



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL de LONDRINA

---

MILENA DO PRADO FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR BIOMIMÉTICO DE POLIPIRROL BASEADO EM  
TECNOLOGIA DE IMPRESSÃO QUÍMICA E PRÉ-CONCENTRAÇÃO CONTROLADA  
ELETROQUIMICAMENTE VISANDO A DETERMINAÇÃO DE SARS-COV-2 EM  
AMOSTRA DE SALIVA**

---

Londrina

2024

MILENA DO PRADO FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR BIOMIMÉTICO DE POLIPIRROL BASEADO EM  
TECNOLOGIA DE IMPRESSÃO QUÍMICA E PRÉ-CONCENTRAÇÃO CONTROLADA  
ELETROQUIMICAMENTE VISANDO A DETERMINAÇÃO DE SARS-COV-2 EM  
AMOSTRA DE SALIVA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley

Londrina

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

F442d Ferreira, Milena do Prado.

Desenvolvimento de sensor biomimético de polipirrol baseado em tecnologia de impressão química e pré-concentração controlada eletroquimicamente visando a determinação de SARS-CoV-2 em amostra de saliva / Milena do Prado Ferreira. - Londrina, 2024.

139 f. : il.

Orientador: César Ricardo Teixeira Tarley.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2024.

Inclui bibliografia.

1. Polímero molecularmente impresso - Tese. 2. Glicoproteína spike - Tese. 3. Coronavírus - Tese. 4. Eletrosíntese - Tese. I. Tarley, César Ricardo Teixeira . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

MILENA DO PRADO FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR BIOMIMÉTICO DE POLIPIRROL BASEADO  
EM TECNOLOGIA DE IMPRESSÃO QUÍMICA E PRÉ-CONCENTRAÇÃO  
CONTROLADA ELETROQUIMICAMENTE VISANDO A DETERMINAÇÃO DE  
SARS-COV-2 EM AMOSTRA DE SALIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Roberta Antigo Medeiros  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Arnaldo César Pereira  
Universidade Federal de São João Del-Rei – UFSJ

---

Profa. Dra. Andressa Galli  
Universidade Estadual do Centro Oeste – UNICENTRO

Londrina, 19 de dezembro de 2024

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, que colocou pessoas nessa trajetória para me ajudar a enfrentar todos os desafios que surgiram ao longo desses anos. Seu cuidado e sua presença constante em minha vida foi fundamental para alcançar esta conquista.

Ao meu esposo Jean, que aceitou pagar o sacrifício junto comigo para que eu fosse atrás daquilo que eu queria. Se sujeitou à distância por um longo tempo, demonstrando seu amor, paciência e compreensão, que foram essenciais em cada etapa deste processo. Obrigada por ser minha rocha, meu conselheiro e por acreditar em mim, mesmo nos momentos em que eu mesma não acreditei. Seu apoio foi fundamental para que eu pudesse seguir em frente e alcançar este sonho.

Ao meu orientador, Professor Dr. César Ricardo Teixeira Tarley, minha mais profunda gratidão. Foram seis anos caminhando juntos, nos quais construí minha base como pesquisadora e pude aprender muitas coisas. Agradeço pelas conversas, pelos conselhos, pelas críticas, pelas oportunidades, pelas parcerias, pela credibilidade no meu trabalho. Mas, principalmente pela orientação, pelo apoio quando precisei, pela paciência, por relevar os desentendimentos, por me aceitar como orientada e por permitir trabalharmos juntos, com uma pessoa que admiro muito. O professor é um exemplo como profissional, que paga o sacrifício para alcançar a excelência, que se dedica sem limites, com certeza, isso impactou minha vida e impacta quem está a sua volta.

À minha família, que sempre foi meu alicerce, meu apoio incondicional. Aos meus pais, que me apoiaram nesta jornada de todas as formas possíveis, principalmente com suas orações. À minha mãe em especial, que me faz tanta falta, ela que sempre esteve presente, me apoiando e se alegrando com cada conquista da minha vida. À minha irmã, meus cunhados e cunhada, pelo carinho e por estarem sempre ao meu lado. Aos meus sogros, pela compreensão e incentivo. A Tia Adelia e o Tio Carlos que inúmeras vezes me acolheram em sua casa quando precisei.

