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE SARS-CoV-2

Aluno: José Augusto Leoncio Gomide

Orientadora: Ana Graci Brito Madurro

Co-Orientador: João Marcos Madurro

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

**UBERLÂNDIA - MG
2023**



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



Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil

G633g
2023 Gomide, José Augusto Leoncio, 1998-
 Genossensor eletroquímico para detecção de SARS-CoV-2 [recurso
 eletrônico] / José Augusto Leoncio Gomide – 2023.

Orientadora: Ana Graci Brito Madurro.
Coorientador: João Marcos Madurro.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.8097>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Bioquímica I. Madurro, Ana Graci Brito, 1967-, (Orient.). II.
Madurro, João Marcos, 1961-, (Coorient.). III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV.
Título.

CDU:577.1

André Carlos Francisco
Bibliotecário – CRB-6/3408



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico/PPGGB.				
Data:	Vinte e oito de setembro de dois mil e vinte e três	Hora de início:	09:30h	Hora de encerramento:	10:00h
Matrícula do Discente:	12022GBI007				
Nome do Discente:	José Augusto Leoncio Gomide				
Título do Trabalho:	Genosensor eletroquímico para detecção de SARS-CoV-2.				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Nanobiotecnologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de biossensores para detecção de Covid-19.				

Aos vinte e oito dias do mês de setembro de dois mil e vinte e três, às 09:30 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: Ana Graci Brito Madurro (Orientadora), Lucas Franco Ferreira e Lizandra Ferreira de Almeida e Borges. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Ana Graci Brito Madurro 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 **Ana Graci Brito Madurro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/09/2023, às 11:54, 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 **Lizandra Ferreira de Almeida e Borges, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/09/2023, às 14:20, 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 **Lucas Franco Ferreira, Usuário Externo**, em 28/09/2023, às 15:20, 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 **4800312** e o código CRC **FCADE249**.



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



GENOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE SARS-CoV-2

ALUNO: José Augusto Leoncio Gomide

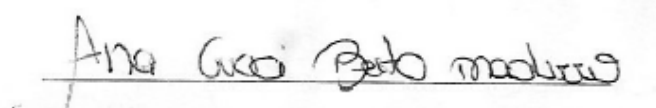
COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Profa Dra. Ana Graci Brito Madurro
(Orientadora)

Examinadores: Membro Externo: Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira (UFVJM - lucas.franco@ict.ufvjm.edu.br)
Membro Interno: Profa. Dra. Lizandra Ferreira de Almeida e Borges (ICBIM-UFU - lizandraborjes@ufu.br)
Suplente Membro Externo: Dra. Ana Cristina Honorato de Castro (UFABC - castro.achonorato@gmail.com)
Suplente Membro Interno: Diego Leoni Franco (IQ-UFU - diegoleoni@ufu.br)

Data da Defesa: 28 /09 / 2023

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas do PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas


Ana Graci Brito Madurro



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



*“Someone's daughter, someone's mother
Holds your hand through plastic now
'(...) I think she's crashing out'
And some things you just can't speak about
Only twenty minutes to sleep
But you dream of some epiphany
Just one single glimpse of relief
To make some sense of what you've seen”*
Epiphany - Taylor Swift

Este trabalho é dedicado a todos os profissionais da saúde que lutaram bravamente tratando de enfermos afetados pela COVID-19 assim como todas as vítimas da negligência estatal do governo vigente durante a pandemia



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Professora Doutora Ana Graci Brito Madurro e ao Professor Doutor João Marcos Madurro por terem me recebido em seu grupo de pesquisa com tanto acolhimento, confiança e apoio. Além disso, agradeço a todos os colegas de laboratório que me apoiaram neste trabalho, em especial, à Doutora Anna Clara Rios Moço, ao Doutor José Manuel Flauzino, ao doutorando Sandro Henrique Ribeiro, à Mestre Natália Parra e ao Leonardo Toshio Rodrigues Tanaka, pessoas com quais aprendi importantes lições e compartilhei momentos de grande felicidade.

Agradeço as colaborações feitas com a Professora Doutora Renata Cristina de Lima, a Doutora Márcia Maria Costa Nunes Soares e o Professor Doutor Ronaldo Júnio de Oliveira, sem as quais, este trabalho não poderia ser realizado. Além disso, agradeço à coordenação do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica (PPGGB), assim como o Instituto de Biotecnologia (IBTEC) excelente pelo serviço prestado.

Agradeço às agências nacionais de fomento em educação e pesquisa: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Fundação de Apoio Universitário (FAU); cujo trabalho faz-se essencial para o desenvolvimento científico e tecnológico do Brasil.

Agradeço à minha família e amigos que sempre estiveram presentes nos momentos mais difíceis que me encontrei e me ampararam com amor e acolhimento, além de me ensinarem valores que moldaram meu atual caráter.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



ÍNDICE

APRESENTAÇÃO	1
CAPÍTULO 01 – Fundamentação teórica	2
1 COVID-19	2
2 BIOSSENSORES	12
2.1 Definição de biossensores	12
2.2 Classificação de biossensores	14
2.2.1 Bioreceptor	15
2.2.1.1 Genossensor	15
2.2.1.2 Imunossensor	16
2.2.1.3 Sensores enzimáticos	17
2.2.1.4 Sensor baseado em peptídeos sintéticos	17
2.2.1.5 Sensor baseado em células inteiras	18
2.2.2 Transdutores	18
2.2.2.1 Ópticos	18
2.2.2.2 Baseados em massa	19
2.2.2.3 Eletroquímicos	20
2.2.2.4 Térmicos	27
3 NANOMATERIAIS E SUA APLICAÇÃO EM BIOSSENSORES	27
4 REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO 02 – Artigo de caráter experimental	42
1. Introduction	44
2. Materials and methods	46
2.1. Chemicals	46
2.2. Apparatus	46
2.3. Preparation of Ag-doped ZnO nanoparticles (ZnOAgNP)	47
2.4. Preparation and characterization of the carbon electrode and its modifications	47

2.5.	Genosensor construction and electrochemical detection.....	48
2.6.	SARS-CoV-2 calibration curve development and stability evaluation in real spiked samples.....	49
2.7.	SARS-CoV-2 gRNA extraction and analysis of patient samples.....	50
2.8.	Computational protocol.....	50
3.	Results.....	51
3.1.	Electrodes and its modification with ZnOAgNP characterization	51
3.2.	Electrochemical target detection and complementary analisys	54
3.3.	Calibration curve construction, SARS-CoV-2 gRNA detection and stability analysis	57
4.	Discussion	60
5.	Conclusion.....	64
6.	Acknowledgments	65
7.	References	65



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 01 – Fundamentação teórica

- Figura 1** – Figura ilustrativa demonstrando as proteínas estruturais que compõem o SARS-CoV-2. 4
- Figura 2** – Esquema representativo da infecção celular causada pelo SARS-CoV-2. 6
- Figura 3** – Esquema representativo demonstrando os métodos de diagnóstico moleculares para COVID-19. 9
- Figura 4** – Representação do método sorológico para anticorpos anti-SARS-CoV-2 pelo método de ELISA. 10
- Figura 5** – Representação dos estágios da COVID-19 de acordo com a evolução dos sintomas e seus possíveis métodos de diagnóstico. 11
- Figura 6** – Componentes do biossensor. 13
- Figura 7** – Classificação dos biossensores. 15
- Figura 8** – Sistema de três compartimentos de uma célula eletroquímica clássica (A) e em eletrodos impressos (B). 21
- Figura 9** – Voltametria cíclica e comportamento do potencial com o tempo (A) e com a corrente (B). 22
- Figura 10** – Formas da onda, em (A) e (C), e voltamogramas, em (B) e (D), da voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada, respectivamente. 23
- Figura 11** – A) Reprodução da interface do eletrodo com a solução e a representação do circuito equivalente do sistema. 26
- Figura 12** – Representação de uma folha de grafeno, sendo precursora de fulereno 0D, nanotubos 1D e grafite 3D. 28
- Figura 13** – Representação das possíveis formas de nanotubos de carbono A) aos ângulos da folha de grafeno e B) em relação ao número de tubos concêntricos. 29
- Figura 14** – Representação dos estados síntese bottom-up para AuNP's. 30
- Figura 15** – Representação dos métodos de síntese de nanopartículas de óxido de zinco dopadas com prata. 31

CAPÍTULO 02 – Artigo de caráter experimental

- Figure 1.** Illustration of the construction of the SARS-CoV-2 biosensor. 49

Figure 2. Electrode and platform characterization.	53
Figure 3. Electrochemical complementary detection and its complementations.	56
Figure 4. Calibration curve construction, SARS-CoV-2 gRNA detection and stability analysis.	59



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 01 – Fundamentação teórica

Tabela 01 – Interpretação de resultados para COVID-19. 12

CAPÍTULO 02 – Artigo de caráter experimental

Table 1. SARS-CoV-2 electrochemical biosensors based on zinc nanomaterials surface modifications. 64



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



APRESENTAÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, até agosto de 2023, sete milhões de mortes globais foram causadas pelo SARS-CoV-2, causador da COVID-19, a doença provoca sintomas como tosse, hiposmia, congestão nasal, hipogeusia e febre. O vírus infecta principalmente as células respiratórias, desencadeando respostas inflamatórias e afetando diversos sistemas do corpo, sendo os fatores idade e presença de comorbidades agravantes da doença. O diagnóstico padrão-ouro para a detecção do SARS-CoV-2 é a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), mas possui limitações, como alto custo, necessidade de mão de obra aplicada para realização de diagnóstico e longo tempo para apresentação de diagnóstico. Os genossensores eletroquímicos oferecem alternativas econômicas, aproveitando vantagens como a seletividade, baixo custo e tempo de resposta rápido. Nesse sentido, esse trabalho mostra o uso de um novo nanomaterial de óxido de zinco dopado com prata para a modificação da superfície do eletrodo impresso de carbono grafite e brometo de etídio como indicador eletroquímico, para o desenvolvimento de genossensor para o diagnóstico da COVID-19. O genossensor mostrou faixa linear de resposta de 2×10^{-5} mol/l a 2×10^{-9} mol/l, limite de detecção de 13 pmol/L, especificidade e seletividade usando swab nasal enriquecido com RNA genômico do SARS COV-2. O tempo de prateleira foi de 60 dias, após esse período o genossensor manteve 91% de resposta, destacando-se por apresentar maior estabilidade em função do tempo, até o presente momento.

Palavras-chave: COVID-19; eletrodo modificado; genossensor; nanomaterial; SARS; ZnOAgNP.

CAPÍTULO 01 – Fundamentação teórica

1 COVID-19

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), foram registradas, aproximadamente, sete milhões de mortes por infecção por COVID-19 globalmente até agosto de 2023, sendo dessas, um milhão e cem mil ocorridas nos Estados Unidos da América (EUA), 700 mil no território brasileiro e 531 mil na Índia (“Painel Coronavírus”, [s.d.]; “WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)”, [s.d.]). Os primeiros casos ocorreram em Wuhan, província de Hubei na China, onde foram relatados diversos casos de “pneumonia” no final do ano de 2019, em dezembro, e somente no dia sete de janeiro de 2020, o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2, em inglês: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) foi identificado. A partir disso, foram notificados casos e mortes em outros países e continentes, levando a declaração de estado pandêmico da COVID-19, nome dado a doença causada pelo SARS-CoV-2 (“Histórico da pandemia de COVID-19 - Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS)/OMS”, [s.d.]; “International Pharmaceutical Federation - Public health emergencies”, [s.d.]). Os primeiros relatos de infecção pela doença no Brasil são de fevereiro de 2020, mês em que o declarou Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN), e somente a partir de 2021, ano em que o país atinge a segunda posição de óbitos no ranking mundial, inicia-se o programa de vacinação com a aprovação uso emergencial da CoronaVac pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), tendo aplicado mais de 500 mil doses de imunizantes até junho de 2023 (“Brazil”, [s.d.]; “INSTITUTO BUTANTAN”, [s.d.]; CAVALCANTE *et al.*, 2020).

Apesar da infecção por SARS-CoV-2 poder não causar sintomas, estudos de casos demonstram que a maioria dos pacientes apresenta tosse, hiposmia (perda de parcial ou total do olfato), congestão nasal, hipogeusia (perda do paladar) e febre (CAVALCANTE *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2020). Dos casos sintomáticos, 5% dos pacientes apresentam-se em estado crítico, ou seja, insuficiência respiratória grave, devido à baixa concentração de oxigênio no sangue (condição denominada hipoxemia), sendo necessário o uso de ventilação mecânica ou choque séptico, podendo ser letal principalmente em casos de comorbidade e faixa etária (DIAS *et al.*, 2020). Mesmo a baixa porcentagem de doença crítica, o fato da alta capacidade

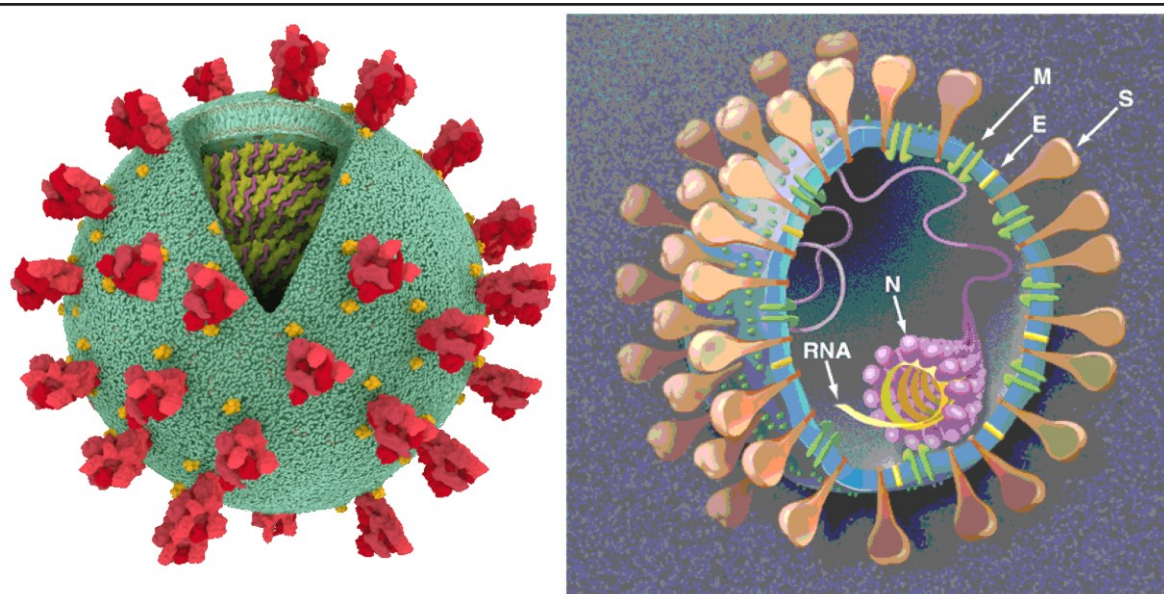
de transmissão do vírus foi capaz de gerar um estado de sobrecarga e calamidade nos sistemas de saúde mundiais e nacionais, como em Manaus, no mês de janeiro de 2021 (“INSTITUTO BUTANTAN”, [s.d.]).

Além disso, mesmo em infecções assintomáticas ou no período pré-sintomático, pode ocorrer a transmissão do vírus (RASMUSSEN; POPESCU, 2021), a qual ocorre a partir de gotículas de fluidos respiratórios e aerossóis emitidos pela cavidade oral de pacientes infectados (DROZDZIK; DROZDZIK, 2022). De modo a reduzir os riscos de propagação, foram indicados o distanciamento social e o uso de equipamentos de proteção individual (EPI) devidos, além da higienização de superfícies e objetos com desinfetantes (AGUIAR *et al.*, 2020; HUSSEN; ALEMU, 2021).

Os coronavírus (CoVs) pertencem a família *Coronaviridae* sendo vírus envelopados de RNA de fita simples de sentido positivo (+ssRNA), e recebem essa denominação devido à presença de glicoproteínas spike em seus envelopes cuja aparência se assemelham a de uma coroa e que são reconhecidas pelo receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2, em inglês: the angiotensin-converting enzyme 2). Tal família se subdivide em quatro gêneros: *Alfacoronavirus* (α -cov), *betacoronavirus* (β -cov), *deltacoronavirus* (δ -cov) e *gamacoronavirus* (γ -cov). O SARS-CoV-2 encontra-se no gênero β -cov e possui maior patogenicidade em comparação com outros coronavírus capazes de causar infecções em seres humanos, como o coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV, em inglês: Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus); coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV, em inglês: Severe acute respiratory syndrome coronavirus) (NAQVI *et al.*, 2020).

O SARS-CoV-2 apresenta cinco principais proteínas estruturais: proteínas spike (S), de envelope (E), de membrana (M), de nucleocapsídeo (N) e a hema-glutininina-esterase (HE) (MENEZES; LIMA; MARTINELLO, 2020; NAQVI *et al.*, 2020). Além disso o vírus possui 5 variantes de maior preocupação (alfa, beta, gama, delta e omicron), as quais se diferem por mutações ocorridas em seu material genético (CASCELLA *et al.*, 2023). Os componentes estruturais do SARS-CoV-2 são apresentados na Figura 1.

Figura 1 – Figura ilustrativa demonstrando as proteínas estruturais que compõem o SARS-CoV-2. M – Proteína de membrana. E – Proteína de envelope. S – Proteína *Spike*. N – Proteína do nucleocapsídeo.



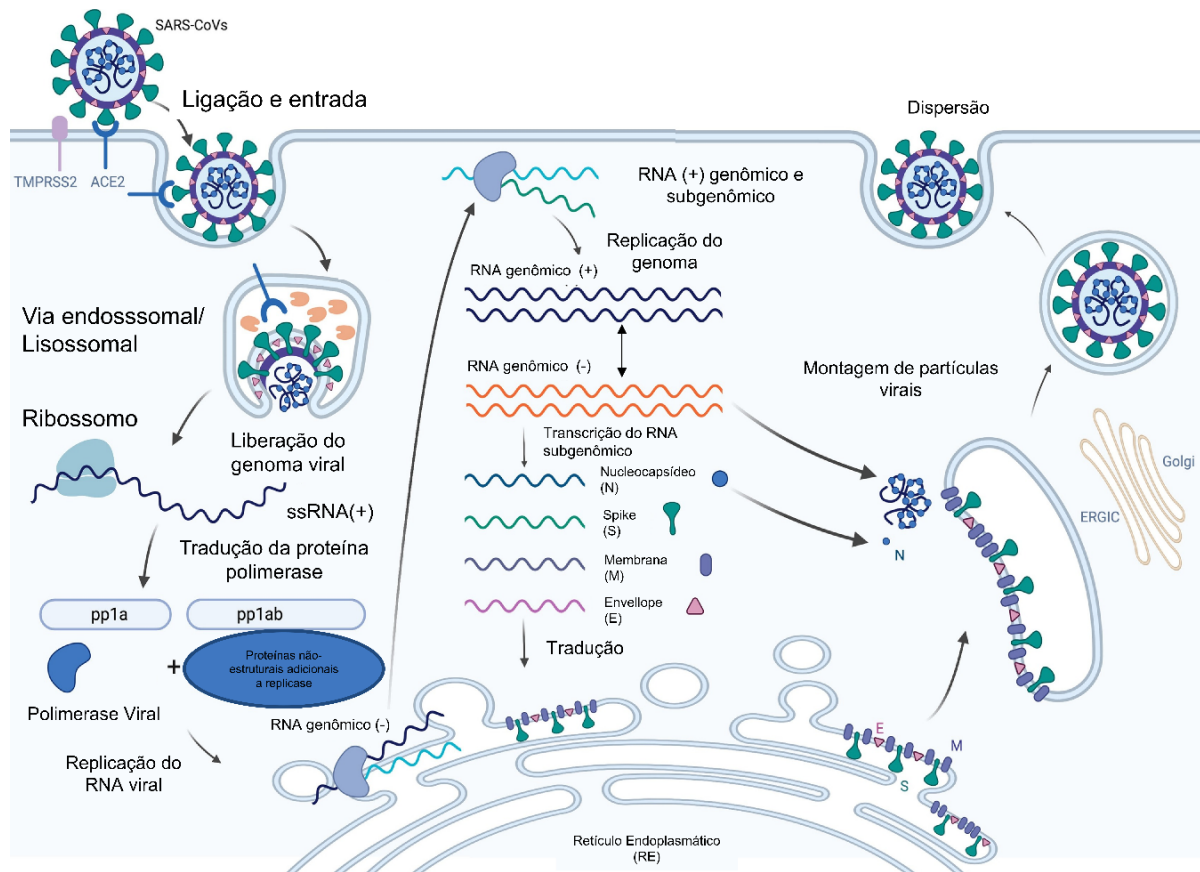
Adaptado de UZUNIAN, 2020.

O processo de infecção do SARS-CoV-2 em células humanas se inicia a partir do reconhecimento do domínio de ligação ao receptor (RBD, do inglês: receptor-binding domain) da proteína S viral pelos receptores ACE2 ou pela Serina protease transmembrana 2 (TMPRSS2, do inglês: surface transmembrane protease serine 2), as quais são expressas em células da mucosa com e sem queratina, das glândulas salivares na boca assim como células endoteliais vasculares, do epitélio pulmonar e macrófagos alveolares, por exemplo. Após o reconhecimento, ocorre a clivagem da proteína viral em subunidades S1 e S2, responsáveis pela adsorção do vírus à superfície celular e pela fusão do envelope viral com a membrana plasmática, respectivamente (MICHELON, 2021; DROZDZIK; DROZDZIK, 2022; HARRISON; LIN; WANG, 2020).

Posteriormente, o genoma do RNA viral é liberado e traduzido no citosol por ribossomos do hospedeiro, sintetizando, primeiramente, poliproteínas (pp1a e pp1b) que são clivadas por uma protease viral e que, posteriormente, formam um complexo de replicase, o qual induz a formação de vesículas de membrana dupla (DMVs, do inglês: double membrane vesicles) derivadas do retículo

endoplasmático (RE) e realiza a replicação do genoma viral com a ação da unidade RNA polimerase dependente de RNA (RdRp, do inglês RNA - dependent RNA polymerase). A partir disso, são sintetizadas moléculas de RNA de fita negativa de comprimento total, importantes para a continuação do processo de replicação, e de RNA subgenômico (sgRNA), ou seja, fragmentos de RNA que possuem informação para síntese das proteínas estruturais e acessórias do vírus, sendo as E, S e M sintetizadas na membrana do RE, enquanto a N é liberada no citosol para proteger +ssRNA viral. A formação de partículas virais ocorre no compartimento intermediário RE-Golgi (ERGIC, do inglês Endoplasmic Reticulum –Golgi intermediate compartment), as quais são posteriormente liberadas na membrana celular através do transporte vesicular pelo complexo de golgi (HARRISON; LIN; WANG, 2020). Tal processo é ilustrado na Figura 2.

Figura 2 – Esquema representativo da infecção celular causada pelo SARS-CoV-2. TMPRSS2 - Serina protease transmembrana 2; ACE2- Enzima conversora de angiotensina 2; Prot – Proteína; ERGIC - compartimento intermediário Retículo endoplasmático-Golgi



Adaptado de HARRISON; LIN; WANG, 2020.

