



UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação em Química

Luiza Aguiar do Nascimento

**ELETROSSÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE FILMES
POLIMÉRICOS DE 2-AMINO BENZAMIDA NO DESENVOLVIMENTO DE UM
GENOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA A COVID-19**

Diamantina – MG

2021

Luiza Aguiar do Nascimento

**ELETROSSÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE FILMES
POLIMÉRICOS DE 2-AMINOBENZAMIDA NO DESENVOLVIMENTO DE UM
GENOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA A COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira
Coorientador: Prof. Dr. Danilo Bretas de Oliveira

Diamantina – MG

2021

Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

N244 Nascimento, Luiza Aguiar do
2021 ELETROSSÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE FILMES
POLIMÉRICOS DE 2-AMINOBENZAMIDA NO DESENVOLVIMENTO DE UM
GENOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA A COVID-19 [manuscrito] / Luiza
Aguiar do Nascimento. -- Diamantina, 2021.
86 p. : il.

Orientador: Prof. Lucas Franco Ferreira.
Coorientador: Prof. Danilo Bretas de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Química) -- Universidade Federal
dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-Graduação
em Química, Diamantina, 2021.

1. COVID-19. 2. Biossensores. 3. 2-aminobenzamida. I.
Ferreira, Lucas Franco. II. Oliveira, Danilo Bretas de. III.
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. IV.
Título.

Luiza Aguiar do Nascimento**ELETROSSÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS DE 2-AMINOENZAMIDA NO DESENVOLVIMENTO DE UM GENOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA A COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira
Coorientador: Prof. Dr. Danilo Bretas de Oliveira

Data de aprovação 30/08/2021

PROF. DR. LUCAS FRANCO FERREIRA

Orientador - UFVJM

PROF. DR. WALLANS TORRES PIO DOS SANTOS

Membro Interno - UFVJM

PROF. DR. ARNALDO CÉSAR PEREIRA

Membro Externo - UFSJ

Diamantina

2021



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Franco Ferreira, Docente**, em 30/08/2021, às 17:18, 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 **Wallans Torres Pio dos Santos, Docente**, em 30/08/2021, às 17:20, 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 **Arnaldo César Pereira, Usuário Externo**, em 30/08/2021, às 17:21, 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://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0432926** e o código CRC **9419384E**.

Dedico este trabalho às vítimas da COVID-19 e suas famílias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais que foram parte essencial da minha formação pessoal e acadêmica.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira, pela parceria durante os anos que estivemos envolvidos nessa pesquisa, que atuou além do que se espera de alguém em sua posição e foi parte essencial para a conclusão deste trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Danilo Bretas de Oliveira, pelo envolvimento desde o início do projeto, sendo parte fundamental para o desenvolvimento deste estudo.

Ao técnico, Thyago José Silva, farmacêutico da faculdade de Medicina, pela solicitude e colaboração importantes para o andamento deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Helen Rodrigues Martins pelo apoio nas primeiras etapas do projeto, antes que houvesse a necessidade de mudar os rumos do estudo.

Aos meus amigos de Diamantina por todo apoio e acolhimento que sempre me deram desde que cheguei à Universidade. Aos meus amigos de Teófilo Otoni e de Ataleia que sempre ficaram muito felizes com todas as minhas conquistas.

Ao Grupo de Eletroquímica e Nanotecnologia Aplicada (GENAp) e à UFVJM pela oportunidade de realizar este trabalho, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

*“A ciência é sábia, siga seus conselhos”
(RICK SANCHEZ, 2013).*

RESUMO

O presente trabalho propõe o desenvolvimento um genossensor eletroquímico utilizando eletrodo de grafite modificados com filmes poliméricos derivados da 2-aminobenzamida (2-AB), sobre os quais foram imobilizadas duas sondas de RNA, complementares à região conservada do genoma do SARS-CoV-2 (região N do vírus) de modo a promover interação específica entre ambos. A estratégia consiste no reconhecimento indireto da hibridização a partir do monitoramento da redução do azul de metileno (AM), agente intercalador de RNA, por voltametria de onda quadrada. O transdutor eletroquímico foi otimizado em função do sinal do AM adsorvido nas sondas. O poli(2-AB) apresenta perfil eletroquímico com dois pares redox em solução 0,50 M de H₂SO₄ e uma baixa resistência a transferência eletrônica em solução de ferro/ferricianeto de potássio, conforme análises de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. O processo de oxidação eletroquímica da 2-AB envolve um elétron e um próton, onde a polimerização ocorre via átomo de nitrogênio do grupo amino. Utilizando eletrodos impressos de grafite, o genossensor foi desenvolvido utilizando 0,25 mM de 2-AB preparada em 0,50 M de H₂SO₄ com 15 ciclos de potencial de -0,2 a +1,0 V a 50 mV/s, e na imobilização dos oligonucleotídeos utilizou-se 7,0 µL de solução 0,1 µM (30 min), sendo estas consideradas as condições ótimas. O tempo de reação com ao alvo específico foi otimizado em 10 min. O genossensor conseguiu identificar a presença do RNA viral em amostras plasmidiais alcançando LOD de 3,89 cópias/mL e um LOQ de 12,97 cópias/mL numa faixa linear de 13,5 a 625 cópias/mL, apresentando funcionalidade quando aplicado para análise em amostras clínicas, onde mostrou 32% de diferença do sinal do AM para as amostras positivas e 14% para as negativas, quando comparadas ao sinal do genossensor. Estudos de reprodutibilidade os mostraram valores de RSD de 12,2% (n=5), e de estocagem uma perda de resposta de 18% para 45 dias armazenados a temperatura de 5 a 10 °C. Análises com 10 amostras para quatro grupos denominados como: genossensor, positivas, negativas e interferentes (Influenza A, Influenza B e HIV, além do SARS-CoV-2 na presença do RNA viral da Influenza A e Influenza B) foram utilizadas para avaliar a sensibilidade e especificidade do biossensor. O teste *t* comprovou que o grupo de amostras positivas é de fato diferente de todos os demais grupos ($p < 0,05$), enquanto os sinais obtidos para o genossensor, alvo não complementar e interferentes foram considerados como equivalentes ($p > 0,05$). Com base nesses resultados, mostramos que a plataforma funcionalizada com o poli(2-AB) mostrou-se promissora para a detecção do SARS-CoV-2.

Palavras-chaves: Genossensor eletroquímico, poli(2-aminobenzamida), COVID-19.

ABSTRACT

The present work proposes the development of an electrochemical genosensor using graphite electrode modified with polymeric films derived from 2-aminobenzamide (2-AB), on which two RNA probes, complementary to the conserved region of the SARS-CoV-2 genome (N-region of the virus), were immobilized, to promote specific interaction between them. The strategy consists of indirect recognition of hybridization by monitoring the reduction of methylene blue (AM), an RNA intercalating agent, by square wave voltammetry. The electrochemical transducer was optimized observing the AM reduction signal adsorbed on the probes. Poly(2-AB) has an electrochemical profile with two redox pairs in a 0.50 M solution of H₂SO₄ and a low resistance to electronic transfer in an potassium ferro/ferricyanide solution, according to cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. The electrochemical oxidation process of 2-AB involves an electron and a proton, where polymerization takes place via the nitrogen atom of the amino group. Using printed graphite electrodes, the genosensor was developed using 0.25 mM of 2-AB prepared in 0.50 M H₂SO₄ with 15 cycles potential of -0.2 to +1.0 V to 50 mV/s, and in the immobilization of the oligonucleotides, 7 μL of a 0.1 μM solution (30 min) were used, which were considered the optimal conditions. Target-specific reaction time was optimized by 10 min. The genosensor was able to identify the presence of viral RNA in plasmid samples reaching a linear range of 13.5 to 625 copies/mL and LOD of 3.89 copies/mL and LOQ of 12.97 copies/mL, presenting functionality when applied for analysis in clinical samples, where it showed a 32% difference in the AM signal for positive samples and 14% for the negative ones, when compared to the genosensor signal. And studies showed the reproducibility RSD values of 12.2% (n = 5), and a loss of response of 18% after 45 days stored at 5 at 10°C. Analyzes with 10 samples for four groups named as: genosensor, positive, negative, and interfering (Influenza A, Influenza B and HIV, in addition to SARS-CoV-2 in the presence of viral RNA from Influenza A and Influenza B) were used to evaluate the sensitivity and specificity of the biosensor. The *t*-test proved that the group of positive samples is in fact different from all other groups (*p*<0.05), while the signals obtained for the genosensor, non-complementary target and interfering ones were considered as equivalent (*p*>0.05). Based on these results, we show that the platform functionalized with poly(2-AB) proved to be promising for the detection of SARS-CoV-2.

Keywords: Electrochemical genosensor, poly(2-aminobenzamide), COVID-19.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura do Coronavírus. Criado com BioRender.com	22
Figura 2: Curva de resposta imunológica após infecção pelo SARS-CoV-2 e faixas de detecção dos testes de RT-PCR e imunocromatográficos.	23
Figura 3: Esquema geral de um biossensor com transdução eletroquímica. Criada com BioRender.com	26
Figura 4: Estrutura química da 2-aminobenzamida com a indicação dos respectivos valores de pKa.	29
Figura 5: Estruturas químicas do (A) AM e (B) base guanina.	30
Figura 6: Esquema representativo de um genossensor com transdução eletroquímica para a detecção indireta do evento de hibridização, utilizando o indicador azul de metileno (AM), na ausência e presença do alvo complementar. Criado com BioRender.com	31
Figura 7: (A) Princípio da varredura de potencial para a técnica de VC. (B) VC resultante obtido para um processo reversível, utilizando, por exemplo, o par redox ferro/ferricianeto de potássio.	32
Figura 8: Diagrama de Nyquist observado para EIE realizada em solução contendo o par ferro/ferricianeto de potássio, equivalente ao circuito de Randles.	34
Figura 9: (A) Visão geral dos parâmetros e princípio de medição da corrente por voltametria de onda quadrada, através dos pulsos de potencial, e (B) VOQ resultante para um sistema reversível.	35
Figura 10: (A) Imagens do eletrodo de grafite representado em 1 e da base de teflon utilizada para conexão do eletrodo ao potenciostato em 2. (B) Barra de grafite, e (C) Eletrodos impressos de grafite contendo os três eletrodos, onde: 1: eletrodo de trabalho, 2: eletrodo auxiliar e 3: eletrodo de referência. Dimensões 3,4 x 1,0 x 0,05 cm.	36
Figura 11: Esquema de construção do genossensor eletroquímico representando o BSA (); o AM (●), as sondas de cDNA (‡) e sequências de RNA complementar (‡) e não complementar (‡). Criado com BioRender.com	42
Figura 12: (A) VC obtido para o EG em solução 5,0 mM de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ preparado em 0,10 de KCl. $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$. Onde para a oxidação temos: I_{pa} e E_{pa} que são a corrente de pico anódica e o potencial de pico anódico, respectivamente, e para a redução temos: I_{pc} e E_{pc} que são a corrente de pico catódica e o potencial de pico catódico, respectivamente. (B) VC obtido	

para o EG em solução 0,50 M de H ₂ SO ₄ . $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$. As setas indicam o sentido da varredura de potencial.....	47
Figura 13: VCs obtidos para o EG em solução 10 mM de 2-AB preparada 0,50 M de H ₂ SO ₄ 0,5 M a 50 mV.s^{-1} . Onde: (A) Primeiro ciclo de potencial, e (B) 100 ciclos consecutivos de potencial, sendo: (—) o primeiro ciclo. As setas contínuas indicam o sentido da varredura de potencial, e aquelas tracejadas o sentido da corrente.	48
Figura 14: VCs obtidos para: (---) EG e o (—) poli(2-AB)/EG em solução de: (A) 0,50 M de H ₂ SO ₄ ; (B) 5,0 mM de K ₄ Fe(CN) ₆ /K ₃ Fe(CN) ₆ + 0,10 M de KCl; e (C) 0,10 M de KCl. Em todos os casos a velocidade de varredura foi de 50 mV.s^{-1}	49
Figura 15: Diagramas de Nyquist de EIE obtidos em 5,0 mM de K ₄ Fe(CN) ₆ /K ₃ Fe(CN) ₆ contendo 0,10 M de KCl para: (o) EG e (□) poli(2-AB)/EG. Amplitude: 10 mV. Faixa de frequência: 100 kHz a 10 mHz. As linhas sólidas representam a simulação de dados experimentais para o respectivo circuito equivalente.....	51
Figura 16: Potencial de pico anódico da 2-AB em função do valor de pH da solução 10 mM de 2-AB (preparada em 0,50 M de H ₂ SO ₄). O ajuste de pH foi realizado com solução 0,50 M de NaOH. Dados referentes ao primeiro ciclo de potencial.	53
Figura 17: Formas mesoméricas para a 2-AB.....	53
Figura 18: Curva de distribuição das espécies da 2-AB em função do pH. Adaptado de Chemicalize.com.	54
Figura 19: (A) Relação de Tafel que estabelece o potencial de pico em função do logaritmo da corrente de pico, e (B) Relação de Laviron que mostra o logaritmo da velocidade de varredura em função do potencial de pico. Para ambos os casos os VCs foram obtidos para o EG em solução 10 mM de 2-AB utilizando 0,50 M de H ₂ SO ₄ como eletrólito suporte nas diferentes velocidades de varredura.	55
Figura 20: VCs obtidos para eletrodo de bastão de grafite em solução 10 mM de 2-AB preparada 0,50 M de H ₂ SO ₄ 0,5 M a 50 mV.s^{-1} . Número de ciclos = 150. As setas contínuas indicam o sentido da varredura de potencial, e aquelas tracejadas o sentido da corrente.	57
Figura 21: Imagens obtidas durante o processo de preparação e extração do poli(2-AB) sobre os eletrodos de bastão de grafite, sendo: (A) Célula eletroquímica destacando o eletrodo de bastão de grafite; (B) Extração do poli(2-AB) em acetonitrila, e (C) Material polimérico extraído.	57
Figura 22: Espectro de FTIR-ATR obtidos para: (A) 2-AB e (B) poli(2-AB) na faixa de 4000-650 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e 128 varreduras.	58
Figura 23: Produto polimérico proposto para a eletropolimerização da 2-AB.	59

Figura 24: Reações de oxirredução propostas para os pares redox da poli(2-AB) que foram observados durante a eletropolimerização apresentada na Figura 13.....	59
Figura 25: Mecanismo proposto para a oxidação eletroquímica da 2-AB com formação da poli(2-AB).	60
Figura 26: (A) VCs consecutivos (15 ciclos) obtidos para o EIG em solução 0,25 mM de 2-AB preparada 0,50 M de H ₂ SO ₄ 0,5 M a 50 mV.s ⁻¹ . Onde: (---) primeiro ciclo de potencial. As setas contínuas indicam o sentido da varredura de potencial, e aquelas tracejadas o sentido da corrente. (B) Diagramas de Nyquist obtidos em 5,0 mM de K ₄ Fe(CN) ₆ /K ₃ Fe(CN) ₆ contendo 0,10 M de KCl para: (o) EIG e (□) poli(2-AB)/EIG. Amplitude: 10 mV. Faixa de frequência: 100 kHz a 10 mHz. As linhas sólidas representam a simulação de dados experimentais para o respectivo circuito equivalente. Em C, D e temos os VCs obtidos para: (---) EIG e o (—) poli(2-AB)/EIG em solução de: (C) 0,50 M de H ₂ SO ₄ ; (D) 5,0 mM de K ₄ Fe(CN) ₆ /K ₃ Fe(CN) ₆ + 0,10 M de KCl; e (E) 0,10 M de KCl. Em todos os casos a velocidade de varredura foi de 50 mV.s ⁻¹	62
Figura 27: Circuitos equivalentes e dados da simulação dos resultados de EIE para (A) EIG, e (B) poli(2-AB)/EIG.	63
Figura 28: VOQ registrado para (A) EIG e (B) poli(2-AB)/EIG referente a redução do AM em solução de tampão fosfato 0,10 M (pH 7,40) contendo 1,0 M NaCl. Sendo: (—) genossensor (cDNA), (—) genossensor + RNA complementar e (—) genossensor + RNA não complementar. Step: 9 mV; amplitude, 270 mV e frequência, 29 Hz. A seta contínua indica o sentido da varredura de potencial.	65
Figura 29: Valores da corrente da altura de pico obtidos para o poli(2-AB)/EIG por VOQ para a redução do AM em solução de tampão fosfato 0,10 M (pH 7,40) contendo 1,0 M NaCl, sendo: (A) Otimização da concentração da 2-AB utilizada na eletropolimerização mantendo 15 ciclos a 50 mV.s ⁻¹ ; (B) Otimização do número de ciclos de potencial onde foi utilizado 2,5 mM de 2-AB e ν de 50 mV.s ⁻¹ ; e (C) Otimização da velocidade de varredura utilizado 2,5 mM de 2-AB e 15 ciclos. Condições da varredura: Step: 9 mV; amplitude, 270 mV e frequência, 29 Hz. ..	66
Figura 30: Valores da corrente da altura de pico obtidos para o poli(2-AB)/EIG por VOQ para a redução do AM em solução de tampão fosfato 0,10 M (pH 7,40) contendo 1,0 M NaCl, sendo: (A) Tempo de imobilização das sondas mantendo-se a concentração de cDNA em 1,0 μ M; e (B) Otimização da concentração de cDNA mantendo-se o tempo de imobilização em 30 min; e (C) Tempo de reação do genossensor com o RNA complementar. Condições de varredura: Step: 9 mV; amplitude, 270 mV e frequência, 29 Hz.....	68

Figura 31: VOQ registrado para o poli(2-AB)/EIG referente a redução do AM em solução de tampão fosfato 0,10 M (pH 7,40) contendo 1,0 M NaCl. Sendo: (—) genossensor (cDNA), (—) genossensor + RNA complementar, e (—) genossensor + RNA não complementar. Sendo: (A) Sistema não otimizado; e (B) Sistema otimizado. Step: 9 mV; amplitude, 270 mV e frequência, 29 Hz. A seta contínua indica o sentido da varredura de potencial. 70

Figura 32: Relação dos valores da corrente da altura de pico obtidos para o poli(2-AB)/EIG por VOQ para a redução do AM em solução de tampão fosfato 0,10 M (pH 7,40) contendo 1,0 M NaCl em função da concentração das amostras contendo o genoma viral do SARS-CoV-2. A linha contínua equivale à regressão linear dos pontos analisados. 71

Figura 33: VOQ obtidos para a redução do AM em solução de tampão fosfato 0,10 M (pH 7,40) contendo 1,0 M NaCl, onde: Sendo: (—) genossensor (cDNA), (—) genossensor + amostra positiva, e (—) genossensor + amostra negativa. Condições da análise: Step: 9 mV; amplitude, 270 mV e frequência, 29 Hz. A seta contínua indica o sentido da varredura de potencial. 72

Figura 34: Análise comparativa das alturas de pico obtidas para (●) genossensor, (●) amostras com RNA não complementar, (●) amostras positivas para COVID-19 e (●) possíveis interferentes que são consideradas amostras negativas para COVID-19 e positivas para Influenza A, Influenza B e HIV. Para cada conjunto temos n=10. 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Biossensores eletroquímicos para detecção do SARS-CoV-2.	75
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AB	2-aminobenzamida
AM	Azul de metileno
BE	Brometo de etídio
BSA	Albumina de soro bovino
CDE	Dupla camada elétrica
cDNA	DNA complementar
Covid-19	do inglês <i>Coronavirus disease 2019</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i>
EG	Eletrodos de grafite
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
EIG	Eletrodos impressos de grafite
FTIR-ATR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada do inglês <i>Fourier transform infrared-attenuated total reflectance</i>
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MERS	Síndrome respiratória do Oriente Médio
OCP	Potencial de circuito aberto
OMS	Organização Mundial de Saúde
PC	Polímeros condutores
Poli(2-AB)	Filme polimérico derivado da 2-aminobenzamida
POP	Procedimento Operacional Padrão
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Ácido ribonucleico do inglês <i>ribonucleic acid</i>
SARS	Síndrome da angústia respiratória grave
SARS-CoV	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave
SARS-CoV-2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2
SUS	Sistema Único de Saúde
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2 – OBJETIVOS	19
2.1 – Objetivo geral	19
2.2 – Objetivos específicos	19
3 – REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 – O surgimento e progressão da pandemia da COVID-19	20
3.2 – O vírus SARS-CoV-2	21
3.2.1 – <i>Diagnóstico</i>	22
3.3 – Biossensores eletroquímicos.....	24
3.3.1 – <i>Eletrodos modificados</i>	28
3.4 – Detecção indireta por azul de metileno (AM)	30
3.5 – Técnicas eletroquímicas.....	31
3.5.1 – <i>Voltametria cíclica (VC)</i>	31
3.5.2 – <i>Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)</i>	33
3.5.3 – <i>Voltametria de onda quadrada (VOQ)</i>	34
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	36
4.1 – Instrumentação, reagentes e soluções	36
4.2 – Estudos da formação e caracterização eletroquímica do filme polimérico sobre EG	37
4.2.1 – <i>Eletrossíntese da poli(2-AB)</i>	37
4.2.2 – <i>Análises eletroquímicas do poli(2-AB)/EG</i>	37
4.2.3 – <i>Influência do pH na oxidação da 2-AB</i>	38
4.2.4 – <i>Obtenção do coeficiente de transferência eletrônica e do número de elétrons</i>	38
4.2.5 – <i>Eletropolimerização, extração e análises de FTIR-ATR do poli(2-AB)</i>	38
<i>formado sobre barras de grafite</i>	38
4.3 – Estudos do desenvolvimento do genossensor para a COVID-19 sobre EIG.....	39
4.3.1 – <i>Eletrossíntese e caracterização eletroquímica da poli(2-AB)</i>	40
4.3.2 – <i>Imobilização dos oligonucleotídeos de reconhecimento</i>	40
4.3.3 – <i>Análises com amostras sintéticas e detecção indireta da hibridização com AM</i>	41

4.3.4 – Otimização dos parâmetros de eletropolimerização da 2-AB.....	42
4.3.5 – Otimização das condições de imobilização das sondas e detecção do alvo	43
4.4 – Avaliação da sensibilidade, reprodutibilidade e estabilidade do genossensor ...	43
4.5 – Aplicação do genossensor em amostras reais	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 – Estudos da formação e caracterização do <i>poli(2-AB)</i> sobre EG	46
5.1.1 – Eletropolimerização da 2-AB sobre os EG	48
5.1.2 – Investigação das propriedades eletroquímicas do <i>poli(2-AB)/EG</i>	49
5.1.3 – Estudo da influência do pH na oxidação da 2-AB	52
5.1.4 – Obtenção do coeficiente de transferência eletrônica e do número de elétrons	54
5.1.5 – Eletropolimerização, extração e análises de FTIR-ATR do <i>poli(2-AB)</i> formado sobre barras de grafite.....	56
5.1.6 – Proposta do mecanismo de oxidação eletroquímica e formação do <i>poli(2-AB)</i>	60
5.2 – Estudos do desenvolvimento do genossensor para a COVID-19 sobre EIG.....	61
5.2.1 – Eletrossíntese e caracterização eletroquímica da <i>poli(2-AB)</i>	62
5.2.2 – Imobilização dos oligonucleotídeos e análises de reconhecimento do genoma viral.....	64
5.2.3 – Otimização dos parâmetros de construção do transdutor	66
5.2.4 – Otimização das condições de imobilização dos oligonucleotídeos e tempo de reação	68
5.3 – Avaliação da sensibilidade, reprodutibilidade e estabilidade do genossensor ...	70
5.4 – Aplicação do genossensor em amostras reais e estudo de interferentes	72
6 – CONSIDERAÇÕES SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO DURANTE A PANDEMIA	77
7 – CONCLUSÃO.....	78
8 – REFERÊNCIAS	79

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas emergentes representam uma grande ameaça à saúde pública mundial. O surgimento do novo coronavírus e a rápida evolução para uma pandemia global deixou em alerta as autoridades de saúde por todo o mundo. Mesmo com todas as medidas de prevenção, monitoramento e controle, a taxa de transmissão do vírus SARS-CoV-2, causador da COVID-19, permaneceu alta e até os dias atuais restringe a convivência.

O diagnóstico padrão para a COVID-19 é o exame de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase, do inglês *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), que têm como princípio a testagem molecular, provendo um resultado com alta sensibilidade e seletividade. No entanto, por demandar profissionais especializados e laboratórios autorizados, a técnica dificulta a testagem em massa da população. Dessa forma, testes imunológicos com resultados rápidos, feitos em amostras sorológicas, foram desenvolvidos e comercializados. As técnicas disponíveis, o teste de ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), e testes imunocromatográficos, somente conseguem identificar os anticorpos produzidos pelo corpo humano. Isso ocorre geralmente após o sétimo dia de infecção. A sensibilidade varia de acordo o fabricante, mas existem altas taxas de falsos negativos provindos desse teste. Além disso, devido à sua faixa de aplicação iniciar em momento tardio, esses métodos não são indicados como forma de monitoramento e controle do espalhamento da doença (PAVÃO *et al.*, 2020).

Uma alternativa que se mostra promissora tanto para promover a acessibilidade para a testagem em massa, quanto para manter a alta sensibilidade e seletividade do diagnóstico padrão, são os biossensores. Estes, são dispositivos que integram um elemento de reconhecimento biológico (biorreceptor) imobilizados sobre um transdutor, o qual é responsável por converter a interação biológica entre biorreceptor e analito em uma resposta de fácil leitura, seja ela química ou física. Contudo, uma das principais dificuldades no desenvolvimento dos biossensores está relacionado a imobilização e manutenção da atividade biológica do elemento de reconhecimento. Sendo assim, a etapa de imobilização se torna uma das etapas mais críticas no processo de desenvolvimento dos biossensores. Então, uma das estratégias para contornar esses problemas é a modificação da superfície transdutora para melhor interação com o biorreceptor, e dentre os transdutores utilizados os ópticos e eletroquímicos têm sido os mais amplamente utilizados.

Os transdutores eletroquímicos transmitem a resposta físico-química resultante de interações ou reações biológicas que acontecem com o biorreceptor nele integrado para o

domínio elétrico. Essa medida é obtida a partir de técnicas eletroquímicas que podem ser baseadas na amperometria, voltametria, potenciometria, dentre outras. Esse elemento tem papel fundamental para o bom funcionamento de um biossensor, uma vez que o biorreceptor está adsorvido em sua superfície. No entanto, se essa interação é fraca, parâmetros como sensibilidade, estabilidade e seletividade do dispositivo podem ser afetadas (MEHRVAR; ABDI, 2004). Neste contexto, para contornar tal situação, a utilização de polímeros condutores (PC) formados por vias eletroquímicas (eletropolimerização) na superfície do transdutor têm-se mostrado muito promissoras. A eletropolimerização permite a formação de filmes poliméricos finos com estruturas e propriedades características, além de não ser possível retirá-los da superfície do dispositivo com facilidade, dessa forma, podendo-se considerar que o transdutor foi modificado. Essa modificação dos transdutores com os PC pode promover interações mais estáveis com as biomoléculas utilizadas como agentes biorreceptores, melhorando seu tempo de resposta e sua sensibilidade. Além disso, os PC também auxiliam na manutenção da atividade biológica dessas moléculas mesmo após processos de lavagem, constantemente utilizadas no desenvolvimento dos biossensores (HOCEVAR, 2016; OLIVEIRA, J. *et al.*, 2013).

Os biossensores podem utilizar diferentes biomoléculas como elemento de reconhecimento, como enzimas, antígenos, anticorpos, material genético, peptídeos, tecidos, células etc. Especificamente, os genossensores, são dispositivos que utilizam sondas de DNA complementar (cDNA) imobilizadas na superfície do transdutor para promover uma interação específica como analito de interesse. Esses dispositivos são amplamente utilizados como métodos de diagnóstico de infecções virais. Para o caso do SARS-CoV-2, um vírus de ácido ribonucleico, do inglês *ribonucleic acid* (RNA), as sondas correspondem a uma região conservada do seu material genético, e interagem formando um híbrido. Devido à especificidade desse fenômeno, os genossensores podem oferecer um diagnóstico com alta precisão, podendo atingir níveis elevados de sensibilidade.