Aos amigos que conquistei no LADEMA e GMPC pelo companheirismo, parceria e contribuições na execução deste trabalho, em especial ao meu amigo Felipe Gorla que me auxiliou nas análises, discussões, interpretações e com quem pude realizar várias parcerias durante o doutorado, pessoa que admiro muito e que sempre posso contar com ele. A minha amiga Luana Rocha, com que tive o prazer de

conviver mais de perto e que também me auxiliou nas análises e interpretações, e por toda troca de conhecimento científico. Minha amiga Luciane Effting que foi meu primeiro contato no grupo, obrigada por todo apoio, pela troca de conhecimento, pelos feriados que passamos juntas no laboratório, pelas risadas, por dividir o mesmo teto, por estar sempre presente. A Letícia Effting com quem também pude contar no doutorado e dividir meu dia-a-dia com ela!

A Maria Almeida (pessoa incrível) por toda ajuda nos tratamentos de dados, nas interpretações e nas trocas de conhecimentos, a Érica Romagnoli pelos artigos compartilhados, pelos conselhos e por trazer a alegria que só ela tem para o laboratório, a Beatriz Benuto por me ajudar em várias imagens ilustrativas desenvolvidas nesses quatro anos, como também por abrir as portas de sua casa sempre que precisei, juntamente com a Franciscara Tonholi e Paula Paulino. As minhas amigas Carol Santana, Carol Teixeira, Livia Ramazzoti e a Juliana Costa, que também fazem parte da “família” que ganhei nesses seis anos, que compartilharam comigo momentos de alegria e desafios.

A Ingrid Iagla, Diego Prudencio e Maisa Menck, amigos com quem trabalhei mais de perto e pude contribuir de alguma forma com os seus projetos, meu muito obrigada, pois aprendi muito caminhando com vocês. Também, agradeço minha amiga Sharise Berton que foi a minha maior incentivadora para prosseguir nesta jornada acadêmica, que no decorrer dos anos se tornou uma irmã para mim. Obrigada por despertar em mim essa paixão pela ciência, por todo direcionamento, pelos ensinamentos, pelos trabalhos em parceria, pelo apoio incondicional.

A todos vocês, agradeço pelo apoio, pelas palavras de incentivo e pelas risadas que tornaram esta jornada mais leve e agradável. Todos foram fundamentais para que eu mantivesse a motivação e o entusiasmo. O meu muito obrigado!

À Universidade Estadual de Londrina, meu sincero reconhecimento e gratidão. Esta instituição me proporcionou um ambiente de aprendizado e crescimento, oferecendo todos os recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço aos professores, colegas e funcionários, que contribuíram de diversas formas para a realização deste projeto.

Finalmente, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este momento fosse possível, meu muito obrigado. Esta conquista é fruto de um esforço coletivo e da colaboração de muitas pessoas que estiveram ao meu lado durante toda esta trajetória.

*"O sucesso é a soma de pequenos esforços  
repetidos dia após dia."*

**Robert Collier**

FERREIRA, Milena do Prado. **Desenvolvimento de sensor biomimético de polipirrol baseado em tecnologia de impressão química e pré-concentração controlada eletroquimicamente visando a determinação de SARS-CoV-2 em amostra de saliva.** 2024. 140 p. Tese de Doutorado em Química – Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