Como citado anteriormente, células do trato respiratório apresentam uma permissividade a infecções por SARS-CoV-2, entre elas as células epiteliais pulmonárias as quais o vírus possui maior tropismo. Isto se deve a diversos fatores, como a presença de ACE2 e, principalmente, de TMPRSS2 em suas membranas celulares, aos quais a proteína S possui intensa afinidade, além da regulação positiva transcrricional da expressão desses receptores na presença de fatores pró-inflamatórios como interferons I e II (IFNs) liberados durante a infecção viral (HARRISON; LIN; WANG, 2020). No entanto, demais tecidos e órgãos, tal qual o pulmão, podem ser afetados pela COVID-19, como o sistema cardiovascular e nervoso, os quais são prejudicados pela infiltração excessiva de células inflamatórias e imunes (macrófagos e neutrófilos) e posterior propagação sistêmica de citocinas, podendo causar inflamação prolongada do miocárdio, doenças cerebrovasculares (HARRISON; LIN; WANG, 2020; PUNTMANN *et al.*, 2020; RIFINO *et al.*, 2021). De mesmo modo, tanto o processo pró-inflamatório agudo quanto a hipóxia abrupta das hemácias pode afetar os rins e o fígado, podendo

gerar insuficiência renal e hepatomegalia (aumento anormal do fígado), assim como o aumento da concentração de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (JUNIOR; LOURENÇO, 2020; POLONI; JAHNKE; ROTTA, 2020).

Além disso, a idade do paciente é um fator determinante tanto para o grau de severidade da doença, quanto para o aparecimento de sequelas, com constantes relatos de diminuição de linfócitos, neutrofilia (aumento de neutrófilos), índices elevados relacionados à inflamação, à coagulação e comprometimento da resposta imune adaptativa (HARRISON; LIN; WANG, 2020). Em relação a possíveis sequelas, um estudo demonstrou a influência de infecções severas por SARS-CoV-2 sobre a síntese de autoanticorpos capazes de gerar doenças autoimunes em idosos (FONSECA *et al.*, 2023), o que reforça a importância da prevenção contra a doença. Ademais, outras comorbidades como diabetes, doenças imunossupressoras (Síndrome da Imunodeficiência adquirida, AIDS, do inglês: *acquired immunodeficiency syndrome*, por exemplo), obesidade e hipertensão aumentam a gravidade, morbidade e taxas de mortalidade de infecção por COVID-19 (HEIDARY *et al.*, 2022; WOLFF *et al.*, 2021).

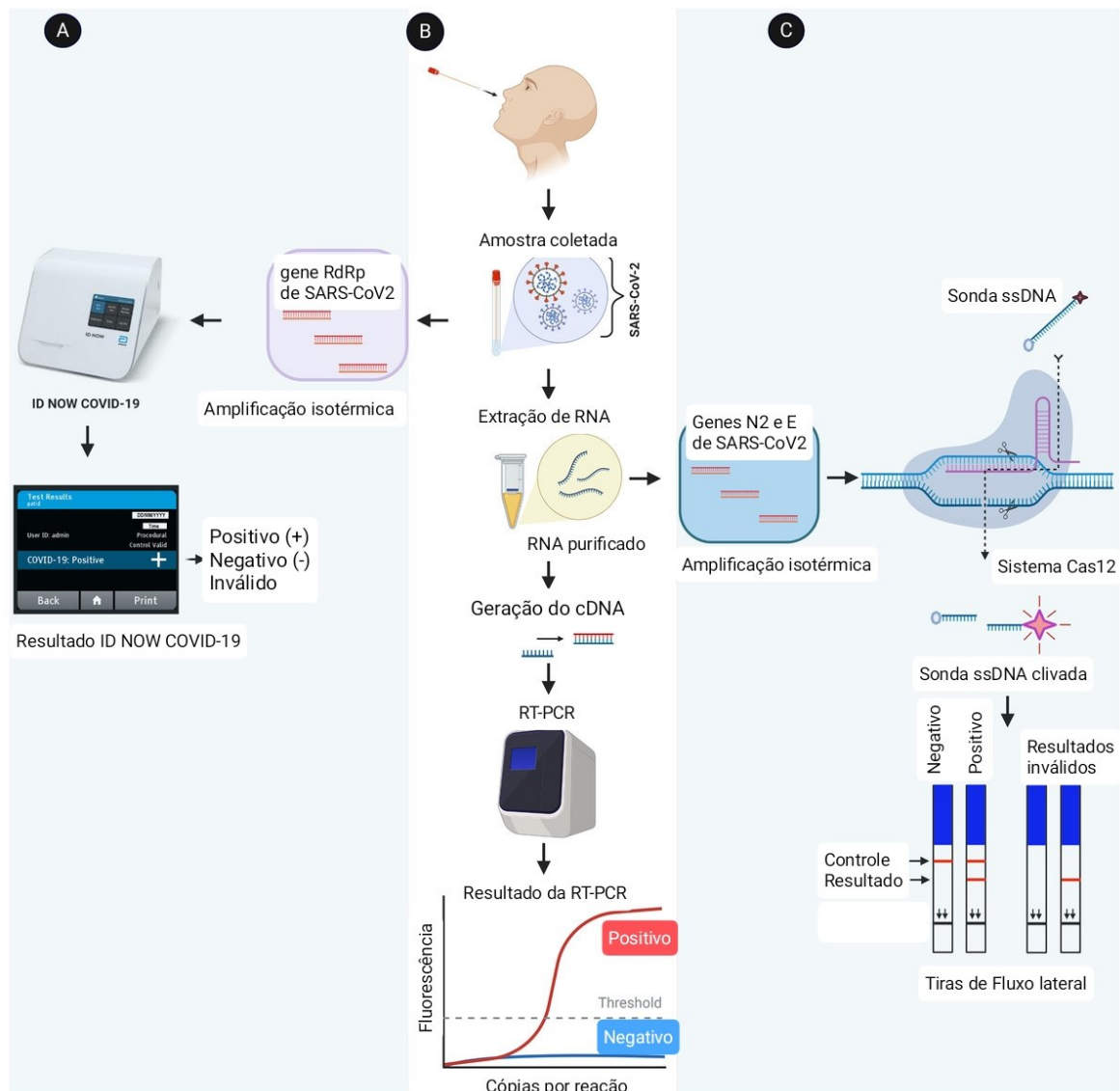
Entre os métodos de diagnóstico moleculares de COVID-19, a reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR, do inglês: *Reverse transcription polymerase chain reaction*) é considerada o padrão ouro e confiável para detecção do SARS-CoV-2 com alta sensibilidade e especificidade. Tal método se baseia na geração de DNA complementar (cDNA) pela ação da transcriptase reversa, a partir do RNA total extraído da amostra swab nasal, soro, fezes e secreções oculares, seguida de sua amplificação, pela DNA polimerase, com primers específicos para os genes 2019nCoV-N1 (N1), 2019nCoV-N2 (N2) e RNase P (RP). Tratando-se de uma PCR quantitativa, ocorre a emissão, detecção e quantificação de fluorescência referente à amplificação dos genes, em que a amostra é considerada positiva se indicada a presença de N1 e N2 e negativa na ausência de ambos. O controle de qualidade da reação é averiguado a partir da amplificação do gene humano RP, cuja ausência torna o resultado inválido. O mesmo ocorre caso apenas um dos genes N1 ou N2 seja amplificado. Apesar de ser o método padrão ouro, é de custo elevado, requer

habilidades profissionais, leva tempo e deve ser realizado em laboratório (DHAMAD; RHIDA, 2020; MENEZES; LIMA; MARTINELLO, 2020).

A Amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP, do inglês loop-mediated isothermal amplification) é outro método molecular que amplifica rapidamente ácidos nucleicos de forma específica a uma temperatura constante (60–65 °C), diferente da PCR que se baseia na variação de temperatura durante os ciclos de desnaturação, polimerização e anelamento pelo termociclador. Essa técnica fornece resultados em minutos e tem alta sensibilidade e especificidade em comparação com os testes PCR baseados em laboratório, porém a sensibilidade geral deste método é de 74,73% (DHAMAD; RHIDA, 2020; NOTOMI *et al.*, 2000).

Além disso, o diagnóstico de COVID-19 também pode ser realizado pelo método baseado em CRISPR-Cas12, em que regiões designadas dos genes N2, E e RP (referentes aos genes virais das proteínas do nucleocapsídeo e envelope e o gene humano para RNase P, respectivamente) são amplificadas por LAMP de transcrição reversa (RT-LAMP, do inglês: Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification) e depois direcionadas pelo sistema CRISPR-Cas12 para detecção do vírus. Posteriormente, é mediada a reação do complexo CRISPR-Cas12, em que, na presença de genes amplificados, realiza a clivagem dessas sequências, assim como de uma sonda de ssDNA que apresenta fluorescência ao ser clivada. O resultado é visualizado por um leitor fluorescente ou uma tira de fluxo lateral e somente é considerado positivo, na presença dos genes N2, E e RP, sendo o último o controle de qualidade das reações. Tal método é considerado um teste rápido, econômico, com alta sensibilidade e especificidade. No entanto, requer ajustes e design específico de enzimas, primers e sondas utilizados (DHAMAD; RHIDA, 2020). Os métodos de diagnósticos moleculares são representados na Figura 3.

Figura 3 – Esquema representativo demonstrando os métodos de diagnóstico moleculares para COVID-19, sendo A) LAMP, B) RT-PCR e C) baseado em CRISPR-Cas12.

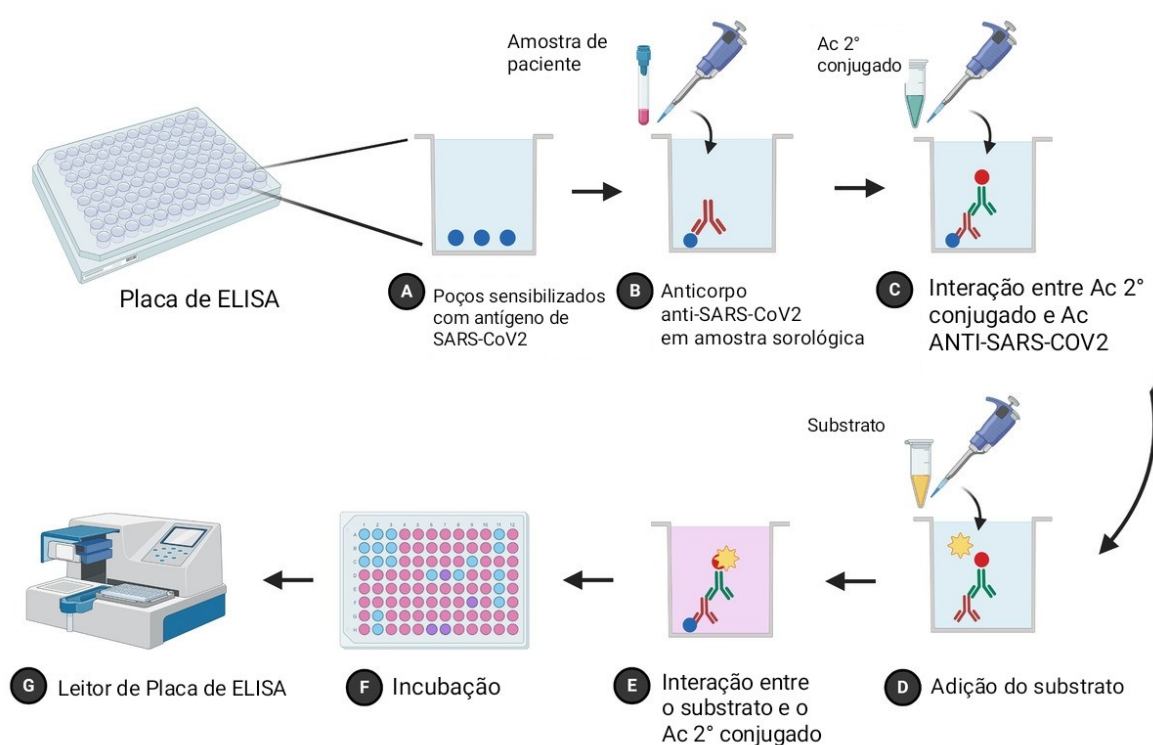


Adaptado de DHAMAD; RHIDA, 2020.

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) é um método utilizado para detectar e quantificar antígenos (Ag) e anticorpos (Ac). Para a determinação de anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgG/IgM é aplicado o protocolo de ELISA indireto, devido a maior sensibilidade, no qual se inicia a partir da sensibilização da superfície interna nos poços de microplacas por proteínas recombinantes do vírus, os quais servirão de antígenos para posterior reconhecimento dos anticorpos primários específicos presentes no plasma de pacientes infectados. A interação Ag/Ac é posteriormente reconhecida por anticorpos secundários conjugados a enzimas, como peroxidase de rábano (HRP) ou a fosfatase alcalina (AP), as quais, na presença de seus substratos

revelam a mudança de cor, que é medida posteriormente por um leitor de placas. O ELISA é relativamente rápido (2-5 horas) e econômico em comparação com a RT-PCR. Estudos relataram que o uso do ELISA apresentou sensibilidade de 77,3% e 83,3% para detectar IgM e IgG, respectivamente, no quarto dia de sintomas (DHAMAD; RHIDA, 2020). O esquema representativo da detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 é representado na Figura 4.

Figura 4 – Representação do método sorológico para anticorpos anti-SARS-CoV-2 pelo método de ELISA.

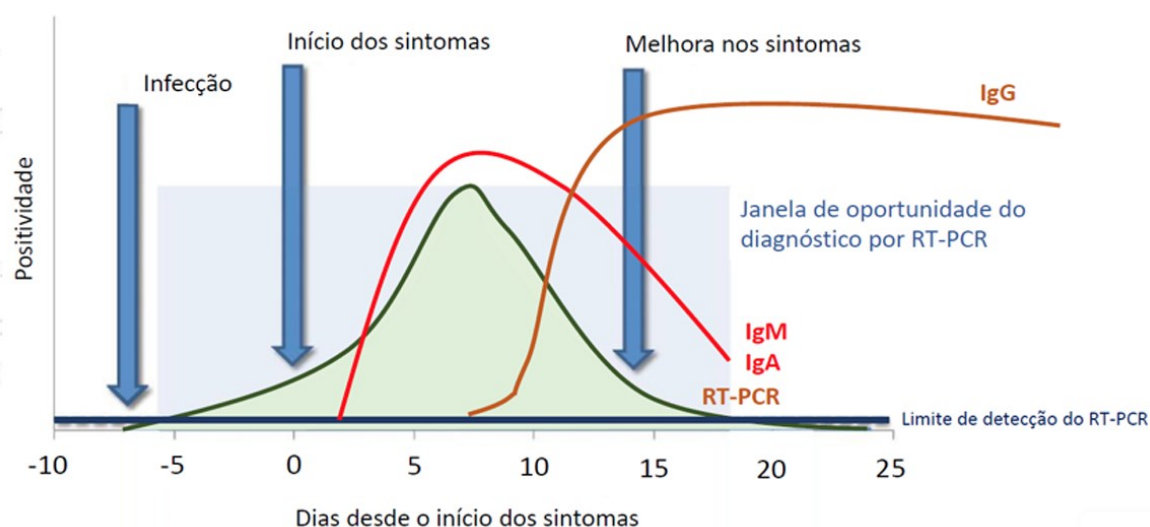


Adaptado de DHAMAD; RHIDA, 2020.

O imunoensaio de quimioluminescência (CLIA, do inglês: Chemiluminescence Immunoassay) é um ensaio de baixo custo dos níveis de anticorpos IgG e IgM com alta reprodutibilidade, sendo capaz de detectar anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 S1 proteína (S1-IgG), IgG anti-SARS-CoV-2 RBD proteína (RBD-IgG) e IgG anti-SARS-CoV-2 N proteína (N-IgG) com base na tecnologia de quimioluminescência. No entanto, CLIA apresenta baixa sensibilidade no início da infecção, sendo menos comumente utilizado (DHAMAD; RHIDA, 2020; YIN *et al.*, 2021).

De modo geral, o período sintomático da doença se inicia a partir do quinto dia após a infecção, sendo este considerado o dia zero, e perdura por cerca de dez dias, em casos moderados e leves. Desde a infecção até, aproximadamente, o sétimo dia de apresentação de sintomas, há um crescimento exponencial da carga viral no paciente, o qual é seguido por um declínio, resultando na melhora dos sintomas por volta do 15º dia após o dia zero. Tal perfil se deve a resposta do sistema imune com o aumento de anticorpos IgM e IgA, seguidos de IgG. Para realizar o diagnóstico de COVID-19 de modo a evitar resultados falsos negativos, indica-se a realização da RT-PCR no período entre três e dez dias após o surgimento dos sintomas (NOGUEIRA; SILVA, 2020). A Figura 5 demonstra os estágios da infecção por SARS-CoV-2.

Figura 5 – Gráfico demonstrando os estágios da COVID-19 de acordo com a evolução dos sintomas e a janela de diagnóstico da doença por RT-PCR.



Fonte: NOGUEIRA; SILVA, 2020

A partir dos resultados obtidos de métodos moleculares e sorológicos, é possível determinar o estágio da infecção pelo SARS-CoV-2 (NOGUEIRA; SILVA, 2020), conforme demonstrado pela Tabela 1.

Tabela 01 – Interpretação de resultados para COVID-19.

Sorologia IgA / IgM	Sorologia IgG	RT-PCR SARS-CoV-2	Interpretação
Não Reagente	Não Reagente	Não detectado	Não há evidência laboratorial de infecção atual ou pregressa
		Detectado	Infecção atual
		Não realizado	Não há evidência laboratorial de infecção pregressa, infecção atual não pode ser descartada
Reagente ou Indeterminado	Não Reagente	Não detectado	Sugestivo de infecção recente (≥ 7 a 10 dias do início dos sintomas)
		Detectado	Sugestivo de infecção atual (< 7 dias do início dos sintomas)
		Não realizado	Sugestivo de infecção (recente ou atual)
Não Reagente, Reagente ou Indeterminado	Reagente	Não detectado	Infecção recente (≥ 7 a 10 dias do início dos sintomas)
		Detectado	Infecção recente com persistência de detecção da carga viral
		Não realizado	Sugestivo de infecção pregressa, porém infecção atual ou recente não pode ser descartada

Fonte: NOGUEIRA; SILVA, 2020

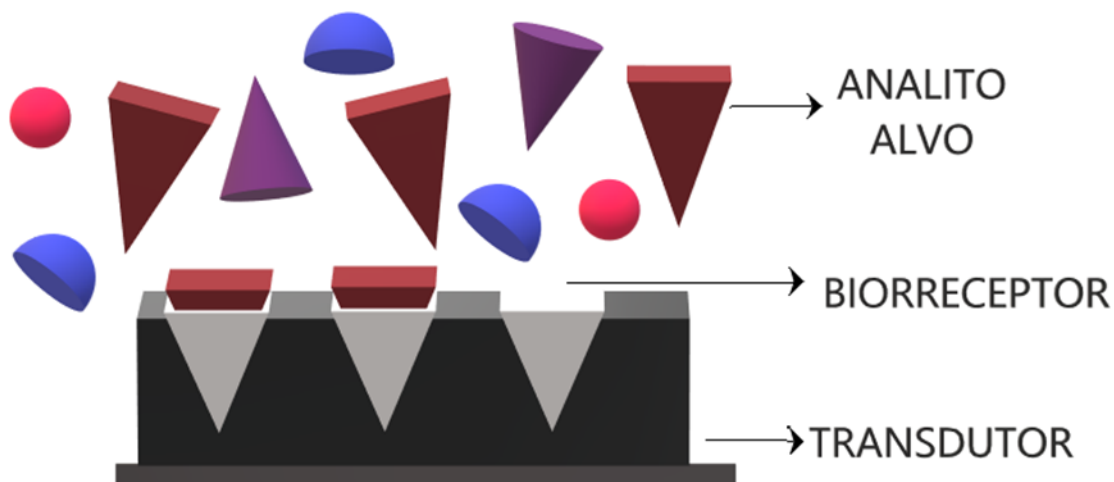
Nesse cenário, o emprego de biossensores como métodos de diagnóstico desponta como uma alternativa promissora, destacando-se por sua notável combinação de custo acessível e eficácia comprovada. Dessa forma, os biossensores se destacam como a escolha prioritária no diagnóstico de uma ampla variedade de doenças, incluindo a COVID-19, com uma capacidade indiscutível de superar as abordagens convencionais (NARESH; LEE, 2021).

2 BIOSSENSORES

2.1 Definição de biossensores

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) define o termo biossensor como um dispositivo que usa reações bioquímicas específicas mediadas por organelas, tecidos, imunossistemas e enzimas isoladas ou células inteiras para detecção de componentes químicos normalmente por sinais elétricos, térmicos ou ópticos (IUPAC, 2014). Atualmente, a diversidade de biomoléculas utilizadas em biossensores é ampla e será melhor explicada em seguida. Para tanto, é necessário o entendimento dos componentes básicos de um biossensor, que são: biorreceptor e transdutor, mostrados na Figura 6 (BHATTARAI; HAMEED, 2020).

Figura 6 – Componentes do biossensor.



Fonte: Autor.

O biorreceptor é a molécula biológica ou biomimética que se liga especificamente ao analito alvo em matrizes completas, acarretando a geração de um sinal detectável e mensurável pelo transdutor e podem ser diversas, como: anticorpos, antígenos, DNA, aptâmeros, peptídeos sintéticos, enzimas e células inteiras (BHATTARAI; HAMEED, 2020; CAJIGAS *et al.*, 2022; MIRIPOUR *et al.*, 2020; SOTO; OROZCO, 2022; VÁSQUEZ *et al.*, 2022; WANDTKE *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2021). O transdutor, por sua vez, é o dispositivo que converte uma forma de energia em outra como as eletroquímicas, ópticas, térmicas ou piezoelétricas (BHATTARAI; HAMEED, 2020; VÁSQUEZ *et al.*, 2022). Normalmente, a energia gerada pelas reações químicas entre o biorreceptor e o analito alvo é convertida em uma voltagem, que passa por um condicionamento de sinal. O sinal analógico dessa voltagem não é reconhecido por computadores e microprocessadores. Portanto, um conversor de sinal analógico para digital realiza esse processo e o sinal pode ser exibido na tela do computador ou outro microprocessador na forma de gráficos, tabelas e outras formas de exibição de dados (YOON, 2016).