A detecção da hibridização pode ser realizada medindo-se diretamente o sinal eletroquímico resultante da oxidação das bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos (AN). É possível também, identificar a hibridização de forma indireta, utilizando compostos indicadores capazes de interagir de formas diferentes com o DNA de fita simples (ssDNA) e de dupla fita (dsDNA), resultando, portanto, no monitoramento eletroquímico dos processos redox deste indicador. Dos compostos que podem ser utilizados, o azul de metileno (AM) é o mais comum entre eles, uma vez que ele apresenta capacidade de interação com as bases guanina do ssDNA, perdendo essa afinidade na presença do dsDNA. Então, a atividade redox do AM pode ser

monitorada por voltametria de onda quadrada (VOQ), por exemplo, apresentando diferentes correntes de pico quando adsorvido às duas estruturas de DNA citadas, permitindo portanto, discriminá-las através dessa diferença de sinal do agente indicador (ERDEM *et al.*, 1999; FERREIRA, 2014; YANG *et al.*, 2002).

Neste contexto, o trabalho propõe a eletropolimerização e a caracterização eletroquímica dos filmes poliméricos da 2-aminobenzamida (2-AB), formados sobre eletrodos de grafite, com a proposta de desenvolvimento de um genossensor eletroquímico para a COVID-19. Para testagem de amostras de *swab* nasofaríngeal visando identificar a presença do RNA do SARS-CoV-2, as sondas de cDNA, utilizadas como elemento de reconhecimento biológico, foram projetadas de forma a serem complementares à região N do vírus, as quais por sua vez podem promover uma interação específica com amostras contendo o RNA viral, apresentando alta sensibilidade e especificidade. Desta forma, monitorando-se a reação de hibridização, ou seja, interação cDNA com RNA viral, o dispositivo pode ser capaz de promover a identificação do vírus ainda durante o período de infecção, independente da carga viral da pessoa infectada. Desta forma, tais dispositivos, quando em contato com a amostra contendo o genoma viral, poderão prover uma reação biológica sensível e específica, a ser monitorada de forma indireta no eletrodo por meio de técnicas eletroquímicas, detectando a redução do intercalador AM.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar eletroquimicamente o filme polimérico da 2-aminobenzamida (2-AB) aplicando-o como plataforma funcionalizada na modificação de eletrodos impressos de grafite (EIG) para o desenvolvimento de um genossensor eletroquímico para testagem de COVID-19 em amostras de *swab* nasofaríngeal.

2.2 – Objetivos específicos

- ✓ Eletropolimerizar a 2-AB sobre eletrodos de grafite através da Voltametria cíclica (VC);
- ✓ Caracterizar os eletrodos modificados, utilizando a VC e a Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), e comparar o comportamento eletroquímico destes com o eletrodo não modificado;
- ✓ Investigar a influência do pH, bem como obter os valores do coeficiente de transferência eletrônica, número de elétrons e da constante heterogênea de transferência de elétrons para a oxidação eletroquímica da 2-AB;
- ✓ Eletropolimerizar a 2-AB sobre bastões de grafite e proceder com a extração do material para realização de análises por Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR);
- ✓ Propor um mecanismo para a oxidação eletroquímica da 2-AB, e para a formação da poli(2-AB);
- ✓ Eletropolimerizar a 2-AB sobre eletrodos impressos de grafite, utilizando a VC, e otimizar os principais parâmetros como: número de ciclos de potencial, concentração do monômero e velocidade de varredura;
- ✓ Otimizar as condições de imobilização de duas sequências de cDNA da região conservada N do SARS-CoV-2 (concentração e tempo de imobilização);
- ✓ Avaliar a resposta do genossensor quanto a sensibilidade e seletividade na presença de amostras específicas, não-específicas e possíveis interferentes para a COVID-19, através do monitoramento da redução do AM, assim como otimizar essa etapa (diluição e tempo de contato);
- ✓ Avaliar a sensibilidade, reprodutibilidade, estabilidade do genossensor, e aplicar o em amostras reais obtidas por *swab* nasofaríngeal humano.

3 – REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 – O surgimento e progressão da pandemia da COVID-19

Em dezembro de 2019, foi amplamente noticiado o surgimento de um novo tipo de coronavírus na cidade de Wuhan, China, no qual julga-se que os primeiros casos de infecção tenham sido transmitidos de animais (morcegos) para os humanos. Posteriormente, esse vírus foi identificado como sendo o “coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2)”, responsável pela *Coronavirus disease* (COVID-19). Então, em 11 de março de 2020, o diretor da Organização Mundial de Saúde (OMS), Tedros Adhanom Ghebreyesus, em seu discurso de abertura do media briefing declarou a situação de pandemia do novo coronavírus (WHO, 2020), iniciando sua declaração da seguinte forma:

“Nas últimas duas semanas, o número de casos de CoVid-19 fora da China aumentou 13 vezes e o número de países afetados triplicou. Existem agora mais de 118.000 casos em 114 países e 4.291 pessoas perderam a vida. Outros milhares estão lutando por suas vidas em hospitais. Nos próximos dias e semanas, esperamos ver o número de casos, o número de mortes e o número de países afetados aumentar ainda mais. A OMS tem avaliado este surto 24 horas por dia e estamos profundamente preocupados tanto com os níveis alarmantes de propagação e gravidade, como com os níveis alarmantes de inação. Portanto, avaliamos que CoVid-19 pode ser caracterizado como uma pandemia.” (WHO, 2020, tradução nossa)*

Cabe ressaltar que a definição de pandemia não depende de um número específico de casos, mas é utilizado quando se considera que uma doença infecciosa atingiu um patamar de espalhamento geográfico de difícil controle. Desta forma, o termo não é utilizado com frequência pela OMS, até mesmo para não causar pânico ou ainda, colocar a população em estado de medo. Contudo, os dados relacionados ao contágio e avanço da Covid-19 pelo mundo foram decisivos nessa tomada de decisão por parte da OMS (WHO, 2020). A Covid-19, desde então, vem sendo o holofote do mundo, causando grande alarde da população e incessantes questionamentos e contribuições, por parte dos pesquisadores da área, em aspectos relacionados ao surgimento e espalhamento do vírus, diagnóstico, tratamento, prevenção e ao desenvolvimento e eficácia das vacinas (BAKADIA *et al.*, 2021; BASAVARAJU *et al.*, 2021;

*In the past two weeks, the number of cases of COVID-19 outside China has increased 13-fold, and the number of affected countries has tripled. There are now more than 118,000 cases in 114 countries, and 4,291 people have lost their lives. Thousands more are fighting for their lives in hospitals. In the days and weeks ahead, we expect to see the number of cases, the number of deaths, and the number of affected countries climb even higher. WHO has been assessing this outbreak around the clock and we are deeply concerned both by the alarming levels of spread and severity, and by the alarming levels of inaction. We have therefore made the assessment that COVID-19 can be characterized as a pandemic.

BLOOM *et al.*, 2021; HUANG, C. *et al.*, 2020; HUANG, Q.; ZENG; YAN, 2021; LEFEBVRE *et al.*, 2021; LISBOA BASTOS *et al.*, 2020; MATTOS DOS SANTOS, 2020; PAN *et al.*, 2020; PILKINGTON *et al.*, 2021; STEINER, 2020).

3.2 – O vírus SARS-CoV-2

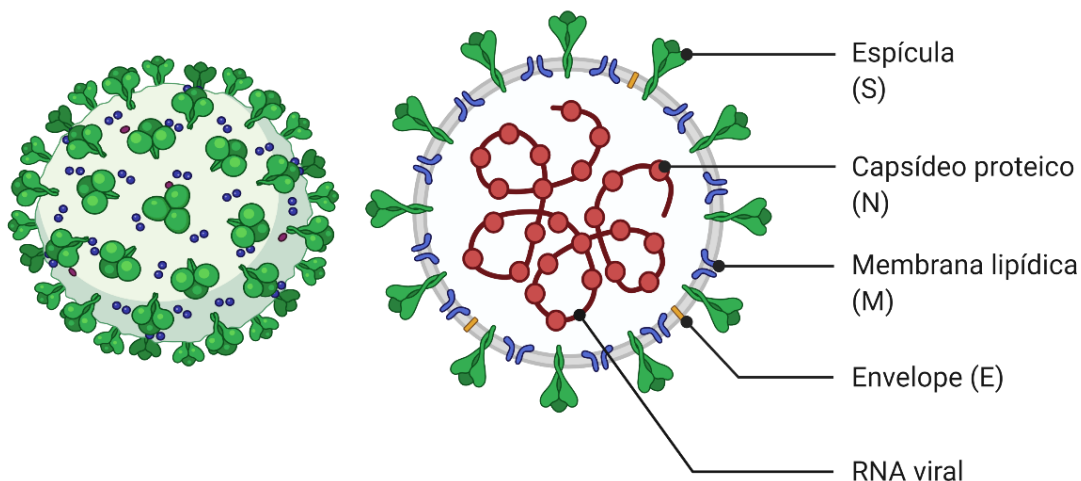
Pertencentes à família *Coronaviridae* e a ordem *Nidovirales*, os coronavírus estão amplamente distribuídos em humanos, estando associados a vários surtos de doenças infecciosas, dentre elas, a Síndrome Respiratória Aguda Grave, do inglês *severe acute respiratory syndrome* (SARS-CoV) que surgiu em 2002 também na China, responsável por um caso epidêmico que durou até meados de 2003, e apresentou um índice de mortalidade de 9,6% (778 mortes entre 8.076 indivíduos infectados em apenas 1 ano) (GONG; BAO, 2018). O seu principal sintoma é a dificuldade de respirar, assim como a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS) identificada em 2012 na Arábia Saudita, afetando posteriormente cerca de 27 países, registrando mais de 2500 casos espalhados globalmente até março de 2020 (DENG; BAKER, 2021; WU, Z. *et al.*, 2021). A infecção pelo SARS-CoV-2 é muito semelhante àquelas causadas pelos outros coronavírus. Até o dia 10 de agosto de 2021, cerca de 203,6 milhões de pessoas no mundo, ocasionando 4,3 milhões de mortes. No Brasil, até esta data, são mais de 20,2 milhões de pessoas infectadas ultrapassando 563 mil mortes. No Estado de Minas Gerais são mais de 1,99 milhões de casos, com registro de mais 51 mil mortes, fazendo-se notar a alta taxa de transmissão, que supera tanto o SARS-CoV e o MERS. (GOOGLE NEWS, 2021).

O termo SARS descreve os aspectos relacionados a síndrome respiratória aguda grave; CoV é a abreviação de coronavírus, a enumeração 2 se deve à similaridade entre o novo coronavírus e o SARS-CoV, sendo, portanto, denominado cientificamente de SARS-CoV-2. Este é o sétimo vírus conhecido por infectar humanos e causar doenças respiratórias, dentre os quais, quatro são responsáveis por afetar o trato respiratório superior e causar sintomas leves (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 e HKU1). Já os outros três (SARS-CoV, MERS-CoV e o atual coronavírus, SARS-CoV-2) afetam o trato respiratório inferior e causam a Síndrome Respiratória Grave (LIU, D. X.; LIANG; FUNG, 2021). O novo coronavírus é um β -coronavírus distinto do SARS-CoV e do MERS-CoV, é um vírus envelopado de RNA polaridade positiva e não segmentada, de aproximadamente 30 mil bases (GUO *et al.*, 2020).

Conforme representação esquemática mostrada na Figura 1, o novo coronavírus possui quatro proteínas estruturais, sendo elas, S: a espícula de contato do vírus com receptores celulares; N: capsídeo proteico; M: é a membrana lipídica; E: envoltório glicoproteico e RNA

viral o material genético. O SARS-CoV-2, até o momento, dentre os coronavírus, é o que mais causou mortes e quadros severos na população, apresentando sintomas diversos, como tosse, perda de olfato e paladar e a dificuldade respiratória, o mais comum entre eles. No entanto, existem também os casos assintomáticos que prejudicam ainda mais no controle da transmissão viral.

Figura 1: Representação esquemática da estrutura do Coronavírus. Criado com [BioRender.com](https://www.biorender.com/)



Neste cenário em que ainda não há medicamento antiviral específico, ações de pesquisa em diferentes frentes, incluindo testagem, tratamentos eficazes para infecções em estágio avançado e compreensão da patogênese da infecção, são fundamentais para o enfrentamento da doença. A experiência dos países afetados pela COVID-19 indica que a testagem em larga escala, e a liberação do resultado em curto período, é imprescindível para o monitoramento da evolução de casos, permitindo, portanto, criar estratégias de controle da disseminação da doença (KOH *et al.*, 2020).

3.2.1 – Diagnóstico

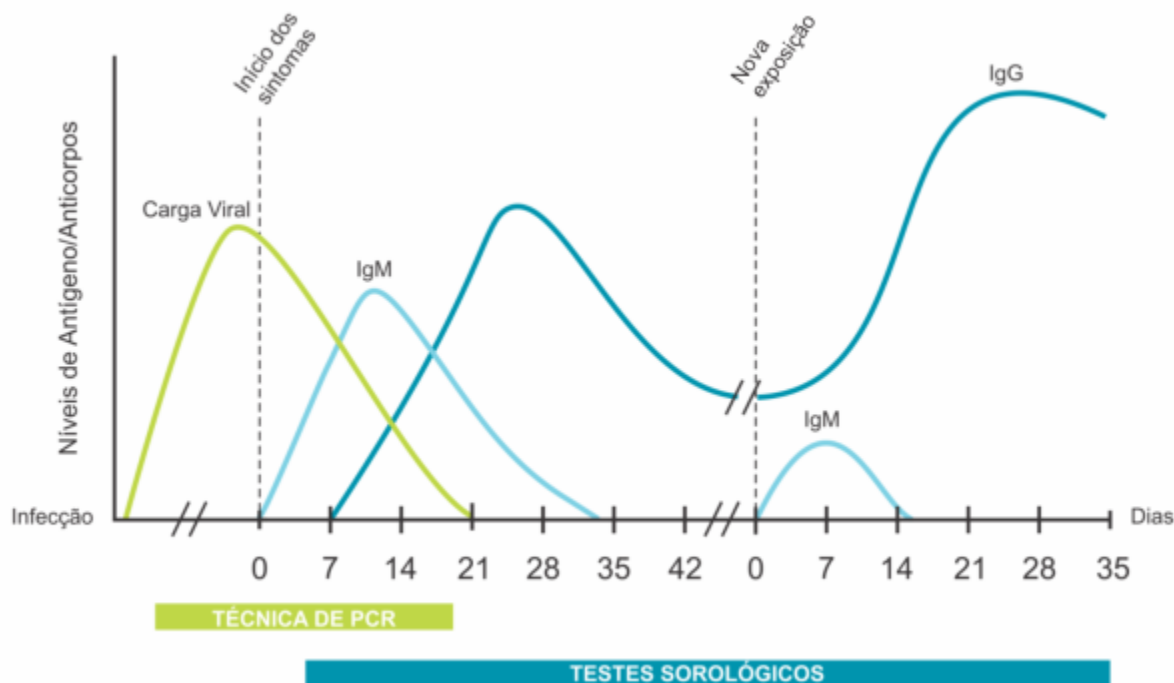
O padrão ouro para o diagnóstico laboratorial da doença é a detecção do genoma do vírus por RT-PCR, a qual oferece grande porcentagem de sensibilidade, ampla faixa de aplicação; forte especificidade e baixa taxa de falsos negativos. No entanto, o método impõe significativa restrição na capacidade de testagem em larga escala, uma vez que a metodologia tem custo elevado, pois requer estrutura específica de laboratório e equipamentos, bem como equipe técnica treinada e altamente capacitada para sua realização (HAN *et al.*, 2021).

Atualmente, estão disponíveis no mercado dois tipos de testes rápidos para o diagnóstico da COVID-19, o do antígeno viral e o de anticorpos, sendo ambos testes

imunocromatográficos. O teste do antígeno viral pode detectar a COVID-19 na fase de atividade da infecção, e o teste de anticorpos pode identificar uma resposta imunológica do corpo em relação ao vírus. A principal vantagem desses testes é a rápida resposta com relação a obtenção de resultados, além da estabilidade, fácil interpretação, operação simples, biotoxicidade extremamente baixa e boa biocompatibilidade (HAN *et al.*, 2021). Por outro lado, podemos citar que tais testes apresentam uma alta especificidade, mas em alguns casos, a sensibilidade fica em aproximadamente 85%, o que pode levar a interpretações de falsos-negativos. Uma outra limitação, por exemplo, está no fato da resposta imunológica do indivíduo em produzir os anticorpos, o que é chamado de janela imunológica, conforme mostrado na

Figura 2. Em média o teste de anticorpos é realizado somente após o 8º dia do início da infecção, enquanto o do antígeno detecta a infecção ativa (fase aguda). Mesmo validados, é importante ressaltar que os testes rápidos apresentam importantes limitações, como, ausência de padronização dos kits, diferentes antígenos e métodos utilizados para a detecção dos anticorpos, resultando em heterogeneidade nos valores de sensibilidade e especificidade (PÉREZ-LÓPEZ; MIR, 2021).

Figura 2: Curva de resposta imunológica após infecção pelo SARS-CoV-2 e faixas de detecção dos testes de RT-PCR e imunocromatográficos.



Fonte: LABTEST, (2020).

3.3 – Biossensores eletroquímicos

Sabendo que, ainda hoje, existe a dificuldade de monitoramento da evolução da pandemia, principalmente no Brasil, é necessário que se proponha novas alternativas que consistem em um método simples e acessível, tanto para a população quanto para os órgãos de saúde, que promova um diagnóstico rápido, capaz de fornecer a mesma sensibilidade do método considerado atualmente como padrão, além de oferecer baixo custo de produção em massa. Tais características condizem com aquelas observadas em muitos testes rápidos já encontrados no mercado, como o de glicose, gravidez, assim como aqueles já disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS) como o teste de HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*), sífilis e hepatites B e C.

Neste sentido, a utilização dos biossensores pode ser adequada para se obter uma metodologia que representa o desenvolvimento de um dispositivo simples, com baixo custo de produção e que tenha como características principais, seu emprego para uma grande quantidade de amostras, bem como seu uso em análises *in loco* sem a necessidade de mão de obra e/ou equipamentos especializados, e que possa garantir, acima de tudo, alta especificidade e sensibilidade (MOBED; SEPEHRI SHAFIGH, 2021).

Entretanto, dentre as desvantagens destes dispositivos para demanda laboratorial, estão a reprodutibilidade nos processos de modificação do eletrodo, produção em escala ampliada e armazenamento a longo prazo. De modo a contornar essas dificuldades, o desenvolvimento de eletrodos planares serigrafados ou em 3D, baratos, sensíveis, reprodutíveis e capazes de miniaturização também tem contribuído para o sucesso dos biossensores eletroquímicos (COUTO; LIMA; QUINAZ, 2016; TUDORACHE; BALA, 2007). Erdem e colaboradores (2011), por exemplo, demonstraram interesse considerável no desenvolvimento de sensores eletroquímicos devido às suas importantes aplicações em medicina, bioengenharia, diagnóstico clínico, diagnóstico preventivo de epidemias e proteção ambiental (ERDEM; KARADENIZ; CALISKAN, 2011). Recentemente, nosso grupo de pesquisa, Grupo de Eletroquímica e Nanotecnologia Aplicada (GENAp) propôs um imunossensor impedimétrico para a detecção simultânea das doenças de Chagas e Leishmaniose visceral, utilizando eletrodos impressos, os quais apresentaram resultados com 100% de precisão, sensibilidade e especificidade para 40 diagnósticos realizados com amostras de soro humano e de cães, incluindo testes de reação cruzadas e outras infecções (CORDEIRO *et al.*, 2020). Mesmo diante de algumas desvantagens destes dispositivos como consumo de fotomáscaras de materiais,

estênceis ou outros recursos físicos para facilitar a padronização, aplicação em grande escala, cada padrão de impressão requerer uma tela separada, dentre outras.

Contudo, os eletrodos impressos comerciais, devido a aquisição no mercado externo, valor do dólar, dentre outros fatores, encontram-se, ainda, a custos elevados. Em cotação recente, datada de 30 de julho de 2021, para os eletrodos utilizados neste trabalho, obteve-se o valor de aproximadamente R\$ 28,00 (vinte e oito reais) para cada eletrodo impresso. Em contrapartida, várias propostas de construção de sistemas eletroquímicos descartáveis são encontradas na literatura, como o desenvolvimento de eletrodos de papel (PUIU; MIRCESKI; BALA, 2021), impressão 3D (DE OLIVEIRA, F. M.; DE MELO; DA SILVA, 2020; MUÑOZ; PUMERA, 2020), impressão de tintas sobre suportes flexíveis (MARTÍN-YERGA *et al.*, 2017; SURESH *et al.*, 2021), nanomateriais condutores (SHRIVAS *et al.*, 2020), tintas condutoras (CAMARGO *et al.*, 2021), dentre outros. Ainda, em uma recente revisão, Suresh *et al.* (2021), abordaram uma discussão sobre a fabricação, tipos de tintas para aplicações de impressão em tela, substratos usados, projeto de eletrodo e procedimentos de pré-tratamento, apresentando o processo de fabricação de eletrodos serigrafados, mediante as oportunidades e desafios.

Em contrapartida, as principais vantagens estão relacionadas ao uso para aplicação em testes de laboratório em pequenos lotes, simplicidade de utilização e aplicação, versatilidade, portabilidade, facilidade de operação, confiabilidade e menor volume de reagentes e amostragem principalmente para aplicações clínicas (AMBAYE *et al.*, 2021; MISTRY *et al.*, 2014; VASILESCU *et al.*, 2016), evidenciando a relevância desses dispositivos na facilitação na testagem e controle de variadas infecções.

Por definição, biossensor é um dispositivo de sensoriamento onde o agente de reconhecimento é um material biológico com reações de afinidade ou atividade catalítica. Este agente biológico está intimamente ligado a um transdutor que irá converter este sinal biológico em um sinal químico e/ou físico, que então possa ser mensurado e analiticamente quantificado (ALHADRAMI, 2018). Desta forma, a comunicação entre o reconhecedor (biomolécula) e o transdutor é a base para a construção de um biossensor.

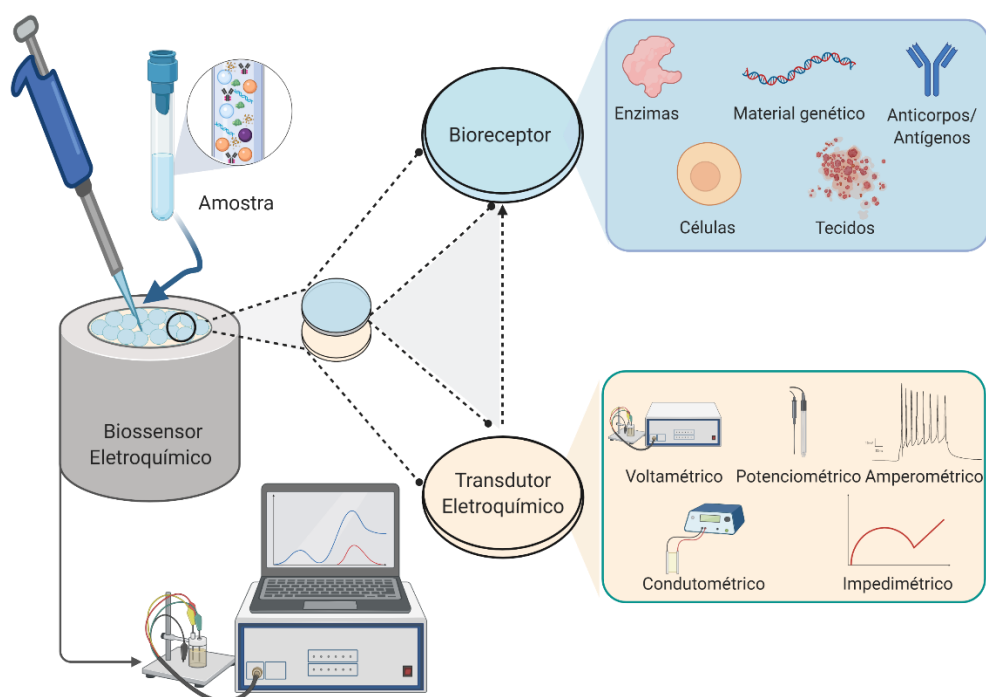
Dentre os diversos tipos de biossensores, aqueles com transdução eletroquímica tornaram-se muito populares por apresentarem características como, instrumentação com baixo custo de aquisição e/ou construção quando comparado às técnicas padrão, possibilidade de modificação da superfície condutora, possibilidade de criação, miniaturização e desenvolvimento de um sistema único portátil, possibilidade de determinação simultânea de diferentes analitos, análises em amostras complexas, realização de análises relativamente rápidas e simples, pequeno tamanho da unidade de medição permitindo menor volume de

amostragem, detecção de analíticos em baixas concentrações, dentre outras (CORDEIRO *et al.*, 2021; HUANG, X.; ZHU; KIANFAR, 2021; NUR *et al.*, 2021).

A Figura 3, apresenta um esquema geral de um biossensor com transdução eletroquímica. A partir disso, pode-se classificá-los quanto ao método de transdução de sinal:

- ✓ Amperométricos: a corrente resultante de um processo de oxidação ou redução eletroquímicas de uma espécie eletroativa é medida a um valor fixo de potencial, e está relacionada à sua concentração;
- ✓ Potenciométricos: a concentração ou atividade do analito é relacionada com a diferença de potencial obtida entre dois eletrodos, um de referência e outro auxiliar, obedecendo a relação de Nernst-Donnan;
- ✓ Condutimétricos: muito utilizado para monitorar reações enzimáticas, biossensores condutimétricos monitoram o efeito causado pela mudança no número de cargas carregadas no eletrólito durante a reação, medindo, portanto, a sua condutividade;
- ✓ Voltamétricos: avaliam a concentração do analito a partir da corrente gerada pela sua oxidação ou redução, aplicando-se variações controladas de potencial;
- ✓ Impedimétricos: dispositivos desse tipo avaliam a resistividade e capacitância da superfície aplicando-se uma excitação de frequência senoidal, gerando então o seu espectro de impedância.

Figura 3: Esquema geral de um biossensor com transdução eletroquímica. Criada com [BioRender.com](https://www.biorender.com)



Fonte: Adaptada de Cordeiro *et al.* (2021).

O papel do agente reconhecedor, nesse dispositivo, é de distinguir uma determinada substância, através de uma interação específica ou reação biológica, no qual gera-se um sinal, podendo ser: variação na concentração de prótons ou de massa, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, liberação de calor, mudança no estado de oxidação do analito, entre outros. A biomolécula utilizada para atuar como biorreceptor é escolhida levando-se em conta o analito a ser identificado, uma vez que as interações que serão proporcionadas entre ambos são altamente específicas. Sabendo disso, os biossensores podem ser novamente classificados com respeito a esse fator, sendo:

- ✓ Enzimáticos: utiliza de enzimas para realizar a catálise do substrato, monitorando o desaparecimento de algum reagente ou surgimento de algum produto;
- ✓ Microbiológicos: nesse tipo de dispositivos, células de microrganismos são os responsáveis por identificar o analito de interesse;
- ✓ Biossensores com tecido: pedaços de tecidos de plantas ou animais são utilizados como elemento de reconhecimento;
- ✓ Imunossensores: baseia-se na reação imunológica entre antígeno e anticorpo;
- ✓ Genossensores: utiliza de uma sequência de ácidos nucleicos como uma sonda, promovendo, portanto, a identificação específica de sequências de DNA ou RNA através do evento de hibridização.

Os genossensores ou biossensores de DNA são mais comumente aplicados em análise genética, e incluem detecção de mutações e modificações genéticas, metais pesados, diagnóstico e monitoramento de infecções virais e microbianas, câncer, análises forenses, teste de paternidade e detecção de armas biológicas (ABOLHASAN *et al.*, 2019; GOOCH *et al.*, 2017; HUANG, R.; HE; LI, 2018; SAIDUR; AZIZ; BASIRUN, 2017; SVITKOVÁ; LABUDA, 2017; WU, Q. *et al.*, 2019; YÁÑEZ-SEDEÑO *et al.*, 2014). Quando utilizados para diagnóstico e monitoramento de infecções virais, estruturas denominadas sondas, são imobilizadas na superfície do transdutor, e são compostas por sequências de oligonucleotídeos com cerca de 20 a 30 bases, desenvolvidas através do DNA complementar (cDNA) ao código genético do vírus de interesse. Essas sondas, portanto, promovem uma interação biológica e específica com o RNA viral, formando uma estrutura de dupla fita chamada de híbrido.