### Resumo

Dados os desafios inerentes aos métodos usualmente utilizados no diagnóstico da COVID-19, como a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR – técnica padrão ouro), a utilização do diagnóstico eletroquímico é uma forma oportuna de superar os inconvenientes relacionados ao longo tempo de resposta, à necessidade de profissionais qualificados e equipamentos caros. Sensores eletroquímicos baseados em Polímero Molecularmente Impresso (MIP) apresentam benefícios como simplicidade operacional, detecção no local, economia, menor quantidade de amostra, tempos de resposta mais rápidos e seletividade pronunciada. Portanto, neste trabalho foi desenvolvido uma nova abordagem para projetar um sensor eletroquímico altamente sensível e seletivo para a detecção da proteína *spike* SARS-CoV-2 (proteína S) em saliva. O sensor foi fabricado com base em polipirrol (PPy) eletropolimerizado com impressão molecular (MIP/PPy) em um eletrodo impresso de carbono (SPCE). Os parâmetros associados a síntese eletroquímica, como número de ciclos e as concentrações de monômero (Py) e molde (proteína S), foram otimizados para obter a melhor resposta eletroanalítica para proteína S. Como controle, polímeros não-impressos (NIP/PPy) foram sintetizados da mesma forma, na ausência da molécula molde. Todas as etapas de otimização foram monitoradas por voltametria cíclica (CV) e espectrometria de impedância eletroquímica (EIS) usando  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  como sonda redox. A morfologia dos sensores MIP/PPy e NIP/PPy foi avaliada por MEV e AFM. Inicialmente, a superfície do SPCE foi ativada com  $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$  utilizando 15 ciclos voltamétricos para aumentar a condutividade e remover possíveis contaminantes. Como esperado, a ativação foi confirmada pela redução na resistência à transferência eletrônica e pelo aumento no sinal da CV. Após a ativação, as melhores condições obtidas após a otimização da eletrossíntese foram definidas como: pirrol a  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ , proteína S a  $40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  e 4 ciclos. A seletividade do MIP/PPy em comparação ao NIP/PPy foi avaliada pela religação da proteína S (pH 7,3) na concentração de  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  por  $\sim 40 \text{ min}$ , seguido do monitoramento da sonda redox. Uma diminuição substancial na corrente de pico anódica da sonda foi observada ao usar o MIP/PPy. A detectabilidade do sensor foi ainda melhorada pela pré-concentração de proteína S controlada eletroquimicamente a  $0,6 \text{ V}$  durante  $1,0 \text{ min}$  no processo de religação, enquanto a seletividade do sensor foi mantida. Sob esta condição, foi observada uma melhoria notável na detectabilidade exibindo um limite de detecção baixo de  $6,8 \text{ fg mL}^{-1}$  e uma curva analítica na faixa de  $25,0\text{--}125,0 \text{ fg mL}^{-1}$  ( $R^2=0,996$ ). A repetibilidade avaliada em 10 sensores foi satisfatória com um desvio padrão relativo (RSD) de 2,8. Após a preparação do sensor, ele pode ser armazenado por até 14 dias sob refrigeração ( $4^\circ\text{C}$ ), mantendo uma eficiência na resposta de 85%. O MIP/PPy exibiu seletividade em relação à proteína S em comparação com antitripsina, albumina sérica humana (HAS), transferrina, HlgG e lisozima. Por fim, o sensor foi aplicado para detectar o vírus SARS-CoV-2 por meio da proteína S em três amostras de saliva de pacientes infectados e validadas por RT-PCR. Além disso, a recuperação obtida, de 91 a 103%, em amostras negativas com proteína S atestou a análise livre de interferência.

**Palavras-chave:** COVID-19, glicoproteína *spike*, pandemia, coronavírus, sensor MIP.

FERREIRA, Milena do Prado. **Development of a biomimetic polypyrrole sensor based on chemical imprinting technology and electrochemically controlled pre-concentration aimed at determining SARS-CoV-2 in a saliva sample.** 2024. 140 p. Thesis of PhD in Chemistry – Center of Exact Sciences, State University of Londria, 2024.

### Abstract

Given the inherent challenges of conventional methods for COVID-19 diagnosis, such as reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR, the gold standard technique), the use of electrochemical diagnostics offers a timely alternative to overcome limitations related to long response times, the need for highly skilled professionals, and expensive equipment. Electrochemical sensors based on Molecularly Imprinted Polymer (MIP) provide benefits such as operational simplicity, on-site detection, cost-effectiveness, reduced sample volume, faster response times, and pronounced selectivity. In this study, a novel approach was developed to design a highly sensitive and selective electrochemical sensor for the detection of the SARS-CoV-2 *spike* protein (S protein) in saliva. The sensor was fabricated using electropolymerized molecularly imprinted polypyrrole (MIP/PPy) on a screen-printed carbon electrode (SPCE). Parameters associated with the electrochemical synthesis, such as the number of cycles and the concentrations of monomer (Py) and template (S protein), were optimized to achieve the best electroanalytical response for the S protein. As a control, non-imprinted polymers (NIP/PPy) were synthesized similarly, in the absence of the template molecule. All optimization steps were monitored by cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) using  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  as the redox probe. The morphology of the MIP/PPy and NIP/PPy sensors was assessed using scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). Initially, the SPCE surface was activated with  $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$  using 15 voltammetric cycles to enhance conductivity and remove potential contaminants. As expected, activation was confirmed by a reduction in charge transfer resistance and an increase in CV signal. After activation, the optimal conditions for electrosynthesis were determined as follows: pyrrole at  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$ , S protein at  $40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , and 4 cycles. The selectivity of MIP/PPy compared to NIP/PPy was evaluated through the rebinding of S protein (pH 7.3) at a concentration of  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  for ~40 minutes, followed by monitoring the redox probe. A substantial decrease in the anodic peak current of the probe was observed with the use of MIP/PPy. The sensor's detectability was further enhanced by electrochemically controlled preconcentration of S protein at 0.6 V for 1.0 minute during the rebinding process, while maintaining sensor selectivity. Under these conditions, a remarkable improvement in detectability was observed, with a low limit of detection (LOD) of  $6.8 \text{ fg mL}^{-1}$  and an analytical curve in the range of  $25.0\text{--}125.0 \text{ fg mL}^{-1}$  ( $R^2 = 0.996$ ). The repeatability evaluated on 10 sensors was satisfactory, with a relative standard deviation (RSD) of 2.8%. After preparation, the sensor could be stored for up to 14 days under refrigeration ( $4^\circ\text{C}$ ), maintaining 85% of its response efficiency. The MIP/PPy exhibited selectivity toward the S protein compared to antitrypsin, human serum albumin (HSA), transferrin, HlgG, and lysozyme. Finally, the sensor was applied to detect the SARS-CoV-2 virus via the S protein in three saliva samples from infected patients validated by RT-PCR. Furthermore, the recovery obtained, from 91 to 103%, in samples negative with protein S attested to the interference-free analysis.