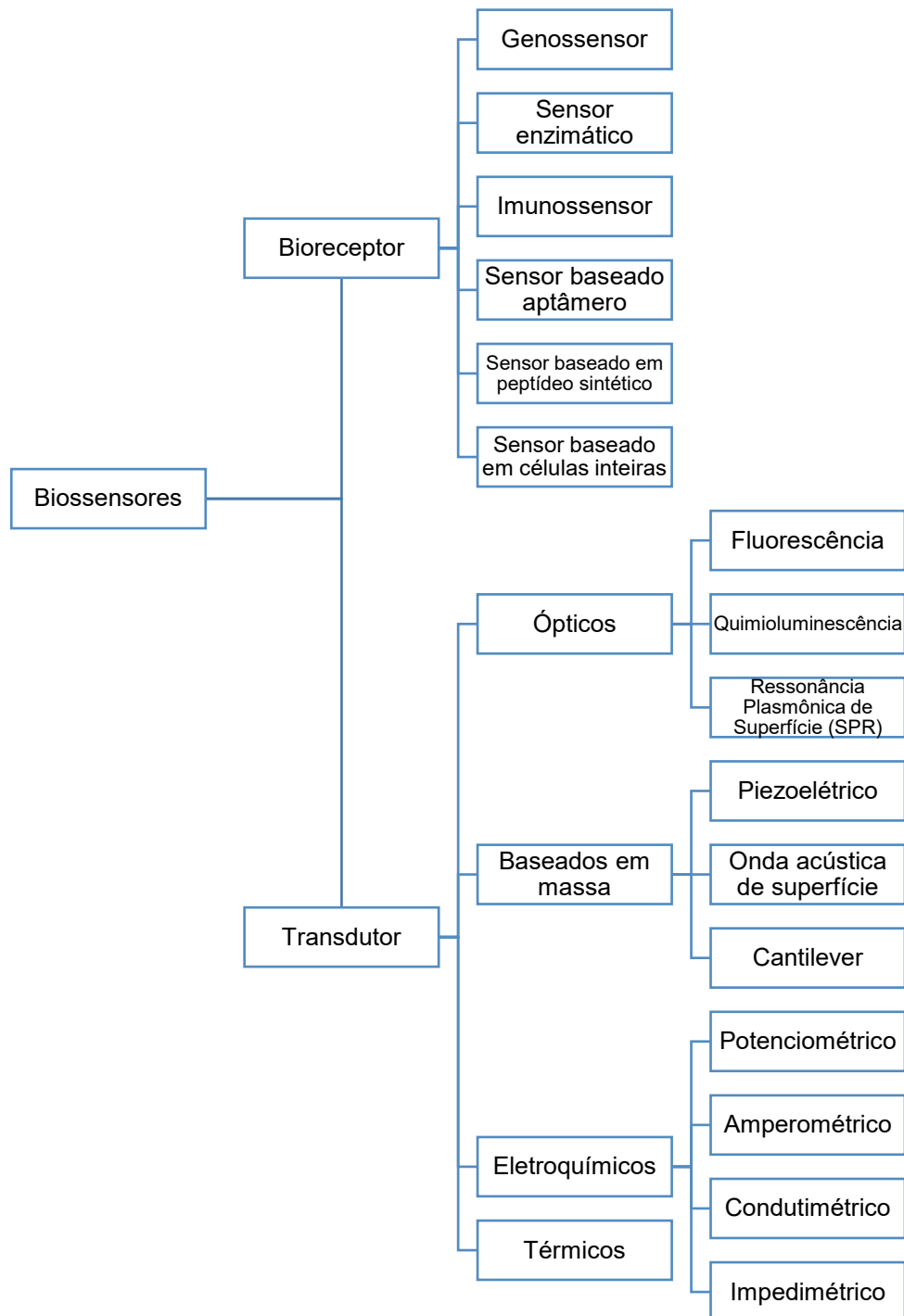
A aplicação de biossensores é ampla, possibilitando a detecção e monitoramento de diversas substâncias nas áreas de segurança alimentar, ambiental, diagnóstica, segurança nacional e biologia molecular (GARCÍA

LOZANO *et al.*, 2019; HALEEM *et al.*, 2021; MANZANO, 2021; MEHROTRA, 2016; POHANKA, 2019). A diversidade da aplicação reflete as características únicas dos biossensores, como a seletividade, sensibilidade e rapidez de resposta. Essas vantagens contrastam-se com os métodos analíticos convencionais utilizados na identificação e quantificação de analitos alvos, uma vez que normalmente são onerosos, demorados, não seletivos em amostras reais, necessidade de muitos passos de separação de moléculas, grande uso de reagentes e pouca possibilidade de utilização em campo (HALEEM *et al.*, 2021; KOCHANA; POLLAP; MADEJ, 2022; MEHROTRA, 2016).

2.2 Classificação de biossensores

Como existem diversas biomoléculas que podem ser imobilizadas no transdutor e muitos tipos de transdutores, a classificação dos biossensores é comumente baseada em dois tipos de perspectivas: da biomolécula e do transdutor. Na Figura 7 é possível visualizar de forma esquemática esses tipos de classificação.

Figura 7 – Classificação dos biossensores.



Fonte: Autor.

2.2.1 Bioreceptor

2.2.1.1 Genossensor

O biorreconhecimento pelo DNA se baseia pelo pareamento de bases altamente específico entre uma sonda de oligonucleotídeos e seu complementar em uma amostra alvo (HE; XU; FANG, 2005). O fenômeno de hibridização do DNA é uma das formas mais utilizadas no biorreconhecimento, porém outros

mecanismos também podem estar envolvidos, como interações com DNA funcionais e DNA como molde para diferentes estruturas (HUA *et al.*, 2022). No primeiro caso, a sequência de DNA pode interagir com o alvo por afinidade conformacional, como os aptâmeros e, no segundo caso, o DNA atua como partículas ou blocos montáveis, como o DNA origami e o DNA tile (HUA *et al.*, 2022; LU *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2020). Os aptâmeros são sequências de fita simples de DNA ou RNA sintetizadas *in vitro* pelo método de Enriquecimento Exponencial pela Evolução Sistemática de Ligantes, do inglês SELEX. A grande vantagem dos aptâmeros é que eles são específicos não apenas a outra sequência de oligonucleotídeos, mas também aos anticorpos, outras proteínas e pequenas moléculas por meio de mudanças conformacionais do aptâmero induzidas pela ligação específica ao alvo (LU *et al.*, 2008).

O DNA como sonda para biorreconhecimento em biossensores possui diversas vantagens como biocompatibilidade, estabilidade térmica, funcionalização alternativa e maior duração da atividade biológica, além de poder ser utilizado para construir diferentes estruturas programáveis, graças aos avanços da nanotecnologia do DNA (MEI *et al.*, 2022). Um exemplo disto é o trabalho desenvolvido por CAJIGAS *et al.*, 2022, o qual se baseou no uso de nanopartículas magnéticas para a detecção eletroquímica específica de SARS-CoV-2.

2.2.1.2 Imunossensor

A utilização dos anticorpos (Ac) ou antígenos (Ag) no reconhecimento biológico se fundamenta na interação altamente específica entre essas moléculas, sendo possível utilizar tanto Ac, quando Ag como sondas para seus alvos específicos. Essa interação ocasiona a formação de um complexo estável e o anticorpo age como um agente de captura (JANIK-KARPINSKA *et al.*, 2022). Os biossensores com anticorpos, ou também chamados de imunossensores, são bastante utilizados pela sua sensibilidade e especificidade, porém possuem desvantagens, como a baixa solubilidade, agregação induzida por mudanças na temperatura, diminuição da atividade em altas temperaturas e estabilidade termal (BHATTARAI; HAMEED, 2020). Eissa e colaboradores (2021) desenvolveram um imunossensor funcionalizado com anticorpo contra a proteína N do nucleocapsídeo

do vírus SARS-CoV-2 e a detecção foi realizada por voltametria de onda quadrada, técnica que será descrita mais adiante. Esse imunossensor obteve um limite de detecção de 0,4 pg/mL em tampão fosfato salino (PBS) e estabilidade avaliada em 10 dias (EISSA *et al.*, 2021).

2.2.1.3 Sensores enzimáticos

As enzimas são largamente conhecidas pelas interações específicas aos seus substratos, o que as tornam biomoléculas muito atrativas no desenvolvimento de biossensores. Os biossensores enzimáticos são altamente específicos mas, de modo geral, possuem algumas desvantagens como falta de estabilidade, pouca resistência às variações de pH e temperatura (BHATTARAI; HAMEED, 2020; ELLEDGE *et al.*, 2021).

Elledge e colaboradores (2021) construíram um anticorpo anti-SARS-CoV-2 fundindo dois fragmentos separados da enzima nanoluciferase, SmBiT e LgBit, aos antígenos da proteína viral do SARS-CoV-2. O sinal gerado por esse biossensor é por luminescência que é emitida quando os dois fragmentos da enzima se ligam e se tornam a enzima completa. Isso é possível devido ao fato de que os anticorpos possuem dois “braços” que se ligam aos antígenos (Fab) e assim, quando o soro dos pacientes infectados entra em contato com os anticorpos modificados e a interação hetero-bivalente ocorre, os fragmentos aproximam-se e há produção de luminescência (ELLEDGE *et al.*, 2021).

2.2.1.4 Sensor baseado em peptídeos sintéticos

Os peptídeos são sequências pequenas de aminoácidos com seletividade, especificidade e natureza química semelhante às proteínas, porém possuem características superiores para utilização em biossensores, como: alta estabilidade contra desnaturação, facilidade de modificação, versatilidade química e habilidade de transferência de elétrons e natureza condutiva para aplicações elétricas (BHATTARAI; HAMEED, 2020; KARIMZADEH *et al.*, 2018).

Os alvos dos peptídeos podem ser vastos, como proteínas, células, pequenas moléculas e íons. Por exemplo, para detecção da proteína Spike do vírus

SARS-CoV-2, Soro e Orozco (2022) construíram um biossensor imobilizando um peptídeo sintético altamente específico em eletrodos de ouro sem modificações. Esse biossensor atingiu um limite de detecção de 18,2 ng/mL de proteína Spike comercial (SOTO; OROZCO, 2022).

2.2.1.5 Sensor baseado em células inteiras

Os biossensores que utilizam células inteiras como biorreceptores comumente empregam microorganismos para este fim, em que são normalmente geneticamente modificados e compostos por um módulo sensor e um módulo repórter. Esses dois módulos permitem a detecção, registro e quantificação do analito alvo. Esses biorreceptores possuem vantagens como baixo custo, portabilidade e compatibilidade ambiental. Em uma abordagem colorimétrica, He e colaboradores (2023) desenvolveram uma levedura geneticamente modificada que expressa em sua superfície domínios de anticorpos contra a proteína *Spike* do vírus SARS-CoV-2. Nanopartículas de ouro foram utilizadas como repórteres e funcionalizadas com anticorpos contra SARS-CoV-2 e enzima peroxidase de rabano. As leveduras se ligam no vírus via interação anticorpo-proteína Spike e as nanopartículas via anticorpos, formando um ensaio *sandwich*. O sinal colorimétrico foi gerado pela reação enzimática da peroxidase e seu substrato colorimétrico e conseguiram um limite de detecção de 0,037 µg/mL (HE *et al.*, 2023).

2.2.2 Transdutores

2.2.2.1 Ópticos

A interação entre os componentes do sensor com a radiação eletromagnética é a base dos biossensores ópticos. Os componentes básicos consistem em uma fonte de luz, tipicamente LED ou laser diodo, componentes que geram feixes de luz para direcionamento da luz e um fotodetector (KOCHANA; POLLAP; MADEJ, 2022).

Os métodos utilizados podem ser por meio da absorção, fluorescência, luminescência, reflexão interna, ressonância plasmônica de superfície (SPR) ou dispersão de luz, porém o método mais utilizado é a SPR (SINGH *et al.*, 2023). O efeito de ressonância plasmônica de superfície é causado pela oscilação da

densidade carga superficial dos elétrons livres na interface de um metal dielétrico. A técnica geralmente envolve a utilização de um substrato com uma camada de ouro sobre a superfície de um prisma onde uma luz incidente é refletida em um detector. A excitação dos elétrons pode ser realizada por um feixe de luz incidente que gera ondas evanescentes. As mudanças no índice de refração na região de detecção/superfície do sensor são registradas como diferentes ângulos de ressonância e essas mudanças são utilizadas como método de detecção (SINGH *et al.*, 2023).

Um método para aumento da sensibilidade de um biossensor baseado em SPR foi demonstrado por Yano e colaboradores (2022) para detecção da proteína N do nucleocapsídeo de SARS-CoV-2 utilizando nanopartículas de ouro (AuNps) de 150 nm de tamanho. Neste trabalho, a camada de ouro foi funcionalizada com um anticorpo primário contra a proteína N e AuNps foram funcionalizadas com anticorpos secundários, aumentando a sensibilidade do método que atingiu limite de detecção de 85 fmol.L^{-1} (YANO *et al.*, 2022).

2.2.2.2 Baseados em massa

Nos biossensores baseados em massa, ocorre uma oscilação na frequência que ocasiona uma mudança da massa do elemento sensor e essa característica é utilizada como mecanismo de detecção. As categorias dessa classe têm em comum o fato de que quando uma pequena molécula se liga em um determinado receptor, ocorre mudança de massa com consequente redução na frequência de oscilação e incluem os materiais piezoelétricos, superfície acústica e microcantilevers (SINGH *et al.*, 2023).

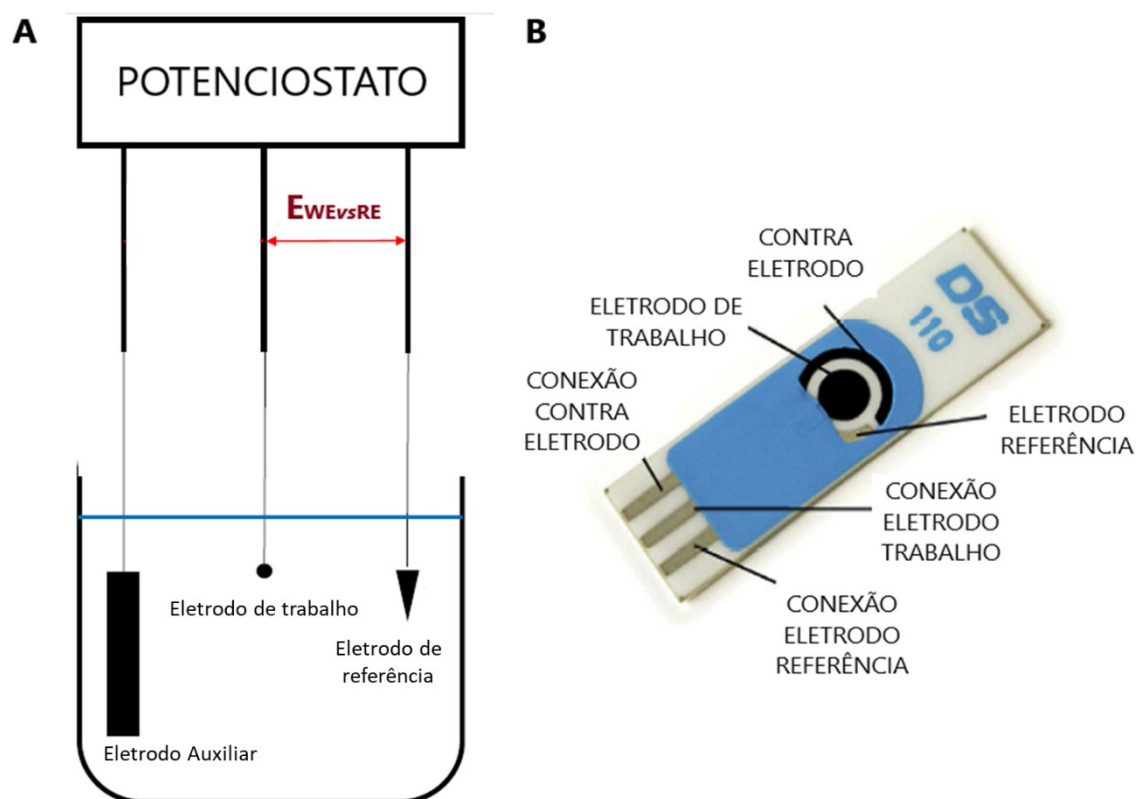
Forinova e colaboradores (2021) desenvolveram um biossensor baseado em ressonância plamônica de superfície para detecção da proteína N do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2. A camada de ouro foi funcionalizada com um polímero de metacrilamida carboxibetaína, N-(2-hidroxipropil) metacrilamida e metacrilamida sulfobetaina com um grupo tiol terminal que se liga covalentemente ao ouro. Anticorpos antiproteína N são incorporados no polímero e quando a amostra é adicionada ocorre a interação via antígeno anticorpo com mudança da massa da frequência e a massa do cristal de quartzo (FORINOVÁ *et al.*, 2021).

2.2.2.3 Eletroquímicos

Os biossensores eletroquímicos são extensamente utilizados devido ao baixo custo, sensibilidade e portabilidade e são baseados na detecção de reações que envolvem a eletroquímica. A eletroquímica estuda a relação da eletricidade e a química (BAGOTSKY, 2005). Nos processos eletroquímicos ocorrem reações de oxidação e redução quando elétrons são transferidos de um substrato, que é oxidado, para outro que está sendo reduzido. Essas reações e suas transferências de elétrons são detectadas por diversos métodos eletroquímicos e todos ocorrem em células eletroquímicas. Nessas células, os substratos que serão oxidados e reduzidos são compartimentados e isso previne o contato físico entre eles, mas permite a transferência de carga na forma de elétrons através de um circuito externo e na forma de íons auxiliares em um contra eletrodo. Portanto, as células eletroquímicas são constituídas por dois ou mais eletrodos, sendo o sistema de três eletrodos muito importante para as técnicas voltamétricas (CHEN, 2007).

Uma célula eletroquímica de três eletrodos, representada na Figura 8A, é composta por: eletrodo de trabalho (Et, onde ocorre a reação eletroquímica de interesse), o contraeletrodo (Ec, ou eletrodo auxiliar, que fornece uma corrente externa para equilibrar as correntes no eletrodo de trabalho) e o eletrodo de referência (Er). Este desempenha um papel crucial na medição e controle da voltagem e potencial eletroquímico na célula, de modo que, em um potenciostato, o Er é projetado para manter um potencial elétrico constante e estável, independentemente das mudanças nas condições da célula. Isso é alcançado usando uma solução eletrolítica e um material eletroquímico estável. Para evitar que a corrente passe pelo eletrodo de referência, ele é projetado de tal forma que a corrente elétrica flua apenas entre o eletrodo de trabalho e o contraeletrodo. O eletrodo de referência não é parte ativa do circuito elétrico da célula eletroquímica; em vez disso, ele é usado como uma referência estável de potencial para medir o potencial no eletrodo de trabalho. Portanto, a função do Er é fornecer uma referência constante para a medição do potencial eletroquímico, e não participar ativamente da reação eletroquímica em curso. Isso ajuda a garantir medições precisas e estáveis em experimentos eletroquímicos. Por outro lado, a corrente elétrica numa célula eletroquímica flui entre os eletrodos de trabalho e auxiliar (CHEN, 2007).

Figura 8 – Sistema de três compartimentos de uma célula eletroquímica clássica (A) e em eletrodos impressos (B).



Adaptado de SCHOLZ, 2015 e REZAEI; IRANNEJAD, 2019.

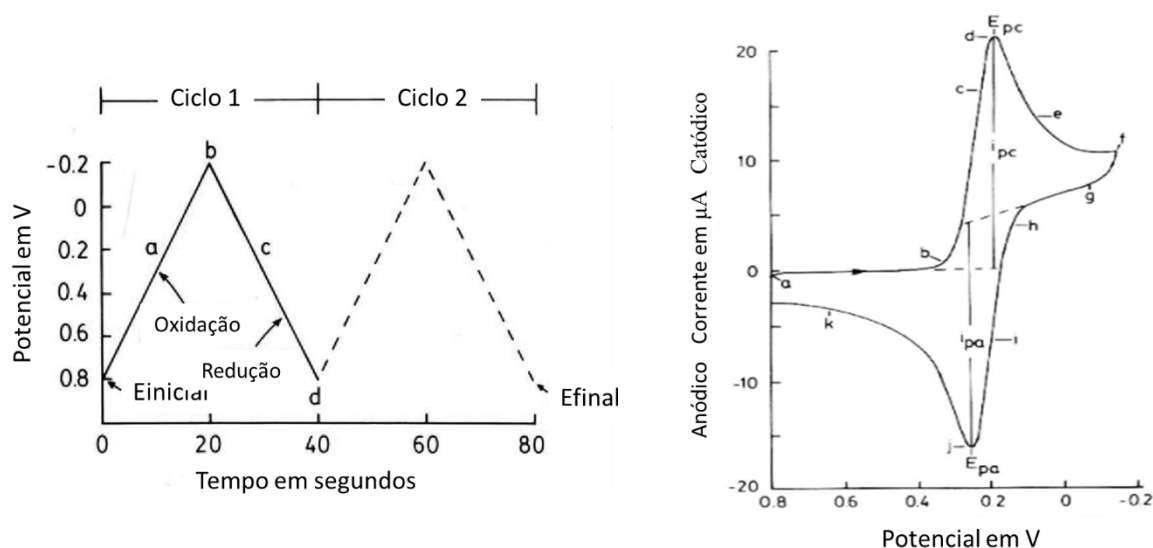
Os eletrodos impressos, normalmente, apresentam o sistema de três eletrodos e são bem conhecidos como excelentes plataformas comerciais de baixo custo para o desenvolvimento de sensores, possibilitando o seu desenvolvimento em diversos substratos como cerâmica, plástico, papel ou vidro (Figura 8B). Além disso, são vastas as opções de desenvolvimento de diferentes padrões de células ou eletrodos com diferentes arquiteturas, como eletrodos únicos, interdigitados, multi eletrodos, etc (ANTUÑA-JIMÉNEZ *et al.*, 2020).

Os transdutores eletroquímicos podem ser divididos em potenciométricos, quando detectam mudanças no potencial de uma célula com corrente nula; amperométrico/voltamétrico, quando detectam mudanças na corrente; condutimétricos, quando detectam mudanças na condutância; impedimétricos, quando detectam mudanças na resistência (BHATTARAI; HAMEED, 2020).

As técnicas voltamétricas foram utilizadas nesse trabalho e se diferenciam pela função do potencial ou corrente aplicados ao eletrodo de trabalho. A seguir serão abordadas algumas técnicas como a voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada.

Na voltametria cíclica ocorre uma varredura de potencial do eletrodo de trabalho em duas direções: sentido direto e inverso ou, ainda, para as regiões positivas (anódicas) e negativas (catódicas) (Figura 9A). Enquanto essa varredura é realizada, a corrente versus o potencial aplicado (I vs E) no eletrodo de trabalho é monitorada e espécies são oxidadas e reduzidas, possuindo diferentes valores de corrente (Figura 9B). O potencial aplicado versus o tempo (E vs t), chamadas de sinais de excitação, são representadas como ondas pulsadas e formato triangulares, como pode ser visualizado na Figura 9A. Essa varredura do potencial em direções opostas fornece informações importantes sobre as características das espécies em solução e, portanto, a voltametria cíclica é frequentemente utilizada para caracterizar comportamento redox de moléculas eletroativas, bem como determinar processos químicos de reações eletroquímicas na análise da cinética da transferência de elétrons (KISSINGER; HEINEMAN, 1983).