Na preparação dos biossensores de DNA, a imobilização da sonda é a etapa primordial que garante o desempenho e funcionamento do dispositivo. Essa etapa pode acontecer por adsorção física ou química; complexos envolvendo biotina-avidina, ligações covalentes e imobilização sobre a superfície de eletrodos compósitos em solução (PIVIDORI; MERKOÇI; ALEGRET, 2000). A adsorção física é o método mais simples, caracterizando-se,

por exemplo, pela interação das cargas negativas da sonda e as cargas positivas presentes na superfície do eletrodo. O processo adsorptivo pode acontecer diretamente sobre a superfície do eletrodo ou de forma indireta, quando as sondas são imobilizadas sobre um filme polimérico fino gerado na superfície do eletrodo de trabalho (CARR, 2019).

O sensoriamento eletroquímico da hibridização pode ser então detectado diretamente (PALEČEK *et al.*, 1997), pelo uso de intercaladores de DNA (ERDEM *et al.*, 1999, 2001; LIU, J.; LI; DONG, 1996; LIU, S. *et al.*, 1996; MARRAZZA; CHIANELLA; MASCINI, 1999; WANG *et al.*, 1996) ou ainda por espécies eletroativas que interagem com as bases guanina das sequências de DNA (ERDEM *et al.*, 2000; JOHNSTON; THORP, 1996). Dentre a diversidade de compostos utilizados, os dois principais para detecção dos eventos de hibridização são o azul de metileno (AM) e o brometo de etídio (BE) (TOSAR; BRAÑAS; LAÍZ, 2010). A ligação de intercalação do BE ao DNA ocorre através do empilhamento dos grupos aromáticos planares entre os espaços dos pares de bases (LIU, S. *et al.*, 1996). Conseqüentemente, o efeito de intercalação inibe tanto a transcrição como a replicação do DNA, causando toxicidade e mutações, devido a isto o BE é muito mais carcinogénico do que o AM.

3.3.1 – Eletrodos modificados

Dentre as diversas propostas de modificação de um eletrodo está a polimerização eletroquímica, também conhecida por eletropolimerização, a qual consiste numa técnica de formação de filmes poliméricos diretamente sobre a superfície do eletrodo. Dentro da categoria dos materiais poliméricos, os polímeros condutores (PC) se destacam por apresentarem características e propriedades peculiares cujo interesse científico e tecnológico tem sido alvo de grande atenção. PC contém elétrons π desemparelhados conjugados de elevada extensão responsáveis por suas propriedades eletrônicas incomuns, como condutividade elétrica, transições ópticas de baixa energia, baixo potencial de ionização e alta afinidade eletrônica (HEINZE; FRONTANA-URIBE; LUDWIGS, 2010).

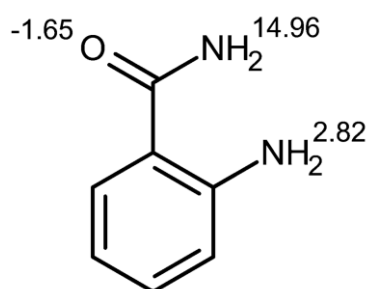
Os PC têm sido utilizados em diversas áreas como: células solares, baterias leves, sensores e dispositivos eletrônicos moleculares, e ainda como materiais inteligentes capazes de responder a estímulos específicos, uma vez que, por apresentarem eletroatividade são materiais capazes de detectar e atuar em tempo real, conferindo a capacidade de trabalhar como sensores e atuadores nos mais diversos campos tecnológicos (BASHIR; RAJENDRAN, 2018; PATRA;

KUMAR; CHAND, 2014; PEREPICHKA *et al.*, 2005; POTYRAILO, 2006; TIAN *et al.*, 2019).

Além disto, tais polímeros também são conhecidos por atuarem como excelentes plataformas para imobilização de biomoléculas e rápida transferência de elétrons para a fabricação de biossensores, já que tais materiais, contendo grupos funcionais preservados, podem promover melhoras significativas no processo de imobilização, e de interação da biomolécula/receptor (SANTOS *et al.*, 2019). Para a construção e desenvolvimento dos biossensores, a utilização dos polímeros condutores na forma de plataformas funcionalizadas, pode garantir ainda, que os eletrodos modificados adquiram sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade, estabilidade e aplicabilidade superiores àquelas do eletrodo convencional sem prévia modificação (HEINZE; FRONTANA-URIBE; LUDWIGS, 2010; SNOOK; KAO; BEST, 2011).

A 2-aminobenzamida (2-AB), também conhecida como antranilamida, é um composto eletroativo com fórmula $C_7H_8N_2O$, derivado da benzamida, que apresenta em sua estrutura química dois grupos funcionais principais, um amina e outro amida, conforme mostrado na Figura 4. O composto à temperatura ambiente apresenta-se na forma de um pó branco para marrom, com massa molar de 136,15 g/mol, ponto de fusão de 110-115 °C, solubilidade em água de 5,44 mg/mL, ponto isoelétrico de 8,89, e valores de pKa de 2,82 e 14,96 (CHEMICALIZE, 2021; FOODB, 2021), podendo ainda sofrer protonação na carbonila do grupo amida em soluções que apresentem valores de pH abaixo de -1,65. Analisando sua estrutura química, podemos dizer que o composto é atrativo para ser utilizado na eletrossíntese de um polímero, uma vez que, na maioria dos casos, a utilização de monômeros com tais características leva a formação de uma plataforma funcionalizada que pode contribuir de forma significativa para no processo de imobilização do componente biológico. Além disso, em nossas pesquisas não encontramos nenhum estudo relacionado a eletropolimerização da 2-AB, bem como sua aplicação no desenvolvimento de biossensores.

Figura 4: Estrutura química da 2-aminobenzamida com a indicação dos respectivos valores de pKa.

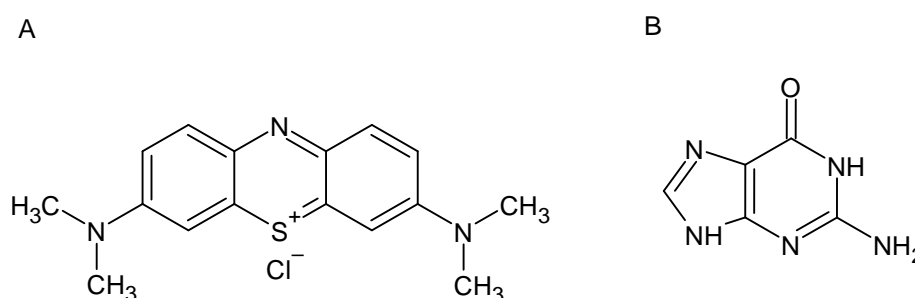


3.4 – Detecção indireta por azul de metileno (AM)

O estado de hibridização de moléculas de DNA e RNA pode ser determinado a partir da oxidação irreversível de suas bases nitrogenadas. No entanto, essa abordagem limita a utilização dos genossensores. É possível ainda, utilizar sondas com marcações redox, no entanto, isso gera um custo elevado na síntese desse material. Dessa forma, para monitorar e identificar o fenômeno de hibridização que acontece em um genossensor, é interessante utilizar a detecção indireta que se baseia na análise eletroquímica de substâncias com propriedades redox que interagem de forma diferentes com o DNA de fita simples (ssDNA) e de fita dupla (dsDNA).

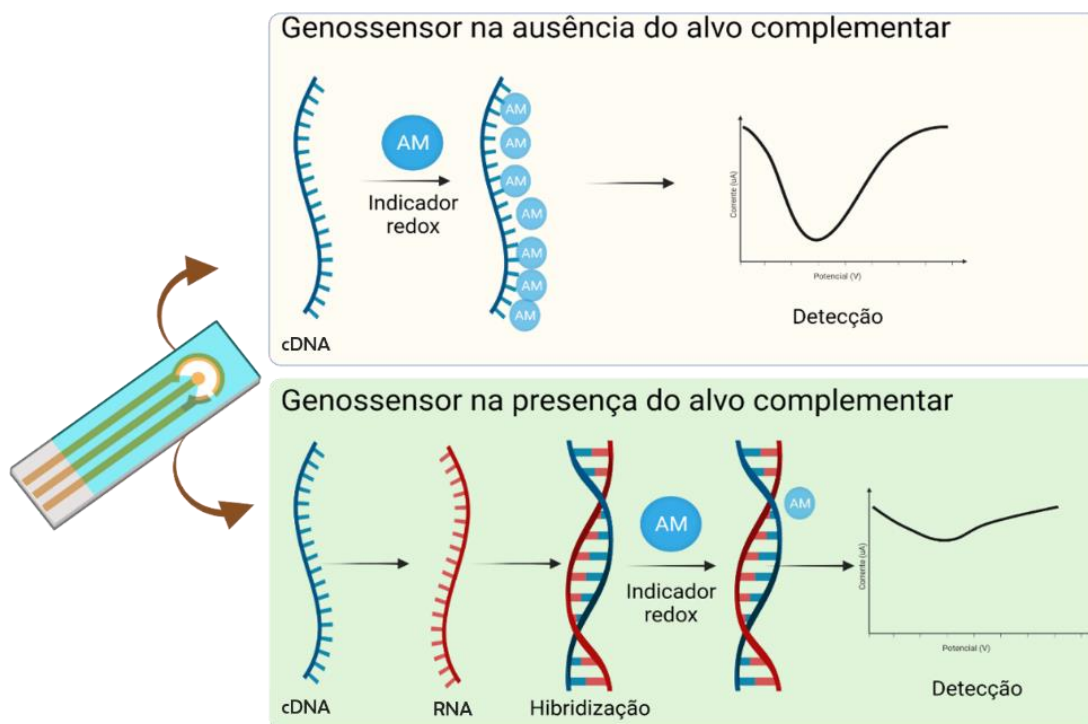
O AM é um corante com estrutura química conforme apresentado na Figura 5A, que apresenta propriedades redox com comportamento característico quando interage com ácidos nucleicos (AN). O composto possui afinidade, principalmente, pelas bases guanina (Figura 5B) do ssDNA. Em contrapartida, quando o fenômeno de hibridização acontece, essas bases deixam de estar disponíveis, e assim, o AM não conseguem interagir diretamente com elas. Em uma análise eletroquímica, o comportamento redox do AM é facilmente detectado para ambos os casos.

Figura 5: Estruturas químicas do (A) AM e (B) base guanina.



Utilizando-se da VOQ para avaliar a interação do AM com as sondas de cDNA, que são fitas simples, e com o híbrido cDNA-RNA viral, nota-se que devido à interação mais facilitada com o cDNA, a técnica apresenta um pico de corrente maior devido à maior quantidade de AM que interagiu com o genossensor. Já para o híbrido, o sinal sofre uma queda, já que o acesso do AM às bases guanina são impedidos, uma vez que não existe mais ssDNA disponível para interação, conforme mostrado na Figura 6 (ERDEM *et al.*, 2000; FARJAMI *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2002)

Figura 6: Esquema representativo de um genossensor com transdução eletroquímica para a detecção indireta do evento de hibridização, utilizando o indicador azul de metileno (AM), na ausência e presença do alvo complementar. Criado com [BioRender.com](https://www.biorender.com/)



3.5 – Técnicas eletroquímicas

A transdução eletroquímica utilizada nos genossensores apresenta vantagens significativas sobre os demais sistemas como, por exemplo, a ampla diversidade de modificação dos eletrodos visando maior eficiência sobre a imobilização da sonda de reconhecimento sobre o transdutor. Dessa forma, torna-se clara a aplicabilidade e versatilidade da construção desses dispositivos para pesquisas e desenvolvimento de novos métodos de reconhecimento biológico (MANZANARES-PALENZUELA *et al.*, 2015; MOHAMMADI; YAMMOURI; AMINE, 2019). Dentre as técnicas eletroquímicas, foram aplicadas para construção, caracterização e otimização do genossensor a voltametria cíclica, a espectroscopia de Impedância eletroquímica e a voltametria de onda quadrada, as quais são brevemente discutidas nos tópicos a seguir.

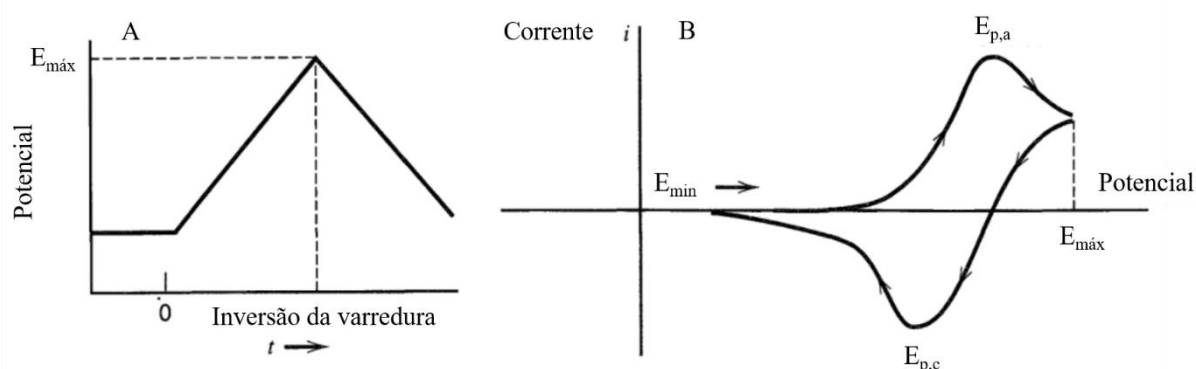
3.5.1 – Voltametria cíclica (VC)

A VC é amplamente utilizada em diversas áreas de estudo da química. A técnica é fácil de ser aplicada e é a que apresenta maior versatilidade para estudo de espécies eletroativas. Resumidamente, a técnica consiste na aplicação de um potencial em um eletrodo, de forma

cíclica, medindo a corrente resultante desse processo. O potencial aplicado varia dentro de um intervalo de potencial mínimo (E_{\min}) e máximo (E_{\max}) com velocidade de varredura ν constante, tendo a forma de uma onda triangular em relação ao tempo de aplicação, conforme mostrado na

Figura 7A.

Figura 7: (A) Princípio da varredura de potencial para a técnica de VC. (B) VC resultante obtido para um processo reversível, utilizando, por exemplo, o par redox ferro/ferricianeto de potássio.



Fonte: Adaptado de BARD; FAULKNER, 2000.

O gráfico resultante da aplicação da VC, denominado voltamograma, dispõe a corrente resultante i versus o potencial aplicado, e possui uma forma muito característica para algumas espécies eletroativas como, por exemplo, o par redox ferro/ferricianeto de potássio, respectivamente $K_4Fe(CN)_6$ e $K_3Fe(CN)_6$, considerado padrão eletroquímico reversível.

Quando se realiza a VC em uma solução contendo esse par, o voltamograma apresenta dois picos de corrente bem distintos, um anódico e outro catódico, conforme mostrado na

Figura 7B. Cada pico corresponde a uma das reações de oxidação ou redução da espécie em solução. Ou seja, quando o potencial é varrido para valores mais positivos, as espécies na forma reduzida que se encontram adjacentes à superfície do eletrodo sofrem oxidação gerando uma corrente anódica que aumenta até atingir um pico máximo. Neste pico, chamado de pico anódico, a concentração da espécie reduzida diminui consideravelmente. Deste ponto em diante, o processo de oxidação então continua ocorrendo até que o potencial atinja o seu valor máximo, e o sentido da varredura é invertido, de forma que a corrente anódica sofra uma queda e a espécie reduzida se esgote na interface eletrodo/solução. A partir daí, com a varredura acontecendo no sentido contrário, o processo se repete, mas desta vez, a espécie que agora se encontra oxidada sofre redução gerando, portanto, uma corrente catódica que dá origem ao pico catódico.

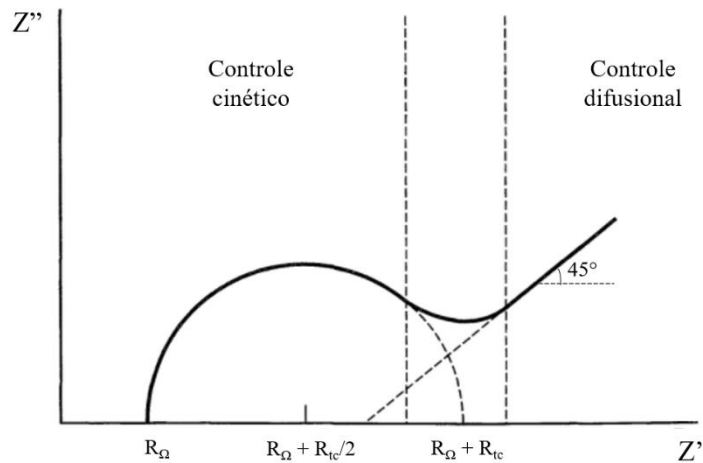
Os potenciais correspondentes a esses picos, $E_{p,a}$ e $E_{p,c}$, potencial de pico anódico e potencial de pico catódico, respectivamente, fornece informações importantes da aplicação da técnica. No caso de soluções onde a reação é reversível, a diferença entre os potenciais de pico deve ser próxima a 60 mV, devido à rápida troca eletrônica que ocorre entre o par redox na superfície do eletrodo (KISSINGER; HEINEMAN, 1983). Esse valor pode sofrer alterações a depender por exemplo da reversibilidade da reação, ou da não idealidade do eletrodo. Neste caso, a técnica tem grande importância para a caracterização e seleção de eletrodos de trabalho utilizados na construção de biossensores.

3.5.2 – Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

Todas as reações eletroquímicas que ocorrem em uma célula eletroquímica, acontecem na superfície do eletrodo de trabalho. Adjacente à sua superfície forma-se a dupla camada elétrica, onde ocorre a transferência de cargas, ou seja, as trocas eletrônicas entre o par redox. Nessa região, a solução apresenta uma resistência à transferência de cargas, R_{tc} , como também uma capacitância (C_{dl}). A partir do limite da dupla camada se encontra o seio da solução (*bulk*), onde ela também apresenta certa resistência, R_{Ω} , e as espécies que se encontram no *bulk* são transportadas, através da difusão, e esse transporte de massa proporciona uma impedância, Z_w , conforme mostrado na Figura 8. Dessa forma, a solução pode ser representada por um circuito elétrico equivalente que descreva as suas propriedades.

A técnica de EIE permite que essas propriedades sejam mensuradas com grande sensibilidade e possam identificar as alterações sofridas por essas propriedades, de acordo com as modificações realizadas na superfície do eletrodo. O método consiste na aplicação de sinais senoidais de corrente alternada em diferentes frequências e a impedância medida no sistema é uma função dessas frequências. A EIE pode ser analisada a partir do diagrama do plano complexo, ou Nyquist, que apresenta no seu eixo vertical a parcela complexa da impedância, e no eixo horizontal, a parte real. Em situações ideais, a reação pode ser completamente reversível, nesse caso, o Nyquist apresenta apenas um semicírculo que intercepta o eixo horizontal em duas posições, fornecendo as resistências R_{tc} e R_{Ω} , e o seu pico equivale à capacitância C_{dl} . Em outro caso ideal, onde existe somente controle difusional, ou seja, apenas transporte de massa, este gráfico se apresenta como uma reta de inclinação de 45°, onde a resistência da solução também é encontrada pela interceptação do eixo horizontal por essa reta, conforme mostrado na Figura 8.

Figura 8: Diagrama de Nyquist observado para EIE realizada em solução contendo o par ferro/ferricianeto de potássio, equivalente ao circuito de Randles.



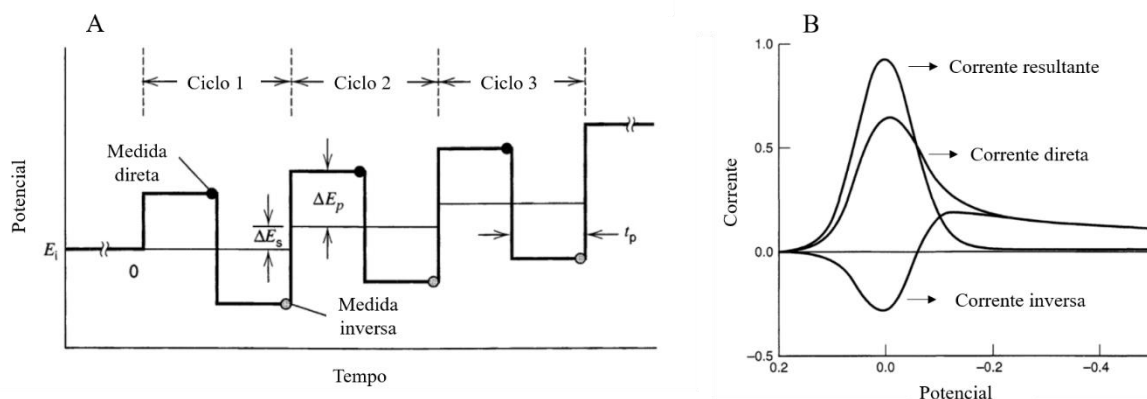
Fonte: Adaptado de BARD; FAULKNER, 2000.

No entanto, na prática existem não idealidades onde a reação é quasi-reversível, o que resulta num gráfico de plano complexo que une ambos os gráficos anteriores. Esse tipo de reação tem relação direta com o circuito elétrico equivalente proposto por Randles, que fornece da mesma forma as informações de R_{tc} , R_Ω e C_{dl} (CONWAY; *et al.*, 1999, BARD; FAULKNER, 1944). Esses parâmetros dependem diretamente do comportamento da DCE que por sua vez sofre interferência da superfície do eletrodo. Dessa forma, a EIE se mostra relevante no estudo e caracterização do processo de modificação de eletrodo para a construção de um biossensor permitindo verificar o seu efeito em cada etapa do procedimento.

3.5.3 – Voltametria de onda quadrada (VOQ)

A VOQ é uma das técnicas de pulso que apresenta maior rapidez e sensibilidade, atingindo limites de detecção muito próximos a outras técnicas como, por exemplo, as cromatográficas ou espectroscópicas. O sinal obtido através da VOQ é o resultado da aplicação de um pulso de potencial a uma certa amplitude, ΔE_p , por um período determinado, t_p . Os pulsos são aplicados em varredura direta e reversa, completando então um ciclo, e ao final de cada varredura, um valor de corrente é registrado. A varredura de pulso acontece como se sobreposta a uma escada de potencial com incremento ΔE_s que determina o início do ciclo seguinte, como apresentado na Figura 9A.

Figura 9: (A) Visão geral dos parâmetros e princípio de medição da corrente por voltametria de onda quadrada, através dos pulsos de potencial, e (B) VOQ resultante para um sistema reversível.



Fonte: Adaptado de BARD; FAULKNER, 2000.

A diferença entre as correntes medidas na varredura direta e inversa resultam em um pico de corrente, com altura, posição e área características do sistema redox avaliado, como mostrado na Figura 9B. A leitura de corrente ao final do degrau de potencial, impede que a corrente capacitiva tenha interferência significativa na medida, melhorando assim a resolução e sensibilidade da medida. Dessa forma, a utilização da técnica para análises específicas e com amostras com baixa concentração de analito se mostra interessante (BARD; FAULKNER, 2000).

Portanto, utilizando-se tais recursos é importante que se promova a síntese eletroquímica da 2-AB e sua caracterização, para fins de compreender a estrutura e propriedades do filme polimérico resultante. Dessa forma, o material pode ser aplicado na modificação de EIG que, por sua vez, será incorporado como transdutor na construção de um genossensor eletroquímico empregado na testagem de amostras de *swab* nasofaríngeal, procurando identificar a presença do RNA do SARS-CoV-2.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

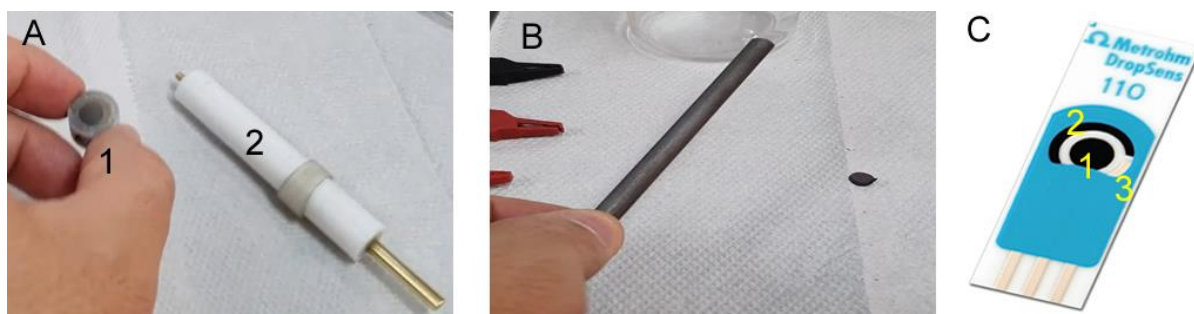
4.1 – Instrumentação, reagentes e soluções

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando-se um Potenciostato/Galvanostato da Autolab® modelo PGSTAT128N contendo módulo FRA32M, acoplado a um computador operando com o *software* Nova 2.1.4.

Para as análises de eletrossíntese e caracterização eletroquímica da poli(2-AB) os experimentos foram realizados em célula eletroquímica de um compartimento, utilizando eletrodos de grafite (EG) (área geométrica de 29,7 mm²) como eletrodo de trabalho (Figura 10A), Ag/AgCl (KCl 3,0 M) como eletrodo de referência, e um fio de platina como eletrodo auxiliar. Os EG foram construídos em nosso laboratório, conforme procedimento previamente descrito por LIMA *et al.* (2021). Para as análises de formação e extração da poli(2-AB) foi utilizado o mesmo sistema eletroquímico, mas em célula de dois compartimentos, onde o contraeletrodo ficou separado dos demais. Contudo, foi utilizado um EG com área geométrica de aproximadamente 12 cm² (bastão de grafite de 6 cm), conforme mostrado na Figura 10B.

Para o desenvolvimento do genossensor eletroquímico foi utilizado um sistema eletroquímico contendo eletrodos impressos de grafite (EIG) (DRP110) obtidos da DropSens®, onde os eletrodos de trabalho e auxiliar são de grafite, enquanto o eletrodo de referência é feito de prata, assim como os contatos elétricos (Figura 10C). A área geométrica do eletrodo de trabalho é de aproximadamente 12,6 mm².

Figura 10: (A) Imagens do eletrodo de grafite representado em 1 e da base de teflon utilizada para conexão do eletrodo ao potenciostato em 2. (B) Barra de grafite, e (C) Eletrodos impressos de grafite contendo os três eletrodos, onde: 1: eletrodo de trabalho, 2: eletrodo auxiliar e 3: eletrodo de referência. Dimensões 3,4 x 1,0 x 0,05 cm.



Todos os reagentes foram utilizados conforme fornecidos pelos fornecedores, e as soluções preparadas com água ultrapura, resistividade de 18,2 MΩ.cm e condutividade de 0,054 μS.cm⁻¹, obtida através do sistema Master System MS 2000.

4.2 – Estudos da formação e caracterização eletroquímica do filme polimérico sobre EG

4.2.1 – Eletrossíntese da poli(2-AB)

Antes de iniciar o processo de modificação dos EG com o filme polimérico, estes foram tratados eletroquimicamente em solução de H_2SO_4 0,5 M aplicando-se 3 ciclos consecutivos de potencial na faixa de 0,0 a +1,2 V com velocidade de varredura de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Em seguida, os eletrodos foram analisados em solução 0,5 M de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ preparada em 0,10 M de KCl na faixa de potencial de -0,1 a +0,6 V a $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

A modificação dos eletrodos foi realizada através da eletropolimerização da 2-AB, utilizando a VC, a partir de uma solução 10 mM do monômero preparada em 0,5 M de H_2SO_4 . Inicialmente, o processo foi conduzido com 100 ciclos consecutivos de potencial na faixa de potencial de 0,0 a +1,3 V a $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Após o procedimento de modificação, os eletrodos foram retirados da célula eletroquímica, lavados com água destilada, e secos sob fluxo de $\text{N}_{2(\text{g})}$ ultrapuro.

4.2.2 – Análises eletroquímicas do poli(2-AB)/EG

O eletrodo de grafite modificado com o filme polimérico derivado da 2-AB (poli(2-AB)/EG), foi analisado por VC e EIE de modo a avaliar as propriedades eletroquímicas e elétricas do material adsorvido na superfície do eletrodo.