**Key words:** COVID-19, *spike* glycoprotein, pandemic, coronavirus, MIP sensor.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Estrutura típica da partícula viral SARS-CoV-2. ....	23
<b>Figura 2</b> – Arquitetura de domínio de cada monômero e modelos de simulação da proteína S do SARSCoV-2 (A e B), juntamente com as subunidades S1 (C) e S2 (D) de SARS-CoV-2. ....	24
<b>Figura 3</b> – Evolução clínica da COVID-19 e os testes utilizados por período de infecção. ....	27
<b>Figura 4</b> – Número de trabalhos publicados por ano sobre sensores eletroquímicos para diagnóstico de doenças entre 2013 e 2024. ....	28
<b>Figura 5</b> – Representação geral dos principais componentes de um imunossensor eletroquímico. O esquema descreve um imunossensor genérico baseado na detecção indireta (A) e direta (B). ....	30
<b>Figura 6</b> – Representação geral dos principais componentes e princípio de detecção de biossensores eletroquímicos de ácidos nucleicos clássicos (A) e <i>label-free</i> (B). .	31
<b>Figura 7</b> – Representação esquemática do processo de diferentes métodos de deposição para integração de MIPs em aplicações de sensores. ....	34
<b>Figura 8</b> – Representação esquemática do processo da síntese do sensor MIP fabricado por Hashemi e colaboradores, por meio da síntese em <i>bulk</i> , para detecção do vírus SARS-CoV-2. ....	36
<b>Figura 9</b> – Esquema representativo do processo de impressão molecular por <i>bulk</i> e por eletropolimerização. ....	38
<b>Figura 10</b> – Representação esquemática da síntese do sensor MIP/P-Arg baseado em L-arginina eletropolimerizada para detecção da proteína N, proposto por Zhang e colaboradores. ....	39

<b>Figura 11</b> – Representação esquemática da síntese do ncovS1-MIP para detecção da proteína S desenvolvido por Ayankojo e colaboradores (A). Esquema mostrando a interação covalente dos grupos carboidratos (esferas vermelhas) da proteína S glicosilado com o grupo ácido borônico do ácido 3-aminofenilborônico (B). .....	40
<b>Figura 12</b> – Representação esquemática da síntese do MIP em agulha de acupuntura para detecção da proteína S proposta por Yang e colaboradores. ....	41
<b>Figura 13</b> – Representação esquemática da síntese do sensor MIP baseado em 3-APBA eletropolimerizado para detecção da proteína S, proposto por Yin e colaboradores.....	42
<b>Figura 14</b> – Representação esquemática da síntese eletroquímica do polipirrol.....	46
<b>Figura 15</b> – Estruturas de PPy neutro (A) e oxidado, nas formas pôlaron (B) e bipôlaron (C). +: carga; •: elétron desemparelhado.....	47
<b>Figura 16</b> – Imagem ilustrativa de um eletrodo impresso de carbono. ....	54
<b>Figura 17</b> – Esquema ilustrativo do processo de fabricação dos sensores MIP/PPy e NIP/PPy.....	57
<b>Figura 18</b> – Voltamogramas cíclicos (A) e diagramas de Nyquist (B) para os eletrodos impressos de carbono, não ativado e ativados com KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> e H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 e 0,5 mol L <sup>-1</sup> em sonda redox. Condições de medidas: ferricianeto de potássio 5,0 mmol L <sup>-1</sup> e KCl 1,0 mol L <sup>-1</sup> como eletrólito suporte, velocidade de varredura na CV de 50 mV s <sup>-1</sup> e intervalo de frequência na EIS de 100 kHz a 0.01 Hz.....	62
<b>Figura 19</b> – Voltamogramas cíclicos obtidos durante a eletropolimerização dos sensores MIP/PPy em diferentes concentrações do pirrol. Condições de síntese: KCl 0,01 mol L <sup>-1</sup> , PBS 50 mmol L <sup>-1</sup> (pH 7,3), proteína S 40 µg mL <sup>-1</sup> e 4 ciclos na eletropolimerização. Faixa de potencial aplicada entre -0,2 a 1,2 V, velocidade de varredura de 100 mV s <sup>-1</sup> . ....	66