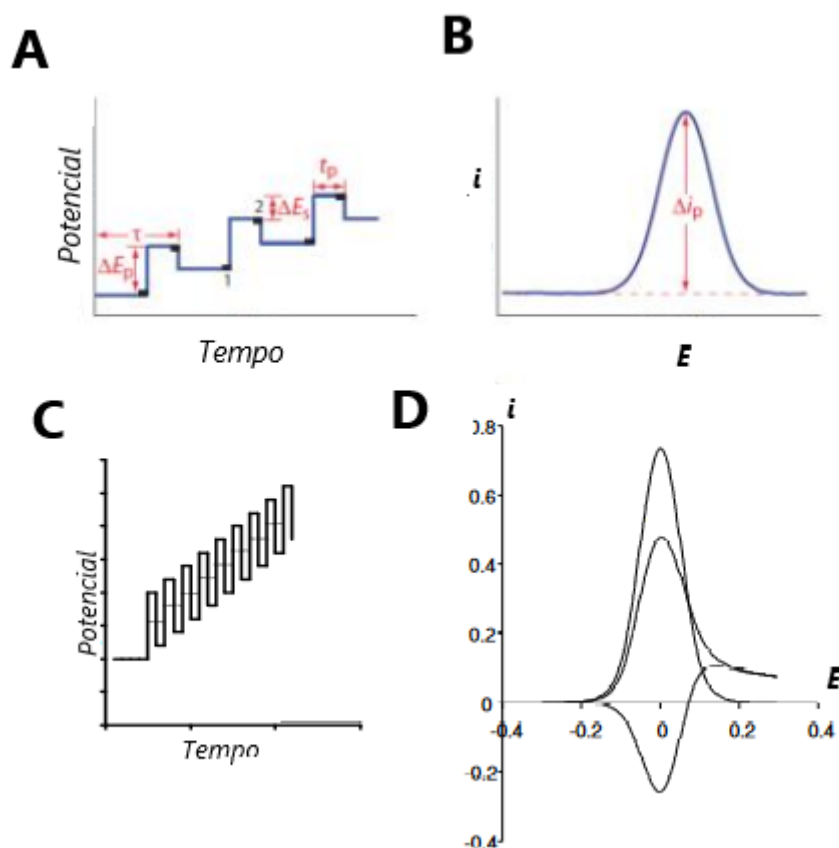
Figura 9 – Voltametria cíclica e comportamento do potencial com o tempo (A) e com a corrente (B).



Adaptado de KISSINGER; HEINEMAN, 1983.

Na voltametria de pulso diferencial ocorre a aplicação de séries de pulsos de amplitude constante de formato retangular que são sobrepostos a uma rampa de potencial crescente (Figura 10A). A corrente resultante é uma subtração da corrente aplicada após e antes do pulso, fato esse que torna essa técnica bastante sensível, uma vez que aumenta o registro de correntes faradáicas e diminui as correntes capacitivas (Figura 10B). De forma bem simples, a corrente faradáica pode ser explicada como aquela gerada apenas pelos processos de oxidação e redução e transferência eletrônica, seguindo a lei de Faraday. Os processos não-faradáicos não resultam da transferência eletrônica e interferem nos processos na interface eletrodo-solução. Assim, técnicas voltamétricas que fazem a subtração dessas correntes aumentam a sensibilidade da técnica e por isso normalmente as técnicas de pulso são as mais utilizadas em biossensores eletroquímicos (SCHOLZ, 2015).

Figura 10 – Formas da onda, em (A) e (C), e voltamogramas, em (B) e (D), da voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada, respectivamente.



Adaptado de BAGOTSKY, 2005 e MIRCESKI; GULABOSKI, 2014.

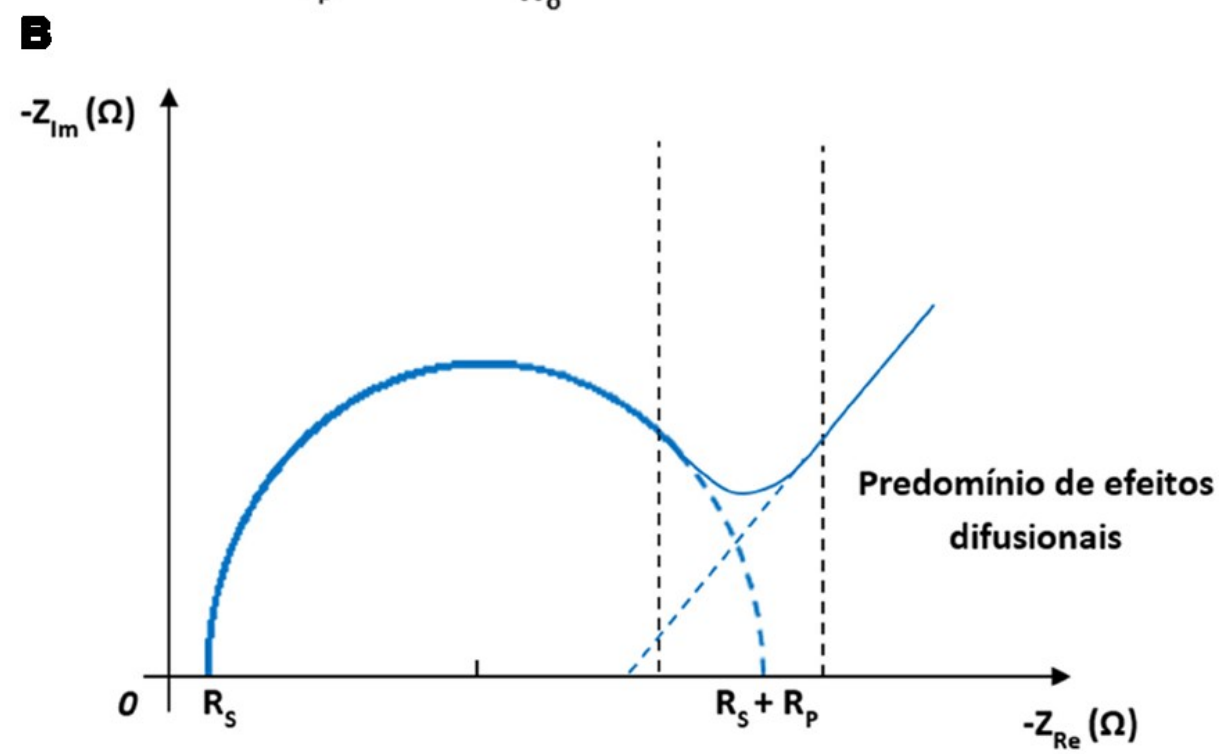
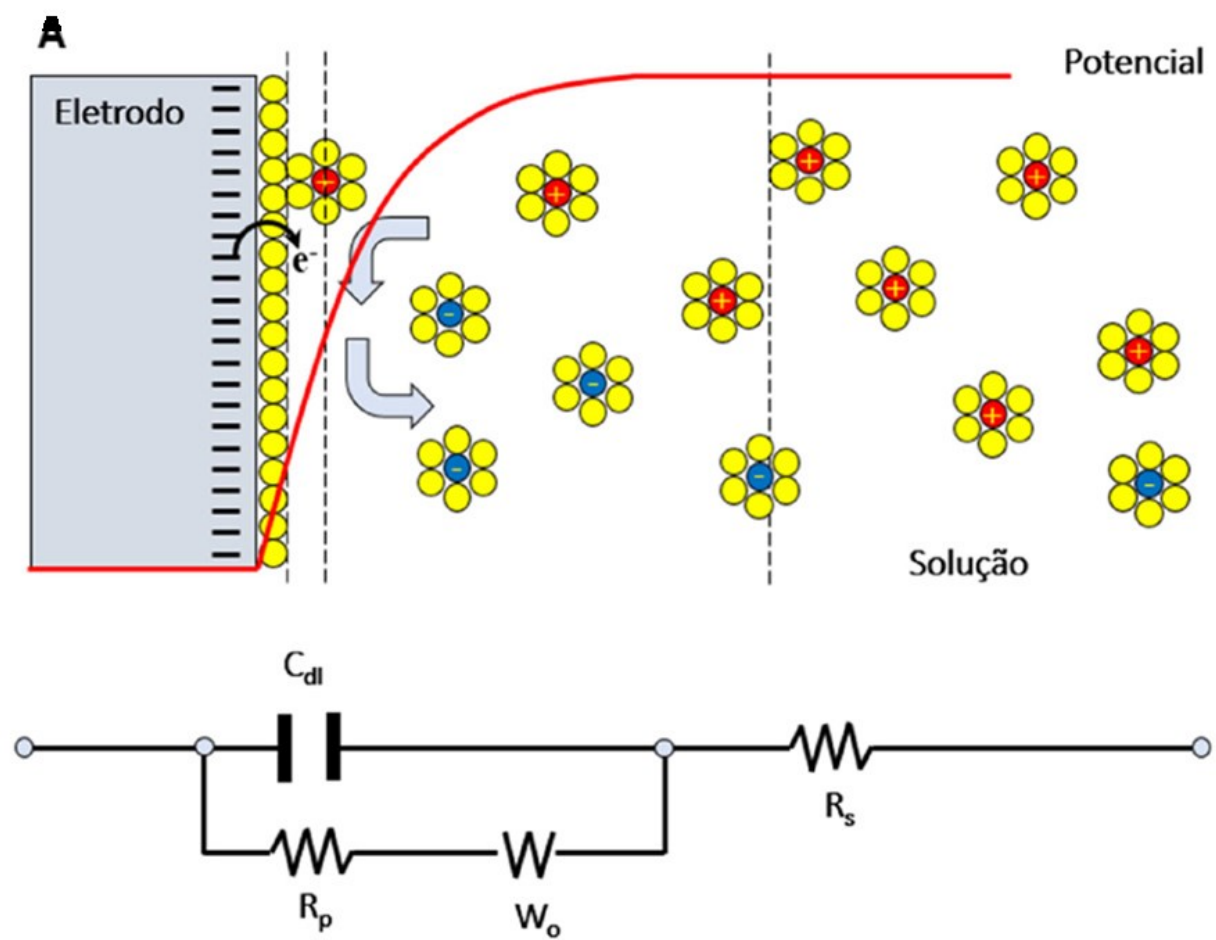
Na voltametria de onda quadrada ocorre a aplicação de onda quadrada de amplitude em um potencial crescente (Figura 10C). Atualmente, no contexto da voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *Square wave voltammetry*), a forma da curva que descreve a relação entre a corrente elétrica e o potencial é moldada pela aplicação de diversos potenciais que variam conforme uma escala específica de potencial com uma amplitude e uma duração chamada de tempo. Tais varreduras simultâneas faz com que essa técnica exiba uma notável sensibilidade e uma elevada capacidade de rejeição de correntes capacitivas, além de possibilitar uma contribuição mínima de correntes faradáicas (Figura 10D) (SCHOLZ, 2015; SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003). Liv e colaboradores (2021) desenvolveram um imunossensor funcionalizado com óxido de grafeno em eletrodo de carbono vítreo e conseguiram um limite de detecção de 0,01 ag/mL para a proteína Spike do SARS-CoV-2, utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada (LIV *et al.*, 2021).

Outra técnica de grande importância é a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS, do inglês: *Electrochemical Impedance Spectroscopy*) com origem entre o final do século XIX e início do XX, utilizando a teoria de sistemas lineares invariantes no tempo e permitindo a caracterização minuciosa da interface/eletrodo assim como a solução em análise, sendo, portanto, amplamente utilizada no ramo de sensores. A EIS se baseia no conceito de admitância teórica (resultado da excitação harmônica complexa em um sistema), o qual não possui caráter físico. No entanto, admitindo-se uma condição de equilíbrio local a campos termodinâmicos, tem-se que quando a frequência da excitação (ω) e seu coeficiente de proporcionalidade é estritamente dependente de ω , o resultado de um sistema linear faz-se harmônico sob uma excitação harmônica complexa. A partir disso, tem-se o caso de transporte elétrico ôhmico e da resposta dielétrica, em que a condutividade e a constante dielétrica são influenciadas pela frequência, temperatura e da composição do material (FERREIRA *et al.*, 2022).

Deste modo, é necessário ressaltar alguns componentes de sistemas eletroquímicos, como o elemento de fase constante, que representa a capacitância de dupla camada (DLC, do inglês: *Double Layer Capacitor*); a Resistência elétrica (de polarização e da solução), a resistência de transferência de carga (R_{ct}) e a

impedância de Warburg, a qual está associada ao processo de difusão iônica, sendo dependente da geometria da célula eletrolítica e utilizada para caracterizar as camadas de difusão semi-infinita, sendo presente em sistemas eletroquímicos com presença de camadas de polímeros e biomoléculas (FERREIRA *et al.*, 2022; LAZANAS; PRODROMIDIS, 2023). A Figura 11 representa um esquema de um sistema eletroquímico demonstrando a interface eletrodo/solução, formação da dupla camada com a presença dos componentes descritos acima, assim como seus respectivos circuito e gráfico de Nyquist.

Figura 11 – A) Reprodução da interface do eletrodo com a solução e a representação do circuito equivalente do sistema. C_{dl} = Capacitância da dupla camada elétrica, R_p = Resistência de polarização, W = Elemento de Warburg, R_s = Resistência da solução. B) Representação de Nyquist para um elemento de Warburg, para o sistema em condições difusionais.



Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2022

2.2.2.4 Térmicos

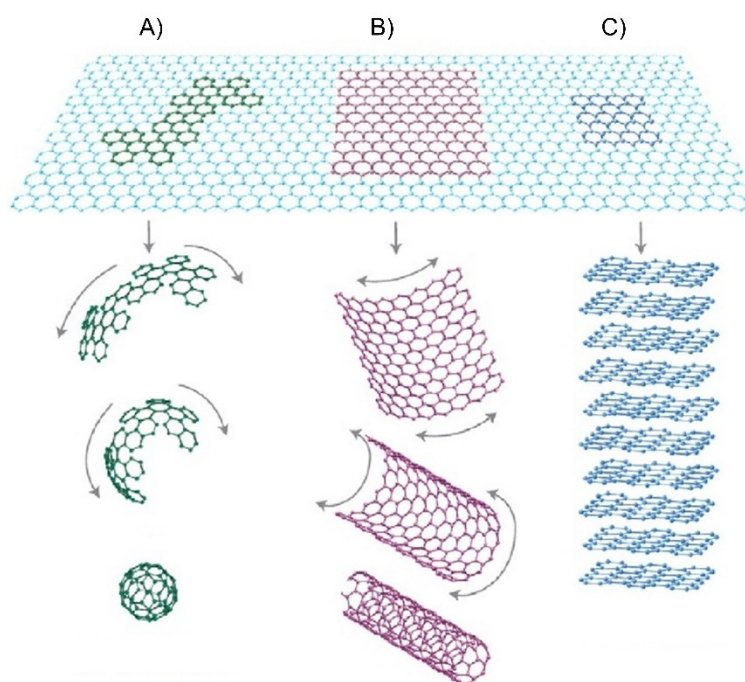
O biossensor térmico opera com base na identificação e análise do calor liberado durante reações bioquímicas. O princípio subjacente consiste em permitir que o analito interaja com uma sonda, desencadeando uma reação térmica, e em seguida, mensurar a variação de temperatura com sensores específicos, a qual está diretamente relacionada à quantidade de analito envolvida na reação. Um exemplo notável é o biossensor térmico diferencial baseado em sistemas microeletromecânicos (MEMS), que oferece vantagens em termos de sensibilidade na detecção de calor e na rapidez de resposta (WU; WU, 2021).

3 NANOMATERIAIS E SUA APLICAÇÃO EM BIOSSENSORES

A Nanotecnologia propõe aplicações práticas de estruturas e moléculas em escalas nanométrica (1 e 100 nm), sendo 'Nano' um prefixo grego que representa um bilionésimo de metro (10^{-9} m). Tais nanomateriais apresentam várias características próprias em relação às suas propriedades morfológicas, estruturais, térmicas, eletromagnéticas, ópticas e mecânicas, as quais se devem à alta razão superfície-área e posterior reatividade química em relação a materiais em larga escala. Deste modo, a aplicação desses nanomateriais é vasta, podendo abranger a medicina, engenharia, química, entre outros (LOOS, 2015).

O carbono apresenta três estados de hibridizações (sp, sp², sp³), exibindo, portanto, uma versatilidade de ligações entre átomos de mesmo elemento e elementos distintos, sendo capaz de formar estruturas poliméricas simples e complexas. A partir disso, nanoestruturas de carbono demonstram grande diversidade e, conseqüentemente, ampla aplicação, como, por exemplo, em biossensores. Entre esses nanomateriais, cita-se: o grafeno, o fulereno e os nanotubos de carbono; as quais estão representadas na Figura 12. Tais estruturas são compostas por átomos de carbono em hibridização sp² que, de modo geral, se organizam em formato hexagonal/pentagonal, sendo geralmente sintetizados por métodos de ablação a laser, partindo do grafite (macromaterial ou bulk), caracterizando uma síntese top-down (KOUR *et al.*, 2020).

Figura 12 – Representação de uma folha de grafeno, sendo precursora de A) fulereno 0D, B) nanotubos 1D e C) grafite 3D



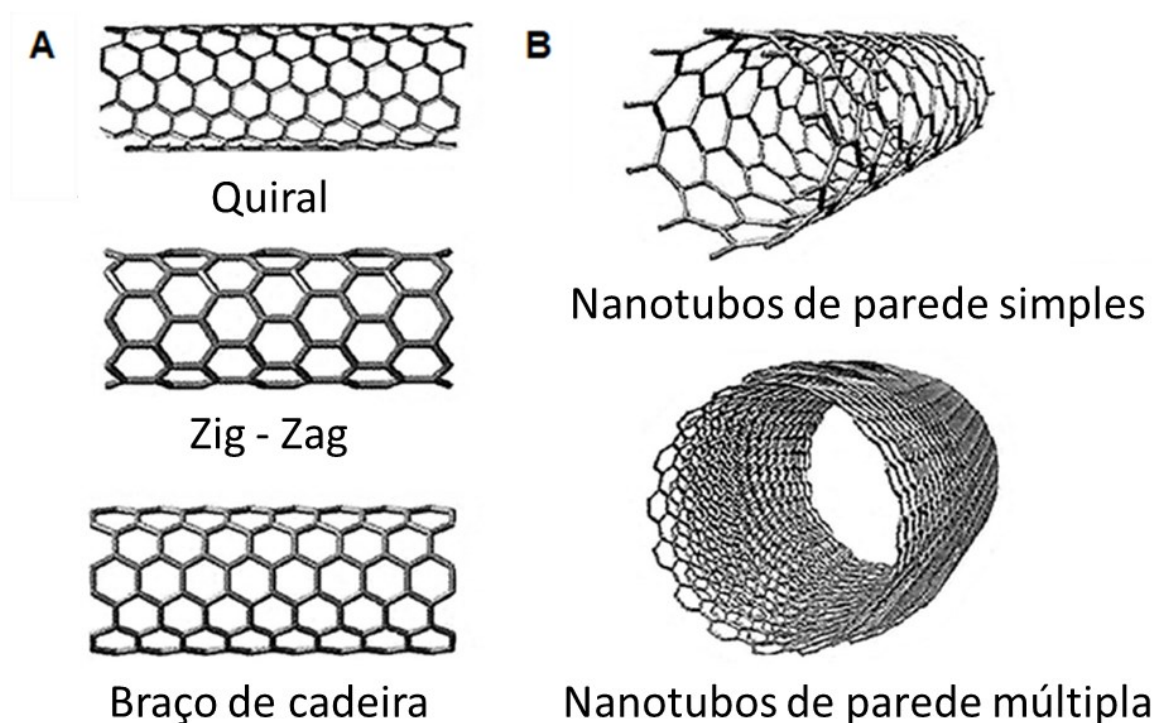
Fonte: (GEIM; NOVOSELOV, 2007)

O grafeno é um material semiconductor com aplicação diversa, apresentando alta rigidez e estabilidade térmica, sendo formado por uma folha de carbono, apresentando, portanto, caráter bidimensional (2D) (KOUR *et al.*, 2020). Além de ser precursor das demais estruturas citadas, a oxidação desse nanomaterial gera óxido de grafeno (GO, do inglês: *graphene oxide*), cuja posterior redução gera óxido de grafeno reduzido (rGO, do inglês: *reduced graphene oxide*), cujas aplicações de ambos em biossensores já foram descritas (FLAUZINO *et al.*, 2021; MOÇO *et al.*, 2019).

Os Fulerenos e nanotubos de carbono (CNT, do inglês: *carbono nanotubes*) são, basicamente, folhas de grafeno enroladas em formato esférico zerodimensional (0D) e cilíndrico unidimensional (1D), respectivamente, como demonstra a Figura 12. Enquanto o fulereno é caracterizado a partir do número de carbonos (C_n) presentes em sua estrutura, podendo conter de 20 (C_{20}) a 60 (C_{60}) átomos; os CNT possuem dois tipos de classificação. A primeira distingue os CNT de parede múltipla (MWCNT, do inglês: *multi-walled carbono nanotubes*), ou seja,

formados com dois ou mais tubos concêntricos, dos de parede simples (SWCNT, do inglês: *single walled carbono nanotubes*), apenas um tubo; já a segunda, os caracteriza a partir do número de vetores na estrutura cristalina do grafeno ao longo de duas direções de sua estrutura hexagonal, podendo ser zigzague, *armchair* ou *chiral*, demonstrados na Figura 13. Ambos, fulereno e CNT's, possuem aplicação na área médica e em biossensores já descrita (KOUR *et al.*, 2020; LAMBERTI *et al.*, 2015).

Figura 13 – Representação das possíveis formas de nanotubos de carbono A) aos ângulos da folha de grafeno e B) em relação ao número de tubos concêntricos.

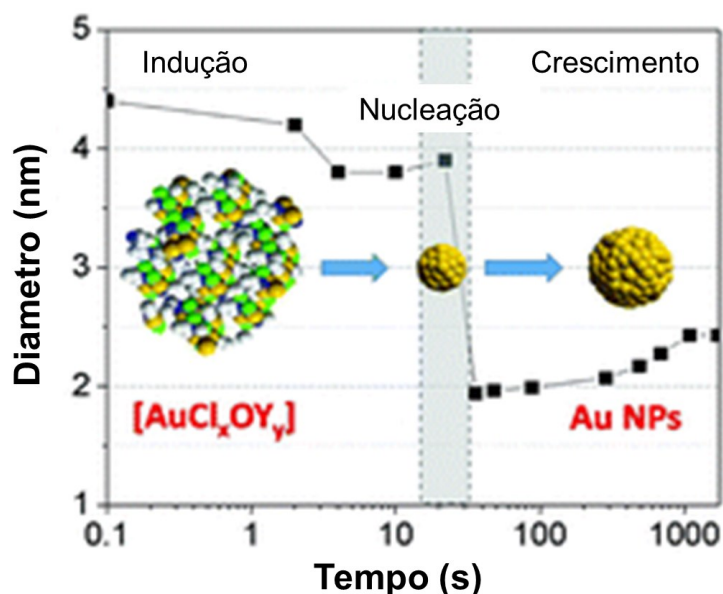


Fonte: (LAMBERTI *et al.*, 2015)

Além de estruturas baseadas em carbono, nanomateriais metálicos também tem sido amplamente aplicados em diversos meios, como em biossensores, devido às suas características ópticas e elétricas singulares. Tais materiais podem ter formatos esféricos (nanopartículas, NP), cúbicos, em bastonetes, estrelas, etc., e sua composição pode variar de acordo com seus precursores metálicos, como ouro, prata, cobre, zinco, entre outros (YARAKI; TAN, 2020).