Sendo assim, o poli(2-AB)/EG foi analisado somente no eletrólito suporte referente a formação do filme, ou seja, em solução 0,50 M de H_2SO_4 , onde registrou-se VCs na faixa de potencial de 0,0 a +0,9 V a $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. O mesmo procedimento foi realizado para o eletrodo não modificado (EG) para fins de comparação.

Além disso, VCs também foram coletados em solução 0,50 M de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ contendo 0,10 M de KCl, e em solução contendo somente o eletrólito suporte (KCl) na faixa de potencial de 0,0 a +0,9 V para o KCl, e de -0,10 a +0,6 V para a solução contendo o par redox, utilizando em ambos os casos $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. O mesmo procedimento foi realizado para o EG para fins de comparação.

Para investigar as propriedades elétricas utilizou-se a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica. Os espectros foram obtidos em solução 0,50 M de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ preparada em 0,1 M de KCl num intervalo de frequência de 1,0 MHz a 10 mHz com excitação senoidal de 10 mV no potencial de circuito aberto (OCP). O diagrama

de Nyquist foi construído ($-Z''$ vs. Z'), e os resultados experimentais simulados, utilizando um circuito equivalente proposto, através do *software* do equipamento.

4.2.3 – Influência do pH na oxidação da 2-AB

Para fins de obter a relação do número de prótons e elétrons envolvidos na oxidação da 2-AB, estudos foram realizados de modo a monitorar o potencial de oxidação do composto em função do pH da solução monomérica. Para isso, inicialmente preparou-se soluções 10 mM de 2-AB em 0,50 M de H_2SO_4 e ajustou-se o pH do meio para valores entre 0,0 e 12,0, gotejando solução 0,5 M de NaOH. Sendo assim, 16 soluções foram preparadas nos seguintes valores de pH: 0,34; 0,99; 1,08; 1,50; 1,98; 2,96; 3,49; 4,00; 5,12; 6,09; 7,13; 7,98; 8,92; 10,13; 10,83 e 12,10. Para cada solução foi utilizado um EG, sendo obtido um VC na faixa de 0,0 a +1,3 V a uma velocidade de varredura de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Um gráfico do valor de pH da solução em função do potencial de pico da oxidação da 2-AB foi construído.

4.2.4 – Obtenção do coeficiente de transferência eletrônica e do número de elétrons

Parâmetros cinéticos como o coeficiente de transferência eletrônica (α), o número de elétrons envolvidos na reação (n), e a constante heterogênea de transferência de elétrons (k^0), podem ser calculados, utilizando as relações de Tafel ($\log(i)$ vs. E_p) e Laviron (E_p vs $\log(v)$), uma vez avaliada a influência da velocidade de varredura no potencial e corrente de pico de oxidação da 2-AB através da VC. Dessa forma, o primeiro ciclo de potencial na faixa de 0,0 a +1,3 V foi registrado em solução 10 mM de 2-AB preparada em 0,50 M de H_2SO_4 , utilizando o EG variando a velocidade de varredura em: 5; 10; 25; 50; 75; 100; 150; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900 e 1000 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. O mesmo EG foi utilizado para todas as medidas. Dois gráficos relacionado o $\log(i)$ vs. E_p , e outro o E_p vs $\log(v)$ foram construídos.

4.2.5 – Eletropolimerização, extração e análises de FTIR-ATR do poli(2-AB) formado sobre barras de grafite

A técnica de espectroscopia de infravermelho permite avaliar algumas condições de formação do filme polimérico, através das bandas de absorção dos grupos funcionais, evidenciando quais deles podem estar envolvidos na reação de polimerização. Desta forma, de modo a compreender a oxidação e formação do polímero, estudos de formação e extração da

poli(2-AB) foram conduzidos, utilizando-se barras de grafite de modo a obter uma maior quantidade de material depositado que pudesse ser analisado, conforme metodologia realizada por SANTOS *et al.* (2019) que investigaram a eletropolimerização de derivados de fenol e anilina, que são compostos similares a 2-AB. Para isso, a poli(2-AB) foi eletrogerada utilizando as mesmas condições descritas no item 4.2.1, alterando-se apenas a quantidade de ciclos realizados que, neste caso foram 150 ciclos. Sendo assim, colocou-se a barra de grafite na solução 10 mM de 2-AB, preparada em 0,50 M de H₂SO₄, e registrou-se os VCs de 0,0 a +1,3 V a 50 mV.s⁻¹. O procedimento foi realizado em 2 barras de grafite distintas.

Em seguida, o eletrodo modificado foi retirado da solução mãe, lavado com água deionizada em abundância, e seco com N_{2(g)}. Após completa secagem, os eletrodos foram imersos em acetonitrila (aproximadamente 12 mL) e colocados em banho de ultrassom por um período de 60 minutos, e agitado alternadamente. Após esse período, a solução de acetonitrila, a qual apresentou uma coloração levemente marrom, foi colocada em uma placa de Petri e incubada a 70 °C na estufa por um período de 24 horas, com o objetivo de evaporar todo o solvente. O material resultante foi analisado por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR) em Espectrômetro FTIR Cary 630 da Agilent, na faixa de 4000-650 cm⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹ e 128 varreduras. O espectro do monômero (2-AB) também foi obtido para fins de comparação.

Com base nos resultados obtidos para a relação do número de prótons e elétrons envolvidos na oxidação da 2-AB (seção 4.2.3); obtenção do coeficiente de transferência eletrônica (α) e do número de elétrons envolvidos na reação (n) (seção 4.2.4); e nas análises de FTIR-ATR foi proposto um mecanismo para a oxidação eletroquímica da 2-AB e formação da poli(2-AB).

4.3 – Estudos do desenvolvimento do genossensor para a COVID-19 sobre EIG

De modo a investigar a proposta do desenvolvimento de um genossensor eletroquímico para detecção de Covid-19, optamos por um sistema eletroquímico miniaturizado e portátil comercial, que são os eletrodos impressos da DropSens®. Desta forma, os estudos de formação dos filmes, otimização dos parâmetros de modificação e construção do biossensor foram realizados nestes eletrodos, conforme procedimentos descritos a seguir.

4.3.1 – Eletrossíntese e caracterização eletroquímica da poli(2-AB)

Antes de realizar qualquer procedimento, os EIG foram tratados eletroquimicamente em solução 0,50 M de ácido sulfúrico, sendo submetidos a 5 ciclos consecutivos de potencial na faixa de 0,0 a +1,2 V. Após o procedimento, os eletrodos foram lavados com água destilada e secos sob fluxo contínuo de $N_{2(g)}$. Em seguida, os EIG foram analisados em solução 5,0 mM de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ preparada em 0,10 M de KCl, obtendo-se um VC na faixa de potencial de -0,3 a +0,6 V a $50\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Obtendo-se o comportamento eletroquímico esperado para o par redox, o EIG era submetido ao processo de modificação.

Para a formação do filme polimérico utilizou-se procedimento similar ao descrito na seção 4.2.1. Contudo, utilizou-se solução 0,25 mM de 2-AB preparada em 0,50 M de H_2SO_4 , e realizou-se 15 ciclos consecutivos de potencial, na faixa de -0,2 a +1,0 V, a $50\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Ao fim do processo, os eletrodos modificados (poli(2-AB)/EIG) foram lavados mergulhando-os em solução tampão fosfato 0,10 M (pH = 7,40) durante 30 segundos e secos em fluxo de $N_{2(g)}$. O poli(2-AB)/EIG foi então analisado por VC e EIE em solução 0,50 M de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ contendo 1,0 M de KCl, a fim de investigar a ocorrência da modificação de sua superfície, conforme procedimento descrito na seção 4.2.2. Tais análises tiveram como objetivo a comparação do processo de modificação no EG e EIG com a 2-AB.

4.3.2 – Imobilização dos oligonucleotídeos de reconhecimento

Como elemento de reconhecimento biológico foram utilizadas duas sequências de cDNA (sondas) da IDT™, complementares à região conservada N do genoma viral, com 20 pares de base cada uma com sequência genômica semelhante aos primers utilizados no protocolo de RT-PCR em tempo real, seguido pelo Laboratório-Escola de Análises Clínicas da UFVJM. Os *forward* primers, utilizados como sondas tem a seguinte sequência:

5'-GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT-3'

5'-TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA-3'

Para promover a adsorção, ou imobilização, das sondas, inicialmente gotejou-se 7 μL de solução 0,10 μM com ambas as sequências preparada em tampão fosfato (pH = 7,40) sobre a superfície do poli(2-AB)/EIG, permanecendo em contato por 30 minutos a temperatura

ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$). Após esse período, o poli(2-AB)/EIG contendo as sonda imobilizadas, o qual podemos denominar de genossensor, foi lavado mergulhando os dispositivos em solução tampão fosfato $0,10\text{ M}$ ($\text{pH} = 7,40$) durante 30 segundos e secos em fluxo de $\text{N}_{2(\text{g})}$.

Antes de colocar o genossensor em contato com a amostra de interesse, seja ela positiva ou negativa para a Covid-19, é necessário que a superfície seja saturada de forma a evitar adsorções inespecíficas. Para isso, gotejou-se $15\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução $0,1\%$ m/v de albumina de soro bovino (BSA) preparada em tampão fosfato $0,1\text{ M}$ ($\text{pH} 7,40$) sobre a superfície do genossensor, deixada em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$). Após essa etapa, o dispositivo foi lavado em solução tampão fosfato $0,10\text{ M}$ ($\text{pH} = 7,40$) durante 30 segundos e secos em fluxo de $\text{N}_{2(\text{g})}$.

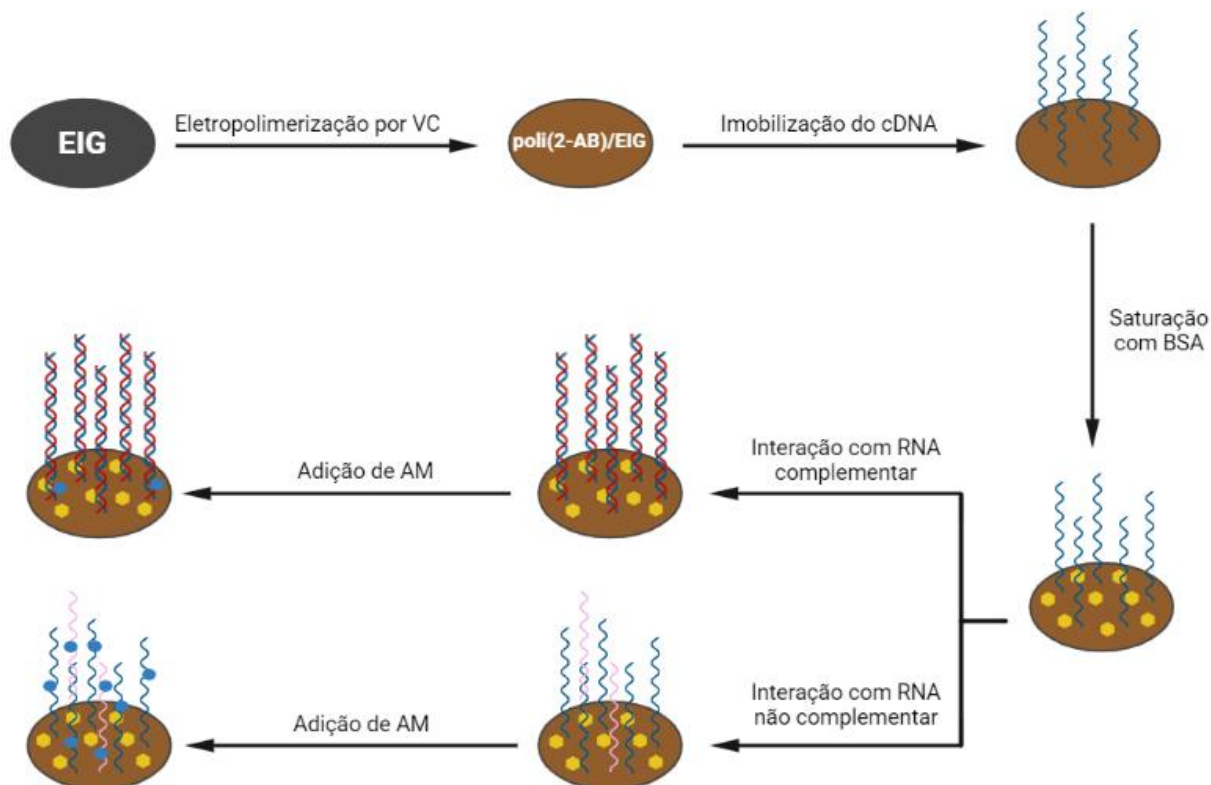
4.3.3 – Análises com amostras sintéticas e detecção indireta da hibridização com AM

Para realizar esse processo, as amostras plasmidiais (sintéticas) foram diluídas em solução tampão fosfato $0,10\text{ M}$ ($\text{pH} 7,40$), e aquecidas a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ em banho maria por 5 minutos. Após esse período, as amostras foram resfriadas imediatamente colocando-as em banho de gelo a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. O aquecimento provoca a linearização do RNA viral, enquanto o resfriamento imediato garante que ele não se enovele novamente. Após esse processo, $7\mu\text{L}$ da solução contendo o alvo foi colocado na superfície do genossensor e o sistema foi mantido em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$).

A hibridização foi monitorada de forma indireta, utilizando-se o intercalador azul de metileno (AM), o qual foi preparado em tampão fosfato $0,10\text{ M}$ ($\text{pH} 7,40$) na concentração de $8,0\text{ mM}$ de AM e $1,0\text{ M}$ de NaCl. Sendo assim, $15\text{ }\mu\text{L}$ desta solução foi colocado na superfície do genossensor. Os dispositivos na ausência (sonda) e presença do alvo permaneceram em contato com a solução de AM por 5 minutos a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$). Em seguida, foram lavados em tampão fosfato, e posteriormente secos com $\text{N}_{2(\text{g})}$. O monitoramento da hibridização foi realizado através da detecção da redução do intercalador (AM) adsorvido na superfície do dispositivo, utilizando a voltametria de onda quadrada (VOQ), aplicada na faixa de potencial de $+0,4$ a $-0,1\text{ V}$ em solução de tampão fosfato $0,10\text{ M}$ ($\text{pH} 7,40$) contendo $1,0\text{ M}$ NaCl com os seguintes parâmetros: step, -9 mV ; amplitude, 270 mV e frequência, 29 Hz .

A Figura 11 mostra o processo de construção e funcionamento do genossensor eletroquímico, utilizando o AM como intercalador.

Figura 11: Esquema de construção do genossensor eletroquímico representando o BSA (●); o AM (●), as sondas de cDNA (⋈) e sequências de RNA complementar (⋈) e não complementar (⋈). Criado com [BioRender.com](https://www.biorender.com)



Cabe ressaltar que foi realizado estes ensaios preliminares de imobilização das sondas, e posterior interação com as amostras sintéticas de modo a verificar a performance do transdutor eletroquímico, ou seja, do poli(2-AB)/EIG. Diante dos resultados obtidos, realizou-se a otimização das condições de construção do transdutor, e do desenvolvimento do genossensor, conforme procedimentos descritos a seguir.

4.3.4 – Otimização dos parâmetros de eletropolimerização da 2-AB

Os principais parâmetros realizados com a eletropolimerização, como o número de ciclos de potencial, concentração do monômero e velocidade de varredura foram otimizados em função da imobilização das sondas, avaliando-se resposta da redução do AM na superfície do genossensor. Todos os processos de otimização foram feitos de forma univariada.

Sendo assim, para verificar como cada parâmetro envolvido na formação do filme polimérico influencia na etapa de imobilização, o número de ciclos de potencial realizados foi o primeiro fator a ser estudado, obtendo plataformas modificadas com 5, 10, 15 e 20 ciclos, utilizando o procedimento de eletrossíntese descrito na seção 4.3.1, onde manteve-se 2,5 mM de 2-AB e velocidade de varredura em $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Após escolha do melhor número de ciclos, otimizou-se a concentração da solução de 2-AB utilizada durante o processo de eletropolimerização. Neste caso, avaliou-se as plataformas modificadas em concentrações de 25,0 mM; 2,5 mM; 0,25 mM; 25 μ M e 2,5 μ M, utilizando 15 ciclos de potencial e velocidade de varredura de 50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Com o número de ciclos e a concentração da 2-AB otimizados, investigou-se a influência da velocidade de varredura na modificação dos eletrodos. Sendo assim, os filmes foram formados a 10, 25, 50, 75 e 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, utilizando 15 ciclos de potencial e 0,25 mM de 2-AB.

4.3.5 – Otimização das condições de imobilização das sondas e detecção do alvo

Visando favorecer uma imobilização mais efetiva das sondas na superfície do poli(2-AB)/EIG, a influência da concentração da solução do cDNA e o tempo de contato com a plataforma funcionalizada foram avaliados. Além disso, com o objetivo de melhorar as condições da detecção, o tempo de hibridização, ou seja, contato do genossensor com a amostra foi estudado. Todos os processos de otimização foram feitos de forma univariada.

Para a otimização da etapa de imobilização, avaliou-se a influência da concentração da solução das sondas preparadas. Então, soluções em concentrações de: 1,0 μ M; 0,1 μ M; 0,01 μ M; 1,0 nM; 0,1 nM; 0,01 nM foram investigadas, utilizando um tempo de contato desta solução com o eletrodo de 60 minutos. Após escolha da concentração da sonda (0,1 μ M), avaliou-se o tempo de contato desta solução com o eletrodo em 15, 30, 60 e 90 minutos.

Após realizados todos os estudos de otimização dos parâmetros envolvidos na construção do genossensor, avaliou-se o seu comportamento com os novos parâmetros de modo a verificar se houve de fato aumento significativo na análise proporcionada. Uma vez que a hibridização é crucial para o diagnóstico, é importante que se avalie a influência do tempo reservado para manter a amostra em contato com o dispositivo. Dessa forma, investigou a resposta do genossensor em contato com o alvo complementar em tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos.

4.4 – Avaliação da sensibilidade, reprodutibilidade e estabilidade do genossensor

Após a finalização de todos os estudos de otimização, foi construída uma curva de calibração, na intenção de verificar a sensibilidade do genossensor desenvolvido. Amostras do alvo complementar plasmidial foram preparadas em concentrações compreendidas entre

0,00239 a 2500 cópias/mL, diluídas em solução tampão fosfato 0,1 M (pH 7,40), e os valores de altura de pico registrados para a redução do AM foram obtidos. O limite de detecção (LOD) e o limite de Quantificação (LOQ) foram calculados em função do coeficiente angular da curva de calibração e do desvio padrão do sinal do branco.

Cinco genossensores foram construídos de acordo com as condições ótimas de construção da plataforma funcionalizada (15 ciclos, 0,25 mM de 2-AB e 50 mV/s) e de imobilização da sonda (0,10 μ M a 30 min), e em seguida foram utilizados para avaliar a repetibilidade e reprodutibilidade na resposta do dispositivo, uma vez que não é possível utilizar o mesmo eletrodo devido ao esgotamento do AM adsorvido na superfície, além da impossibilidade de retirada do RNA hibridizado, mantendo-se as sondas. Para o estudo de estabilidade de armazenamento cinco genossensores foram guardados na geladeira (5 a 10 °C) por um período de 45 dias. Para cada condição, a resposta dos genossensor foi avaliada colocando-se o genossensor em contato com o AM, e posteriormente obtendo os VOQ para a redução do composto. Então, o desvio padrão das correntes de pico catódico (I_{pc}) foi calculado para cada situação. No caso dos eletrodos armazenados na geladeira, antes da adição do AM, os dispositivos foram deixados até atingir a temperatura ambiente.

4.5 – Aplicação do genossensor em amostras reais

Para verificar se o dispositivo desenvolvido pode ser aplicado, inicialmente, como técnica auxiliar para diagnóstico da COVID-19, o genossensor foi testado em 10 amostras clínicas, obtidas através de *swabs* nasofaríngeais, previamente coletadas e validadas pelo teste de RT-PCR em tempo real. A extração do RNA obedeceu ao Procedimento Operacional Padrão (POP) seguido pelo Laboratório-Escola de Análises Clínicas da UFVJM, que indica a adição de 140 μ L da amostra coletada em *ependorf* contendo 560 μ L de tampão de lise viral AVL preparado com carreador de RNA e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. A sua purificação é feita com adições de etanol (96-100 %), tampão de lavagem AW1 e tampão de lavagem AW2 em diferentes etapas, nessa ordem, intercaladas por centrifugação a 6000xg (8000 rpm) por 1 minuto em uma coluna *QIAamp mini column*.

O dispositivo foi aplicado para detecção do RNA do Sars-CoV-2 em amostras clínicas diluídas na proporção de 1:320 em tampão fosfato 0,10 M (pH 7,40) seguindo as etapas esquematizadas na Figura 11. A amostra, após aquecida e resfriada, seguindo as especificações previamente citadas, permaneceu em contato com o genossensor por 10 minutos. Finalmente, os eletrodos foram lavados em cada etapa por 30 segundos em tampão fosfato 0,10 M (pH 7,40)

e secos em fluxo de $N_{2(g)}$, e os VOQ obtidos para a redução do intercalador. Por fim, a seletividade e sensibilidade do dispositivo foram testadas avaliando-se a sua resposta para 10 amostras de *swab* nasofaríngeal negativas e positivas, previamente testadas por RT-PCR, e 10 amostras positivamente testadas para possíveis interferentes virais, sendo eles: Influenza A, Influenza B e HIV. Para avaliar se o genossensor é capaz de identificar o RNA do SARS-CoV-2 mesmo na presença de outras infecções do trato respiratório, testou-se duas amostras que continham, além do genoma do SARS-CoV-2, o RNA viral da Influenza A e Influenza B.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho foi dividido em duas partes principais: a primeira relacionada à formação e caracterização do filme polimérico sobre EG e a segunda relacionada ao desenvolvimento do genossensor sobre eletrodos comerciais impressos de grafite.

Na primeira parte (seção 5.1) serão discutidos os resultados relacionados à modificação do eletrodo de grafite com o poli(2-AB), caracterização eletroquímica dos eletrodos modificados e não modificados, influência do pH e determinação dos valores do coeficiente de transferência eletrônica, número de elétrons e da constante heterogênea de transferência de elétrons para a oxidação eletroquímica da 2-AB. Por fim, uma análise de FTIR-ATR para fins de comprovação da formação do polímero com a proposta de um mecanismo de oxidação eletroquímica da 2-AB e, também, para a formação da poli(2-AB).

Na segunda parte (seção 5.2), serão discutidos os resultados da construção do genossensor eletroquímico sobre EIG, incluindo a otimização dos parâmetros de formação do filme polimérico, otimização das condições de imobilização das sondas de reconhecimento, otimização do tempo de reação e, também, os resultados das análises preliminares da interação do genossensor com amostras específicas e não específicas, de modo a detectar de forma indireta o evento de hibridização, através da redução do AM por VOQ.

Finalmente, a sensibilidade, reprodutibilidade e estabilidade do genossensor foram avaliadas (seção 5.4) assim como a sua aplicação em amostras clínicas (*swab* humano), já validadas por RT-PCR em tempo real (seção 5.5).

5.1 – Estudos da formação e caracterização do *poli(2-AB)* sobre EG

Após o tratamento eletroquímico dos EG, eles foram analisados em solução 5,0 mM contendo o par redox ferro/ferricianeto de potássio ($K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$) preparado em solução 0,10 de KCl, utilizado como eletrólito suporte. Tal procedimento faz-se necessário, uma vez que os eletrodos são confeccionados manualmente em nosso laboratório. Dentre as diversas etapas realizadas na sua construção, é necessária uma rápida verificação das principais características eletroquímicas do eletrodo, de modo a manter um “padrão” entre os dispositivos construídos, garantindo-se assim, reprodutibilidade nas análises subsequentes.

O par ferro/ferricianeto é um padrão muito utilizado em análises eletroanalíticas por proporcionar um comportamento reversível muito bem conhecido e definido, apresentando uma reação eletroquímica de esfera externa. Ou seja, são reações rápidas, sem adsorção na superfície

do eletrodo, envolvendo apenas a transferência de elétrons (BARD; FAULKNER, 2000). A Figura 12A mostra o perfil eletroquímico obtido para EG na solução do par redox. Como podemos observar, é nítido o aparecimento de um pico de oxidação e outro de redução, os quais estão relacionados com a reação reversível da Eq. 1.

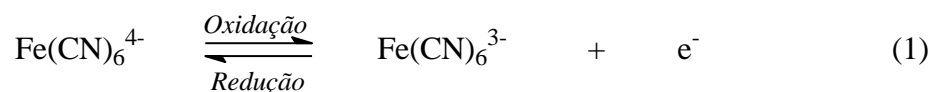
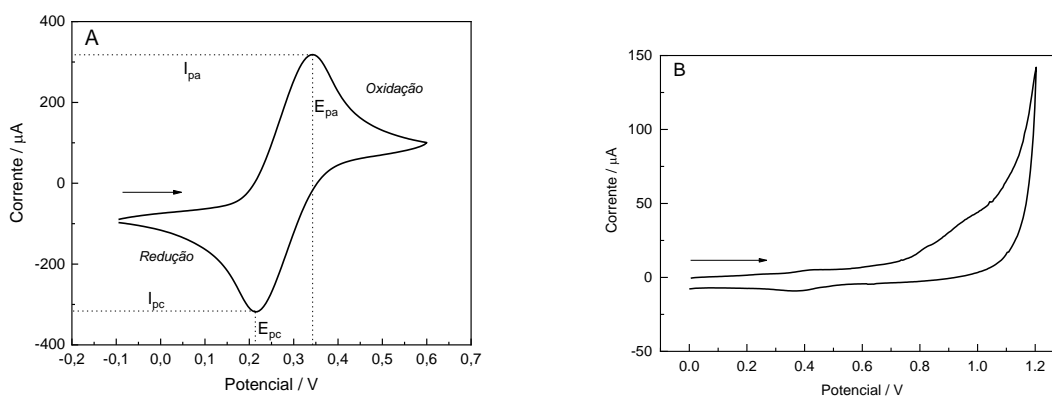


Figura 12: (A) VC obtido para o EG em solução 5,0 mM de $\text{K}_4\text{Fe(CN)}_6/\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$ preparado em 0,10 de KCl. $\nu = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Onde para a oxidação temos: I_{pa} e E_{pa} que são a corrente de pico anódica e o potencial de pico anódico, respectivamente, e para a redução temos: I_{pc} e E_{pc} que são a corrente de pico catódica e o potencial de pico catódico, respectivamente. (B) VC obtido para o EG em solução 0,50 M de H_2SO_4 . $\nu = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. As setas indicam o sentido da varredura de potencial.



De acordo com Bard e Faulkner (2000) para uma reação simples idealmente reversível e que envolve 1 elétron, a diferença dos potenciais de pico (ΔE_p) deve ser $\leq 56 \text{ mV}$. Além disto, também é considerado um sistema reversível quando se obtém uma relação de I_{pa}/I_{pc} próximo a uma unidade. Analisando os dados do VC da Figura 12A obtemos um ΔE_p de 126 mV e $I_{pa}/I_{pc} = 1,001$. Apesar dos valores de ΔE_p estarem acima do esperado, estes são considerados aceitáveis principalmente ao saber que os EG são relativamente porosos, além de serem produzidos de forma artesanal em laboratório, o que pode conferir, mesmo utilizando uma cola epóxi condutora, uma resistência do eletrodo ao transporte de carga.