<b>Figura 20</b> – Valores de delta de corrente em função da concentração de pirrol usada na eletropolimerização dos sensores MIP/PPy e NIP/PPy (n = 3). Condições: proteína S 40 µg mL <sup>-1</sup> , KCl 0,01 mol L <sup>-1</sup> , PBS 50 mmol L <sup>-1</sup> (pH 7,3) e 4 ciclos na eletropolimerização; religação com 100 ng mL <sup>-1</sup> de proteína S; medias em sonda redox [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> 5,0 mmol L <sup>-1</sup> em KCl 1,0 mol L <sup>-1</sup> .....	68
<b>Figura 21</b> – Voltamogramas de pulso diferencial para sonda redox [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> antes e após religação de 100 ng mL <sup>-1</sup> de proteína S em sensores MIP/PPy fabricados com diferentes concentrações de Py. Condições: sonda redox [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> 5 mmol L <sup>-1</sup> em KCl 1 mol L <sup>-1</sup> .....	69
<b>Figura 22</b> – Valores de delta de corrente em função da concentração de proteína S na etapa de religação para os sensores MIP/PPy e NIP/PPy (n = 3). Condições: Py 0,3 mol L <sup>-1</sup> , proteína S 40 µg mL <sup>-1</sup> , KCl 0,01 mol L <sup>-1</sup> , PBS 50 mmol L <sup>-1</sup> (pH 7,3) e 4 ciclos na eletropolimerização; medidas em sonda redox [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> 5,0 mmol L <sup>-1</sup> em KCl 1,0 mol L <sup>-1</sup> . .....	70
<b>Figura 23</b> – Valores de delta de corrente em função da concentração de proteína S usada na eletropolimerização do sensor MIP/PPy (n = 3). Condições: Py 0,3 mol L <sup>-1</sup> , KCl 0,01 mol L <sup>-1</sup> e PBS 50 mmol L <sup>-1</sup> (pH 7,3), 4 ciclos de eletropolimerização; religação realizada com 10 ng mL <sup>-1</sup> proteína S; sonda redox [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> 5,0 mmol L <sup>-1</sup> em KCl 1,0 mol L <sup>-1</sup> . .....	71
<b>Figura 24</b> – Valores de delta de corrente em função do número de ciclos empregado na eletropolimerização do sensor MIP/PPy (n = 3). Condições: Py 0,3 mol L <sup>-1</sup> , proteína S 40 µg mL <sup>-1</sup> , KCl 0,01 mol L <sup>-1</sup> e PBS 50 mmol L <sup>-1</sup> (pH 7,3) na eletropolimerização; religação com 10 ng mL <sup>-1</sup> proteína S, medidas em sonda redox [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> 5,0 mmol L <sup>-1</sup> em KCl 1,0 mol L <sup>-1</sup> .....	73

**Figura 25** – Voltamogramas de pulso diferencial para sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  referente ao estudo da quantidade de ciclos na eletropolimerização para obtenção do sensor MIP/PPy em resposta à religação de  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  proteína S (n = 3). Condições: Py  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ , proteína S  $40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , KCl  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  e PBS  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 7,3) na eletropolimerização; medidas em sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$   $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em KCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ . .....73

**Figura 26** – Valores de delta de corrente obtidos no estudo do efeito do tempo de remoção da proteína S usando HAc 10% e SDS 0,2% para os sensores MIP/PPy e NIP/PPy (n = 3). Condições: Py  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ , proteína S  $40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , KCl  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , PBS  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 7,3) e 4 ciclos na eletropolimerização; religação com  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  de proteína S; medidas em sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$   $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em KCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  .....76

**Figura 27** – Valores de corrente obtidos para proteína S no estudo de reusabilidade do sensor MIP/PPy (n = 3). Condições: tempo de remoção de 2 h, religação com  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  de proteína S, medidas em ferricianeto de potássio  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em KCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  .....77

**Figura 28** – Voltamogramas cíclicos, voltamogramas de pulso diferencial e diagramas de Nyquist para sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  referente as etapas de fabricação dos sensores MIP/PPy (A, C e D) e NIP/PPy (B, D e F). Condições: eletropolimerização realizada com Py  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ , proteína S  $40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , 4 ciclos; religação com  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  de proteína S; medidas em sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$   $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em KCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  .....79