A síntese de nanopartículas metálicas, como por exemplo de AuNP's, pode ser feita a partir da redução de um precursor metálico, como o ácido tetracloroáurico (III) (AuCl_4H) (fase de indução), em solução o que forma átomos de metal zero-valente, de modo a cruzar a barreira de energia de ativação, fazendo com que esses se agrupem, processo que, quando atinge tamanho crítico de agrupamento, é denominado de nucleação, o qual é seguido pela fase de crescimento dessas partículas. Tal método se baseia na teoria clássica de nucleação (CNT, do inglês: *classical nucleation theory*) e está representada pela Figura 14, porém há outras formas de síntese que não necessitam extrapolar o limiar de supersaturação de átomos reduzidos por gerar aglomerados a partir da formação sucessiva de dímeros, por exemplo (RAMAMOORTHY *et al.*, 2020).

Figura 14 – Representação dos estados síntese *bottom-up* para AuNP's



Fonte: (RAMAMOORTHY *et al.*, 2020)

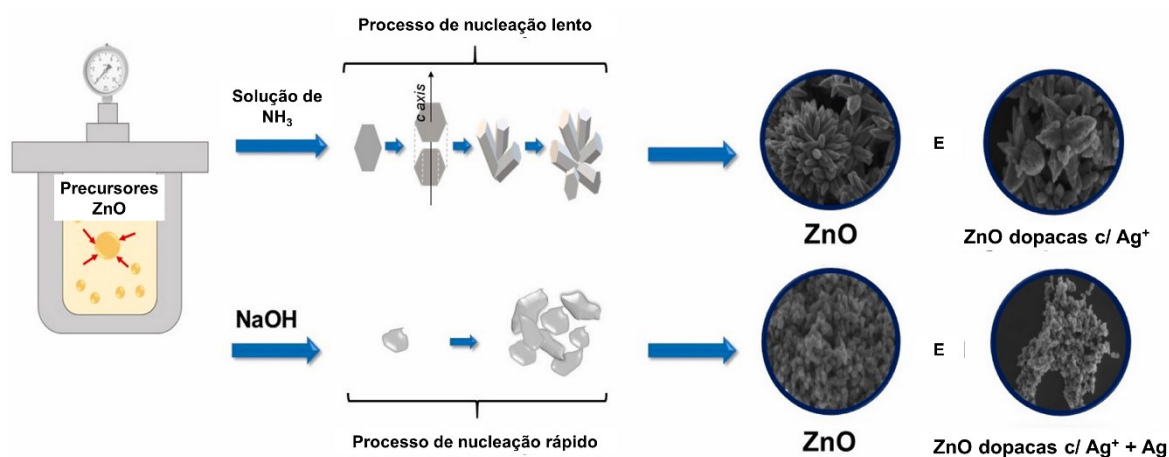
Já em relação às características óptico-colorimétricas das nanopartículas metálicas, as AuNP's, por exemplo, apresentam diferentes faixas de absorção por espectroscopia UV-visível de acordo com os seus tamanhos, seguindo o princípio de que em tamanhos menores, apresentam coloração avermelhada, e em maiores, azulada, de um modo geral. Tal característica associada a intensa ligação entre átomos de enxofre e ouro é útil na aplicação em biosensores, haja vista a possibilidade de imobilização orientada de sondas biológicas (DNA e anticorpos,

por exemplo) modificadas com grupamento tiol. Além disso, como demonstrado por Oliveira e colaboradores, 2018, AuNP's modificadas com sonda para hepatite B (AuNPs/HEPB1S) apresentam menor susceptibilidade a desestabilização por sal saturado na presença do alvo complementar (AuNPs/HEPB1S). No entanto, AuNPs/HEPB1S na presença de amostras negativas, E. coli (EC) e hepatite C (HCV) não desestabilizam, apresentando coloração avermelhada, indicando a seletividade do biosensor (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Além das nanopartículas de ouro, nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) também demonstram diversas aplicações biomédicas, incluindo *drug delivery*, *delivery* de genes, antimicrobiana e em biossensores (RAJESHKUMAR; LAKSHMI; NAIK, 2019). Normalmente, tais estruturas são conjugadas a nanoestruturas carbônicas para a aplicação em biossensores para diagnóstico da COVID-19 (HAGHAYEGH *et al.*, 2022; SARWAR *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2023).

Recentemente, foi testada a influência de soluções alcalinas de amônia (NH_3) e hidróxido de sódio (NaOH) na formação de nanoestruturas de ZnO e ZnO dopado com prata (Ag), a partir de uma nova síntese que utiliza o método hidrotérmico assistido por micro-ondas, cujos resultados foram nanoestruturas de formatos e tamanhos distintos (GUSMÃO *et al.*, 2021). O esquema de tais processos, assim como a morfologia de tais nanomateriais são apresentadas na Figura 15.

Figura 15 – Representação dos métodos de síntese de nanopartículas de óxido de zinco dopadas com prata.



Fonte: (GUSMÃO *et al.*, 2021)

Deste modo, devido a importância do diagnóstico para COVID-19, indica-se o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico altamente estável, capaz de realizar a detecção do RNA genômico do SARS-CoV-2, a partir de eletrodos screen-printed de carbono modificados com nanoestruturas de ZnO dopado com prata (Ag), haja vista seu caráter inovador e seu possível potencial eletroquímico.

4 REFERÊNCIAS

AGUIAR, B. F. *et al.* Reprocessing of N95 masks or equivalent: a narrative review. **Journal of Infection Control**, v. 9, n. 2, p. 78–85, 21 abr. 2020.

ANTUÑA-JIMÉNEZ, D. *et al.* Screen-Printed Electrodes Modified with Metal Nanoparticles for Small Molecule Sensing. **Biosensors**, v. 10, n. 2, p. 9, fev. 2020. <https://doi.org/10.3390/bios10020009>.

BAGOTSKY, V. S. **Fundamentals of Electrochemistry**. 2. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2005. p. 573-593. <https://doi.org/10.1002/047174199X.ch30>.

BHATTARAI, P.; HAMEED, S. Basics of Biosensors and Nanobiosensors. Em: **Nanobiosensors**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2020. p. 1–22. <https://doi.org/10.1002/9783527345137.ch1>.

Brazil WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data. Disponível em: <<https://covid19.who.int>>. Acesso em: 31 ago. 2023.

CAJIGAS, S. *et al.* Electrochemical genosensor for the specific detection of SARS-CoV-2. **Talanta**, v. 245, p. 123482, 1 ago. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123482>.

CAVALCANTE, J. R. *et al.* COVID-19 no Brasil: evolução da epidemia até a semana epidemiológica 20 de 2020. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 29, n. 4, 2020. p.1-13. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742020000400010>.

CHEN, S. 2 - Practical Electrochemical Cells. Em: ZOSKI, C. G. (Ed.). **Handbook of Electrochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 33–56. <https://doi.org/10.1016/B978-044451958-0.50003-3>.

DHAMAD, A. E.; RHIDA, M. A. A. COVID-19: molecular and serological detection methods. **PeerJ**, v. 8, p. e10180, 7 out. 2020. <https://doi.org/10.7717/peerj.10180>.

DIAS, V. M. DE C. H. *et al.* Orientações sobre Diagnóstico, Tratamento e Isolamento de Pacientes com COVID-19/ Guidelines on the Diagnosis, Treatment and Isolation of Patients with COVID-19. **Journal of Infection Control**, v. 9, n. 2, p. 58–77, 13 abr. 2020.

DROZDZIK, A.; DROZDZIK, M. Oral Pathology in COVID-19 and SARS-CoV-2 Infection—Molecular Aspects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1431, jan. 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23031431>.

EISSA, S. *et al.* Voltammetric-based immunosensor for the detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid antigen. **Microchimica Acta**, v. 188, n. 6, p. 199, 26 maio 2021. <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04867-1>.

ELLEGE, S. K. *et al.* Engineering luminescent biosensors for point-of-care SARS-CoV-2 antibody detection. **Nature Biotechnology**, v. 39, n. 8, p. 928–935, ago. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00878-8>.

FERREIRA, D. L. F. *et al.* Espectroscopia de Impedância Eletroquímica: Princípios Básicos e Algumas Aplicações. **Revista Virtual de Química**, v. 15, n. 3, 13 set. 2022. p. 536-552.

FLAUZINO, J. M. R. *et al.* DNA electrochemical biosensor for detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* utilizing *Hoechst 33258* as indicator. **Bioelectrochemistry**, v. 140, p. 107801, 1 ago. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107801>.

FONSECA, D. L. M. *et al.* Severe COVID-19 patients exhibit elevated levels of autoantibodies targeting cardiolipin and platelet glycoprotein with age: a systems biology approach. **npj Aging**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 24 ago. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41514-023-00118-0>.

FORINOVÁ, M. *et al.* Biosensor for rapid detection of SARS-CoV-2 in real-world samples. **2021 IEEE Sensors**, p. 1–4, out. 2021. <https://doi.org/10.1109/SENSORS47087.2021.9639783>.

GARCÍA LOZANO, M. *et al.* Chapter 40 - Biosensors for Food Quality and Safety Monitoring: Fundamentals and Applications. Em: KUDDUS, M. (Ed.). **Enzymes in Food Biotechnology**. [s.l.] Academic Press, 2019. p. 691–709. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00040-2>.

GEIM, A. K.; NOVOSELOV, K. S. The rise of graphene. **Nature Materials**, v. 6, n. 3, p. 183–191, mar. 2007. <https://doi.org/10.1038/nmat1849>.

GUSMÃO, L. A. *et al.* Alkali influence on ZnO and Ag-doped ZnO nanostructures formation using the microwave-assisted hydrothermal method for fungicidal inhibition. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 158, p. 110234, 1 nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2021.110234>.

HAGHAYEGH, F. *et al.* Highly Stable Buffer-Based Zinc Oxide/Reduced Graphene Oxide Nanosurface Chemistry for Rapid Immunosensing of SARS-CoV-2 Antigens. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, n. 8, p. 10844–10855, 2 mar. 2022. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c24475>.

HALEEM, A. *et al.* Biosensors applications in medical field: A brief review. **Sensors International**, v. 2, p. 100100, 1 jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2021.100100>.

HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 12, p. 1100–1115, 1 dez. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>.

HE, P.; XU, Y.; FANG, Y. A Review: Electrochemical DNA Biosensors for Sequence Recognition. **Analytical Letters**, v. 38, n. 15, p. 2597–2623, 1 dez. 2005. <https://doi.org/10.1080/00032710500369794>.

HE, Y. *et al.* Development of Nanobody-Displayed Whole-Cell Biosensors for the Colorimetric Detection of SARS-CoV-2. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 15, n. 31, p. 37184–37192, 9 ago. 2023. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c05900>.

HEIDARY, M. *et al.* COVID-19 in HIV-positive patients: A systematic review of case reports and case series. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 36, n. 4, p. e24308, abr. 2022. <https://doi.org/10.1002/jcla.24308>

Histórico da pandemia de COVID-19 - Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS)/OMS. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19>>. Acesso em: 31 ago. 2023.

HUA, Y. *et al.* DNA-Based Biosensors for the Biochemical Analysis: A Review. **Biosensors**, v. 12, n. 3, p. 183, 20 mar. 2022. <https://doi.org/10.3390/bios12030183>.

HUSSEN, H.; ALEMU, Z. A. Risk of COVID-19 Infection and Associated Factors Among Healthcare Workers: A Cross-Sectional Study at Eka Kotebe Treatment Center in Ethiopia. **International Journal of General Medicine**, v. 14, p. 1763–1772, 7 maio 2021. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S301518>.

INSTITUTO BUTANTAN. **Retrospectiva 2021: segundo ano da pandemia é marcado pelo avanço da vacinação contra Covid-19 no Brasil.** Disponível em: <<https://butantan.gov.br/noticias/retrospectiva-2021-segundo-ano-da-pandemia-e-marcado-pelo-avanco-da-vacinacao-contr-covid-19-no-brasil>>. Acesso em: 31 ago. 2023.

International Pharmaceutical Federation - Public health emergencies. Disponível em: <<https://www.fip.org/public-health-emergencies>>. Acesso em: 31 ago. 2023.

JANIK-KARPINSKA, E. *et al.* Immunosensors—The Future of Pathogen Real-Time Detection. **Sensors**, v. 22, n. 24, p. 9757, jan. 2022. <https://doi.org/10.3390/s22249757>.

JUNIOR, R. B. DE O.; LOURENÇO, P. M. **Alterações laboratoriais e a COVID-19.** Disponível em: <<https://www.rbac.org.br/artigos/alteracoes-laboratoriais-e-covid-19/>>. Acesso em: 2 set. 2023.

KARIMZADEH, A. *et al.* Peptide based biosensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 107, p. 1–20, 1 out. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.07.018>.

KIM, G. -U *et al.* Clinical characteristics of asymptomatic and symptomatic patients with mild COVID-19. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 7, p. 948.e1-948.e3, 1 jul. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.04.040>.

KISSINGER, P. T.; HEINEMAN, W. R. Cyclic voltammetry. **J. Chem. Educ.**, v. 60, n. 9, p. 702–706, 1983. <https://doi.org/10.1021/ed060p702>.

KOCHANA, J.; POLLAP, A.; MADEJ, M. Introduction to Biosensors. Em: BUSZEWSKI, B.; BARANOWSKA, I. (Eds.). **Handbook of Bioanalytics**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 729–745. https://doi.org/10.1007/978-3-030-95660-8_33.

KOUR, R. *et al.* Review—Recent Advances in Carbon Nanomaterials as Electrochemical Biosensors. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 167, n. 3, p. 037555, jan. 2020. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ab6bc4>.

LAMBERTI, M. *et al.* Carbon nanotubes: Properties, biomedical applications, advantages and risks in patients and occupationally-exposed workers. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 4–13, 1 mar. 2015. <https://doi.org/10.1177/0394632015572559>.

LAZANAS, A. CH.; PRODRONIDIS, M. I. Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial. **ACS Measurement Science Au**, v. 3, n. 3, p. 162–193, 21 jun. 2023. <https://doi.org/10.1021/acsmeasuresciau.2c00070>.

LIV, L. *et al.* A rapid, ultrasensitive voltammetric biosensor for determining SARS-CoV-2 spike protein in real samples. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 192, p. 113497, 15 nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113497>.

LOOS, M. Chapter 1 - Nanoscience and Nanotechnology. Em: LOOS, M. (Ed.). **Carbon Nanotube Reinforced Composites**. Oxford: William Andrew Publishing, 2015. p. 1–36. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3195-4.00001-1>.

LU, Y. *et al.* Aptamer-Based Electrochemical Sensors with Aptamer–Complementary DNA Oligonucleotides as Probe. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 6, p. 1883–1890, 15 mar. 2008. <https://doi.org/10.1021/ac7018014>

MANZANO, M. Chapter 6 - Labelled and unlabelled probes for pathogen detection with molecular biology methods and biosensors. Em: GÜRTLER, V. (Ed.). **Methods in Microbiology**. Fluorescent Probes. [s.l.] Academic Press, 2021. v. 48p. 179–225. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2021.03.001>.

MEHROTRA, P. Biosensors and their applications – A review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, n. 2, p. 153–159, 1 maio 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>.

MEI, Y. *et al.* Recent Progresses in Electrochemical DNA Biosensors for SARS-CoV-2 Detection. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, p. 952510, 15 jul. 2022. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.952510>.

MENEZES, M. E.; LIMA, L. M.; MARTINELLO, F. **Diagnóstico laboratorial do SARS-CoV-2 por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)**. Disponível em: <<https://www.rbac.org.br/artigos/diagnostico-laboratorial-do-sars-cov-2-por-transcricao-reversa-seguida-de-reacao-em-cadeia-da-polimerase-em-tempo-real-rt-pcr/>>. Acesso em: 2 set. 2023.

MICHELON, M. C. Principais variantes do SARS-CoV-2 notificadas no Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas (RBAC)**, 29 abr. 2021.

MIRCESKI, V.; GULABOSKI, R. Recent achievements in square-wave voltammetry – A review. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 33, n. 1, p. 1–12, 2 maio 2014.

MIRIPOUR, Z. S. *et al.* Real-time diagnosis of reactive oxygen species (ROS) in fresh sputum by electrochemical tracing; correlation between COVID-19 and viral-induced ROS in lung/respiratory epithelium during this pandemic. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 165, p. 112435, 1 out. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112435>.

MOÇO, A. C. R. *et al.* Electrochemical Detection of Zika Virus in Biological Samples: A Step for Diagnosis Point-of-care. **Electroanalysis**, v. 31, n. 8, p. 1580–1587, 2019. <https://doi.org/10.1002/elan.201900068>.

NAQVI, A. A. T. *et al.* Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 10, p. 165878, 1 out. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165878>.

NARESH, V.; LEE, N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. **Sensors**, v. 21, n. 4, p. 1109, jan. 2021. <https://doi.org/10.3390/s21041109>.

NOGUEIRA, J. M. DA R.; SILVA, L. O. P. DA. **Diagnóstico laboratorial da COVID-19 no Brasil**. Disponível em: <<https://www.rbac.org.br/artigos/diagnostico-laboratorial-da-covid-19-no-brasil/>>. Acesso em: 2 set. 2023.

NOTOMI, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, p. e63, 15 jun. 2000. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.

OLIVEIRA, D. A. *et al.* Application of nanomaterials for the electrical and optical detection of the hepatitis B virus. **Analytical Biochemistry**, v. 549, p. 157–163, 15 maio 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.03.023>.

Painel Coronavírus. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 31 ago. 2023.

POHANKA, M. Current Trends in the Biosensors for Biological Warfare Agents Assay. **Materials**, v. 12, n. 14, p. 2303, jan. 2019. <https://doi.org/10.3390/ma12142303>.

POLONI, J. A. T.; JAHNKE, V. S.; ROTTA, L. N. **Insuficiência renal aguda em pacientes com COVID-19**. Disponível em: <<https://www.rbac.org.br/artigos/insuficiencia-renal-aguda-em-pacientes-com-covid-19/>>. Acesso em: 2 set. 2023.

PUNTMANN, V. O. *et al.* Outcomes of Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging in Patients Recently Recovered From Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **JAMA Cardiology**, v. 5, n. 11, p. 1265–1273, 1 nov. 2020. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2020.3557>.

RAJESHKUMAR, S.; LAKSHMI, T.; NAIK, P. Chapter 18 - Recent advances and biomedical applications of zinc oxide nanoparticles. IN: SHUKLA, A. K.; IRAVANI, S. (Eds.). **Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles**. Micro and Nano Technologies. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 445–457. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00019-8>.

RAMAMOORTHY, R. K. *et al.* The role of pre-nucleation clusters in the crystallization of gold nanoparticles. **Nanoscale**, v. 12, n. 30, p. 16173–16188, 6 ago. 2020. <https://doi.org/10.1039/D0NR03486J>.

RASMUSSEN, A. L.; POPESCU, S. V. SARS-CoV-2 transmission without symptoms. **Science**, v. 371, n. 6535, p. 1206–1207, 19 mar. 2021. <https://doi.org/10.1126/science.abf9569>.

REZAEI, B.; IRANNEJAD, N. Chapter 2 - Electrochemical detection techniques in biosensor applications. Em: ENSAFI, A. A. (Ed.). **Electrochemical Biosensors**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 11–43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816491-4.00002-4>.

RIFINO, N. *et al.* Neurologic manifestations in 1760 COVID-19 patients admitted to Papa Giovanni XXIII Hospital, Bergamo, Italy. **Journal of Neurology**, v. 268, n. 7, p. 2331–2338, 1 jul. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-10251-5>.

SARWAR, S. *et al.* Ultrasensitive electrochemical biosensors based on zinc sulfide/graphene hybrid for rapid detection of SARS-CoV-2. **Advanced Composites and Hybrid Materials**, v. 6, n. 1, p. 49, 26 jan. 2023. <https://doi.org/10.1007/s42114-023-00630-7>.

SCHOLZ, F. Voltammetric techniques of analysis: the essentials. **ChemTexts**, v. 1, n. 4, p. 17, 9 set. 2015. <https://doi.org/10.1007/s40828-015-0016-y>.

SINGH, A. K. *et al.* Optical biosensors: a decade in review. **Alexandria Engineering Journal**, v. 67, p. 673–691, 15 mar. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2022.12.040>.

SOTO, D.; OROZCO, J. Peptide-based simple detection of SARS-CoV-2 with electrochemical readout. **Analytica Chimica Acta**, v. 1205, p. 339739, 1 maio 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339739>.

UZUNIAN, A. Coronavírus SARS-CoV-2 e Covid-19. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 56, p. e3472020, 25 set. 2020.

VÁSQUEZ, V. *et al.* SARS-CoV-2 electrochemical immunosensor based on the spike-ACE2 complex. **Analytica Chimica Acta**, v. 1205, p. 339718, 1 maio 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339718>.

WANDTKE, T. *et al.* Aptamers—Diagnostic and Therapeutic Solution in SARS-CoV-2. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1412, jan. 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23031412>.

WANG, J.-Z. *et al.* Post-synthetic modification-driven ZIF reconstruction and functionalization for efficient SARS-CoV-2 ECL detection. **Analyst**, v. 148, n. 15, p. 3603–3609, 26 jul. 2023. <https://doi.org/10.1039/D3AN00881A>.

WANG, S. *et al.* DNA Origami-Enabled Biosensors. **Sensors**, v. 20, n. 23, p. 6899, jan. 2020. <https://doi.org/10.3390/s20236899>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. Disponível em: <<https://covid19.who.int>>. Acesso em: 31 ago. 2023.

WOLFF, D. *et al.* Risk factors for Covid-19 severity and fatality: a structured literature review. **Infection**, v. 49, n. 1, p. 15–28, 1 fev. 2021. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01509-1>.

WU, J.; WU, Q. The Review of Biosensor and its Application in the Diagnosis of COVID-19. **E3S Web of Conferences**, v. 290, p. 03028, 2021. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202129003028>.

YANO, T. *et al.* Ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein using large gold nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1060, 20 jan. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05036-x>.

YARAKI, M. T.; TAN, Y. N. Metal Nanoparticles-Enhanced Biosensors: Synthesis, Design and Applications in Fluorescence Enhancement and Surface-enhanced Raman Scattering. **Chemistry – An Asian Journal**, v. 15, n. 20, p. 3180–3208, 2020. <https://doi.org/10.1002/asia.202000847>.

YIN, Q. *et al.* Chemiluminescence Immunoassay Based Serological Immunoassays for Detection of SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies in COVID-19 Convalescent Patients and Vaccinated Population. **Viruses**, v. 13, n. 8, p. 1508, 30 jul. 2021. <https://doi.org/10.3390/v13081508>.

YOON, J.-Y. **Introduction to Biosensors: From Electric Circuits to Immunosensors**. [s.l.] Springer, 2016. 2. ed., p. 171-193.