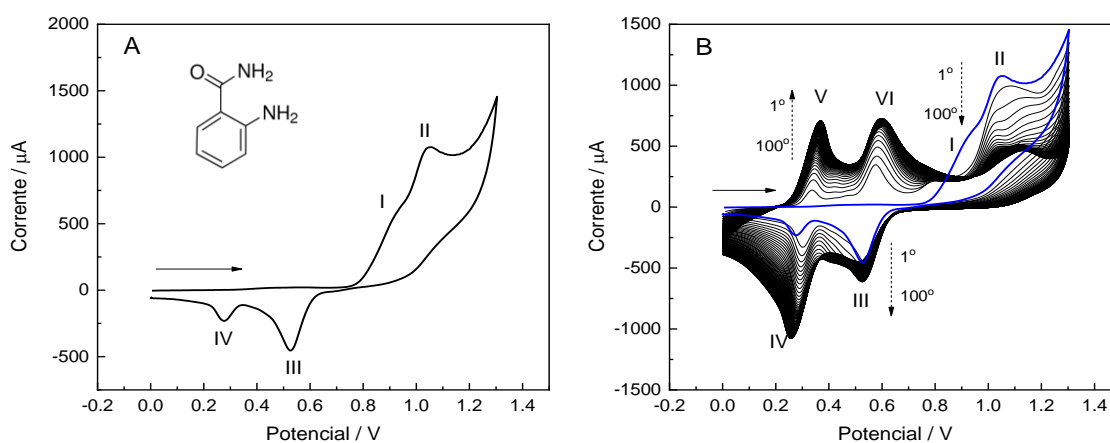
Na Figura 12B é mostrado o comportamento eletroquímico do eletrodo em solução de H_2SO_4 . Neste caso, é observado uma corrente capacitiva, relativamente baixa, para o eletrodo, indicando que nesta faixa de potencial, o EG está apto para ser utilizado. Ainda se observa o aparecimento de um par de picos com valores de corrente muito baixos. Estudos preliminares realizados em laboratório mostram que esses picos podem estar relacionados com a formação de azul da prússia, derivado da utilização da solução de ferro/ferricianeto de potássio, no entanto, esse fenômeno não é significativo a ponto de inviabilizar a utilização dos

eletrodos. Sendo assim, os EG foram confeccionados e foram selecionados aqueles com comportamento semelhante aos da Figura 12.

5.1.1 – Eletropolimerização da 2-AB sobre os EG

O perfil eletroquímico da 2-AB é mostrado na Figura 13A. Na varredura anódica observamos aparentemente dois picos de oxidação (I e II). O pico I, mais discreto, é notado em +0,92 V, e o pico II em +1,05 V. No sentido catódico, também observamos dois picos (III e IV), onde o pico III surge em +0,52 V e o pico IV em +0,28 V. Contudo, à medida que realizamos ciclos consecutivos, conforme mostrado na Figura 13B, podemos observar que o pico I é suprimido, e o pico II diminui a intensidade de corrente com o aumento do número de ciclos. Em contrapartida, os picos III e IV, aumentam em relação aos seus respectivos valores de corrente com o número de ciclos de potencial, inclusive levando a formação de dois novos picos de oxidação correspondentes (V e VI) em +0,33 V e +0,57 V, respectivamente.

Figura 13: VCs obtidos para o EG em solução 10 mM de 2-AB preparada 0,50 M de H₂SO₄ 0,5 M a 50 mV.s⁻¹. Onde: (A) Primeiro ciclo de potencial, e (B) 100 ciclos consecutivos de potencial, sendo: (—) o primeiro ciclo. As setas contínuas indicam o sentido da varredura de potencial, e aquelas tracejadas o sentido da corrente.



Diante destas observações podemos sugerir que a oxidação da 2-AB ocorre em +1,05 V (pico II), sem o aparecimento de um pico de corrente catódico correspondente, ou seja, possivelmente resultando em um processo irreversível. No entanto, o aparecimento de dois picos redox (IV/V e III/VI) sugere a formação e a adsorção de um material eletroativo na superfície do eletrodo, corroborando com os estudos realizados por Santos *et al.* (2019), os quais foram realizados para monômeros com estrutura química similar ao da 2-AB. Sendo assim, o entendimento pode ser a formação de um cátion radical na varredura anódica (pico II), o qual inicia processos de acoplamentos para a formação de dímeros, trímeros até a geração do

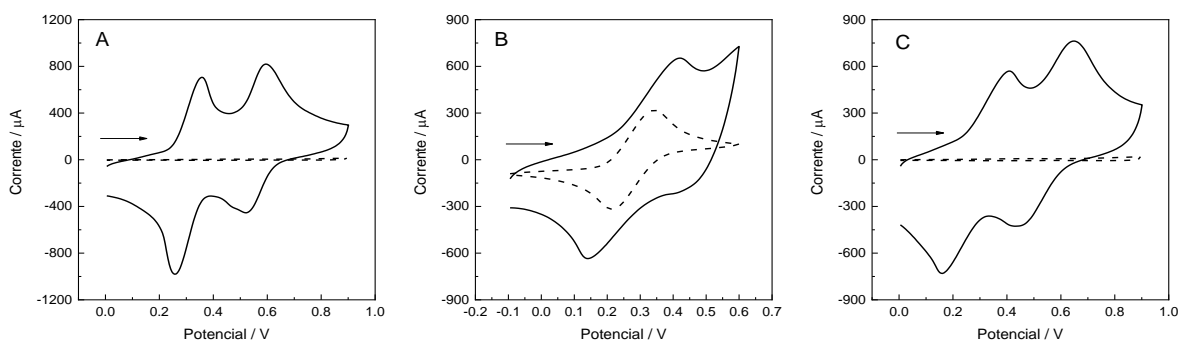
polímero, o qual adsorve na superfície do EG. Desta forma, à medida que o número de ciclos aumenta, mais monômero é oxidado, gerando novos cátions radicais e novos acoplamentos são formados, levando a uma maior quantidade de material eletrossintetizado. Em consequência, a superfície do EG vai sendo recoberta com este material, ocasionado um bloqueio parcial no processo de transferência eletrônica, o que pode justificar, em partes, o decréscimo nos valores de corrente relacionadas ao pico II, associado ainda, ao esgotamento da 2-AB na superfície do eletrodo (camada difusional). Nota-se, também, o desaparecimento do pico I com a sucessão de ciclos de potencial aplicado. Tal fenômeno pode estar relacionado à presença da espécie desprotonada da 2-AB, que na concentração de solução monomérica utilizada no experimento, pode aparecer em quantidade suficiente para apresentar tal pico. Essa hipótese, portanto, é corroborada posteriormente com o estudo da interferência do pH do meio.

Neste contexto, para confirmar a modificação da superfície do EG, e consequente adsorção do filme polímero, os eletrodos modificados foram retirados da solução monomérica, lavados com água em abundância e analisados em solução contendo somente o eletrólito suporte utilizado durante a eletropolimerização (H_2SO_4), bem como em solução de ferro/ferricianeto de potássio.

5.1.2 – Investigação das propriedades eletroquímicas do poli(2-AB)/EG

A investigação da adsorção do filme polimérico sobre a superfície do EG, e suas propriedades eletroquímicas foram inicialmente avaliadas utilizando-se a VC, obtendo-se os voltamogramas em solução do eletrólito suporte da eletropolimerização (Figura 14A), solução de ferro/ferricianeto de potássio contendo cloreto de potássio (Figura 14B), e solução de cloreto de potássio (Figura 14C).

Figura 14: VCs obtidos para: (---) EG e o (—) poli(2-AB)/EG em solução de: (A) 0,50 M de H_2SO_4 ; (B) 5,0 mM de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ + 0,10 M de KCl; e (C) 0,10 M de KCl. Em todos os casos a velocidade de varredura foi de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



A Figura 14A mostra claramente que o EG foi modificado durante a eletropolimerização, onde nota-se o aparecimento de dois picos redox na mesma região de potencial dos picos IV/V e III/VI da Figura 13B. Desta forma, é confirmado que tais picos estão relacionados ao material adsorvido da superfície do eletrodo, e são provenientes da eletropolimerização da 2-AB.

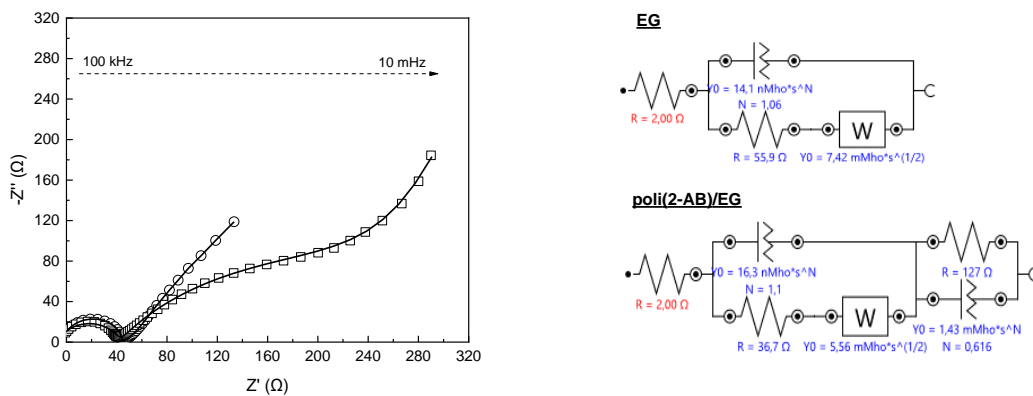
Os voltamogramas obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio, mostrados na Figura 14B, também evidenciam a modificação da superfície do EG. Nestes, podemos notar um distanciamento entre os potenciais de pico do par redox, aumentando o valor de ΔE_p , possivelmente pela deposição do filme polimérico na superfície do eletrodo, sugerindo um bloqueio parcial da transferência eletrônica do composto. Além disto, observamos um aumento nos valores de I_{pa} e I_{pc} . Contudo, devido à eletroatividade do filme polimérico, é necessário avaliar o comportamento do poli(2-AB)/EG somente em solução do eletrólito suporte do par redox. Ao analisarmos os voltamogramas da Figura 14C, obtidos somente em KCl (eletrólito da solução de ferro/ferricianeto de potássio), notamos um perfil muito semelhante ao da Figura 14A, porém com um ligeiro deslocamento dos valores de potencial. Isso evidencia que o poli(2-AB) também apresenta eletroatividade em solução de KCl na mesma faixa de potencial daquela observada para o ferro/ferricianeto de potássio. Ou seja, na Figura 14B tem-se uma contribuição dos processos faradâicos do poli(2-AB) com o do par redox. Inclusive, como as Figura 14B e Figura 14C estão na mesma escala, podemos relacionar o comportamento eletroquímico observado na Figura 14B para o poli(2-AB)/EG com a eletroatividade do eletrodo, e não da sonda redox. A partir disso, podemos sugerir que o filme polimérico apresenta um comportamento mais resistivo e, neste sentido, uma análise por espectroscopia de impedância eletroquímica foi realizada.

A EIE pode ser utilizada em complementação às análises voltamétricas para fins de avaliar as propriedades elétricas interfaciais do filme polimérico adsorvido na superfície do EG a partir da associação da interface eletrodo-solução com componentes de circuitos elétricos. A Figura 15 apresenta o diagrama do plano complexo obtido para o EG e para o poli(2-AB)/EG em solução de ferro/ferricianeto de potássio em potencial de circuito aberto.

O EG apresenta um comportamento esperado, onde em regiões de altas frequências é observado um pequeno semicírculo, e em regiões de baixa frequência uma reta com uma inclinação próximo a 45° . Na EIE, os processos cinéticos do eletrodo são observados na região de altas frequências. Desta forma, quanto maior o semicírculo, maior a resistência à transferência de carga na interface eletrodo/solução. Por outro lado, em regiões de baixas

frequências são observados os processos difusionais. Para o EG, considerando que as medidas estão sendo realizadas utilizando o par redox ferro/ferricianeto de potássio, um circuito equivalente de Randles pode ser utilizado para realizar a simulação dos dados experimentais, de modo a obter valores de resistências e capacitâncias associados aos processos interfaciais. O circuito de Randles é descrito como $R_s(Q_{dl}[R_{tc}W])$, onde: R_s é a resistência ôhmica do sistema; Q_{dl} : a capacitância da dupla camada; R_{tc} a resistência a transferência de carga e W a impedância de Warburg (difusão). Conforme observado, o circuito se ajustou muito bem aos dados experimentais, e dentre os principais valores obtidos, podemos destacar a baixa resistência ôhmica do sistema ($2,0 \Omega$), e um valor de R_{tc} de $55,9 \Omega$.

Figura 15: Diagramas de Nyquist de EIE obtidos em 5,0 mM de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ contendo 0,10 M de KCl para: (o) EG e (□) poli(2-AB)/EG. Amplitude: 10 mV. Faixa de frequência: 100 kHz a 10 mHz. As linhas sólidas representam a simulação de dados experimentais para o respectivo circuito equivalente.



No caso do poli(2-AB)/EG, o Diagrama de Nyquist apresenta um comportamento distinto daquele observado para o EG. Além de um semicírculo em regiões de altas frequências, observa-se outro semicírculo pouco definido em regiões de baixas frequências, suprimindo o processo difusional anteriormente observado para o EG. O aparecimento desta segunda constante de tempo pode estar relacionado ao filme polimérico. Desta forma, utilizamos um circuito equivalente constituído por um circuito de Randles modificado, incluindo um novo conjunto em paralelo a este circuito constituído por $(R_p Q_p)$, onde R_p é a resistência relacionada ao polímero e Q_p a capacitância do polímero. Sendo assim, o circuito foi definido como: $R_s(Q_{dl}[R_{tc}W])(R_p Q_p)$.

Quando se compara os valores de R_{tc} para o EG e o poli(2-AB)/EG, nota-se que praticamente houve uma pequena alteração nos valores de $55,9$ para $36,7 \Omega$, respectivamente. Essa alteração não é considerada significativa para indicar uma maior resistência ao processo de transferência de carga para o par redox no eletrodo modificado, o que pode ser considerado

um ponto positivo, sugerindo que o material não é totalmente isolante. Além disto, o valor de R_p foi de apenas 127 Ω , o que também indica uma baixa resistência do filme no processo de transferência eletrônica. Por outro lado, observa-se um aumento nos valores da capacitância para o eletrodo modificado, o que pode estar relacionado ao recobrimento da superfície do mesmo com um material eletroquimicamente ativo e provavelmente carregado devido à presença dos grupos funcionais do monômero, gerando uma superfície mais capacitiva.

Diante de tais resultados, e associando com aqueles obtidos com a voltametria cíclica pode-se confirmar a modificação do EG, e sugerir que o material adsorvido apresenta eletroatividade e baixa resistência ao processo de transferência eletrônica. Neste sentido, de modo a compreender a estrutura química do material depositado, estudos relacionados ao mecanismo de oxidação eletroquímica da 2-AB foram conduzidos de forma a propor a via de formação do filme polimérico.

5.1.3 – Estudo da influência do pH na oxidação da 2-AB

Para melhor compreensão do mecanismo de oxidação eletroquímica, e consequente eletropolimerização da 2-AB, avaliou-se a influência do pH em função do potencial de oxidação do composto. Este estudo permite obter uma relação entre o número de prótons e elétrons, utilizando-se uma adaptação na equação de Nernst (Eq. 2). Desta forma, avaliando-se o potencial de oxidação do composto em função do pH da solução é possível obter uma relação linear, onde o coeficiente angular será a relação entre prótons e elétrons envolvidos na oxidação da 2-AB.

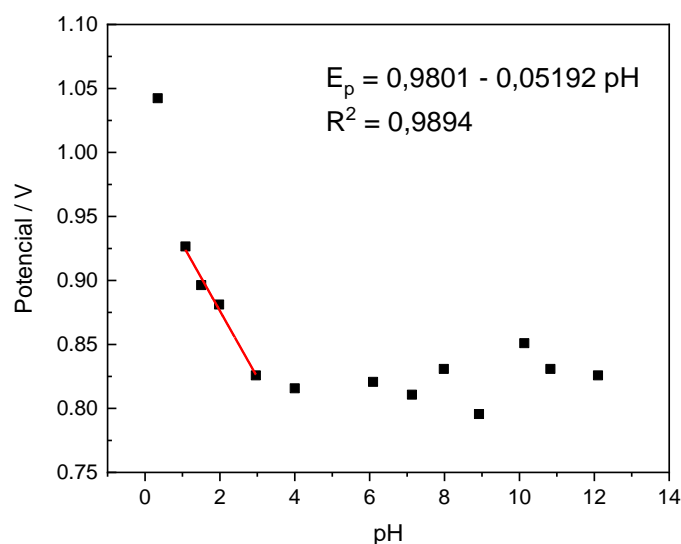
$$E_p = E^0 - 0,059 \left(\frac{H^+}{n} \right) \text{pH} \quad (2)$$

Sendo: E^0 : Potencial padrão do sistema; E_p : Potencial de pico; H^+ : número de prótons; n : número de elétrons.

A Figura 16 mostra a relação do potencial de pico anódico da 2-AB em função do valor de pH da solução, obtidos para o primeiro ciclo de potencial. Cabe ressaltar que, para cada medida, foi utilizado um EG para fins de evitar a influência do filme polimérico adsorvido no processo analisado. De modo geral, observamos uma queda brusca no potencial até o valor de

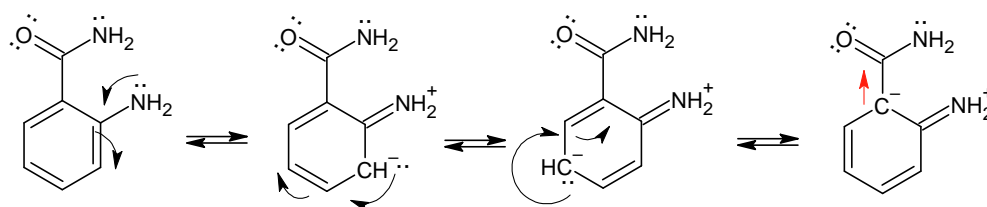
pH próximo a 4. A partir deste valor praticamente não há variação significativa ($\approx 6,9\%$) no valor do E_{pa} ($E_{pa} = +0,823 \text{ V} \pm 0,016$).

Figura 16: Potencial de pico anódico da 2-AB em função do valor de pH da solução 10 mM de 2-AB (preparada em 0,50 M de H_2SO_4). O ajuste de pH foi realizado com solução 0,50 M de NaOH. Dados referentes ao primeiro ciclo de potencial.



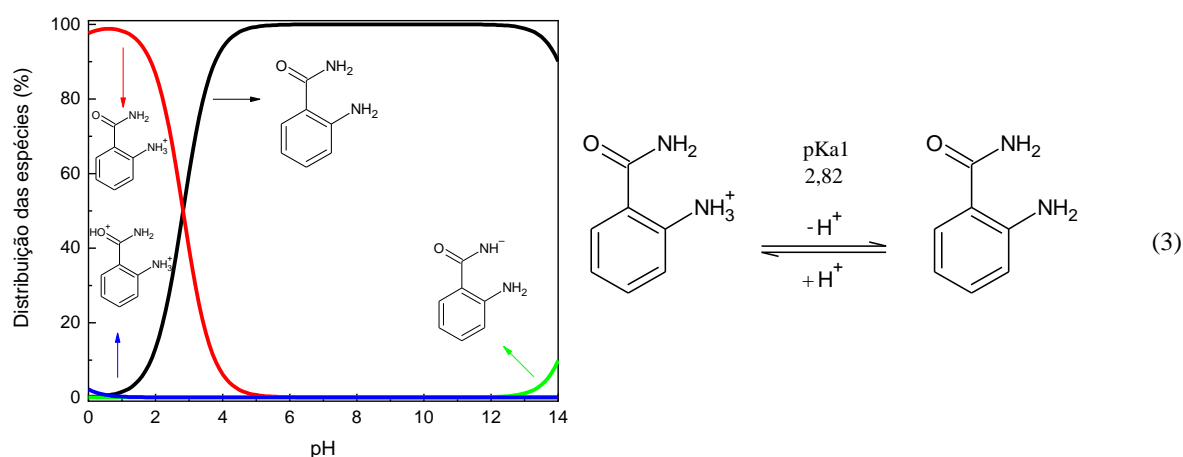
O valor do primeiro pK_a da 2-AB é de 2,82 (CHEMICALIZE, 2021), resultando no equilíbrio químico de protonação para as espécies, conforme descrito na Eq. 3, que dispõe o equacionamento químico da forma protonada do rufo amino-benzil e sua base conjugada, e seu respectivo valor de pK_a . A basicidade de uma amina está relacionada à disponibilidade do par de elétrons livres no átomo de nitrogênio. Uma amina alifática como a cicloexilamina é mais básica que uma amina aromática como a anilina, pois o par de elétrons da primeira está completamente disponível para uma reação, enquanto o par de elétrons da segunda está compartilhado com os orbitais π do anel aromático. Consequentemente, o ácido conjugado proveniente da fenilamina é mais ácido. A presença de grupos retiradores de elétrons no anel aromático também contribui para a deslocalização eletrônica ilustrada na Figura 17, o que torna o par de elétrons do nitrogênio ainda menos disponível para uma reação e, conseqüentemente, tornando-o o ácido conjugado da 2-AB ainda mais forte.

Figura 17: Formas mesoméricas para a 2-AB.



Considerando o gráfico de distribuição das espécies da 2-AB em função do pH, mostrado na Figura 18, e que a oxidação ocorre no nitrogênio do grupo amino, podemos justificar a queda brusca no potencial de oxidação, uma vez que acima deste valor de pH a molécula estará na sua forma desprotonada, requerendo menor potencial para oxidação. Como acima deste valor de pH não há mais protonação neste grupo funcional, prevalecendo a espécie desprotonada, o potencial de oxidação do sistema praticamente fica constante. Nota-se, portanto, que o potencial de oxidação dessa espécie flutua em torno de 0,8 V, correspondente ao valor de potencial observado na Figura 13B para o pico I, corroborando, portanto, com a hipótese de que a espécie desprotonada da 2-AB está presente de forma a apresentar um pico de oxidação perceptível.

Figura 18: Curva de distribuição das espécies da 2-AB em função do pH. Adaptado de Chemicalize.com.



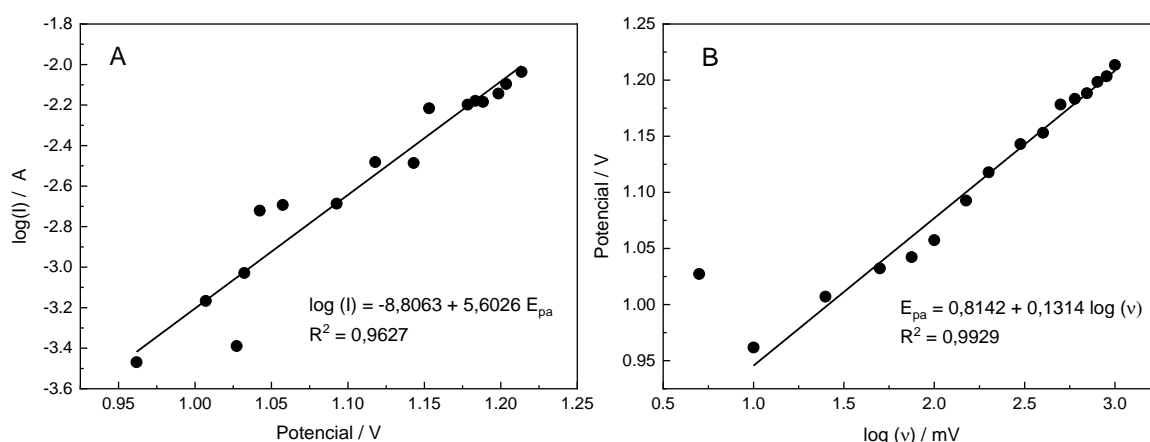
O coeficiente angular obtido através da regressão linear indicada na Figura 16 foi de 0,05192. Desta forma, relacionando este valor com o da Eq. 2, encontramos um valor de 0,88 o que representa uma relação (H^+/n) próximo a uma unidade, ou seja, a oxidação da 2-AB envolve o mesmo número de prótons e elétrons em uma razão 1:1, entre a faixa de pH de 1 a 3. Sendo assim, de forma a determinar especificamente o número de elétrons envolvidos no processo foram realizados estudos complementares baseados nas relações de Tafel e Laviron.

5.1.4 – Obtenção do coeficiente de transferência eletrônica e do número de elétrons

Parâmetros cinéticos envolvidos na formação do filme polimérico podem ser avaliados estabelecendo uma relação entre o $\log(I)$ vs potencial aplicado, e do potencial aplicado vs $\log(v)$. Essas relações são descritas, respectivamente, por Tafel e Laviron,

permitindo o cálculo do coeficiente de transferência eletrônica (α), e o número de elétrons envolvidos na reação (n). Desta forma, realizou-se os voltamogramas cíclicos da 2-AB, alterando-se a velocidade de varredura das análises, obtendo-se assim todos os valores necessários para a construção das curvas para os estudos, conforme mostrado na Figura 19. Nestes estudos, o mesmo EG foi utilizado para todas as medidas.

Figura 19: (A) Relação de Tafel que estabelece o potencial de pico em função do logaritmo da corrente de pico, e (B) Relação de Laviron que mostra o logaritmo da velocidade de varredura em função do potencial de pico. Para ambos os casos os VCs foram obtidos para o EG em solução 10 mM de 2-AB utilizando 0,50 M de H₂SO₄ como eletrólito suporte nas diferentes velocidades de varredura.



A relação de Tafel (Figura 19A) somente é válida quando a relação do $\log(I)$ vs potencial aplicado é linear. Dessa forma, considerando os resultados obtidos da regressão linear encontramos um valor de 5,6026 para o seu coeficiente angular. Relacionando a equação da reta obtida no gráfico de Tafel (Figura 19A) com a Equação de Tafel (Eq. 4), é possível calcular o coeficiente de transferência de elétrons (α), considerando: $F = 96485,34 \text{ C mol}^{-1}$; $R = 8,3145 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ e $T = 298,15 \text{ K}$.

$$\alpha = \frac{(1 - \alpha)F}{2,3RT} \quad (4)$$

$$\log I (A) = 5,6026 E(V) - 8,81$$

$$5,6026 = \frac{(1 - \alpha) 96485,34}{2,3 * (298,15) * (8,3145)}$$

$$\alpha = 0,67$$

O valor de α de 0,67 sugere um processo irreversível para a 2-AB, corroborando com os resultados obtidos pelas análises voltamétricas.

A Figura 19B apresenta uma relação linear entre o potencial de pico e o $\log(v)$, obedecendo então a equação de Laviron. Nesse caso, o número de elétrons envolvidos é encontrado a partir da inclinação da reta, conforme descrito na Eq. 5, utilizando do valor de α encontrado na equação de Tafel.

$$\alpha = \frac{2,3RT}{(1 - \alpha)nF} \quad (5)$$

$$E = 0,1314 \log v + 0,8142$$

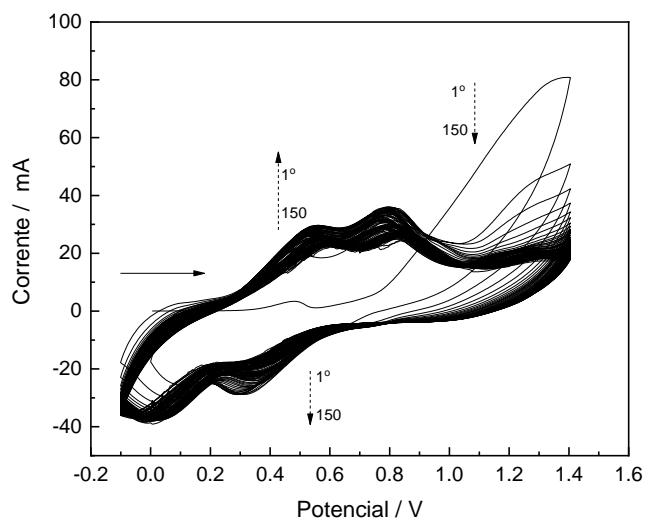
$$0,1314 = \frac{2,3 * (298,15) * (8,3145)}{(1 - 0,67) * n * 96485,34} \rightarrow n = 1,36 \text{ elétrons}$$

Uma vez que os cálculos realizados são aproximados para o sistema em questão, o valor de 1,36 pode ser arredondado para 1, sugerindo o envolvimento de apenas 1 elétron na oxidação da 2-AB. Diante desse resultado, é possível propor um mecanismo para a oxidação eletroquímica da 2-AB. Porém, para fins de caracterização estrutural realizamos a eletrossíntese sobre bastões de grafite para fins de extração do material polimérico, e posterior caracterização por FTIR-ATR.