**Figura 29** – Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos eletrodos SPCE sem modificação, MIP /PPy e NIP/PPy após a eletropolimerização e, após a remoção para o MIP/PPy e NIP/PPy. Ampliações de 6.000 vezes e 30.000 vezes. ....84

<b>Figura 30</b> – Imagens de microscopia de força atômica dos eletrodos SPCE sem modificação, MIP/PPy e NIP/PPy após a eletropolimerização e, MIP/PPy e NIP/PPy após a remoção.....	85
<b>Figura 31</b> – Fotografias da gota de água estática sobre superfície dos eletrodos e seus respectivos valores dos ângulos de contato obtidos após cada etapa de fabricação dos sensores MIP/PPy e NIP/PPy. ....	90
<b>Figura 32</b> – A) Valores de delta de corrente em função da concentração do tampão usado na pré-concentração da proteína S no sensor MIP/PPy. Condições: +0,5 V por 1 minuto (n = 3). B) Voltamogramas de pulso diferencial para sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ após religação com tampão e da proteína S. Religação com PBS 0,5 mmol L <sup>-1</sup> e de 100 fg mL <sup>-1</sup> de proteína S em PBS 0,5 mmol L <sup>-1</sup> (n = 3).....	92
<b>Figura 33</b> – Valores de delta de corrente em função do tempo de acumulação (A) e do potencial aplicado (B) na pré-concentração de 100 fg mL <sup>-1</sup> de proteína S no sensor MIP/PPy (n = 4). Condições: sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L <sup>-1</sup> em KCl 1,0 mol L <sup>-1</sup> .....	94
<b>Figura 34</b> – Voltamogramas de pulso diferencial para sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em KCl 1 mol L <sup>-1</sup> após a pré-concentração de 100 fg mL <sup>-1</sup> de proteína S para o MIP/PPy e o NIP/PPy.....	95
<b>Figura 35</b> – Voltamogramas de pulso diferencial (A) após religação de diferentes concentrações de proteína S (25, 30, 40, 50, 65, 80, 90, 100, 115, 125 fg mL <sup>-1</sup> ). Curva analítica (B) para proteína S utilizando o sensor MIP/PPy (n = 3). Condições: sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5 mmol L <sup>-1</sup> em eletrólito suporte KCl 1 mol L <sup>-1</sup> .....	97
<b>Figura 36</b> – Isotherma de ligação do sensor MIP/PPy em diferentes concentrações de proteína S SARS-CoV-2 (0,32; 0,39; 0,52; 0,64; 0,84; 1,03; 1,16; 1,29; 1,48; 1,61	

fmol L<sup>-1</sup>). Condições: sonda redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 5 mmol L<sup>-1</sup> em eletrólito suporte KCl 1 mol L<sup>-1</sup>..... 100

**Figura 37** – Valores de delta de corrente obtidos para diferentes proteínas em comparação a proteína S no estudo de seletividade do sensor MIP/PPy (n = 3). Condições: sonda redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 5 mmol L<sup>-1</sup> em eletrólito suporte KCl 1 mol L<sup>-1</sup>.

..... 104

**Figura 38** – Voltamogramas cíclicos e valores de delta de corrente de 10 sensores MIP/PPy após a religação de 100 fg mL<sup>-1</sup> de proteína S. Condições: sonda redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 5 mmol L<sup>-1</sup> em eletrólito suporte KCl 1 mol L<sup>-1</sup>.

..... 105

**Figura 39** – Valores das porcentagens obtidas no estudo de estabilidade do sensor MIP/PPy (n = 3) por 14 dias. Condições: religação com 100 fg mL<sup>-1</sup> de proteína S; medidas em sonda redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 5 mmol L<sup>-1</sup> em eletrólito suporte KCl 1 mol L<sup>-1</sup>.

..... 106

**Figura 40** – Voltamogramas de pulso diferencial para sonda redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 5 mmol L<sup>-1</sup> em solução KCl 1 mol L<sup>-1</sup> para o sensor MIP/PPy após incubação de saliva diluída em 0,5 mmol L<sup>-1</sup> PBS (n = 3). Diluições de A) 50 vezes, B) 100 vezes, C) 150 vezes e D) 200 vezes.