ZHANG, N. *et al.* Versatile artificial mer operons in *Escherichia coli* towards whole cell biosensing and adsorption of mercury. **PLOS ONE**, v. 16, n. 5, p. e0252190, 26 maio 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252190>.

CAPÍTULO 02 – Artigo de caráter experimental

Artigo escrito no formato padrão “*Biosensors and bioelectronics*”, disponível em: <https://www.elsevier.com/journals/biosensors-and-bioelectronics/0956-5663/guide-for-authors>

New COVID-19 diagnosis method: a stable amperometric biosensor based on carbon screen-printed electrodes modified with silver-doped zinc nanoparticles (ZnOAgNP) for SARS-CoV-2 genomic RNA detection.

José Augusto Leoncio Gomide¹; Anna Clara Rios Moço¹; Leonardo Toshio Rodrigues Tanaka¹; Maikon Rangel Alves Alexandre²; Fernanda Modesto Tolentino-Binhardi³; Milena Polotto de Santi³; Márcia Maria Costa Nunes Soares³; Ronaldo Junio de Oliveira⁴; Renata Cristina de Lima²; João Marcos Madurro^{1,2}; Ana Graci Brito Madurro^{1*}

1 - Instituto de Biotecnologia (IBTEC), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), 38400-902, Uberlândia-MG, Brazil.

2 - Instituto de Química (IQ-UFU), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), 38400-902, Uberlândia-MG, Brazil.

3 - Adolfo Lutz Institute, Regional Laboratory, 15061-020, São José do Rio Preto-SP, Brazil.

4 - Instituto de Ciências Exatas, Naturais e Educação, Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), 38064-200, Uberaba-MG, Brazil.

* Corresponding author: Laboratory of nanopolimeric films and nanotechnology (LAFIP) and Laboratory of biosensors (BIOSENS), Instituto de biotecnologia (IBTEC), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), 38400-902, Uberlândia-MG, Brazil.

E-mail address: agbrito@ufu.br (Ana Graci Brito Madurro).

Highlights

- First genosensor using silver doped zinc nanoparticles onto screen-printed carbon electrodes.
- Capable of realizing a COVID-19 diagnosis within 30 minutes without the need of any amplification, enzymatic process or heating.
- Linear range of 2×10^{-5} to 2×10^{-9} mol L⁻¹ and detection limit of 13 pmol L⁻¹ in nasal swab enriched with COV-2 target, with high reproducibility.
- Higher storage stability when compared to others genosensors for COVID-19 (60 days).
- Molecular modeling and morphological analysis in agreement with obtained electrochemical results.

Abstract

Recent data obtained of the World Health Organization reported seven million deaths from SARS-CoV-2 in the world. The virus primarily infects respiratory cells, triggering inflammatory responses and affecting various body systems, being age and comorbidities worsen disease severity and mortality. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) is the gold standard for SARS-CoV-2 detection but has limitations. Electrochemical genosensors offer cost-effective alternatives leveraging advantages, like selectivity and response time. In this work, silver-doped zinc oxide nanomaterial (ZnOAgNP) was used onto carbon screen-printed electrode and ethidium bromide as indicator for COVID-19 electrochemical genosensor development. The genosensor demonstrated a good linearity between the concentrations of 2×10^{-5} to 2×10^{-9} mol L⁻¹ and detection limit of 13 pmol L⁻¹, was able to detect the probe's complementary target in spiked and gRNA in patients samples. For first time, to the best of our knowledge, this a first genosensor using silver-doped zinc oxide nanomaterial, being the most stable genosensor for COVID-19, found in the literature.

Keywords: COVID-19; modified electrode; genosensor; nanomaterial; SARS; ZnOAgNP.

1. Introduction

According to the World Health Organization (WHO), there were notified until august 2023, seven million deaths for the Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 SARS-CoV-2 globally, which causes cough hyposmia (partial or total loss of smell), nasal congestion, hypogeusia (loss of taste) and fever (Kim *et al.*, 2020). The virus transmission occurs in either symptomatic or non-symptomatic infections through droplets of respiratory fluids and aerosols, being important the use of individual protection equipment and social distancing (Drozdzik and Drozdzik, 2022; Rasmussen and Popescu, 2021). Coronaviruses (CoVs) belong to the Coronaviridae family, from betacoronavirus (β -cov) genre, and are enveloped positive-sense single-stranded RNA (+ssRNA) viruses and present five main structural proteins: spike (S), envelope (E), membrane (M), nucleocapsid (N) and haemagglutinin-esterase (HE) proteins (Casella *et al.*, 2023; Naqvi *et al.*, 2020). This virus infects mainly cells from the respiratory tract, which leads to an acute inflammatory response capable of causing the lung tissue mal-function by the interferon I and II factors (IFNs) released during viral infection, which, associated with other cytokines, may also effect the cardiovascular, the cerebrovascular systems, etc. (Harrison *et al.*, 2020). Besides, the patient's age is a determining factor for both the degree of severity of the disease and the appearance of sequelae, with constant reports of decreased lymphocytes, increased neutrophils and impairment of the adaptive immune response (Harrison *et al.*, 2020). In addition, other comorbidities such as diabetes, immunosuppressive diseases (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS, for example), obesity and hypertension increase the severity, morbidity and mortality rates of COVID-19 infection (Heidary *et al.*, 2022; Wolff *et al.*, 2021).

Among the diagnostic methods for COVID-19, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) is considered the gold standard technique for detecting SARS-CoV-2, which is based on action of reverse transcriptase from total genomic RNA (gRNA) extracted from nasal swabs, followed by its amplification by DNA polymerase with specific primers for the N1, N2 and RNase P (RP) genes. As this is a quantitative PCR, fluorescence is emitted, detected and quantified in

relation to the amplification of the genes. Despite being the gold standard method, it is expensive, requires professional skills, takes time and needs be carried out in a laboratory, therefore, not being a point-of-care diagnostic method (Dhamad and Rhida, 2020; Menezes *et al.*, 2020).

For this reason, the use and development of new biosensors is indicated as cheap and efficient diagnostic methods for various diseases, such as COVID-19, which can surpass conventional techniques (NARESH; LEE, 2021). The diversity of applications reflects the unique characteristics of biosensors, such as selectivity, sensitivity and speed of response. These advantages contrast with the conventional analytical methods used to identify and quantify target analytes, since they are usually costly, time-consuming, non-selective in real samples, require many steps to separate molecules, use a lot of reagents and have little possibility of being used in the field (Haleem *et al.*, 2021; Kochana *et al.*, 2022; Mehrotra, 2016).

DNA biorecognition is based on highly specific base pairing between an oligonucleotide probe and its complementary a target sample and widely in biosensors (He *et al.*, 2005) for its easy, cheap and simple direct (without the use of an indicator) or indirect (with its use) detection. Electrochemical biosensors are widely used due to their low cost (especially with screen-printed carbon electrodes), sensitivity and portability and are based on the detection of reactions involving electrochemistry. These reactions and their electron transfers are detected by various electrochemical methods and all take place in electrochemical cells (Chen, 2007). Therefore, the establishment of new viral diagnostic methods with electrochemical genosensors is an alternative to conventional techniques.

The use of nanomaterials in biosensors development is important for the probes correct orientation, as well as to improve the electrodes electrochemical and physical characteristics, such as the conductivity and surface area (Moço *et al.*, 2019). Gusmão *et al.*, 2021, have recently described a new silver-doped zinc oxide nanomaterial, which electrochemical characteristics have not been tested yet in biosensors. In addition, the use of an indicator, may also improve the target's electrochemical detection. The Ethidium bromide is a reagent with high affinity to double stranded DNA strains and its electrochemical characteristics as an indicator for the nucleic acid detection in genosensors has already been described (de Castro

et al., 2022, 2018; Moço *et al.*, 2021), which makes it a great candidate for the development of a new biosensor for COVID-19.

For these reasons, this work aimed to develop a new genosensor, based on screen-printed carbon electrode modified with silver-doped zinc oxide nanoparticles, using ethidium bromide as an indicator.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Ultrapure water (MS 3000, Gehaka, Brazil) was utilized in the preparation of all solutions. 1-Methyl-2-Pyrrolidone (Dinâmica, Brazil) was used to suspend the metallic Silver doped Zinc oxide nanoparticles (ZnOAgNP). Sulfuric acid solution (H_2SO_4 , 0.1 mol l^{-1} , Neon, Brazil) was used in the preconditioning of the electrodes. A Sodium phosphate buffer (Na_2HPO_4 and NaH_2PO_4 , 0.1 mol l^{-1} , pH 7.4, Neon, Brazil) was used as support electrolyte for the electrochemical reduction of Ethidium bromide (EB, 1×10^{-4} mol l^{-1} , United States of America, Merck) for the further electrochemical detections with the Differential pulse voltammetry (DPV) technique. A potassium chloride solution (KCl 0.1 mol l^{-1} , Neon, Brazil), containing potassium ferrocyanide/ferricyanide ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 5 mmol l^{-1} , Acros Organics, USA), was used for the electrochemical characterization of the electrode and its modifications. Oligonucleotides sequences (Exxtend, Brazil) were used as the SARS-CoV-2 DNA probe (COVP -5'TTACAAACATTGGCCGCAA3'), SARS-CoV-2 target (COVT -5'TTTGCGGCCAATGTTTGTA3'), and SARS-CoV-2 negative (ZIKA -5'CTTGTGTGTTGGGCAGCG3'). The SARS-CoV-2 sequences were based on the ones developed by Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and the ZIKA from Adolfo Lutz Institute.

2.2. Apparatus

The DP-110 screen-printed carbon electrodes (SPCE) (Metrohm, Switzerland) were used in this work. The preconditioning and electrochemical detection were executed on the Dropsens 8400 potentiostat (Metrohm, Switzerland) and the Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) were analysed on the

Gamry interface 1000 (Gamry Instruments, United States of America). Atomic force microscopy (AFM) and Scanning electron microscopy (SEM), coupled to Energy Dispersive x-ray Spectroscopy (EDS), were made, respectively, on a SPM 9600 microscope (Shimadzu) with a NGS01 cantilever (Scansens) and a VEGA 3 LMU microscope (Tescan, Czech Republic) for the surface morphology analysis. Rede de Laboratórios Multiusuários da Universidade Federal de Uberlândia (RELAM-UFU) carried out the SEM and EDS analysis.

2.3. Preparation of Ag-doped ZnO nanoparticles (ZnOAgNP)

It was followed the protocol previously described by Gusmão *et al.*, 2021, with a few modifications. The sample of ZnOAgNP (8% mol Ag) was obtained by adding 1.93×10^{-4} mol of AgNO_3 in a solution containing 2.39×10^{-3} mol of $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ in 40 ml of distilled water. Then, Sodium hydroxide (NaOH) solution (3 mol l^{-1}) was added until $\text{pH} = 12$ was attained. The final solution was transferred to a sealed Teflon autoclave and heated by microwave assisted hydrothermal method for 8 minutes at 90°C . The precipitate powder was washed three times with distilled water and one time with ethanol. Lastly, the sample was dried at 60°C for 2 hours in atmospheric air. For the electrochemical use, 1.6 mg of the ZnOAgNP powder was solubilised in 15 ml in 1-Methyl-2-Pyrrolidone, to which was applied ultrasonication bath.

2.4. Preparation and characterization of the carbon electrode and its modifications

Before every analysis, the SPCE were preconditioned by Cyclic voltammetry (CV) with a H_2SO_4 solution in the range of 0 to 1 V and velocities of 500 mV s^{-1} (50 cycles), 100 mV s^{-1} (10 cycles) and 50 mV s^{-1} (5 cycles). The last scan of the preconditioning of each electrode was selected to their electrochemical properties similarity evaluation. After their preconditioning, 5 μl of ZnOAgNP solution were dropped onto the surface of the working electrode, which were then incubated for 40 minutes at 60°C . For the electrochemical characterization of the bare electrode (SPCE) and after its modification with ZnOAgNP (SPCE/ZnOAgNP), was

made a CV with the ferrocyanide/ferricyanide solution (-0.4 to 0.6V range; 50mV s⁻¹) and an EIS with frequency range of 10000 Hz to 0.1 Hz, open circuit potential, 10 mV of amplitude and quiet time of 10 s. The potentials and currents of cathodic (E_{CP} , I_{CP}) and anodic peaks (E_{AP} , I_{AP}) as well as the area obtained by the integration of the CV plot made with the redox couple were evaluated. The charge transfer resistance (R_{CT}) was obtained by EIS of the SPCE and the SPCE/ZnOAg and their circuits by the Gamry Echem Analyst software (Gamry Instruments, United States of America). The circuits fitting were analysed by the chi-square (χ^2) test, in which values below 0.001 were accepted. The surface characterizations and composition evaluation were made through AFM, SEM and EDS, as previously described. The AFM results were analysed by the Gwyddion software (Czech republic) and the Mean square roughness (S_q) value was obtained for further quantitative comparison. For SEM and EDS analysis, the samples were sputter coated with an ultrathin layer of gold.

2.5. Genosensor construction and electrochemical detection

The genosensor construction is represented by the Figure 1 and was initiated by the electrodes preconditioning and the ZnOAgNP addition to its surface, as previously described. Subsequently, the 5 μ L of COVP oligonucleotide solution in phosphate buffer, 1×10^{-6} mol l⁻¹, maintained at -20°C, were dropped onto the SPCE/ZnOAg working electrode (SPCE/ZnOAgNP/COVP), which was then incubated in 60°C for 15 min.

The electrochemical detection were carried out after the genosensor construction and were made by the addition of 5 μ l of COVT solution (suspended in phosphate buffer, 4×10^{-6} mol l⁻¹) onto the SPCE/ZnOAgNP/COVP working electrode (SPCE/ZnOAgNP/COVP/COVT) and then incubated for 20 minutes in Room temperature (RT). After the probe hybridization to its target, the electrode was submerged into phosphate buffer solution for 5 seconds and, then 5 μ l of the EB solution were added to the surface of the SPCE/ZnOAgNP/COVP and SPCE/ZnOAgNP/COVP/COVT and incubated in RT for 5 min. The electrodes were washed, as previously described, and the BE oxidation peak were evaluated with a DPV in the range of 0.2 to 0.6 V (velocity of 50mV s⁻¹, 25 mV of pulse amplitude and 0.01 s of pulse time). The ZIKA sequence (a non-complementary

oligonucleotide to COVP) was used for the selectivity essay, which was executed similarly the electrochemical detection as described, with the substitution of the target sequence to the ZIK (SPCE/ZnOAgNP/COVP/ZIKA). EIS, SEM and AFM were carried out for SPCE/ZnOAgNP/COVP and SPCE/ZnOAg/COVP/COVT.

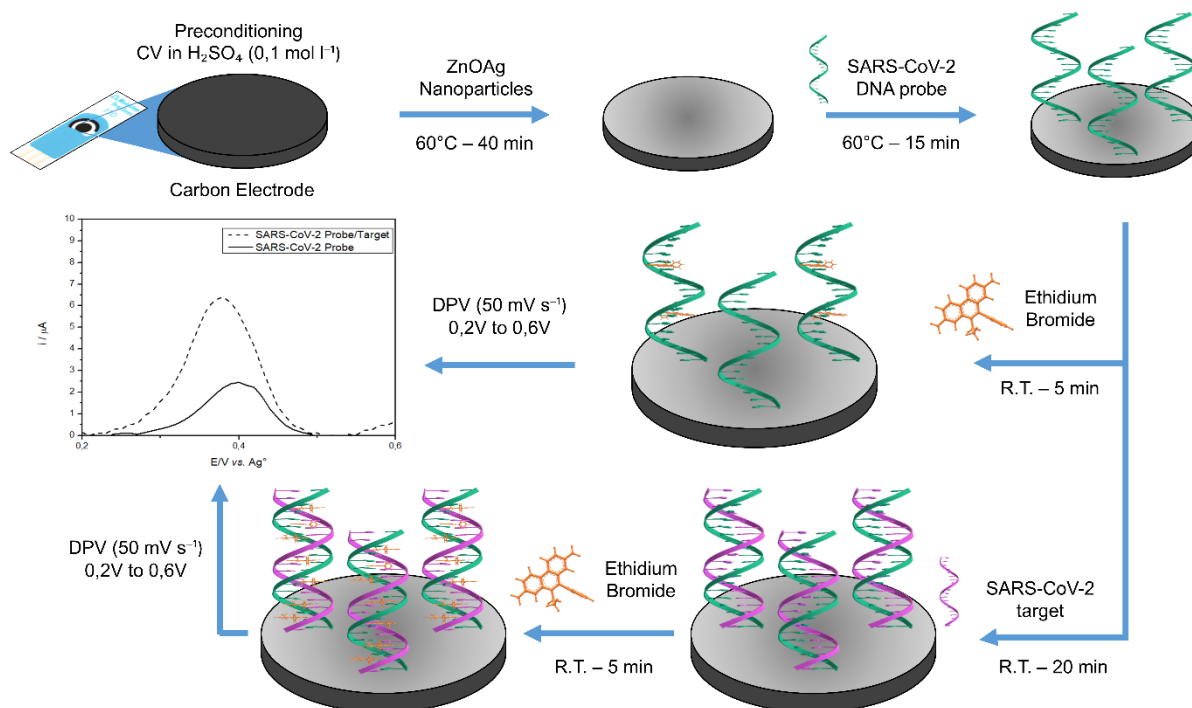


Figure 1. Illustration of the construction of the SARS-CoV-2 biosensor. The workflow represents the electrode pre-conditioning, its ZnOAgNP modification, COVP adsorption, COVT recognition by the probe and its indirect detection with EB.

2.6. SARS-CoV-2 calibration curve development and stability evaluation in real spiked samples

A nasopharynx sample was taken from a previously negative diagnosed Covid-19 patient, in which the swab was immersed into 5 ml of phosphate buffer and stored refrigerated at 3°C . Spiked samples were prepared through the solubilisation of the COVT with the nasopharynx sample in the concentrations of 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-7} , 2×10^{-8} and $2 \times 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$. These solutions were prepared in the day their detections, which was made as previously described comparing the negative and spiked samples. The linear regression were obtained and the Limit of Detection (LOD) was calculated through the Formula 1. To evaluate the stability of

the biosensor, genosensors were constructed at day zero, stored in refrigeration at 3°C, and their electrochemical target detection in the spiked sample ($2 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$) was evaluated in the times zero, 10, 20, 40 and 60 days.

$$LOD = \frac{3.3 * \text{standard error}}{\text{angular coefficient}}$$

2.7. SARS-CoV-2 gRNA extraction and analysis of patient samples

The SARS-CoV-2 gRNA were extracted by nasopharynges samples of patients by the Adolfo Lutz Institute (São Paulo, Brazil, Ethics Commission Number: 47757021.0.0000.0059) through the Extracta Kit (Loccus, Brazil). The qualitative diagnostic of SARS-CoV-2 were made by reverse transcriptase- polymerase chain reaction (RT-PCR) through the molecular kit INFA/INFB/SC2 (Bio-Manguinhos, Brazil). The extracted samples were stored at -80°C at the Rede de Laboratórios Multiusuários da Universidade Federal de Uberlândia (RELAM- UFU). Both positive and negative samples were evaluated by the biosensor described by this work in order to test its selectivity.

2.8. Computational protocol

The initial conformation of the DNA probe was created in a local python notebook with the COVP sequence evaluated by the proto-Nucleic-Acid Builder (pNAB) library (Alenaizan *et al.*, 2021). The resulting pNAB initial structure was submitted to the CHARMM-GUI web server (Lee *et al.*, 2016) that created the files for the following molecular dynamics step. Default parameters were used in the web server for the building steps: reading, solvating and setting up periodic boundary conditions. KCl ions were added to neutralize extra charges. The simulation step was composed of energy minimization, room temperature equilibration and one 10-ns production run. This molecular dynamics step was executed in the recent GROMACS suite version 2023.1 for GPUs (Berendsen *et al.*, 1995; Páll *et al.*, 2020). The last step was to perform the molecular docking studies with the conformation of the last snapshot run. DT10 nucleotide at the center of the double-stranded DNA was chosen as the ligand-binding cavity center. The molecular docking of the EB indicator on the dsDNA structure was evaluated with the Genetic Optimization for Ligand Docking (GOLD) suit version 2023 (Verdonk *et al.*, 2003), similarly to the previous published methods (Kaiser da Silva *et al.*, 2022; Pereira *et*

al., 2021; Souza *et al.*, 2022). Protein structures were analyzed with PyMOL (<https://pymol.org>) and ProteinsPlus (Schöning-Stierand *et al.*, 2020) web server identified the mainly DNA-ligand interactions. This theoretical study was based in previous protocols (Alves *et al.*, 2019; Antunes *et al.*, 2019; Guedes *et al.*, 2021).

3. Results

3.1. Electrodes and its modification with ZnOAgNP characterization

The characterization of the electrode and its modification with the ZnOAgNP were made through CV and EIS with the redox couple $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ solution as well by the surface morphological microscopies. All the results are displayed at Figure 2.

It was observed a brief shift on E_{CP} (0.06 V, SPCE; 0.04 V, SPCE/ZnOAgNP) and E_{AP} (0.21 V, SPCE; 0.18 V, SPCE/ZnOAgNP) as well as an increase of 24% on the I_{AP} (119.3 μA , SPCE; 174.9 μA SPCE/ZnAgNP) and of 27% on I_{CP} (118.7 μA , SPCE; 151.1 SPCE/AgNP) on the CV analysis after the electrodes modification. The integration of the CV plot also demonstrated an increase of 35% on the plot area of the SPCE/ZnOAg (1194.90 $\mu A \times V \pm 12.09$) when compared to the SPCE (880.4 $\mu A \times V \pm 7.14$). These results are found on Figure 2A as a voltammogram and a bar graphic of the plot areas.

Through the EIS technique, it was possible to notice an intense reduction of 82% on the R_{CT} values when comparing the SPCE to SPCE/ZnOAgNP results, being 369.9 $\Omega \pm 21.9$ and 56.63 $\Omega \pm 3.7$, respectively ($n=3$). The Randle's cell model was fitted to the circuit and showed a χ^2 of 6.69×10^{-4} for SPCE and $7,5 \times 10^{-4}$ for SPCE/ZnOAgNP. The results of EIS are displayed at the Figure 2B.

The SEM analysis demonstrated a profile typical of a SPCE electrode evidencing the carbon flakes enclosed to the electrode's surface, which can be seen at the Figure 2C. The same was observed of the SPCE the AFM analysis (Figure 2D), of which S_q value was of 184.9 nm $\pm$ 15.41. Whereas, the SPCE/ZnAgONP SEM profile (Figure 2E) showed clusters of nanostructure with medium size of 93 nm $\pm$ 6.12 (meseared by ImageJ, USA) believed to be the ZnOAgNP onto the electrode's surface, as the AFM analysis (Figure 2F) demonstrated an increase of roughness for about 49% (362.5 nm $\pm$ 24.32), when compared to SPCE.

In order to prove the composition of the nanoclusters observed at the SPCE/ZnOAgNP visualized at the SEM analysis, it was carried out an EDS evaluation, which demonstrated the absence, in the SPCE samples (Figure 2G), and presence of Zinc and a slight residue of Silver in the SPCE/ZnOAgNP (Figure 2H). The apparent concentrations ratio were of 10:1.