5.1.5 – Eletropolimerização, extração e análises de FTIR-ATR do poli(2-AB) formado sobre barras de grafite

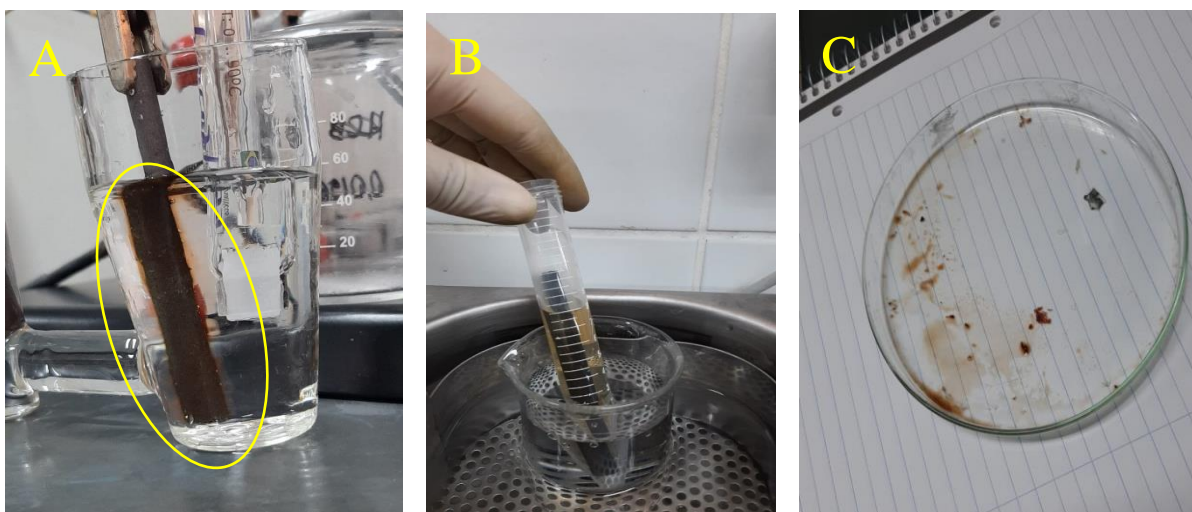
Visando produzir uma quantidade significativa de polímero que pudesse ser analisado por FTIR-ATR, uma vez que a análise diretamente na superfície do eletrodo não é viável, utilizados um bastão de grafite com área geométrica de aproximadamente 12 cm². Neste processo, também foi utilizado uma célula eletroquímica de 2 compartimentos, de modo a separar o contra eletrodo do eletrodo de trabalho para evitar possíveis interferências. O perfil eletroquímico do processo é mostrado na Figura 20, onde observamos uma menor resolução dos picos descritos na Figura 13, provavelmente devido à área geométrica do eletrodo de trabalho. Contudo, os perfis são próximos.

Figura 20: VCs obtidos para eletrodo de bastão de grafite em solução 10 mM de 2-AB preparada 0,50 M de H_2SO_4 0,5 M a $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Número de ciclos = 150. As setas contínuas indicam o sentido da varredura de potencial, e aquelas tracejadas o sentido da corrente.



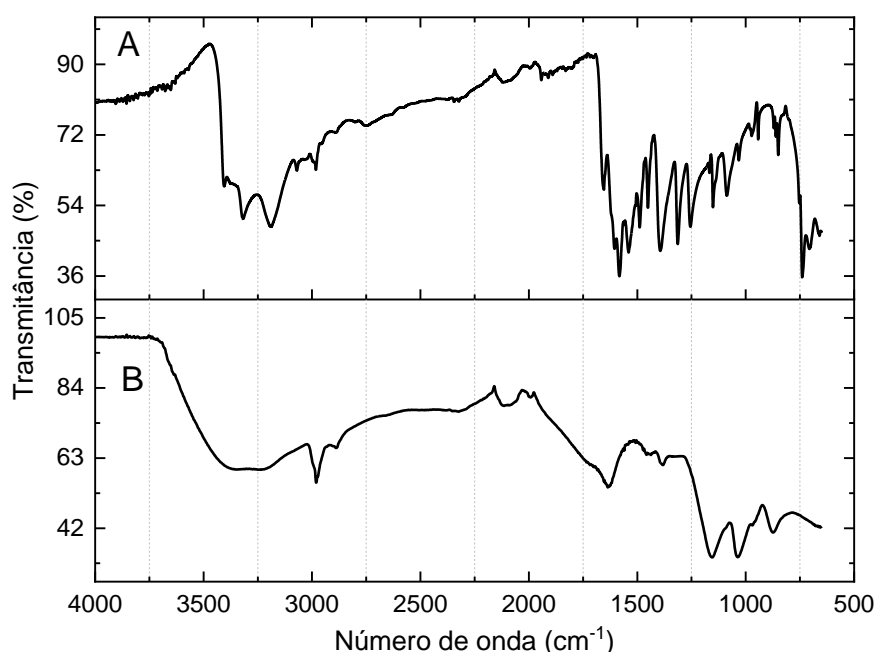
Durante o processo de eletropolimerização utilizando estes eletrodos foi observado uma mudança de cor da solução na superfície do eletrodo, conforme mostrado na Figura 21A. Isso pode estar relacionado à formação do polímero e oligômeros, uma vez que o monômero é um derivado da anilina que tende a formar filmes com características crômicas similares. Após a eletropolimerização, quando colocado em contato com a solução de acetonitrila (Figura 21B), o material permaneceu com a mesma coloração. Finalmente, após a evaporação do solvente (Figura 21C), o material obtido apresentou novamente a mesma coloração, indicando ser uma característica do material polimérico. Em seguida, esse material, foi analisado por FTIR-ATR.

Figura 21: Imagens obtidas durante o processo de preparação e extração do poli(2-AB) sobre os eletrodos de bastão de grafite, sendo: (A) Célula eletroquímica destacando o eletrodo de bastão de grafite; (B) Extração do poli(2-AB) em acetonitrila, e (C) Material polimérico extraído.



A análise comparativa do espectro de FTIR para a 2-AB e o *poli(2-AB)* permite verificar os grupos funcionais presentes na estrutura. Em consequência, podemos fazer uma relação dos grupos existentes no monômero com aqueles que são preservados na formação do polímero e, ainda, quando possível, a indicação do grupo funcional no acoplamento entre as moléculas. A Figura 22 mostra os espectros de FTIR-ATR para a 2-AB e para *poli(2-AB)*.

Figura 22: Espectro de FTIR-ATR obtidos para: (A) 2-AB e (B) *poli(2-AB)* na faixa de 4000-650 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e 128 varreduras.

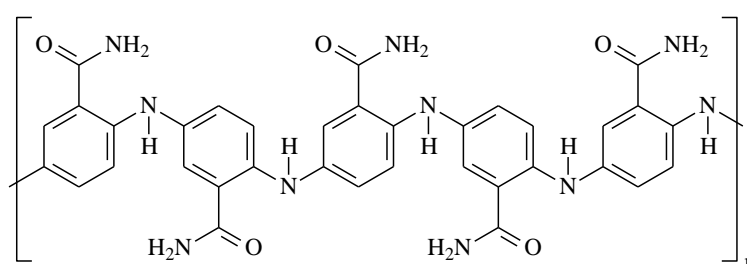


Para o monômero, é possível claramente de se ver as bandas características de aminas, amidas e aromático. As bandas na região entre 3190 e 3317 cm^{-1} são características do estiramento N-H, que nesse caso são provenientes de ambos os grupos amina e amida primária. A banda mais intensa do espectro aparece em torno de 1600 cm^{-1} relacionada ao estiramento C=O da carbonila do grupo amida. Múltiplas bandas aparecem no espectro próximas do estiramento C=O provenientes dos estados livres e associados e sobreposição das bandas de N-H nessa mesma região. A região de impressão digital contém também as bandas de estiramento C-N de aromático entre 1200 e 1400 cm^{-1} . A intensa banda em torno de 700 cm^{-1} corresponde ao estiramento fora do plano N-H.

Para o polímero, observa-se uma diminuição das bandas de estiramento de N-H em altos números de onda, mas o aumento do sinal C-H de aromático entre 2800 e 3000 cm^{-1} . Também é notável a diminuição na intensidade das bandas de estiramento de carbonila, embora

ainda presentes. O estiramento fora do plano N-H permanece intenso em torno de 700 cm^{-1} assim como as bandas entre 1000 e 1250 cm^{-1} correspondentes aos estiramentos C-N. Assim como a eletropolimerização da anilina, e associando ao mecanismo proposto por Santos *et al* (2019) para a 4-aminobenzamida, sugere-se, pelos dados obtidos pelos espectros de infravermelho que a polimerização esteja ocorrendo via átomo de nitrogênio do grupo amino e formando um material que retém, em partes, o grupo amida no material final, como pode ser ilustrado na Figura 23.

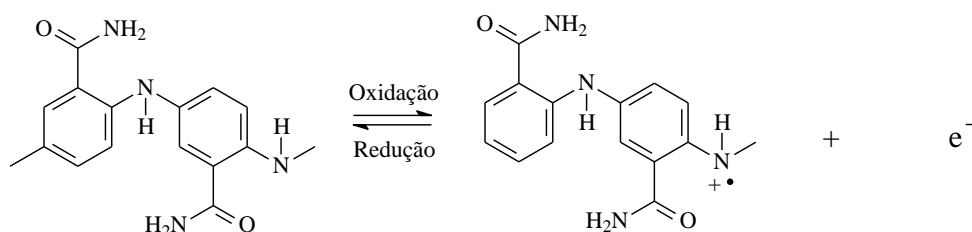
Figura 23: Produto polimérico proposto para a eletropolimerização da 2-AB.



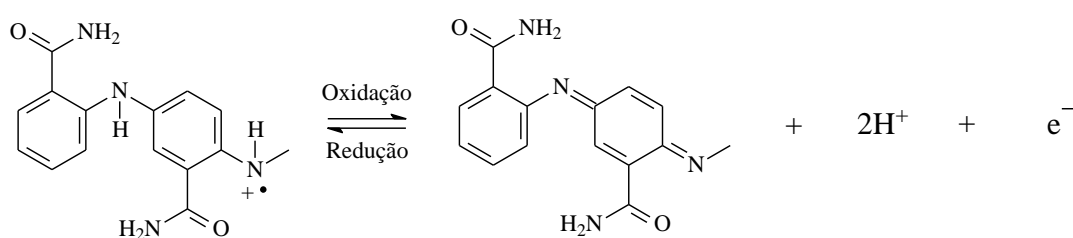
Desta forma, considerando essa estrutura, podemos propor que os processos eletroquímicos observados na Figura 13 (pares redox V/IV e VI/III), os quais estão relacionados ao material polimérico adsorvido, conforme previamente discutido, apresentam especificamente as reações de oxirredução mostradas na Figura 24.

Figura 24: Reações de oxirredução propostas para os pares redox da poli(2-AB) que foram observados durante a eletropolimerização apresentada na Figura 13.

Picos V e IV da Fig. 8



Picos VI e III da Fig. 8

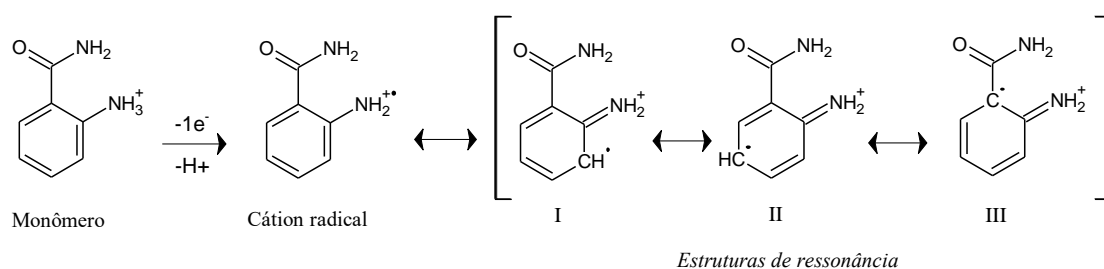


5.1.6 – Proposta do mecanismo de oxidação eletroquímica e formação do poli(2-AB)

Diante dos resultados obtidos para o número de elétrons para a oxidação eletroquímica da 2-AB discutido na seção 5.1.4, e os espectros de FTIR-ATR na seção 5.1.5 o mecanismo proposto para a oxidação da 2-AB com formação da poli(2-AB) é apresentado na Figura 25.

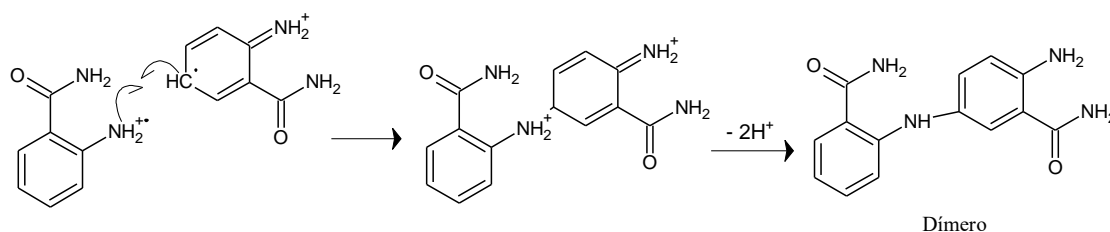
Figura 25: Mecanismo proposto para a oxidação eletroquímica da 2-AB com formação da poli(2-AB).

Etapa 1 - Eletroquímica: Oxidação do monômero e estruturas de ressonância do cátion radical

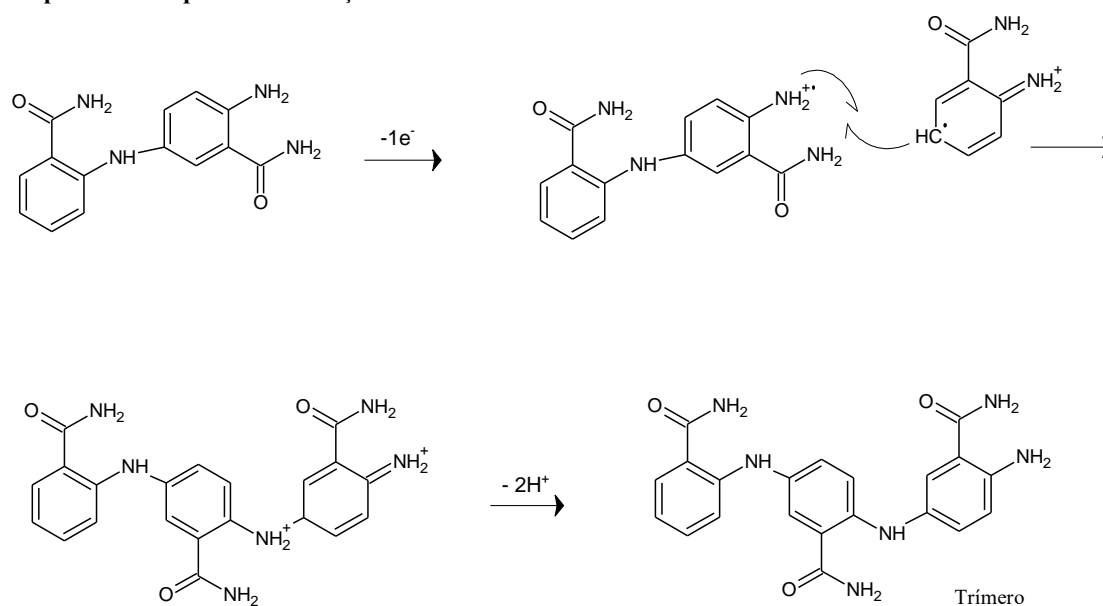


Etapa 2 - Química: Acoplamentos

Formação de dímeros



Etapa 3 - Eletroquímica: Formação de trímeros



Observa-se a oxidação da 2-AB, envolvendo um elétron, no grupo amino da molécula levando a formação do cátion radical, o qual é estabilizado pela deslocalização de elétrons, levando às estruturas de ressonância mostradas em I, II e III (ver Fig. 20). Em seguida, inicia-se uma etapa química referente aos acoplamentos para formação do dímero a partir da reação entre dois radicais. A forma mais estável do cátion radical pode ser aquela apresentada na estrutura II devido aos impedimentos estéricos da molécula. Contudo, considerando a reatividade das reações radicalares, não podemos deixar de mencionar que outros acoplamentos podem ocorrer, como por exemplo cátion radical e a estrutura I, cátion radical com a estrutura III, ou até mesmo cátion radical-cátion radical. Porém, de acordo com o espectro de FTIR-ATR a forma predominante é aquela proposta na etapa 2 da Fig. 20, levando a formação do dímero.

Após a formação do dímero, ocorre novamente uma etapa eletroquímica gerando novamente o cátion radical e seguindo com formação do trímero, conseqüentemente chegando até a formação do polímero, uma vez que pelo processo de eletropolimerização constantemente é gerado o cátion-radical na superfície do eletrodo.

Desta forma, podemos notar que o polímero eletrogerado apresenta-se com uma estrutura química bastante funcionalizada com grupos amida e fenilamina, que podem contribuir no processo de construção do genossensor, uma vez que a molécula de reconhecimento pode interagir de uma forma efetiva com a superfície do transdutor, mantendo-se assim sua atividade biológica e efetiva imobilização sobre a superfície do transdutor. Por isso, a segunda parte do trabalho irá explorar os aspectos relacionados a construção do genossensor e otimização das condições de formação do filme polimérico para a imobilização dos oligonucleotídeos.

5.2 – Estudos do desenvolvimento do genossensor para a COVID-19 sobre EIG

Uma vez conhecida as propriedades eletroquímicas da poli(2-AB), bem como sua estrutura química, iniciou-se a etapa de construção do genossensor eletroquímico para detecção do genoma viral do SARS-CoV-2, causador da Covid-19, utilizando um sistema eletroquímico descartável constituído de eletrodos impressos comerciais de carbono.

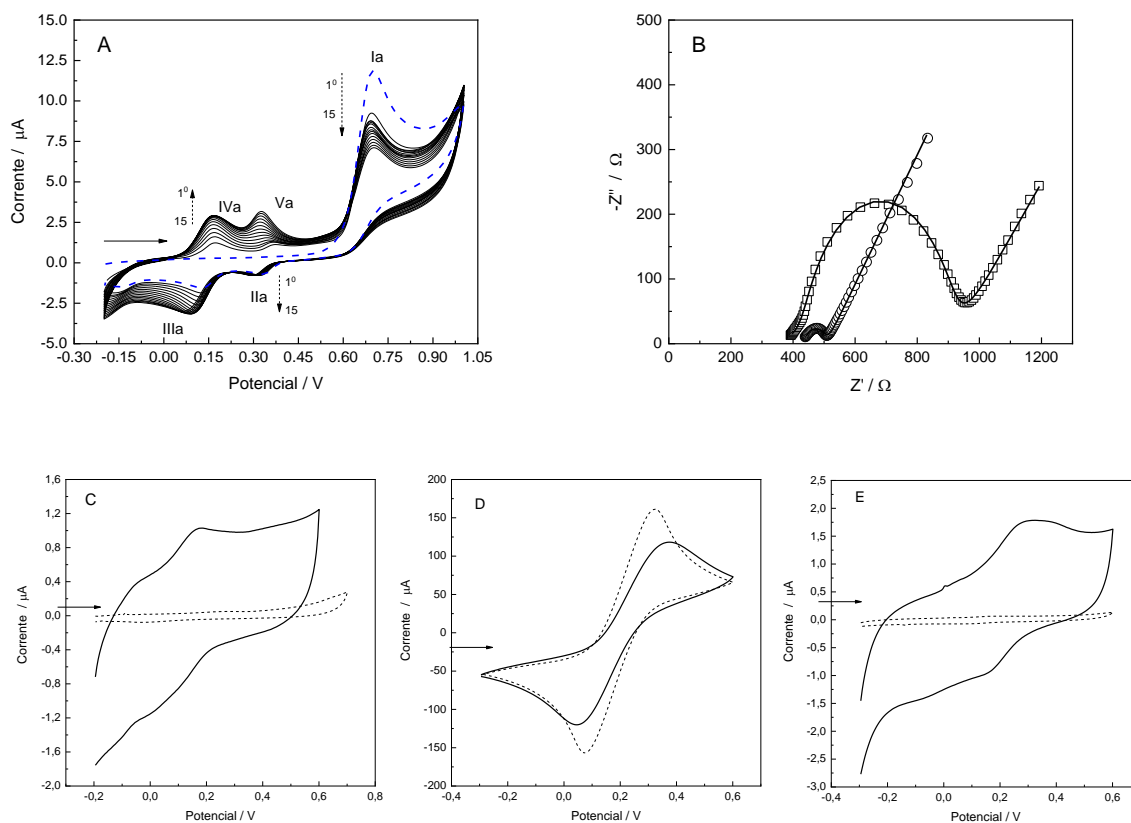
Eletrodos impressos são sistemas eletroquímicos completos e têm-se mostrado como dispositivos eficientes para o desenvolvimento de biossensores com aplicação em diversas áreas (GARCÍA-MIRANDA FERRARI; ROWLEY-NEALE; BANKS, 2021; MINCU *et al.*, 2020; MUSA *et al.*, 2021; SMART *et al.*, 2020).

Neste contexto, os eletrodos impressos de carbono DRP-110 foram utilizados, como proposto neste trabalho, com a perspectiva de obter uma maior sensibilidade para a reação de reconhecimento biológico. Contudo, antes de iniciar a imobilização das sondas realizou-se uma rápida investigação sobre a formação do filme polimérico derivado da 2-AB sobre a superfície desses eletrodos, de modo a comparar com aqueles resultados obtidos sobre o EG, conforme será discutido a seguir.

5.2.1 – Eletrossíntese e caracterização eletroquímica da poli(2-AB)

A Figura 26 apresenta os estudos eletroquímicos para a formação da poli(2-AB), assim como a investigação eletroquímica dos EIG modificados por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica.

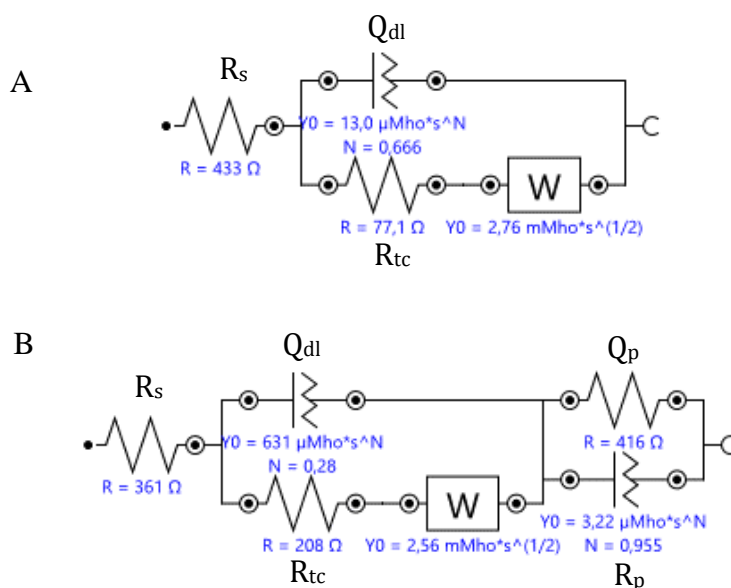
Figura 26: (A) VCs consecutivos (15 ciclos) obtidos para o EIG em solução 0,25 mM de 2-AB preparada 0,50 M de H_2SO_4 0,5 M a $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Onde: (---) primeiro ciclo de potencial. As setas contínuas indicam o sentido da varredura de potencial, e aquelas tracejadas o sentido da corrente. (B) Diagramas de Nyquist obtidos em 5,0 mM de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ contendo 0,10 M de KCl para: (o) EIG e (□) poli(2-AB)/EIG. Amplitude: 10 mV. Faixa de frequência: 100 kHz a 10 mHz. As linhas sólidas representam a simulação de dados experimentais para o respectivo circuito equivalente. Em C, D e temos os VCs obtidos para: (---) EIG e (—) poli(2-AB)/EIG em solução de: (C) 0,50 M de H_2SO_4 ; (D) 5,0 mM de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ + 0,10 M de KCl; e (E) 0,10 M de KCl. Em todos os casos a velocidade de varredura foi de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



A Figura 26A mostra o perfil da eletropolimerização da 2-AB sobre o EIG, onde a oxidação do composto ocorre em +0,70 V (pico Ia), seguido do aparecimento de dois pares redox Va/IIa (+0,33/+0,31 V) e IVa/IIIa (+0,17/+0,10 V). O perfil eletroquímico é muito similar àquele observado para a eletropolimerização do composto sobre o EG (ver Figura 13B), lembrando que, neste caso (EIG) foram realizados apenas 15 ciclos de potencial. Sendo assim, toda discussão já apresentada, incluindo a formação do cátion radical, acoplamentos, e as reações de oxirredução para os pares redox (Figura 24) é válida neste caso.

A Figura 26B mostra os estudos de EIE para o EIG não modificado em comparação ao modificado com a poli(2-AB). Neste caso, o EIG apresentou o mesmo comportamento para o EG, ou seja, um pequeno semicírculo em regiões de altas frequências seguido de uma reta que representa os processos difusionais. Entretanto, podemos destacar que para este tipo de eletrodo, observa-se uma maior resistência ôhmica ($\approx 400 \Omega$) quando comparado ao EG. Para a poli(2-AB)/EIG são observados dois semicírculos, sendo um deles, muito discreto, na região de altas frequências e outro mais definido em regiões de baixas frequências, observando-se ainda o processo relacionado ao transporte de massa. Os circuitos equivalentes utilizados para a simulação dos dados experimentais foram os mesmos utilizados para os EG, ou seja, um circuito de Randles para o EIG, $R_s(Q_{dl}[R_{tc}W])$, e outro representado por $R_s(Q_{dl}[R_{tc}W])(R_pQ_p)$ para o poli(2-AB)/EIG. Os respectivos circuitos e os dados da simulação estão apresentados na Figura 27. Para o eletrodo modificado observamos um aumento nos valores de R_{tc} , assim como nos de Q_{dl} e da resistência associada ao material polimérico, o que indica que, neste caso, os eletrodos apresentam uma maior resistência ao processo de transferência de carga.

Figura 27: Circuitos equivalentes e dados da simulação dos resultados de EIE para (A) EIG, e (B) poli(2-AB)/EIG.



A Figura 26C estabelece uma comparação entre eletrodo modificado e não modificado para os VCs obtidos em solução do eletrólito da polimerização, solução de ferri/ferricianeto de potássio, e em solução de KCl (eletrólito da solução de ferro/ferricianeto). Nos voltamogramas obtidos somente em solução de H_2SO_4 é possível observar um aumento nos valores de corrente e o aparecimento dos pares redox do filme na mesma região de potencial no qual o filme é formado. Isto sugere a adsorção e eletroatividade do polímero. Os voltamogramas obtidos em solução de ferro/ferricianeto de potássio (Figura 26D), mostram claramente os processos de oxirredução deste par redox, com uma diminuição nas correntes de pico para o eletrodo modificado, indicando maior resistência neste caso o que corrobora com as análises de EIE. E por fim, os VCs obtidos em solução de KCl também apresentam um perfil eletroquímico semelhante àquele obtido na solução H_2SO_4 , o que indica a contribuição deste processo nos voltamogramas da Figura 26D, deixando claro a maior resistência do eletrodo modificado na transferência eletrônica do ferro/ferricianeto de potássio.

Todos esses resultados obtidos para a eletropolimerização da 2-AB sobre os EIG são similares aos apresentados e discutidos na seção 5.1.2, os quais foram obtidos para o EG. Sendo assim, consideramos que a modificação do eletrodo impresso pela poli(2-AB) foi realizada com sucesso, e o material adsorvido apresenta eletroatividade e características de uma plataforma funcionalizada para aplicação na imobilização de biomoléculas. Então, foi realizado um estudo preliminar para a imobilização dos oligonucleotídeos e reconhecimento do alvo complementar de interesse.

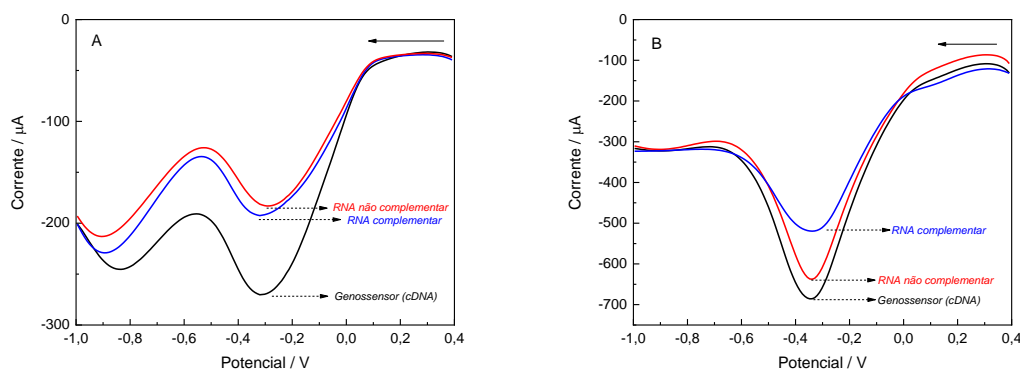
5.2.2 – Imobilização dos oligonucleotídeos e análises de reconhecimento do genoma viral

Para fins de avaliar a utilização do transdutor eletroquímica (poli(2-AB)/EIG) na imobilização do cDNA de regiões conservadas do genoma do SARS-CoV-2, e consequente monitoramento do evento de hibridização com o RNA complementar, realizou-se um estudo inicial em três situações distintas. Na primeira as sondas foram imobilizadas sobre a superfície do poli(2-AB)/EIG, gerando o genossensor. Na segunda e terceira, o genossensor foi colocado em contato com RNA complementar e não complementar, respectivamente. Para todos os casos o AM foi adicionado à superfície de cada dispositivo como última etapa do processo. Sendo assim, após os procedimentos de imobilização e lavagem realizou-se o monitoramento do evento de hibridização através do monitoramento indireto da redução do AM por VOQ. De modo a evidenciar o papel exercido pelo poli(2-AB) no aumento de sensibilidade e

funcionalidade do genossensor, as mesmas situações foram avaliadas sobre o EIG sem modificação.