..... 107

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Parâmetros voltamétricos e de impedância eletroquímica para os SPCEs não ativado e ativados com KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> e H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 e 0,5 mol L <sup>-1</sup> . Condições de medidas: ferricianeto de potássio 5,0 mmol L <sup>-1</sup> em KCl 1,0 mol L <sup>-1</sup> . .....	63
<b>Tabela 2</b> – Valores de resistências (R), capacitância (Q), resistência à difusão (W) e valor estatístico X <sup>2</sup> para cada etapa de fabricação dos sensores MIP/PPy e NIP/PPy. Condições: sonda redox [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> 5 mmol L <sup>-1</sup> em eletrólito suporte KCl 1 mol L <sup>-1</sup> . .....	82
<b>Tabela 3</b> – Resumo dos dados obtidos na análise de AFM para SPCE, MIP/PPy e NIP/PPy antes e após a remoção da molécula molde. ....	88
<b>Tabela 4</b> – Comparação do sensor MIP/PPy com outros sensores e biossensores eletroquímicos para detecção da proteína S do SARS-CoV-2. ....	102
<b>Tabela 5</b> – Porcentagem de recuperação de proteína S em saliva de pacientes saudáveis em ensaios de adição e recuperação, em detecção voltamétrica empregando o sensor MIP/PPy (n = 2). ....	108
<b>Tabela 6</b> – Concentração de proteína S encontrada em saliva de pacientes infectados com COVID-19 empregando o sensor MIP/PPy (n = 2). ....	109

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2	<i>Angiotensin-converting enzyme type 2</i> – Enzima conversora de angiotensina tipo 2
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> – Microscopia de força atômica
AuNP	Nanopartícula de prata
CV	<i>Cyclic voltammetry</i> – Voltametria cíclica
DPV	<i>Differential pulse voltammetry</i> – Voltametria de pulso diferencial
EIS	<i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i> – Espectroscopia de impedância eletroquímica
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
HAc	Ácido acético
HlgG	<i>Human immunoglobulin G</i> – Imunoglobina G humana
HSA	<i>Human serum albumin</i> – Albumina sérica humana
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> – União Internacional de Química Pura e Aplicada
LAMP	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i> – Amplificação isotérmica mediada por loop
LD	Limite de detecção
LFT	<i>Lateral flow test</i> – Teste de fluxo lateral
LQ	Limite de quantificação
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIP	<i>Molecularly Imprinted Polymer</i> – Polímero impresso molecularmente
NIP	<i>Non-Imprinted Polymer</i> – Polímero não-impresso molecularmente
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – Tampão fosfato salino
Proteína S	Proteína <i>spike</i> SARS-COV-2
PPy	Polipirrol
Py	Pirrol
RBD	<i>Receptor-Binding Domain</i> – Domínio de ligação ao receptor
rGO	Óxido de grafeno reduzido
RMS	<i>Root-mean-square roughness</i> – Rugosidade quadrática média
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – Ácido ribonucléico
RSD	<i>Relative standard deviation</i> – Desvio padrão relativo

RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> – Dodecil sulfato de sódio
SPC	<i>Screen-printed electrode</i> – Eletrodo impresso
SPCE	<i>Screen-printed carbon electrode</i> – Eletrodo impresso de carbono
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i> – Ressonância plasmônica de superfície

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>22</b>
2.1	PANDEMIA COVID-19 .....	22
2.1.1	SARS-CoV-2 .....	23
2.2	MÉTODOS USUALMENTE EMPREGADOS NO DIAGNÓSTICO DE COVID-19L .....	26
2.3	MÉTODOS ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM BIORRECEPTORES PARA O DIAGNÓSTICO DE COVID-19.....	28
2.4	POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR COMO PLATAFORMA DE DETECÇÃO ELETROQUÍMICA PARA COVID-19 .....	33
2.5	MONÔMEROS ELETROATIVOS EMPREGADOS NA SÍNTESE DE MIPs - POLIPIRROL .....	44
2.6	ESTRATÉGIAS USADAS PARA INCREMENTO DA DETECTABILIDADE DE SENSORES	49
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>52</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	52
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	52
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	53
4.2	INSTRUMENTAÇÃO.....	53
4.3	PREPARAÇÃO DO SENSOR ELETROQUÍMICO .....	55
4.3.1	Ativação do eletrodo .....	55
4.3.2	Construção do sensor MIP/PPy.....	55
4.4	ENSAIOS DE RELIGAÇÃO DA PROTEÍNA S.....	58
4.5	PERFORMANCE ANALÍTICA DO SENSOR MIP/PPY .....	58
4.6	ENSAIOS DE SELETIVIDADE, ESTABILIDADE E REUSABILIDADE .....	59
4.7	PREPARAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS CLÍNICAS .....	59
4.8	ANÁLISE DAS AMOSTRAS CLÍNICAS .....	60