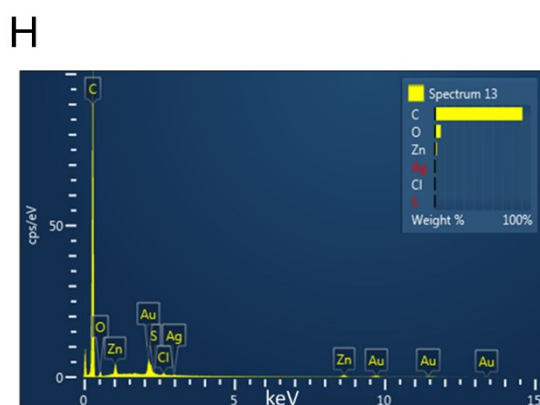
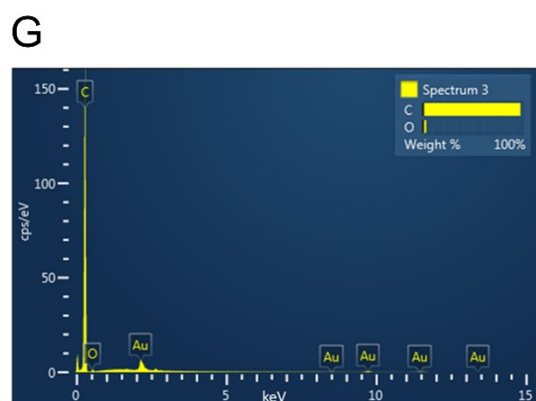
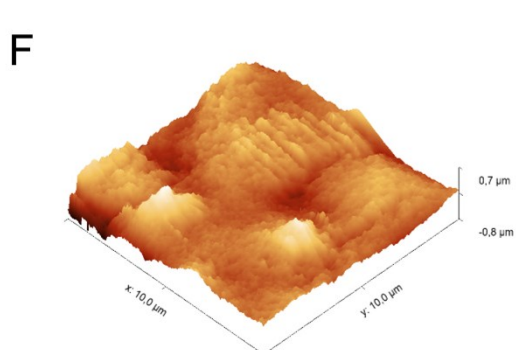
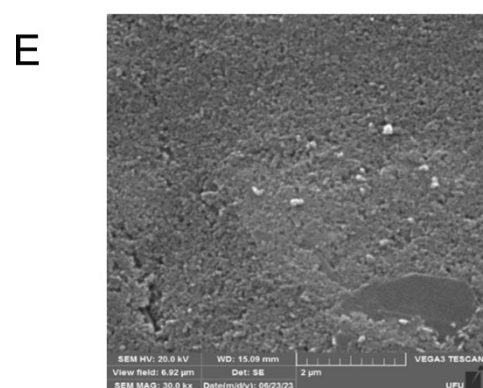
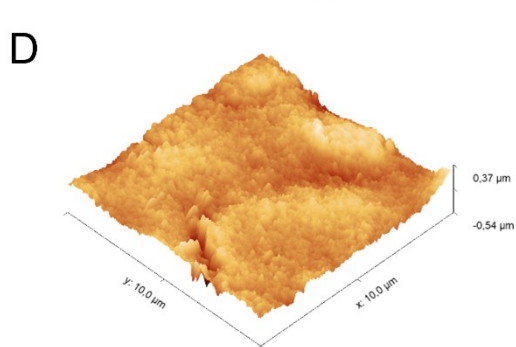
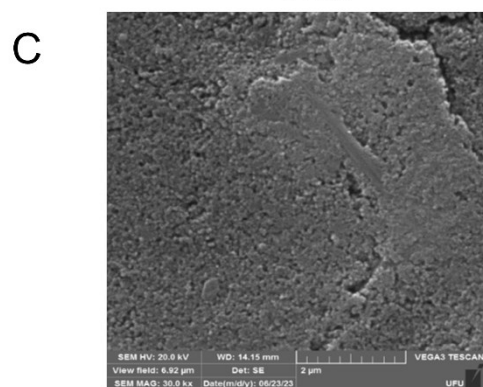
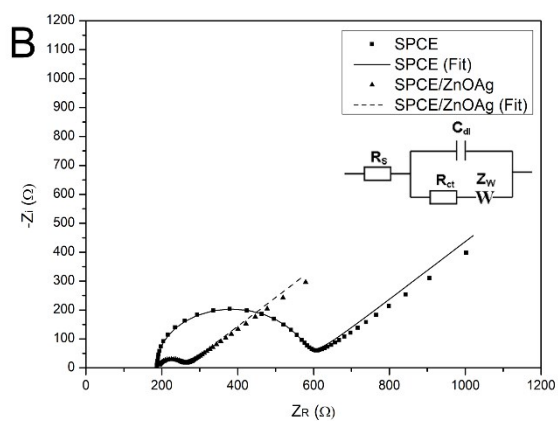
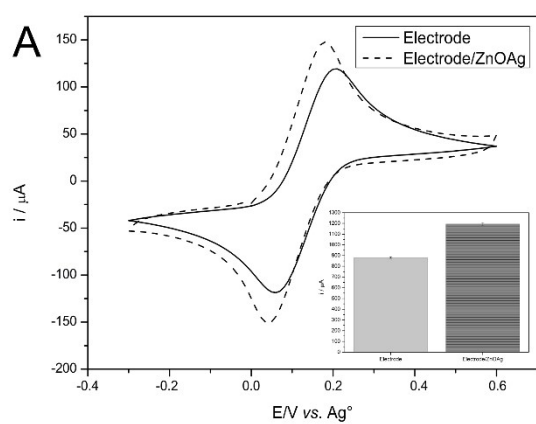


Figure 2. Electrode and platform characterization. **A)** Voltammogram of the CV with the redox couple $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ of SPCE and the SPCE/ZnOAgNP samples as well as a bar graphic demonstrating the increase of electrochemical surface area after the electrodes modification. The area values ($n=3$) were obtained by the integration of the CV plots. **B)** Nyquist plot of EIS analysis of the SPCE and SPCE/ZnOAgNP with its circuit components: solution resistance (R_s), charge-transfer resistance (R_{CT}), Warburg impedance (W) and constant phase element (C_{PE}). **C)** SEM image of SPCE. **D)** AFM image of SPCE. **E)** SEM image of SPCE/ZnOAgNP. **F)** AFM image of SPCE/ZnOAgNP. **G)** EDS analysis graphic of SPCE. **H)** EDS analysis graphic of SPCE/ZnOAgNP.

3.2. Electrochemical target detection and complementary analysis

After the biosensor construction, it was executed the complementary target electrochemical detection which demonstrated an oxidation peak at the potential around $0.386 \text{ V} \pm 0.011$ and current of $2.46 \mu\text{A} \pm 0.1$, $6.43 \mu\text{A} \pm 0.04$ and $3.86 \mu\text{A} \pm 0.08$ for SPCE/ZnOAgNP/COVP, SPCE/ZnOAgNP/COVP/COT and SPCE/ZnOAgNP/COVP/ZIK, respectively. The voltammogram of the previous results is found on Figure 3A.

In order to complement the target detection by COVP sequence, an EIS was performed with SPCE/ZnOAgNP/COVP and SPCE/ZnOAgNP/COVP/COT, which showed an increase of the R_{CT} values when comparing the probe to probe/target complex results, being $99.49 \Omega \pm 6.088$ and $486.75 \Omega \pm 18.74$, respectively ($n=3$). Once again, the Randle's cell model was fitted to the circuit and demonstrated a χ^2 of 8.59×10^{-4} for SPCE/ZnOAgNP/COVP and 9.3×10^{-4} for SPCE/ZnOAgNP/COVP/COVT. These results are displayed at the Figure 3B.

As another complementation method, the SEM analysis were performed, of which the SPCE/ZnOAgNP/COVP profile (Figure 3C) demonstrated the presence of globular structures, different from those seen in SPCE/ZnOAgNP, yet a less apparent roughness aspect than the one of SPCE/ZnOAgNP/COVP/COVT (Figure 3D). These results were also seen by the AFM profiles and the S_q values, which were of $367.9 \text{ nm} \pm 27.43$ and $575.9 \text{ nm} \pm 18.1$, for SPCE/ZnOAgNP/COVP (Figure 3E) and SPCE/ZnOAgNP/COVP/COVT (Figure 3F), respectively.

It was evaluated the molecular interactions of the binding between the dsDNA and the hybridization indicator EB by predictions of the computational protocol (Figure 3). Figure 3G presents the initially modeled structure of the probe with its target DNA. The initial DNA structure was simulated over 10 ns. In Figure 3G, the initial structure had its radius of gyration (R_g) slightly decreased in the beginning of the simulation and remained constant by most of the 10-ns run. The same was occurred for the total energy of the simulated system that also remained constant over the simulated time. It is a relatively short simulation, although it produced a stable final structure that was relaxed with respect to its initial conformation.

Figure 3H presents the molecular docking step that consisted in using the probe-target dsDNA final conformation for the binding of the hybridization indicator EB. The indicator agent was used first as probe to find the most probable binding cavity along the selected DNA conformation. Most of the 100 docking solutions were found in the vicinities of the minor binding cavity shown in Figure 3H. Thus, the best ranked solution was chosen for the interaction analysis. In Figure 3H, the compound is bound to target DNA strand mainly via three interactions: hydrophobic, ionic and hydrogen bonds. However, the decoys of all the other solutions were found docked at the minor DNA groove alternating between both strands. The binding energy of the best ranked DNA-ligand complex was $-19.6 \text{ kcal mol}^{-1}$, estimated by the ChemScore function of GOLD (Verdonk *et al.*, 2003). The other solutions resulted in a similar binding energy that spam between -7 and $-19 \text{ kcal mol}^{-1}$.

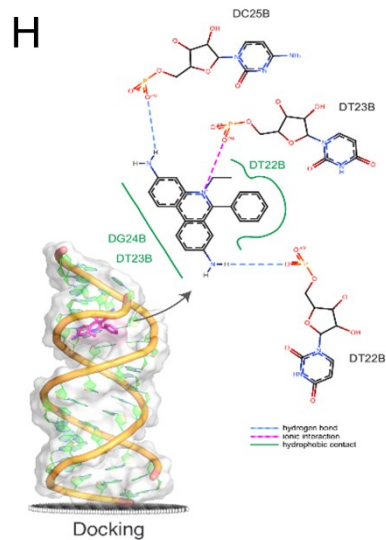
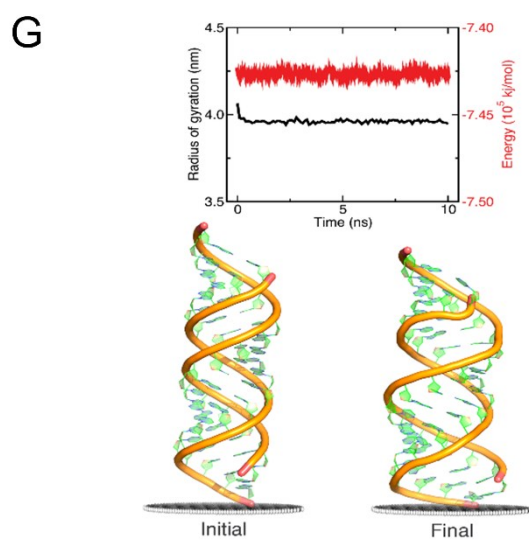
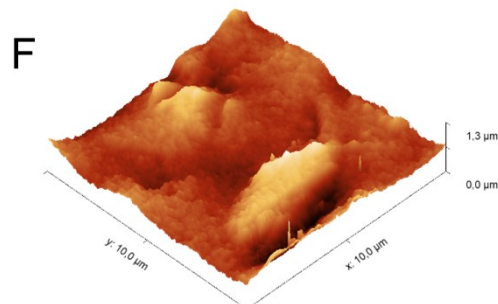
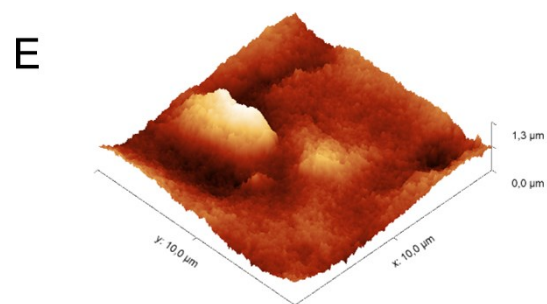
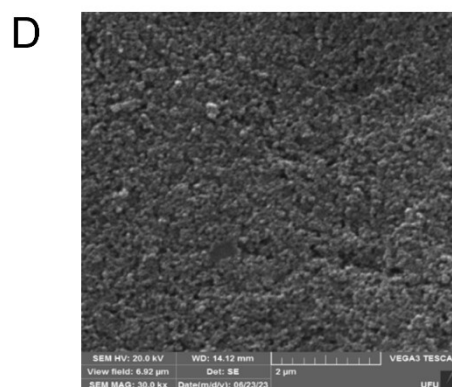
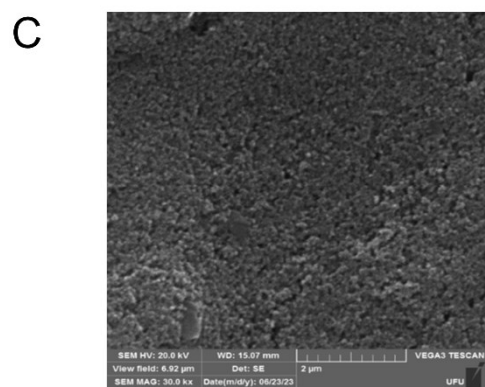
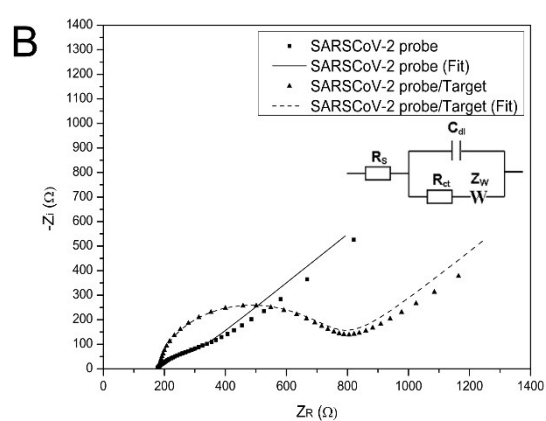
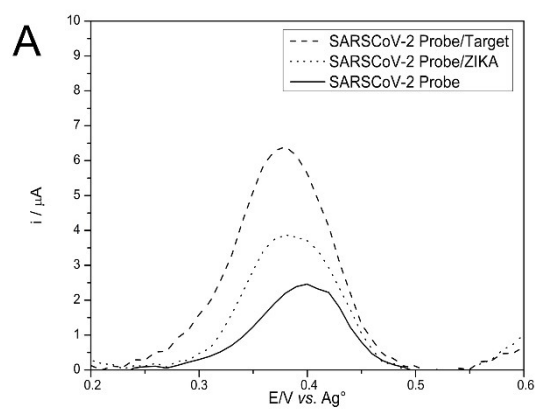


Figure 3. Electrochemical complementary detection and its complementations. **A)** Voltammogram of the DPV with the of SPCE/ZnOAgNP/COVP, SPCE/ZnOAgNP/COVP/COVT and SPCE/ZnOAgNP/COVP/ZIKA samples utilizing EB as indicator (n=3). **B)** Nyquist plot of EIS analysis of the SPCE/ZnOAgNP/COVP and SPCE/ZnOAgNP/COVP/COVT with its circuit components: R_s , R_{CT} , W and C_{PE} . **C)** SEM image of SPCE/ZnOAgNP/COVP. **D)** SEM image of SPCE/ZnOAgNP/COVP/COVT. **E)** AFM image of SPCE/ZnOAgNP/COVP. **F)** AFM image of SPCE/ZnOAgNP/COVP/COVT. **G)** It is shown at the top the radius of gyration (R_g , black) and the energy of the simulated system (red) as a function of the molecular dynamic time. At the bottom in G), it is represented the initial and the final conformations of the dsDNA. **H)** The final conformation in G) is used to dock the indicator (pink) with its final pose shown in surface representation. In H), it is also presented the DNA-ligand interactions in a two-dimensional projection. Hydrophobic interactions with the probe are shown in green, hydrogen bonds in blue and ionic interactions in pink. DC25B – Deoxycytidine, position 25 at the B chain; DT22B and DT23B – deoxythymidine, position 22 and 23 at the B chain, respectively; DG24B – deoxyguanosine, position 24 at the B chain.

3.3. Calibration curve construction, SARS-CoV-2 gRNA detection and stability analysis

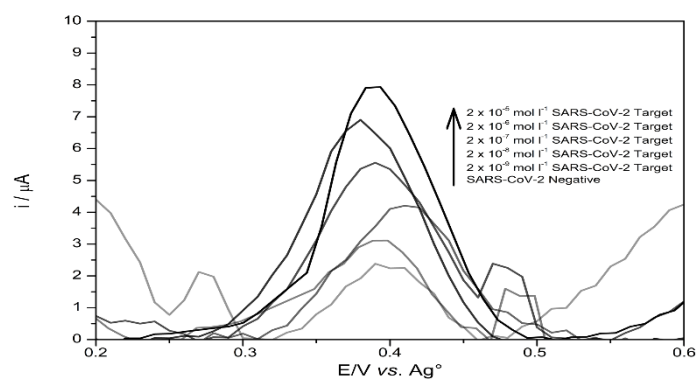
The results of the Calibration curve construction pointed the presence of an oxidation peak in the potential similar to the found in other detections (0.38 V) for positive and negative samples. While the current peak values of the 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-7} , 2×10^{-8} , 2×10^{-9} mol l⁻¹ and negative samples were of 8.0223 μ A $\pm$ 0.226, 7.151 μ A $\pm$ 0.497, 5.794 μ A $\pm$ 0.338, 4.373 μ A $\pm$ 0.387, 3.14 μ A $\pm$ 0.0398, 2.575 μ A $\pm$ 0.247, respectively. Based on these results, it was obtained the logarithmic relationship between the COVT concentration and current peak values ($R^2 = 0.9983$), as well as the LOD of 13 pmol l⁻¹. The voltammogram and the calibration curve obtained through this these results are displayed at Figure 4 A and 4B in that order.

After the biosensor construction, it was executed the electrochemical detection with the gRNA of SARS-CoV-2 positive and negative patients, as

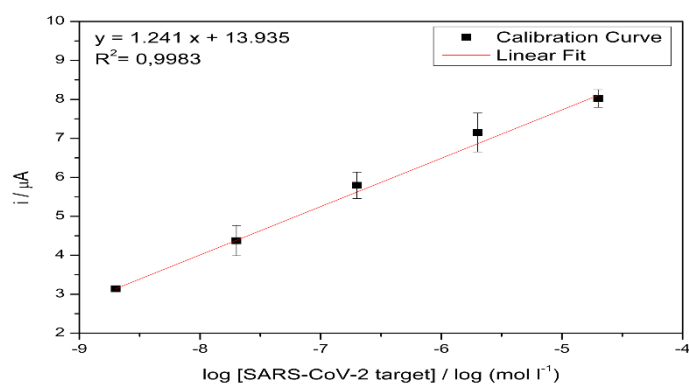
previously described. The results obtained demonstrated the presence of oxidative peaks at the potential 0.38 V for both samples types and, overall, the current peak values of the negatives samples ($n = 3$) were lower than the ones obtained from the positives ($n = 10$). The positive (1 to 10) samples obtained current values of $8.47668 \mu\text{A} \pm 0.52778$, $9.62715 \mu\text{A} \pm 0.90367$, $6.9259 \mu\text{A} \pm 0.59055$, $6.80839 \mu\text{A} \pm 0.10863$, $4.90855 \mu\text{A} \pm 0.07593$, $6.3769 \mu\text{A} \pm 0.41137$, $5.49945 \mu\text{A} \pm 0.46632$, $7.44355 \mu\text{A} \pm 0.57409$, $8.91504 \mu\text{A} \pm 0.90991$, $12.0051 \mu\text{A} \pm 1.08142$, and negatives (11 to 13) of $2.42137 \mu\text{A} \pm 0.20894$, $2.62877 \mu\text{A} \pm 0.25353$, $2.70826 \mu\text{A} \pm 0.19802$. The results on the diagnosis of the gRNA SARS-CoV-2 positive and negative patients are displayed at Figure 4 C.

The biosensor stability was tested, as previously described, and resulted on the presence of oxidative peaks at same potential as the other analysis with the current values of $7.152 \mu\text{A} \pm 0.497$, $7.547 \mu\text{A} \pm 0.661$, $7.355 \mu\text{A} \pm 0.699$, $6.666 \mu\text{A} \pm 0.643$ and $6.459 \mu\text{A} \pm 0.626$ for the times 0, 10, 20, 40 and 60 days, respectively. Demonstrating a relation of 90.031% between the last and first periods of analysis. The result of the stability test can be verified at the Figure 4 D.

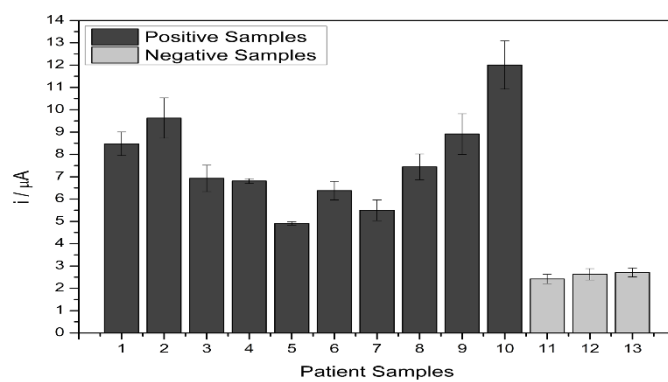
A



B



C



D

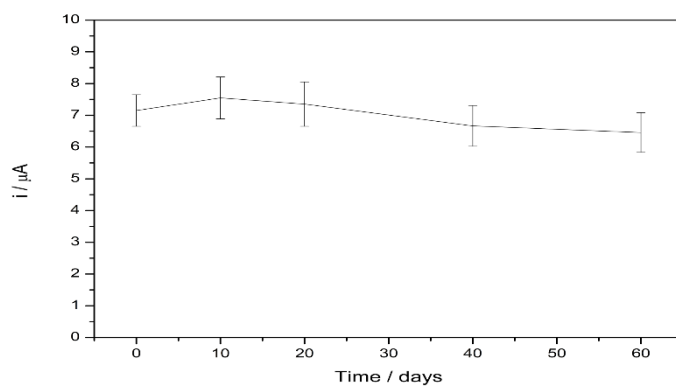


Figure 4. Calibration curve construction, SARS-CoV-2 gRNA detection and stability analysis. **A)** Voltammogram of the DPV of the 2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-7} , 2×10^{-8} , 2×10^{-9} mol L⁻¹ and negative samples for the complementary SARS-CoV-2 target utilizing EB as indicator (n=3). **B)** Calibration curve of the genosensor. **C)** Graphic bar of the SARS-CoV-2 gRNA positive and negative samples detection. **D)** Stability Analysis of the genosensor for 0, 10, 20, 40 and 60 days.