Os respectivos VOQ para o EIG (Figura 28A) e para o poli(2-AB) (Figura 28B) foram registrados, onde se observa a ineficácia do sistema no EIG na distinção entre amostras específicas e não específicas, enquanto para o poli(2-AB) tem-se um pico bem definido em -0,34 V, o qual é atribuído a redução do AM com clara diferença entre as amostras alvo. Para todos os casos não foi observado deslocamento de potencial deste processo. Contudo, diferentes valores da I_{pc} foram obtidos, sendo a maior para o genossensor. Como já discutido, o AM apresenta afinidade pelas bases guanina, as quais estariam “livres” tanto no genossensor quanto no genossensor contendo o alvo não-específico, resultando em maior adsorção do AM sobre a superfície, conseqüentemente gerando um maior sinal eletroquímico. Por outro lado, quando o genossensor foi colocado com o alvo específico foi observado uma diminuição no sinal de redução, o que pode ser justificado pela hibridização, a qual dificultou o acesso do AM a base nitrogenada do oligonucleotídeo.

Figura 28: VOQ registrado para (A) EIG e (B) poli(2-AB)/EIG referente a redução do AM em solução de tampão fosfato 0,10 M (pH 7,40) contendo 1,0 M NaCl. Sendo: (—) genossensor (cDNA), (—) genossensor + RNA complementar e (—) genossensor + RNA não complementar. Step: 9 mV; amplitude, 270 mV e frequência, 29 Hz. A seta contínua indica o sentido da varredura de potencial.



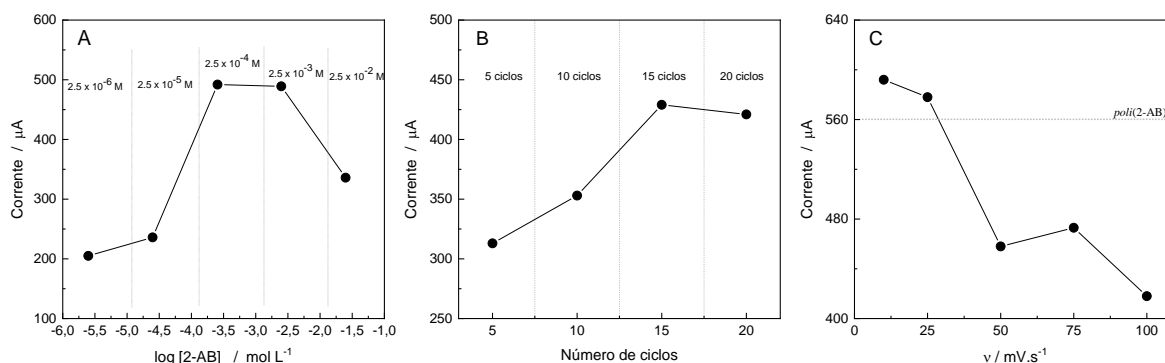
O sinal de corrente obtido para o genossensor foi de 685 μA , enquanto para o genossensor em contato com o alvo não complementar de 637 μA , e para o alvo complementar de 519 μA . Tais resultados indicam uma boa resposta do dispositivo em reconhecer o alvo de específico, uma vez que, observou-se uma diminuição do sinal do AM em aproximadamente 25%, enquanto para os alvos não específicos foi de 7%.

A partir destes resultados, buscou-se uma otimização para construção do transdutor, bem como para as etapas de imobilização e reconhecimento, com o objetivo de aumentar, ainda mais, a sensibilidade do genossensor.

5.2.3 – Otimização dos parâmetros de construção do transdutor

A interação entre a sonda e a plataforma funcionalizada é de extrema importância para a produção do genossensor, sendo uma das etapas mais críticas, uma vez que é desejável imobilizar e, ao mesmo tempo, manter a atividade do componente biológico. Dessa forma, avaliou-se como o número de ciclos de potencial, a concentração da solução de 2-AB, e a velocidade de varredura, parâmetros relacionados a modificação do eletrodo impresso, poderiam influenciar na etapa de imobilização da sonda. Neste sentido, sabendo que o AM é um intercalador de fita simples, e que o mesmo deve apresentar um maior sinal quanto mais adsorvido na superfície do transdutor, monitorou-se este parâmetro de modo a observar aquela situação que apresentasse maior altura de pico registrado na VOQ. A Figura 29 mostra os resultados obtidos para essa etapa, sendo cada parâmetro otimizado de forma univariada.

Figura 29: Valores da corrente da altura de pico obtidos para o poli(2-AB)/EIG por VOQ para a redução do AM em solução de tampão fosfato 0,10 M (pH 7,40) contendo 1,0 M NaCl, sendo: (A) Otimização da concentração da 2-AB utilizada na eletropolimerização mantendo 15 ciclos a 50 mV.s⁻¹; (B) Otimização do número de ciclos de potencial onde foi utilizado 2,5 mM de 2-AB e v de 50 mV.s⁻¹; e (C) Otimização da velocidade de varredura utilizado 2,5 mM de 2-AB e 15 ciclos. Condições da varredura: Step: 9 mV; amplitude, 270 mV e frequência, 29 Hz.



A Figura 29A apresenta a influência da concentração da solução de 2-AB na resposta de imobilização dos oligonucleotídeos. Os EIG foram modificados com solução de 2-AB em concentrações de 2,5 μM ; 25 μM ; 0,25 μM ; 2,5 mM e 25 mM todas preparadas em 0,50 M de H_2SO_4 e realizando 15 ciclos de potencial a 50 mV.s⁻¹. As alturas dos picos relativos à redução do AM para cada situação foram comparadas e analisadas. A concentração do monômero é um parâmetro que está diretamente relacionado com a quantidade de espécies eletroativas na interface eletrodo/solução, o que pode resultar, inclusive, em uma maior ou menor desorganização da malha polimérica, e conseqüente saturação da superfície do eletrodo. Sendo assim, para a faixa de concentração investigada nota-se que há um aumento na resposta

até a concentração de 0,25 mM, e após 2,5 mM uma queda nos valores. Para as concentrações de 0,25 mM e 2,5 mM o sinal do AM obtido praticamente o mesmo, sugerindo uma maior interação dos oligonucleotídeos com a plataforma. Dessa forma, a concentração escolhida para prosseguimento do trabalho, foi a de 0,25 mM.

A Figura 29B mostra a influência do número de ciclos de potencial na resposta de imobilização dos oligonucleotídeos. Sendo assim, considerando a concentração da 2-AB já otimizada (0,25 mM), nessa etapa, as plataformas eletroquímicas foram preparadas com 5, 10, 15 e 20 ciclos consecutivos de potencial a $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. A quantidade de ciclos está diretamente relacionada com a formação do cátion-radical, e consequente acoplamento das espécies, ou seja, espera-se que quanto mais ciclos possam ser realizados maior quantidade de material polimérico formado, o que pode influenciar diretamente na sua espessura, eletroatividade e permeseletividade. Pelos resultados obtidos, nota-se um aumento na resposta até 15 ciclos, e após este quantitativo não há alterações significativas. Sendo assim, 15 ciclos foi considerado como condição ótima para a interação com os oligonucleotídeos, e consequentemente modificação do tradutor.

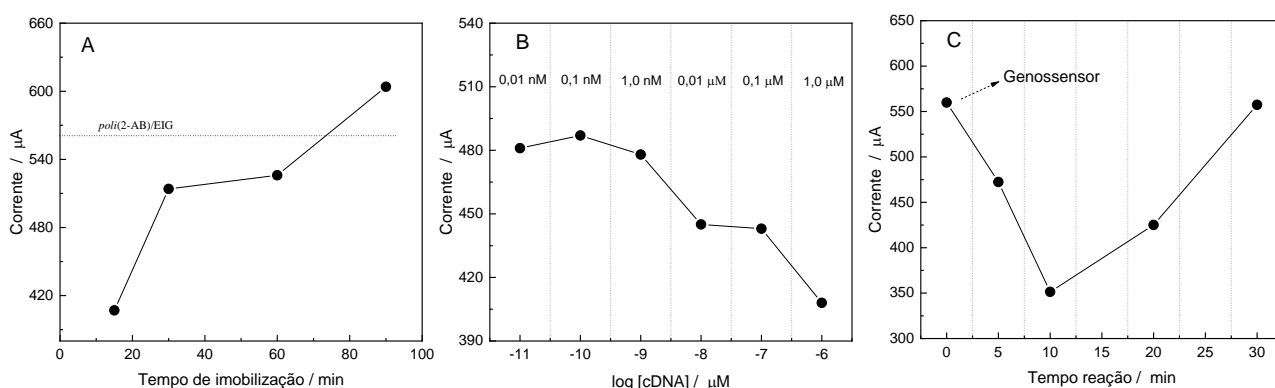
A Figura 29C, apresenta a influência da velocidade de varredura no processo de eletropolimerização, e posterior imobilização do componente biológico. A velocidade de varredura estabelece a variação do potencial aplicado em função do tempo, ou seja, se o processo de eletropolimerização ocorrerá de forma mais rápida ou mais lenta. No caso da formação de um filme polimérico, isso pode ter forte influência na estrutura do polímero, uma vez que velocidades mais lentas tendem a formar estruturas “mais organizadas”, e em velocidades mais rápidas “mais desorganizadas”. Isso devido ao fato da velocidade de geração do cátion-radical, e reações eletroquímicas e químicas na superfície do eletrodo. Sendo assim, a influência deste parâmetro foi avaliada mantendo-se a concentração da 2-AB em 0,25 mM e 15 ciclos realizados a 5, 25, 50, 75 e $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Nota-se que em velocidades 10 e $25 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ o sinal obtido para o AM é alto, no entanto, eles estão acima daquele sinal obtido para a adsorção do AM somente no poli(2-AB)/EIG. É possível, que quando formado nessas velocidades de varredura, o filme de poli(2-AB) não promove uma interação estável com a sonda, permitindo que o filme fique exposto para interação direta com o AM, aumentando o sinal obtido para o intercalador na técnica. Dessa forma, não é possível garantir que o sinal registrado seja da redução do AM proveniente do seu contato com a sonda. Já os filmes formados em 50 e $75 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ apresentam alturas de pico próximas permitindo uma detecção da redução do AM em contato com a biomolécula. Sendo assim, a velocidade de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ foi escolhida.

Com a construção do transdutor otimizada, buscou-se otimizar os parâmetros relacionados a imobilização dos oligonucleotídeos e análises de reconhecimento.

5.2.4 – Otimização das condições de imobilização dos oligonucleotídeos e tempo de reação

A identificação da presença de RNA viral nas amostras analisadas pelo sistema desenvolvido se dá pela interação entre esse RNA genômico com os oligonucleotídeos do genossensor. Dessa forma, deve existir uma quantidade de oligonucleotídeos, disponíveis na superfície do eletrodo, que melhor irá interagir com o analito de interesse. Então, além das condições de construção da plataforma funcionalizada, os parâmetros que envolvem a etapa de imobilização da sonda também podem afetar a quantidade de material adsorvido na superfície do eletrodo, e conseqüentemente sua atividade biológica. Para avaliar tais parâmetros, o tempo de imobilização da sonda e a sua concentração foram estudados de forma a promover as melhores condições para o reconhecimento da imobilização, assim como o tempo de reação do genossensor com o alvo complementar buscando aquele que oferece melhor hibridização, através do monitoramento do AM em contato com o dispositivo. Os resultados são mostrados na Figura 30.

Figura 30: Valores da corrente da altura de pico obtidos para o poli(2-AB)/EIG por VOQ para a redução do AM em solução de tampão fosfato 0,10 M (pH 7,40) contendo 1,0 M NaCl, sendo: (A) Tempo de imobilização das sondas mantendo-se a concentração de cDNA em 1,0 μM ; e (B) Otimização da concentração de cDNA mantendo-se o tempo de imobilização em 30 min; e (C) Tempo de reação do genossensor com o RNA complementar. Condições de varredura: Step: 9 mV; amplitude, 270 mV e frequência, 29 Hz.



A Figura 30A mostra os resultados do tempo de contato da solução que contém as sondas com a plataforma funcionalizada, de modo a promover a imobilização deste componente. A partir de uma solução 1,0 μM de cDNA o tempo de imobilização foi investigado em 15, 30, 60 e 90 minutos. É possível observar um aumento do sinal com o aumento do tempo

de imobilização, sendo que em tempos de 30 e 60 min não houve variação significativa. Em 90 minutos o sinal obtido para o AM é maior do que àquele adquirido para o AM somente na superfície do poli(2-AB)/EIG. Como o volume da solução é relativamente pequeno (7 μ L), e o tempo de contato foi longo (90 min), a solução secou na superfície do eletrodo, o que pode resultar em interações inespecíficas do AM com a plataforma, gerando um maior sinal para esta situação. Sendo assim, considerando o tempo de preparo do dispositivo e maior celeridade nas análises, optamos pelo tempo de imobilização de 30 minutos, uma vez que para 60 min o aumento de sinal foi de apenas 2,3% não justificando um tempo maior do que aquele de 30 min.

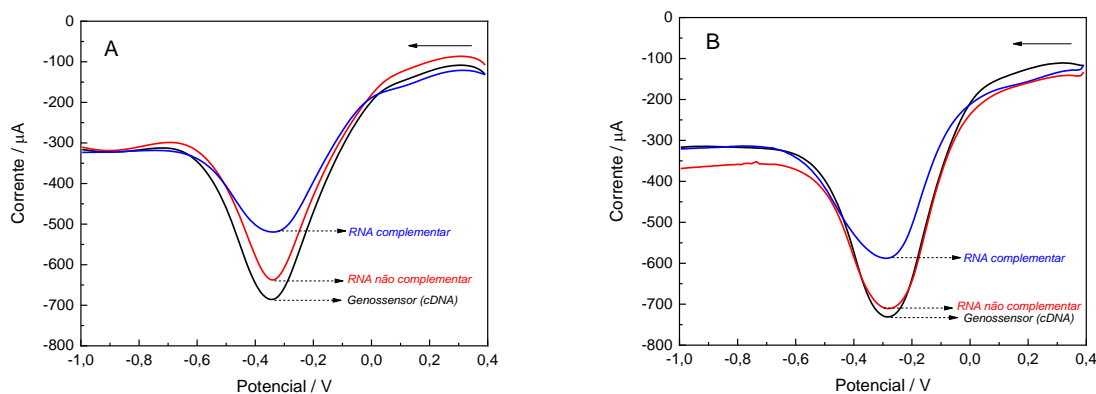
Na Figura 30B observa-se a variação do sinal do AM em função da concentração dos oligonucleotídeos imobilizados na faixa de 0,01 nM a 1,0 μ M, fixando-se o tempo de imobilização em 30 minutos. Nota-se um decréscimo no sinal com o aumento da concentração da sonda, o que indica que o acesso do AM às bases guanina foi dificultado, o que pode ser resultado da sobreposição ou impedimento estérico das sequências de oligonucleotídeos na superfície do eletrodo devido à maior concentração utilizada, e conseqüentemente maior quantidade de espécies adsorvidas sobre o poli(2-AB)/EIG. Diante dos resultados obtidos, foi escolhida a concentração de 0,1 μ M para construção do genossensor, sendo um sinal intermediário, uma vez que a diferença do sinal do AM entre a menor e a maior concentração foi de apenas 15%.

A Figura 30C apresenta a resposta do genossensor em função do tempo de reação com amostras plasmidiais contendo a região específica do SARS-CoV-2, após otimização dos parâmetros de desenvolvimento do transdutor e condições de imobilização das sondas. O tempo de reação foi monitorado em 5, 10, 20 e 30 minutos. Pelos resultados obtidos, observamos uma diminuição do sinal do AM até o tempo de 10 min, e após este tempo um aumento. O tempo 0 foi colocado para fins de comparação, e representa a resposta do genossensor para o AM, na ausência da amostra. A queda no sinal pode ser justificada pela interação do genossensor com os RNAs complementares, ocasionado numa menor adsorção para o AM. Em contrapartida, o aumento do sinal observado para os tempos de 20 e 30 minutos pode estar realizado a adsorções inespecíficas sobre a plataforma, e conseqüentemente adsorção do AM no RNA plasmidial. Neste contexto, o tempo de 10 min foi definido como o tempo de análise do genossensor.

A Figura 31 mostra uma comparação da performance do genossensor antes e após o processo de otimização dos principais parâmetros relacionados a construção e resposta do genossensor. O sinal de corrente para o sistema otimizado foi de 20% referente a diferenciação com o RNA complementar. Em contrapartida para o alvo não complementar foi de 3%. Se compararmos este valor com aqueles obtidos para o sistema não otimizado (25% específico e

7% não específico), notamos que apesar da perda de sinal para a amostra contendo o RNA do SARS-CoV-2, houve uma aproximação entre o sinal do genossensor e o sinal para o RNA não complementar, o que pode ser interessante do ponto de vista de funcionamento do biossensor de modo a evitar respostas como falsos-positivos. Entretanto, para estas análises, foram reutilizados alguns EIG, devido a indisponibilidade destes em nosso laboratório. Desta forma, acreditamos que o sinal do genossensor, talvez, pode ser aprimorado se utilizado EIG novos, ou então através de uma otimização multivariada dos parâmetros investigados de modo a mostrar a dependência entre eles, caso existam.

Figura 31: VOQ registrado para o poli(2-AB)/EIG referente a redução do AM em solução de tampão fosfato 0,10 M (pH 7,40) contendo 1,0 M NaCl. Sendo: (—) genossensor (cDNA), (—) genossensor + RNA complementar, e (—) genossensor + RNA não complementar. Sendo: (A) Sistema não otimizado; e (B) Sistema otimizado. Step: 9 mV; amplitude, 270 mV e frequência, 29 Hz. A seta contínua indica o sentido da varredura de potencial.



Mesmo o dispositivo tendo como objeto a discriminação do RNA complementar ou não complementar, o que implica numa resposta positiva ou negativa à presença do SARS-CoV-2, investigou-se o comportamento da resposta do dispositivo em função da diluição das amostras, uma vez que dependendo da resposta imunológica do indivíduo, assim como tempo de infecção, os níveis do RNA viral podem-se alterar.

5.3 – Avaliação da sensibilidade, reprodutibilidade e estabilidade do genossensor

A

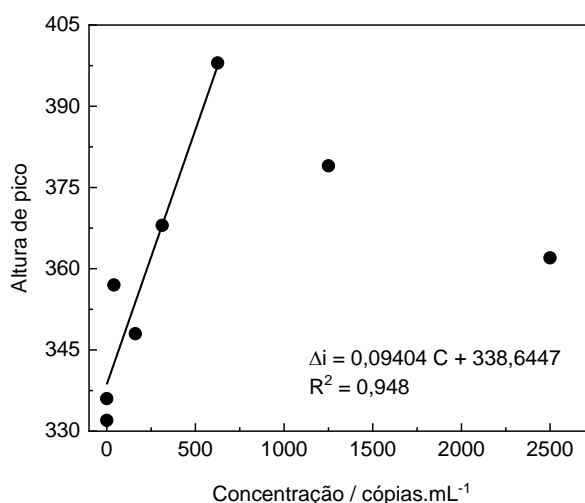
Figura 32 mostra a resposta do genossensor para diferentes diluições da amostra específica. Para esse estudo, foram preparadas amostras de alvo complementar plasmidial em concentrações compreendidas entre 0,00239 a 2500 cópias/mL, diluídas em solução tampão fosfato 0,1 M (pH 7,40), e os valores de altura de pico registrados para a redução do AM foram

obtidos. Nota-se que para os valores de concentração investigados, o genossensor proporciona diferenciação significativa do valor obtido somente para o genossensor na ausência de alvo complementar (500 μ A). Além disto, percebe-se que diminuindo-se a concentração da amostra avaliada, a detecção se mostra mais sensível. O genossensor respondeu linearmente na faixa de 13,5 a 625 cópias/mL. A partir da relação entre o sinal obtido e a concentração da amostra analisada, os LOD e LOQ puderam ser calculados a partir da inclinação da reta (b) e o desvio padrão do branco (S_a) conforme as equações 6 e 7, resultando em 3,89 e 12,97 cópias/mL respectivamente.

$$LOD = 3 \cdot \frac{S_a}{b} \quad (6)$$

$$LOQ = 10 \cdot \frac{S_a}{b} \quad (7)$$

Figura 32: Relação dos valores da corrente da altura de pico obtidos para o poli(2-AB)/EIG por VOQ para a redução do AM em solução de tampão fosfato 0,10 M (pH 7,40) contendo 1,0 M NaCl em função da concentração das amostras contendo o genoma viral do SARS-CoV-2. A linha contínua equivale à regressão linear dos pontos analisados.



Para os estudos de reprodutibilidade, os genossensores mostraram valores de RSD de 12,2% (n=5), o que pode ser considerado aceitável quando se compara os resultados do genossensor na ausência e presença do alvo específico, as quais são bem distintas para um dispositivo do tipo *on/off*. Medidas de repetibilidade, utilizando o mesmo sensor, não foram realizadas, uma vez que a redução do AM é um processo irreversível. Para as análises de estocagem do genossensor, obteve-se uma perda de resposta de 18%, em relação a resposta inicial para os 45 dias de armazenamento na geladeira em temperatura de 5 a 10 °C.

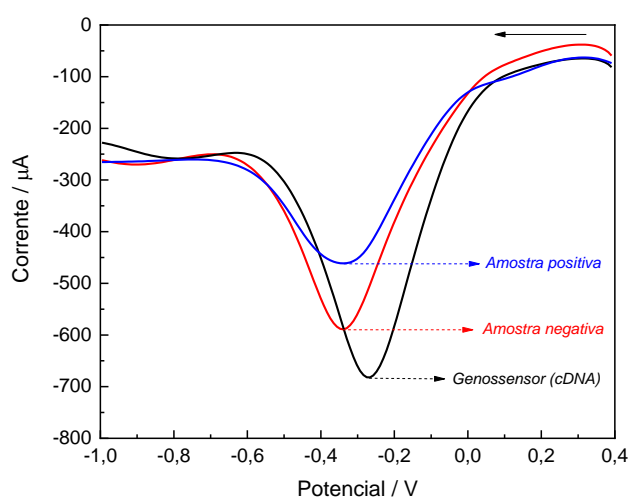
Após todos esses estudos, utilizou-se o genossensor em amostras reais, obtidas de soro de pacientes diagnosticados com a Covid-19, para fins de comparação com a metodologia de RT-PCR.

5.4 – Aplicação do genossensor em amostras reais e estudo de interferentes

As amostras clínicas (positivas e negativas) foram cedidas pelo prof. Danilo Bretas de Oliveira, docente da Faculdade de Medicina da UFVJM e coorientador deste trabalho. Para ambas as amostras, o diagnóstico da Covid-19 (positivo ou negativo) foi previamente confirmado pelo método de RT-PCR, e o uso destas foi realizado de acordo com o projeto registrado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFVJM de número do Parecer: 4.226.506, o qual permite o uso das amostras clínicas, as quais estão armazenadas no banco de amostras da Covid-19 da UFVJM.

A Figura 33 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para o AM para o genossensor na presença e ausência do RNA do SARS-CoV-2 em amostras de *swab* nasofaríngeal humano após extração e purificação do RNA seguindo o procedimento operacional padrão (POP) utilizado pelo Laboratório-Escola de Análises Clínicas da UFVJM. Nota-se que o dispositivo respondeu de forma similar quando aplicado as amostras plasmidiais.

Figura 33: VOQ obtidos para a redução do AM em solução de tampão fosfato 0,10 M (pH 7,40) contendo 1,0 M NaCl, onde: Sendo: (—) genossensor (cDNA), (—) genossensor + amostra positiva, e (—) genossensor + amostra negativa. Condições da análise: Step: 9 mV; amplitude, 270 mV e frequência, 29 Hz. A seta contínua indica o sentido da varredura de potencial.



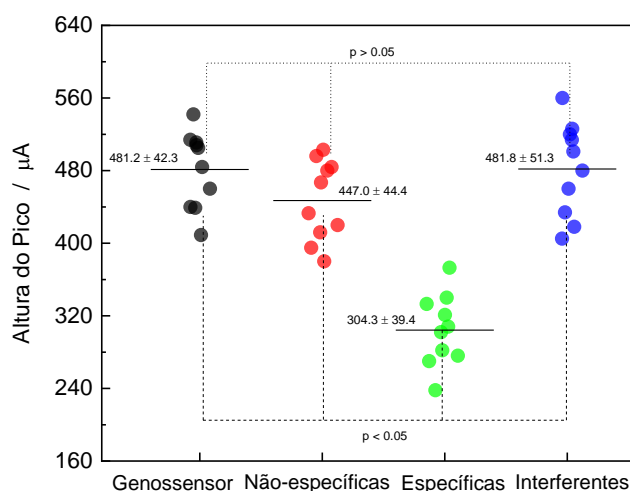
O sinal do AM para o genossensor foi o maior, enquanto para a amostra positiva o menor, o que sugere o reconhecimento da formação do híbrido. Quando comparado os sinais das amostras com o genossensor (branco), obteve-se uma diferente diminuição de

aproximadamente 32% para as amostras positivas, e de 14% para as negativas. Neste caso, apesar da diferença do sinal das amostras negativas comparado ao sinal do genossensor ter sido maior do que aquela obtida na Fig. 26 para as amostras plasmidiais, podemos dizer que neste caso, devido à complexidade das amostras clínicas, pode-se gerar certa interferência na adsorção e detecção do AM. Porém, há uma diferença significativa entre o sinal da amostra positiva com aquele da negativa.

Para contornar tais problemas, e evitar resultados falso-positivos, o ideal seria realizar um estudo do efeito da matriz sobre esse sistema de detecção, onde um estudo de diluição da amostra real poderia contribuir, neste quesito, com a melhoria do sinal. Contudo, devido a limitação de eletrodos impressos disponíveis esse estudo não foi realizado.

A Figura 34 apresenta os resultados de um ensaio comparativo para amostras positivas e negativas para COVID-19, e possíveis interferentes, onde foram utilizadas 10 amostras diferentes para cada conjunto, de modo a avaliar, preliminarmente, a seletividade do genossensor. Apesar do número de amostras ser pequeno para comprovar a real sensibilidade e especificidade do dispositivo, devido a limitação de eletrodos impressos disponíveis no laboratório, não conseguimos realizar os experimentos com um número maior de amostras. Contudo, os resultados mostram-se promissores com relação ao uso da plataforma eletroquímica de poli(2-AB)/EG para o desenvolvimento de um genossensor para a detecção dos SARS-CoV-2, uma vez que as análises do teste *t* mostraram significância estatística para os conjuntos amostrais, considerando uma confiabilidade de 95%.

Figura 34: Análise comparativa das alturas de pico obtidas para (●) genossensor, (●) amostras com RNA não complementar, (●) amostras positivas para COVID-19 e (●) possíveis interferentes que são consideradas amostras negativas para COVID-19 e positivas para Influenza A, Influenza B e HIV. Para cada conjunto temos n=10.