4. Discussion

Firstly, the comparison of bare and modified electrodes by potassium ferricyanide/ferrocyanide CV exhibited a shift of the values towards a lower potential for both E_{AP} and E_{CP} as well as an enhancement of the I_{AP} and I_{CP} , which led to the increase of the integrated plot area. These results suggest that the addition of the ZnOAgNP onto the electrode surface resulted in improved electron transfer kinetics. Besides, the EIS also demonstrated the drastic reduction of the R_{CT} values when comparing SPCE to SPCE/ZnOAgNP, hence exhibiting better conductivity when modified and confirming the previous CV results (Bard *et al.*, 2022). Therefore, the modification with ZnOAg is suggested to enhance the charge transfer, reactivity and capacitance on the electrode surface area, implying an improvement of the biosensor's performance.

Furthermore, the SEM analysis demonstrated the presence of a nanostructure with a similar elongated shape to the ZnOAgNP described by Gusmão *et al.*, 2021, but an increased size, which might be due to the increase of the Ag proportion during its synthesis once the article proposes a synthesis with 2% of Ag. The EDS analysis also confirmed the composition of the nanostructures found by SEM, in which the concentration proportion of Zn:Ag were of 10:1, similar proportion of ZnOAgNP (8% of Ag).

Moreover, the AFM exhibited the presence of nanostructures similar to the ones found and described by SEM, and, through this analysis, it was possible to determine the S_q value, which quantifies the roughness and offers evidence of the superficial area of the electrode. Its quantitative results demonstrated that the electrode's surface modification with ZnOAg improved its S_q value in almost 50%. This increase aligns with previous studies (Guedes *et al.*, 2021; Moço *et al.*, 2019; Nasraoui *et al.*, 2022) along with the $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ CV results,

considering superficial area enhancement is able to improve the electrochemical charge transfer, effecting the redox couple analysis plot area and the I_{AP}-I_{CP} (Bard *et al.*, 2022).

Through the results obtained of the electrode with and without its modification with the ZnOAgNP, it is possible to affirm that the application of the nanocomposite were not only successfully achieved, but also improved its characteristics once the electrochemical and morphological analysis demonstrated a great differences between the SPCE and SPCE/ZnOAgNP on their respective profiles.

The electrochemical detection of the complementary target was successfully achieved once the oxidation peak of EB was higher in the presence of the target (SPCE/ZnOAgNP/COVP/COVT) than in its absence, SPCE/ZnOAgNP/COVP. Besides, it is possible to affirm not only that the anchoring of the probe by the SPCE/ZnOAgNP was accomplished, indicating the ZnOAgNP's good biocompatibility, but also that the probe demonstrated specificity to its target, as the SPCE/ZnOAgNP/COVP/COVT oxidation peak was higher even in the presence of a non-complementary sequence (SPCE/ZnOAgNP/COVP/ZIKA). This profile were expected owing to EB greater affinity to dsDNA than to ssDNA as previously described by biosensors using it as an indicator (de Castro *et al.*, 2022, 2018; Moço *et al.*, 2021).

In addition, it was carried out an EIS for the electrochemical COVT detection confirmation, which exhibited a greater R_{CT} in the presence of the complementary target in comparison to the SPCE/ZnOAgNP/COVP. This result is due to the more compact and tight bound aspect of the probe/target conformation compared to the probe itself, which prevents the redox species migration to electrode's surface, thereby causing an increase in charge transfer resistance. Moreover, the electrochemical detection of the target by the EIS technique aligns with the results of the COVT sensing with EB by the SPCE/ZnOAgNP/COVP, confirming the probe's bioreceptive and the ZnOAgNP's biocompatible characteristics. The EIS profiles obtained are in line with previous works (Haghighyegh *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2014).

The morphological evaluation methods were also aligned with the previously results discussed as SEM and AFM analysis demonstrated an increase

of the electrode's surface roughness in the SPCE/ZnOAgNP/COVP/COVT when comparing to the SPCE/ZnOAgNP/COVP. The reason for this result are the same as the one described in the EIS once the more rigid aspect of the dsDNA leads to a greater roughness, as described in previous articles (Moço *et al.*, 2021).

Additionally, the computational studies elucidated the EB interactions to the probe/target complex and evinced that the average values shown in Figure 3G are consistent with the theoretical predictions of a similar dsDNA genosensor (Guedes *et al.*, 2021). It also demonstrated that the predicted binding energy found is consistent with previous estimates of druggable compounds interactions between enzymes obtained by GOLD fitness functions (Pereira *et al.*, 2021), and between DNA obtained by semiempirical quantum calculations (Sousa *et al.*, 2020).

In order to check the biosensor's selectivity, it was tested the electrochemical detection in nasopharynges samples which led to the discrimination of healthy and spiked samples. The results were similar to the electrochemical detection of the complementary target in buffer solution, in other words, the EB's oxidation peak were more intense in the spiked samples than in the healthy ones, demonstrating the biosensor's ability to distinguish the analyte of interest in the presence of other biomolecules.

Regarding the biosensor's selectivity, its calibration curve was obtained utilizing nasopharynges samples in the concentrations from 2×10^{-5} to 2×10^{-9} mol L^{-1} . The results showed good linear aspect of the logarithmic correlation between the target's concentration and the indicators current peak with a determination coefficient (R^2) and linear equation of 0.9983 and $y = 1.241 x + 13.935$. Through the slope and the standard error, it was possible to calculate the biosensor's LOD of 13.831 pmol L^{-1} . According to Marc *et al.*, 2021, the transmission probability for household contacts of 48% happens when the viral load is greater than 10^{10} copies mL^{-1} based on statistical and microbiological studies. Therefore, the biosensor proposed in this work is able to realize the diagnosis for COVID-19 during the infectiousness period, thus preventing further infections.

The biosensor proposed also demonstrated the capacity to detect the target with genomic RNA from previously positive patient samples discerning from the negative ones. Along with that, the biosensor's stability was also tested and its

target detection in spiked samples performance lasted 60 days in refrigerated storage. Thereat, it is possible to affirm that the biosensor presented exhibited good selectivity for gRNA SARS-CoV-2 detection and excellent stability.

Previous studies also described electrochemical biosensors for the SARS-CoV-2 detection with electrode's surface modification based on zinc nanomaterials being all of these composed of zinc nanoparticles combined with carbonic chemical/nanostructures as graphene oxide (GO) (Sarwar *et al.*, 2023), reduced graphene oxide (rGO) (Haghighat *et al.*, 2022) and imidazolate (Wang *et al.*, 2023). From these, all of the articles demonstrated good linear range and LOD values, being only the one proposed by Sarwar *et al.*, 2023 with a higher LOD than this work. Just biosensor of Sarwar *et al.*, 2023 described its stability (30 days with percentage reduction of 12.5%), whereas ours achieved a 60 days with lower reduction (9.97%), and checked the biosensors capacity of the target detection in real samples as this work. The Table 1 summarizes the characteristics of these biosensors previously mentioned, pointing the electrode type, its surface modification, the indicator used, the technique applied, the use selectivity test with real samples, the linear range and LOD obtained, as well as the stability test with their time and percentage reduction.

Table 1. SARS-CoV-2 electrochemical biosensors based on zinc nanomaterials surface modifications

Electrode/ Nanostructure	Indicator	Tec. Appl.	Real sample	Linear range	LOD	Stability (time/ reduction)	References
CE/ZnO/rGO	K ₃ [Fe(CN) ₆]	EIS	Yes	1– 10 ⁴ pg ml ⁻¹	21 fg ml ⁻¹	30 days / 12.5%	(Haghighat <i>et al.</i> , 2022)
GCE/ZnS/GO	K ₃ [Fe(CN) ₆]	DPV	No	10 ⁻¹⁸ – 10 ⁻⁷ mol l ⁻¹	4.453 × 10 ⁻²⁰ mol l ⁻¹	None	(Sarwar <i>et al.</i> , 2023)
GCE/ pm- ZIF/P(Zn)	HEPES/O ₂	ECL	No	10 ⁻¹² – 10 ⁻⁸ mol l ⁻¹	158 pmol l ⁻¹	None	(Wang <i>et al.</i> , 2023)
CE/ZnOAgNP	Ethidium Bromide	DPV	Yes	2 10 ⁻⁵ – 2 10 ⁻⁹ mol l ⁻¹	13 pmol l ⁻¹ or 84 pg ml ⁻¹	60 days / 9.97%	This work

Abbreviation: Tec. appl – Technique applied; LOD - Limit of detection; CE – Carbon Electrode; ZnO - Zinc oxide; rGO – reduced graphene oxide; EIS – Electrochemical impedance spectroscopy; GCE – Glassy carbon electrode; ZnS – Zinc sulphide; GO – Graphene oxide; DPV – Differential pulse voltammetry; pm-ZIF/P(Zn) - Post-modified zeolitic imidazolate framework; ECL – Electrochemiluminescence; ZnOAgNP – Ag-doped ZnO nanoparticles

5. Conclusion

In conclusion, this work propose a new biosensor based on screen-printed carbon electrodes modified with a novel conductive and biocompatible nanostructure based on silver doped zinc nanoparticles for the electrochemical detection of SARS-CoV-2 gRNA. Through computational analysis, it suggested that the mechanism of detection of this biosensor is based on the ethidium bromide intercalating capacity leading to a greater affinity to dsDNA complexes than to ssDNA and, thenceforth, a higher electrochemical signal in the presence of the analyte. From the tests carried out, the SPCE/ZnOAgNP/COVP biosensor demonstrated good sensitivity with an acceptable LOD, great selectivity on gRNA and spiked samples target detection, as well as good specificity on the negative analysis. In order to improve even more the SPCE/ZnOAgNP/COVP sensitivity, it is suggested the combination of other nanostructures with ZnOAgNP. However, the highest point of this biosensor is its stability, once it achieved a 60 days period with around 90% of its prior response. Furthermore, this biosensor is capable of realizing a COVID-19 diagnosis within 30 minutes without the need of any amplification, enzymatic process or heating (as target and indicator incubations are executed in room temperature), therefore, being ideal for commercial applications.

6. Acknowledgments

Financial support was provided by the Brazilian agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, APQ-02303-21), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 312328/2019-2; 130197/2021-1) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Computational resources were provided by the Núcleo de Computação Científica da Universidade do Estado de São Paulo (NCC/GridUnesp) and the Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho in São Paulo (CENAPAD-SP). Some laboratory resources were provided by Laboratórios Multiusuários da Universidade Federal de Uberlândia (RELAM), Instituto de Biotecnologia and Instituto de Química of the Universidade Federal de Uberlândia.

7. References

- Alenaizan, A., Barnett, J.L., Hud, N.V., Sherrill, C.D., Petrov, A.S., 2021. The proto-Nucleic Acid Builder: a software tool for constructing nucleic acid analogs. *Nucleic Acids Res.* 49, 79–89. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1159>
- Alves, L.M., Barros, H.L.S., Flauzino, J.M.R., Guedes, P.H.G., Pereira, J.M., Fujiwara, R.T., Mineo, T.W.P., Mineo, J.R., de Oliveira, R.J., Madurro, J.M., G.Brito-Madurro, A., 2019. A novel peptide-based sensor platform for detection of anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 175, 112778. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112778>
- Antunes, V.U., Llontop, E.E., Vasconcelos, F.N. da C., López de los Santos, Y., Oliveira, R.J., Lincopan, N., Farah, C.S., Doucet, N., Mittermaier, A., Favaro, D.C., 2019. Importance of the $\beta 5$ – $\beta 6$ Loop for the Structure, Catalytic Efficiency, and Stability of Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamase Subfamily OXA-143. *Biochemistry* 58, 3604–3616. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00365>
- Bard, A.J., Faulkner, L.R., White, H.S., 2022. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons.
- Berendsen, H.J.C., van der Spoel, D., van Drunen, R., 1995. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.* 91, 43–56. [https://doi.org/10.1016/0010-4655\(95\)00042-E](https://doi.org/10.1016/0010-4655(95)00042-E)
- Cascella, M., Rajnik, M., Aleem, A., Dulebohn, S.C., Di Napoli, R., 2023. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19), in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Chen, S., 2007. 2 - Practical Electrochemical Cells, in: Zoski, C.G. (Ed.), *Handbook of Electrochemistry*. Elsevier, Amsterdam, pp. 33–56. <https://doi.org/10.1016/B978-044451958-0.50003-3>
- de Castro, A.C.H., Kochi, L.T., Flauzino, J.M.R., Soares, M.M.C.N., Alves, V.A., da Silva, L.A., Madurro, J.M., Brito-Madurro, A.G., 2022. Electrochemical Biosensor for Sensitive Detection of Hepatitis B in Human Plasma. *Appl.*

- Biochem. Biotechnol. 194, 2604–2619. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03829-4>
- de Castro, A.C.H., Kochi, L.T., Moço, A.C.R., Coimbra, R.S., Oliveira, G.C., Cuadros-Orellana, S., Madurro, J.M., Brito-Madurro, A.G., 2018. A new genosensor for meningococcal meningitis diagnosis using biological samples. J. Solid State Electrochem. 22, 2339–2346. <https://doi.org/10.1007/s10008-018-3940-0>
- Dhamad, A.E., Rhida, M.A.A., 2020. COVID-19: molecular and serological detection methods. PeerJ 8, e10180. <https://doi.org/10.7717/peerj.10180>
- Drozdziak, A., Drozdziak, M., 2022. Oral Pathology in COVID-19 and SARS-CoV-2 Infection—Molecular Aspects. Int. J. Mol. Sci. 23, 1431. <https://doi.org/10.3390/ijms23031431>
- Guedes, P.H.G., Brussasco, J.G., Moço, A.C.R., Moraes, D.D., Flauzino, J.M.R., Luz, L.F.G., Almeida, M.T.G., Soares, M.N., Oliveira, R.J., Madurro, J.M., Brito-Madurro, A.G., 2021. Ninhydrin as a novel DNA hybridization indicator applied to a highly reusable electrochemical genosensor for *Candida auris*. Talanta 122694. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122694>
- Gusmão, L.A., Peixoto, D.A., Marinho, J.Z., Romeiro, F.C., Gonçalves, R.F., Longo, E., de Oliveira, C.A., Lima, R.C., 2021. Alkali influence on ZnO and Ag-doped ZnO nanostructures formation using the microwave-assisted hydrothermal method for fungicidal inhibition. J. Phys. Chem. Solids 158, 110234. <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2021.110234>
- Haghighayegh, F., Salahandish, R., Hassani, M., Sanati-Nezhad, A., 2022. Highly Stable Buffer-Based Zinc Oxide/Reduced Graphene Oxide Nanosurface Chemistry for Rapid Immunosensing of SARS-CoV-2 Antigens. ACS Appl. Mater. Interfaces 14, 10844–10855. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c24475>
- Haleem, A., Javaid, M., Singh, R.P., Suman, R., Rab, S., 2021. Biosensors applications in medical field: A brief review. Sens. Int. 2, 100100. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2021.100100>
- Harrison, A.G., Lin, T., Wang, P., 2020. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. Trends Immunol. 41, 1100–1115. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
- He, P., Xu, Y., Fang, Y., 2005. A Review: Electrochemical DNA Biosensors for Sequence Recognition. Anal. Lett. 38, 2597–2623. <https://doi.org/10.1080/00032710500369794>
- Heidary, M., Asadi, A., Noorbakhsh, N., Dashtbin, S., Asadollahi, P., Dranbandi, A., Navidifar, T., Ghanavati, R., 2022. COVID-19 in HIV-positive patients: A systematic review of case reports and case series. J. Clin. Lab. Anal. 36, e24308. <https://doi.org/10.1002/jcla.24308>
- Kaiser da Silva, A., Mateus Santos, M., Aparecida Candido, P., de Oliveira Lopes, É., Rogério Pavan, F., Aparecida Carneiro, Z., Vinícius da Silva, M., José Freire de Oliveira, C., Azevedo Batista, A., Junio de Oliveira, R., Marcelo Deflon, V., Ivo da Silva Maia, P., 2022. Gold(III) heteroleptic complexes with SNS-thiosemicarbazone ligands as cytotoxic agents: experimental and computational insights into the mechanism of action. Polyhedron 115767. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2022.115767>
- Kim, G.-u, Kim, M.-J., Ra, S.H., Lee, J., Bae, S., Jung, J., Kim, S.-H., 2020. Clinical characteristics of asymptomatic and symptomatic patients with mild

- COVID-19. Clin. Microbiol. Infect. 26, 948.e1-948.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.04.040>
- Kochana, J., Pollap, A., Madej, M., 2022. Introduction to Biosensors, in: Buszewski, B., Baranowska, I. (Eds.), Handbook of Bioanalytics. Springer International Publishing, Cham, pp. 729–745. https://doi.org/10.1007/978-3-030-95660-8_33
- Lee, J., Cheng, X., Swails, J.M., Yeom, M.S., Eastman, P.K., Lemkul, J.A., Wei, S., Buckner, J., Jeong, J.C., Qi, Y., Jo, S., Pande, V.S., Case, D.A., Brooks, C.L., MacKerell, A.D., Klauda, J.B., Im, W., 2016. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. J. Chem. Theory Comput. 12, 405–413.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>
- Marc, A., Keroui, M., Blanquart, F., Bertrand, J., Mitjà, O., Corbacho-Monné, M., Marks, M., Guedj, J., 2021. Quantifying the relationship between SARS-CoV-2 viral load and infectiousness. eLife 10, e69302.
<https://doi.org/10.7554/eLife.69302>
- Mehrotra, P., 2016. Biosensors and their applications – A review. J. Oral Biol. Craniofacial Res. 6, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>
- Menezes, M.E., Lima, L.M., Martinello, F., 2020. Diagnóstico laboratorial do SARS-CoV-2 por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Rev. Bras. Análises Clínicas RBAC. <https://doi.org/10.21877/2448-3877.20200006>
- Moço, A.C.R., Guedes, P.H., Flauzino, J.M.R., da Silva, H.S., Vieira, J.G., Castro, A.C.H., Gomes, É.V.R., Tolentino, F.M., Soares, M.M.C.N., Madurro, J.M., Brito-Madurro, A.G., 2019. Electrochemical Detection of Zika Virus in Biological Samples: A Step for Diagnosis Point-of-care. Electroanalysis 31, 1580–1587. <https://doi.org/10.1002/elan.201900068>
- Moço, A.C.R., Neto, J.A.S., de Moraes, D.D., Guedes, P.H., Brussasco, J.G., Flauzino, J.M.R., Luz, L.F.G., Soares, M.M.C.N., Madurro, J.M., Brito-Madurro, A.G., 2021. Carbon ink-based electrodes modified with nanocomposite as a platform for electrochemical detection of HIV RNA. Microchem. J. 170, 106739. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106739>
- Naqvi, A.A.T., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I.K., Singh, A., Atif, S.M., Hariprasad, G., Hasan, G.M., Hassan, Md.I., 2020. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis. 1866, 165878. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165878>
- Nasraoui, S., Ameer, S., Al-Hamry, A., Ben Ali, M., Kanoun, O., 2022. Development of an Efficient Voltammetric Sensor for the Monitoring of 4-Aminophenol Based on Flexible Laser Induced Graphene Electrodes Modified with MWCNT-PANI. Sensors 22, 833.
<https://doi.org/10.3390/s22030833>
- Páll, S., Zhmurov, A., Bauer, P., Abraham, M., Lundborg, M., Gray, A., Hess, B., Lindahl, E., 2020. Heterogeneous parallelization and acceleration of molecular dynamics simulations in GROMACS. J. Chem. Phys. 153, 134110. <https://doi.org/10.1063/5.0018516>
- Pereira, P.H. do N., Lima, J.C., Deflon, V.M., Malpass, G.R.P., De Oliveira, R.J., Maia, P.I.D.S., 2021. Nitroisatin dithiocarbamate: Synthesis, structural

- characterization, DFT, and docking studies. *Eur. J. Chem.* 12, 235–241. <https://doi.org/10.5155/eurjchem.12.3.235-241.2106>
- Rasmussen, A.L., Popescu, S.V., 2021. SARS-CoV-2 transmission without symptoms. *Science* 371, 1206–1207. <https://doi.org/10.1126/science.abf9569>
- Sarwar, S., Lin, M.-C., Amezaga, C., Wei, Z., Iyayi, E., Polk, H., Wang, R., Wang, H., Zhang, X., 2023. Ultrasensitive electrochemical biosensors based on zinc sulfide/graphene hybrid for rapid detection of SARS-CoV-2. *Adv. Compos. Hybrid Mater.* 6, 49. <https://doi.org/10.1007/s42114-023-00630-7>
- Schöning-Stierand, K., Diedrich, K., Fährrolfes, R., Flachsenberg, F., Meyder, A., Nittinger, E., Steinegger, R., Rarey, M., 2020. ProteinsPlus: interactive analysis of protein–ligand binding interfaces. *Nucleic Acids Res.* 48, W48–W53. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa235>
- Sousa, L.M., Souza, W.A., Paixão, D.A., Fazzi, R.B., Tezuka, D.Y., Lopes, C.D., Carneiro, Z.A., Moreira, M.B., Pivatto, M., Netto, A.V.G., de Albuquerque, S., Ferreira, F.B., De Oliveira, R.J., Resende, J.A.L.C., Lino, R.C., De Oliveira Júnior, R.J., Da Costa Ferreira, A.M., Guerra, W., 2020. DNA binding, cleavage, apoptosis and cytotoxicity studies of three heteroleptic nickel complexes bearing β -diketones. *Inorganica Chim. Acta* 511, 119824. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119824>
- Souza, W.A., Ramos, L.M.S., de Almeida, A.M., Tezuka, D.Y., Lopes, C.D., Moreira, M.B., Zanetti, R.D., Netto, A.V.G., Ferreira, F.B., de Oliveira, R.J., Guedes, G.P., de Albuquerque, S., Silva, J.R.L., Pereira-Maia, E.C., Resende, J.A.L.C., de Almeida, M.V., Guerra, W., 2022. Preparation, cytotoxic activity and DNA interaction studies of new platinum(II) complexes with 1,10-phenanthroline and 5-alkyl-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-thione derivatives. *J. Inorg. Biochem.* 237, 111993. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111993>
- Verdonk, M.L., Cole, J.C., Hartshorn, M.J., Murray, C.W., Taylor, R.D., 2003. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins* 52, 609–623. <https://doi.org/10.1002/prot.10465>
- Wang, J.-Z., Li, Y.-X., Yang, Q., Li, J., Chauvin, J., Zhang, X.-J., Cosnier, S., Marks, R.S., Shan, D., 2023. Post-synthetic modification-driven ZIF reconstruction and functionalization for efficient SARS-CoV-2 ECL detection. *Analyst* 148, 3603–3609. <https://doi.org/10.1039/D3AN00881A>
- Wolff, D., Nee, S., Hickey, N.S., Marschollek, M., 2021. Risk factors for Covid-19 severity and fatality: a structured literature review. *Infection* 49, 15–28. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01509-1>
- Yang, Y., Li, C., Yin, L., Liu, M., Wang, Z., Shu, Y., Li, G., 2014. Enhanced Charge Transfer by Gold Nanoparticle at DNA Modified Electrode and Its Application to Label-Free DNA Detection. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6, 7579–7584. <https://doi.org/10.1021/am500912m>