O teste *t* comprovou que o grupo de amostras positivas para COVID-19 é de fato diferente de todos os demais grupos ($p < 0,05$), enquanto os sinais obtidos para o genossensor, alvo não complementar e interferentes são considerados como equivalentes ($p > 0,05$), ou seja, a resposta do genossensor ou do genossensor na presença de amostras não específicas ou contendo possíveis interferentes são estatisticamente iguais entre si, enquanto que na presença de amostras positivas o sinal torna-se diferente de todos os demais grupos indicando a presença do SARS-CoV-2. Portanto, o genossensor conseguiu identificar a presença do SARS-CoV-2 em todas as amostras consideradas como positivas pelas análises de RT-PCR. O teste ainda evidencia que o dispositivo não sofre interferências de outros genomas virais testados como a Influenza A, Influenza B e HIV, além de não apresentar falsos-positivos para amostras que contém apenas o RNA não complementar.

Avaliando-se ainda a seletividade do genossensor, duas amostras contendo os RNAs virais do SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B foi testada utilizando o sistema desenvolvido neste trabalho. Para uma amostra contendo o genoma viral dos possíveis interferentes, o sistema apresentou um sinal de $328,6 (\pm 48,8) \mu\text{A}$. Desta forma, nota-se que, mesmo na presença de outros RNAs de infecções virais do trato respiratório, o sistema ainda é capaz de fornecer um resultado positivo para COVID-19 sem interferência, ou seja, o dispositivo poderia distinguir a COVID-19 de uma síndrome gripal comum.

Conhecendo-se a urgência do desenvolvimento de métodos rápidos, baratos e sensíveis para detecção de SARS-CoV com intuito de prover um diagnóstico para a COVID-19, diversas pesquisas buscaram descrever e desenvolver novos dispositivos, principalmente biossensores eletroquímicos. A Tabela 1 dispõe as principais características dos dispositivos já desenvolvidos permitindo a comparação entre eles.

Para Kim *et al* (2021) o dispositivo desenvolvido foi testado apenas em amostras plasmidiais, ou seja, o dispositivo não foi validado para detecção em amostras clínicas. Além disso, as sondas utilizadas possuem em sua estrutura uma modificação com um grupo tiol, processo esse que pode causar o encarecimento desse componente. Zhao *et al* (2021) conseguiram aplicar o seu sistema em uma grande variedade de matrizes amostrais, no entanto, ainda possui um limite de detecção alto quando comparado aos demais. Yakoh *et al* (2021) tem como princípio de detecção a interação antígeno-anticorpo, a mesma utilizada nos testes imunocromatográficos comercialmente disponíveis. Esse tipo de dispositivo apresenta problemas para detecção precoce da infecção, promovendo um diagnóstico eficaz somente após o 8º dia de infecção, mesmo oferecendo alta sensibilidade.

Tabela 1: Biossensores eletroquímicos para detecção do SARS-CoV-2.

Técnica ^a	Eletrodo ^b	Modificação ^c	Biorreceptor	Analito	Tipo	Amostra	Fixa linear	Limite de detecção	Referência
VPD	ECV	nPANI	Peptídeos	RNA	Genossensor	Soro	10 ⁻¹⁴ a 10 ⁻⁹ M	3,5 fM	(SONG <i>et al.</i> , 2021)
VPD	μAu	Sem modificação	Primers-tiol	RNA	Biosensor	Plasmídiais	10 ³ a 10 ⁹ cópias	0,972 fg/μL (RdRP gene) e 3,925 fg/μL (gene Nele)	(KIM <i>et al.</i> , 2021)
VPD	SPCE	HT/CP/Au@Fe ₃ O ₄	Primers	ORF1ab	Biosensor	Clínicas	10 ⁻¹⁷ a 10 ⁻¹² cópias	200 cópias/mL	(ZHAO <i>et al.</i> , 2021)
VOQ	ePAD	GO	Receptor Proteína Spike	Anticorpos	Imunossensor	Soro	1 to 1000 ng/mL	1 ng/mL	(YAKOH <i>et al.</i> , 2021)
VPD	SPCE	CB	Anticorpos	Proteínas S e N	Biosensor	Saliva	---	19 ng/mL (S) 8 ng/mL (N)	(FABIANI <i>et al.</i> , 2021)
VOQ	EIG	poli(2-AB)	cDNA	RNA viral	Genossensor	Swab nasofaringe	13,5 a 625 cópias/mL	3,89 cópias/mL	Este trabalho

^a: **VPD**: Voltametria de Pulso Diferencial; **VOQ**: Voltametria de Onda Quadrada.

^b: **ECV**: Eletrodo de carbono vítreo; **μAu**: microeletrodos de ouro em multi-arranjo; **SPCE**: Eletrodos impressos de carbono; **e-PAD**: Eletrodos baseados em papel.

^c: **nPANI**: Nanofios de polianilina polimerizado eletroquimicamente; **HT/CP/Au@Fe₃O₄**: Nanocompósito de Au@Fe₃O₄ com sonda de captura e hexano-1-tiol; **GO**: grafeno oxidado; **CB**: Carbon black; **poli(2-AB)**: Filmes poliméricos de poli(2-aminobenzamida).

As novas variantes do novo coronavírus que estão surgindo, possuem mutações na região S do seu genoma, uma região mais externa envolvida diretamente na sua interação com a célula hospedeira da pessoa infectada. Dessa forma, testes baseados na detecção dessa região ou sua proteína respectiva podem perder a validade para testagem das novas variantes. Fabiani *et al* (2021) desenvolveram um dispositivo baseado na detecção dessa região concomitantemente com a região N do vírus. Mesmo apresentando baixos limites de detecção e sendo capaz de detectar a presença do genoma do SARS-CoV-2 a partir da sua região N, a sensibilidade do dispositivo pode ser comprometida quando utilizado para detectar as novas variantes. Song *et al* (2021) propuseram um dispositivo muito promissor e aplicável em amostras sorológicas complexas com baixo limite de detecção. No entanto, o sistema de reconhecimento biológico utiliza-se peptídeos e sondas marcados com biotina, o que pode tornar a construção do dispositivo mais complexa e de custo mais alto.

O método proposto neste trabalho possui princípio de construção simples e de baixo custo, com detecção de uma região conservada do genoma viral (N-gene) e aplicável em amostras clínicas. Além disso, o sistema foi capaz de identificar a presença do SARS-CoV-2 em todas as amostras testadas sem sofrer efeito de possíveis interferências devido à presença de outros RNAs virais, tornando-o promissor para utilização como método auxiliar ao diagnóstico realizado pelo padrão ouro (RT-PCR) além de interessante devido à rapidez na obtenção dos resultados (10 minutos), alta seletividade e simplicidade.

6 – CONSIDERAÇÕES SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO DURANTE A PANDEMIA

Na data de ingresso no Programa de Pós-Graduação em Química da UFVJM, especificamente em agosto de 2019, ainda não havia sido decretado o estado de pandemia causado pela COVID-19. Desta forma, a proposta inicial de trabalho era o desenvolvimento de um genossensor eletroquímico para detecção do papilomavírus humano (HPV). Entretanto, apesar de ter iniciado os estudos para o desenvolvimento deste projeto, principalmente aqueles relacionados ao desenho e investigação dos oligonucleotídeos de regiões conservadas do HPV, bem como a síntese destas sondas, no início de 2020, fomos informados pelos nossos colaboradores que não seria mais possível a disponibilização das amostras de pacientes com HPV, em virtude de um imprevisto relacionado a perda das amostras, por motivos de força maior no banco de amostragem.

Logo após receber essa informação, no Brasil e no mundo a pandemia causada pela COVID-19 já estava em alta, causando efeitos devastadores. Posteriormente, em meados de abril de 2020, na UFVJM o Laboratório-Escola de Análises Clínicas foi credenciado oficialmente junto a FUNED para realização do diagnóstico da doença, onde meu orientador e coorientador participaram efetivamente desta ação, e seria possível a utilização de amostras já validadas pelo RT-PCT. Desta forma, optou-se por uma mudança nos objetivos da proposta inicial do projeto de mestrado, onde o mesmo foi totalmente alterado para o desenvolvimento de um genossensor eletroquímico para o diagnóstico do SARS-CoV-2.

Em consequência, apesar do curto período para execução do plano de trabalho proposto, considerando o estado de pandemia, restrições parciais no acesso às dependências dos laboratórios da UFVJM, e ainda, falta de recursos, todas as etapas propostas foram cumpridas, dentro do possível, sendo a principal restrição para realização de ensaios adicionais o número limitado de eletrodos impressos disponíveis em nosso laboratório. Contudo, buscamos apresentar nesta dissertação aqueles resultados que consideramos promissores ao desenvolvimento e aplicação da plataforma eletroquímica.

7 – CONCLUSÃO

No presente trabalho foi realizada a investigação e caracterização eletroquímica da oxidação da 2-aminobenzamida, bem como da formação de seu respectivo polímero. Foi possível observar que o polímero formado sobre o eletrodo de grafite apresentou um comportamento pouco resistivo, através de uma reação de oxidação irreversível do monômero. Os estudos, ainda, apresentam o espectro de infravermelho do monômero e do filme polimérico, evidenciando os grupos funcionais envolvidos na reação, podendo, dessa forma, propor um mecanismo de polimerização eletroquímica para o material.

Além disso, foi possível avaliar a influência dos parâmetros de formação da plataforma funcionalizada, e da etapa de imobilização do elemento de reconhecimento biológico na sensibilidade do genossensor, percebendo que para o sistema estudado, a otimização desses parâmetros alterou a sensibilidade do método. O trabalho examinou a relevância da diluição da amostra na sensibilidade, evidenciando que o genossensor desenvolvido é capaz de identificar o RNA viral em amostras com diluição na ordem de 10^5 . No entanto, as limitações do sistema e da técnica permitem somente perceber que o dispositivo consegue identificar concentrações muito baixas de genoma do Sars-CoV-2, mas não permite estabelecer os LOD e LOQ.

O genossensor eletroquímico se mostrou promissor para análise de amostras clínicas obtidas de *swab* nasofaríngeal, uma vez que conseguiu diferenciar os sinais de todas as amostras positivas testadas daqueles para o genossensor e para amostras negativas com 95% de confiança. O método foi capaz de diferenciar o sinal para amostras de SARS-CoV-2 de possíveis interferentes como: HIV, Influenza A e Influenza B. Além disso, o genossensor conseguiu identificar o SARS-CoV-2 concomitante as Influenzas A e B.

Como perspectivas, e considerando os resultados obtidos tanto na detecção do RNA do Sars-CoV-2 em amostras plasmodiais quanto em amostras clínicas, o método dispõe de potencial para ser utilizado como diagnóstico auxiliar ao RT-PCR em tempo real, fornecendo um resultado específico e sensível em curto tempo de reação (10 min). Entretanto, estudos do efeito da matriz precisam ser investigados de modo a aumentar a seletividade do sistema e diminuir possíveis possibilidades de falsos positivos. Além disso, o método utiliza de interações específicas com regiões conservadas do genoma viral. Dessa forma, conhecendo-se o código genético das variantes que surgiram e certificando-se que a sequência genética da região complementar às sondas aqui utilizadas, é possível que a identificação dessas variantes seja possibilitada pelo genossensor proposto.

8 – REFERÊNCIAS

- ABOLHASAN, Rozita *et al.* Application of hairpin DNA-based biosensors with various signal amplification strategies in clinical diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 129, p. 164–174, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.01.008>
- ALHADRAMI, Hani A. Biosensors: Classifications, medical applications, and future prospective. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [s. l.], v. 65, n. 3, p. 497–508, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bab.1621>
- AMBAYE, Abera Demeke *et al.* Recent developments in nanotechnology-based printing electrode systems for electrochemical sensors. **Talanta**, [s. l.], v. 225, p. 121951, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121951>
- BAKADIA, Bianza Moise *et al.* Prevention and treatment of COVID-19: Focus on interferons, chloroquine/hydroxychloroquine, azithromycin, and vaccine. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 133, p. 111008, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111008>
- BARD, Allen J.; FAULKNER, Larry R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2nd. ed. [S. l.: s. n.], 2000.
- BASAVARAJU, Sridhar V *et al.* Serologic Testing of US Blood Donations to Identify Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)–Reactive Antibodies: December 2019–January 2020. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 72, n. 12, p. e1004–e1009, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1785>
- BASHIR, Musavir; RAJENDRAN, Parvathy. A review on electroactive polymers development for aerospace applications. **Journal of Intelligent Material Systems and Structures**, [s. l.], v. 29, n. 19, p. 3681–3695, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1045389X18798951>
- BLOOM, Jesse D *et al.* Investigate the origins of COVID-19. **Science**, [s. l.], v. 372, n. 6543, p. 694 LP – 694, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.abj0016>
- CAMARGO, Jéssica Rocha *et al.* Development of conductive inks for electrochemical sensors and biosensors. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 164, p. 105998, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.105998>
- CARR, Olívia. **Desenvolvimento de genossensor para a detecção precoce de câncer de cabeça e pescoço**. São Carlos: [s. n.], 2019.
- CHEMICALIZE. **Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://chemicalize.com/app/calculation/2-aminobenzamide>. Acesso em: 7 jul. 2021.
- CORDEIRO, Taís Aparecida Reis *et al.* Electrochemical biosensors for neglected tropical diseases: A review. **Talanta**, [s. l.], v. 234, p. 122617, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122617>
- CORDEIRO, Taís Aparecida Reis *et al.* Impedimetric immunosensor for rapid and

simultaneous detection of chagas and visceral leishmaniasis for point of care diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 169, p. 112573, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112573>

COUTO, R A S; LIMA, J.L.F.C.; QUINAZ, M B. Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis. **Talanta**, [s. l.], v. 146, p. 801–814, 2016. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.011>

DE OLIVEIRA, Fabiano M; DE MELO, Edmar I; DA SILVA, Rodrigo A B. 3D Pen: A low-cost and portable tool for manufacture of 3D-printed sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [s. l.], v. 321, p. 128528, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128528>

DENG, X; BAKER, S C. Coronaviruses: Molecular Biology (Coronaviridae). In: BAMFORD, Dennis H; ZUCKERMAN, Mark B T - Encyclopedia of Virology (Fourth Edition) (org.). Oxford: Academic Press, 2021. p. 198–207. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814515-9.02550-9>

ERDEM, Arzum *et al.* Detection of Interaction Between Metal Complex Indicator and DNA by Using Electrochemical Biosensor. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 11, n. 18, p. 1372–1376, 1999. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4109\(199912\)11:18<1372::AID-ELAN1372>3.0.CO;2-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4109(199912)11:18<1372::AID-ELAN1372>3.0.CO;2-4)

ERDEM, Arzum *et al.* Methylene Blue as a Novel Electrochemical Hybridization Indicator. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 219–223, 2001. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200103\)13:3<219::AID-ELAN219>3.0.CO;2-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1521-4109(200103)13:3<219::AID-ELAN219>3.0.CO;2-7)

ERDEM, Arzum *et al.* Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 422, n. 2, p. 139–149, 2000. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01058-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01058-8)

ERDEM, Arzum; KARADENIZ, Hakan; CALISKAN, Ayfer. Dendrimer modified graphite sensors for detection of anticancer drug Daunorubicin by voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. **Analyst**, [s. l.], v. 136, n. 5, p. 1041–1045, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C0AN00357C>

FABIANI, Laura *et al.* Magnetic beads combined with carbon black-based screen-printed electrodes for COVID-19: A reliable and miniaturized electrochemical immunosensor for SARS-CoV-2 detection in saliva. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 171, p. 112686, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112686>

FARJAMI, Elaheh *et al.* DNA interactions with a Methylene Blue redox indicator depend on the DNA length and are sequence specific. **Analyst**, [s. l.], v. 135, n. 6, p. 1443–1448, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C0AN00049C>

FERREIRA, Danielly Santos Campos. **DESENVOLVIMENTO DE GENOSENSORES PARA O DIAGNÓSTICO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)**. 120 f. 2014. -

Universidade Federal de Pernambuco, [s. l.], 2014.

FOODB. **Showing Compound 2-Aminobenzamide (FDB012155)**. [s. l.], 2021. Disponível em: <https://foodb.ca/compounds/FDB012155>. Acesso em: 6 jul. 2021.

GARCÍA-MIRANDA FERRARI, Alejandro; ROWLEY-NEALE, Samuel J; BANKS, Craig E. Screen-printed electrodes: Transitioning the laboratory in-to-the field. **Talanta Open**, [s. l.], v. 3, p. 100032, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100032>

GONG, Shu-ran; BAO, Lin-lin. The battle against SARS and MERS coronaviruses: Reservoirs and Animal Models. **Animal Models and Experimental Medicine**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 125–133, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ame2.12017>

GOOCH, James *et al.* Developing aptasensors for forensic analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 94, p. 150–160, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.07.019>

GOOGLE NEWS. **Coronavirus (Covid-19)**. [s. l.], 2021. Disponível em: <https://news.google.com/covid19/map?hl=pt-BR&gl=BR&ceid=BR%3Apt-419&state=1>. Acesso em: 7 jun. 2021.

GUO, Yan-Rong *et al.* The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. **Military Medical Research**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00240-0>

HAN, Tingting *et al.* Recent advances in detection technologies for COVID-19. **Talanta**, [s. l.], v. 233, p. 122609, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122609>

HEINZE, Jürgen; FRONTANA-URIBE, Bernardo A; LUDWIGS, Sabine. Electrochemistry of Conducting Polymers—Persistent Models and New Concepts. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 110, n. 8, p. 4724–4771, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr900226k>

HOCEVAR, Marcele Arais. **Biossensores Estruturados com Polímeros Condutores para Detecção de Glicose**. 147 f. 2016. - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [s. l.], 2016.

HUANG, Chaolin *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, [s. l.], v. 395, n. 10223, p. 497–506, 2020. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)

HUANG, Qingrui; ZENG, Jiawei; YAN, Jinghua. COVID-19 mRNA vaccines. **Journal of Genetics and Genomics**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 107–114, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.02.006>

HUANG, Rongrong; HE, Nongyue; LI, Zhiyang. Recent progresses in DNA nanostructure-based biosensors for detection of tumor markers. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 109, p. 27–34, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.02.053>

HUANG, Xiaoping; ZHU, Yufang; KIANFAR, Ehsan. Nano Biosensors: Properties,

applications and electrochemical techniques. **Journal of Materials Research and Technology**, [s. l.], v. 12, p. 1649–1672, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.03.048>

JOHNSTON, Dean H; THORP, H Holden. Cyclic Voltammetry Studies of Polynucleotide Binding and Oxidation by Metal Complexes: Homogeneous Electron-Transfer Kinetics. **The Journal of Physical Chemistry**, [s. l.], v. 100, n. 32, p. 13837–13843, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jp960252f>

KIM, Hyo Eun *et al.* Sensitive electrochemical biosensor combined with isothermal amplification for point-of-care COVID-19 tests. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 182, p. 113168, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113168>

KOH, Wee Chian *et al.* Containing COVID-19: Implementation of Early and Moderately Stringent Social Distancing Measures Can Prevent The Need for Large-Scale Lockdowns. **Annals of global health**, [s. l.], v. 86, n. 1, p. 88, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5334/aogh.2969>

LABTEST. **LABTEST LANÇA TESTE RÁPIDO PARA COVID-19**. [S. l.], 2020.

LEFEBVRE, M *et al.* COVID-19 vaccines: Frequently asked questions and updated answers. **Infectious Diseases Now**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 319–333, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idnow.2021.02.007>

LIMA, Thaís Machado *et al.* A novel electrochemical sensor for simultaneous determination of cadmium and lead using graphite electrodes modified with poly(p-coumaric acid). **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 168, p. 106406, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106406>

LISBOA BASTOS, Mayara *et al.* Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, [s. l.], v. 370, p. m2516, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmj.m2516>

LIU, Ding X; LIANG, Jia Q; FUNG, To S. Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae). In: BAMFORD, Dennis H; ZUCKERMAN, Mark B T - Encyclopedia of Virology (Fourth Edition) (org.). Oxford: Academic Press, 2021. p. 428–440. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21501-X>

LIU, Junli; LI, Jinghong; DONG, Shaojun. Interaction of brilliant cresyl blue and methylene green with DNA studied by spectrophotometric and voltammetric methods. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 8, n. 8–9, p. 803–807, 1996. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elan.1140080818>

LIU, Shenghui *et al.* Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 335, n. 3, p. 239–243, 1996. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(96\)00331-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-2670(96)00331-5)

MANZANARES-PALENZUELA, C Lorena *et al.* Electrochemical genosensors as innovative tools for detection of genetically modified organisms. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 66, p. 19–31, 2015. Disponível em:

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.10.006>

MARRAZZA, G; CHIANELLA, I; MASCINI, M. Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 43–51, 1999. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(98\)00102-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0956-5663(98)00102-X)

MARTÍN-YERGA, Daniel *et al.* Point-of-need simultaneous electrochemical detection of lead and cadmium using low-cost stencil-printed transparency electrodes. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 981, p. 24–33, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.027>

MATTOS DOS SANTOS, Rodrigo. Isolation, social stress, low socioeconomic status and its relationship to immune response in Covid-19 pandemic context. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, [s. l.], v. 7, p. 100103, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbih.2020.100103>

MEHRVAR, Mehrab; ABDI, Mustafe. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. **Analytical Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 1113–1126, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.2116/analsci.20.1113>

MINCU, Nicolae-Bogdan *et al.* **Screen-Printed Electrodes (SPE) for In Vitro Diagnostic Purpose**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/diagnostics10080517>

MISTRY, Kalyan Kumar *et al.* A review on amperometric-type immunosensors based on screen-printed electrodes. **The Analyst**, [s. l.], v. 139, n. 10, p. 2289, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c3an02050a>

MOBED, Ahmad; SEPEHRI SHAFIGH, Ebrahim. Biosensors promising bio-device for pandemic screening “COVID-19“. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 164, p. 106094, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106094>

MOHAMMADI, Hasna; YAMMOURI, Ghita; AMINE, Aziz. Current advances in electrochemical genosensors for detecting microRNA cancer markers. **Current Opinion in Electrochemistry**, [s. l.], v. 16, p. 96–105, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coelec.2019.04.030>

MUÑOZ, Jose; PUMERA, Martin. 3D-printed biosensors for electrochemical and optical applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 128, p. 115933, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115933>

MUSA, Auwal M *et al.* Recent progress in screen-printed electrochemical sensors and biosensors for the detection of estrogens. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 139, p. 116254, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116254>

NUR, Yuspian *et al.* Applications of electrochemical biosensor of aptamers-based (APTASENSOR) for the detection of leukemia biomarker. **Sensing and Bio-Sensing Research**, [s. l.], v. 32, p. 100416, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2021.100416>

OLIVEIRA, J. *et al.* Uso de polímeros condutores em sensores parte 3: biossensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, [s. l.], v. 1, p. 1–11, 2013.

PALEČEK, Emil *et al.* Chronopotentiometric stripping of DNA at mercury electrodes. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 9, n. 13, p. 990–997, 1997. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elan.1140091305>

PAN, Hongchao *et al.* Repurposed antiviral drugs for COVID-19 –interim WHO SOLIDARITY trial results. **medRxiv**, [s. l.], p. 2020.10.15.20209817, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.10.15.20209817>

PATRA, Asit; KUMAR, Rachana; CHAND, Suresh. Selenium-Containing π -Conjugated Polymers for Organic Solar Cells. **Israel Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 54, n. 5–6, p. 621–641, 2014. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijch.201400052>

PAVÃO, Ana Luiza *et al.* **Nota Técnica: Considerações sobre o diagnóstico laboratorial da Covid-19 no Brasil.** [S. l.: s. n.], 2020.

PEREPICHKA, I. F. *et al.* Light-Emitting Polythiophenes. **Advanced Materials**, [s. l.], v. 17, n. 19, p. 2281–2305, 2005. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adma.200500461>

PÉREZ-LÓPEZ, Briza; MIR, Mònica. Commercialized diagnostic technologies to combat SARS-CoV2: Advantages and disadvantages. **Talanta**, [s. l.], v. 225, p. 121898, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121898>

PILKINGTON, Emily H *et al.* From influenza to COVID-19: Lipid nanoparticle mRNA vaccines at the frontiers of infectious diseases. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.06.023>

PIVIDORI, M I; MERKOÇI, A; ALEGRET, S. Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 291–303, 2000. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(00\)00071-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0956-5663(00)00071-3)

POTYRAILO, Radislav A. Polymeric Sensor Materials: Toward an Alliance of Combinatorial and Rational Design Tools? **Angewandte Chemie International Edition**, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 702–723, 2006. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.200500828>

PUIU, Mihaela; MIRCESKI, Valentin; BALA, Camelia. Paper-based diagnostic platforms and devices. **Current Opinion in Electrochemistry**, [s. l.], v. 27, p. 100726, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coelec.2021.100726>

SAIDUR, M R; AZIZ, A R Abdul; BASIRUN, W J. Recent advances in DNA-based electrochemical biosensors for heavy metal ion detection: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 90, p. 125–139, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.039>

SANTOS, Cátia da Cruz *et al.* Electropolymerization of phenol and aniline derivatives: Synthesis, characterization and application as electrochemical transducers. **Journal of**

Electroanalytical Chemistry, [s. l.], v. 846, p. 113163, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.05.045>

SHRIVAS, Kamlesh *et al.* Advances in flexible electronics and electrochemical sensors using conducting nanomaterials: A review. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 156, p. 104944, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104944>

SMART, A *et al.* Screen-printed carbon based biosensors and their applications in agri-food safety. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 127, p. 115898, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115898>

SNOOK, Graeme A; KAO, Pon; BEST, Adam S. Conducting-polymer-based supercapacitor devices and electrodes. **Journal of Power Sources**, [s. l.], v. 196, n. 1, p. 1–12, 2011. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2010.06.084>

SONG, Zhen *et al.* Electrochemical Biosensor with Enhanced Antifouling Capability for COVID-19 Nucleic Acid Detection in Complex Biological Media. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 93, n. 14, p. 5963–5971, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00724>

STEINER, Alexandre A. Should we let fever run its course in the early stages of COVID-19? **Journal of the Royal Society of Medicine**, [s. l.], v. 113, n. 10, p. 407–409, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0141076820951544>

SURESH, Raghavv Raghavender *et al.* Fabrication of screen-printed electrodes: opportunities and challenges. **Journal of Materials Science**, [s. l.], v. 56, n. 15, p. 8951–9006, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10853-020-05499-1>

SVITKOVÁ, Veronika; LABUDA, Ján. Construction of electrochemical DNA biosensors for investigation of potential risk chemical and physical agents. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, [s. l.], v. 148, n. 9, p. 1569–1579, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00706-017-2012-y>

TIAN, Qingyun *et al.* Three-dimensional PEDOT composite based electrochemical sensor for sensitive detection of chlorophenol. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 837, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.01.055>

TOSAR, J P; BRAÑAS, G; LAÍZ, J. Electrochemical DNA hybridization sensors applied to real and complex biological samples. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 1205–1217, 2010. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.08.053>

TUDORACHE, Madalina; BALA, Camelia. Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 388, n. 3, p. 565–578, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1293-0>

VASILESCU, Alina *et al.* **Electrochemical Affinity Biosensors Based on Disposable Screen-Printed Electrodes for Detection of Food Allergens**. [S. l.: s. n.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/s16111863>

WANG, Joseph *et al.* Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 326, n. 1, p. 141–147, 1996. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2670\(96\)00042-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2670(96)00042-6)

WHO. **WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>. Acesso em: 10 ago. 2021.

WU, Qiaoyun *et al.* Review of Electrochemical DNA Biosensors for Detecting Food Borne Pathogens. **Sensors (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 19, n. 22, p. 4916, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/s19224916>

WU, Zhonglan *et al.* The unique features of SARS-CoV-2 transmission: Comparison with SARS-CoV, MERS-CoV and 2009 H1N1 pandemic influenza virus. **Reviews in Medical Virology**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. e2171, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/rmv.2171>

YAKOH, Abdulhadee *et al.* Paper-based electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: Detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 176, p. 112912, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112912>

YÁÑEZ-SEDEÑO, P *et al.* Biosensors in forensic analysis. A review. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 823, p. 1–19, 2014. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.03.011>

YANG, Wenrong *et al.* Evidence for the Direct Interaction Between Methylene Blue and Guanine Bases Using DNA-Modified Carbon Paste Electrodes. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 14, n. 18, p. 1299–1302, 2002. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200210\)14:18<1299::AID-ELAN1299>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1521-4109(200210)14:18<1299::AID-ELAN1299>3.0.CO;2-Y)

ZHAO, Hui *et al.* Ultrasensitive supersandwich-type electrochemical sensor for SARS-CoV-2 from the infected COVID-19 patients using a smartphone. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [s. l.], v. 327, p. 128899, 2021. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128899>



UFVJM