<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
5.1	PREPARAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO SENSOR MIP/PPY.....	61
5.1.1	Ativação do eletrodo.....	61
5.1.2	Efeito da concentração do pirrol na eletropolimerização .....	64
5.1.3	Efeito da concentração da proteína S na religação .....	70
5.1.4	Efeito da concentração da proteína S na eletropolimerização .....	71
5.1.5	Efeito do número de ciclos na eletropolimerização .....	72
5.1.6	Otimização do tempo de remoção da molécula molde.....	74
5.2	AVALIAÇÃO DA REUSABILIDADE DO SENSOR MIP/PPY .....	76
5.3	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA.....	77
5.4	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	83
5.5	CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA .....	85
5.6	ÂNGULO DE CONTATO .....	89
5.7	OTIMIZAÇÃO DA PRÉ-CONCENTRAÇÃO CONTROLADA ELETROQUIMICAMENTE DA PROTEÍNA S NO SENSOR MIP/PPY .....	91
5.8	DESEMPENHO ANALÍTICOS DO SENSOR MIP/PPY.....	96
5.9	APLICAÇÃO DO SENSOR EM AMOSTRAS DE SALIVA .....	106
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>111</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>112</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Recentemente, o mundo enfrentou uma das mais severas pandemias, desencadeada pela infecção do novo coronavírus SARS-CoV-2 (Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2), resultando na doença conhecida como COVID-19. A declaração oficial de pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) foi emitida em março de 2020, e desde então, um elevado número de casos e óbitos tem sido registrado (OPAS, 2020). A estrutura do vírus é composta principalmente por uma única fita de ácido ribonucleico (RNA, do inglês *ribonucleic acid*) e quatro proteínas distintas, a saber: proteína *spike* (S), proteína do nucleocapsídeo (N), proteína do envelope (E) e proteína da membrana (M) (Bar-on *et al.*, 2020). Dentre essas proteínas estruturais, as proteínas S e N destacam-se como os principais imunógenos, sendo a proteína S responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira através da ACE2 (Mousavizadeh; Ghasemi, 2021; Pizzato *et al.*, 2022).

A reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR, do inglês *reverse transcription polymerase chain reaction*) é a principal técnica para o diagnóstico de COVID-19 (padrão ouro). Baseia-se na identificação do RNA viral através da transcrição reversa e amplificação do ácido nucleico (El Sharif *et al.*, 2022; Han *et al.*, 2021; Mehmandoust *et al.*, 2022). Entretanto, apresenta algumas limitações, tais como: longo tempo de resposta, necessidade de técnicos qualificados e equipamentos caros, o que inviabiliza para fins de triagem quando se espera um diagnóstico rápido e de baixo custo (Ayankojo *et al.*, 2022; Ying *et al.*, 2020).

Nesse contexto, testes moleculares como Teste de fluxo lateral (LFT, do inglês *lateral flow test*) e Amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP, do inglês *loop-mediated isothermal amplification*) podem ser ferramentas alternativas no controle e diagnóstico da COVID-19, mas ainda necessitam de algumas horas e pessoal qualificado para a análise (Ayankojo *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2020). Tem-se também os testes sorológicos, que se baseiam na resposta imunológica do paciente. As imunoglobulinas das classes M, A e G, ou seja, os anticorpos IgM, IgA e IgG, respectivamente, são produzidos após a infecção pelo vírus e apresentam níveis detectáveis após o quinto dia após o início dos sintomas. Dessa forma, esses testes

não são os mais recomendados para o diagnóstico precoce da doença (Carter *et al.*, 2020; Ying *et al.*, 2020).

É possível perceber que tanto os testes moleculares quanto os testes sorológicos empregados no diagnóstico de COVID-19 apresentam limitações. Portanto, uma outra alternativa promissora é a aplicação de métodos eletroquímicos. Sensores eletroquímicos tem chamado a atenção nas aplicações médicas, devido à sua operação simples, alta capacidade de detecção, tempos de resposta rápidos, possibilidade de trabalhar com pequenas quantidades de amostras, como de miniaturização e por proporcionar sensibilidade e seletividade comparáveis aos sistemas biológicos (Kaushik, *et al.*, 2020; Mahshid; Flynn; Mahshid, 2021).

Para o diagnóstico de COVID-19 através de transdução eletroquímica, diferentes sensores foram desenvolvidos, como: imunossensores (Fabiani *et al.*, 2021; Mehmandoust *et al.*, 2022; Mojsoska *et al.*, 2021; Nascimento *et al.*, 2022; Rahmati *et al.*, 2021), genossensores (Cajigas *et al.*, 2022; Zhao, HUI *et al.*, 2021) e aptasensores (Abrego-Martinez *et al.*, 2022; Sari *et al.*, 2022; Tabrizi; Acedo, 2022). Todos esses sensores mencionados fazem parte da classe denominada de biossensores, pois utilizam elementos de reconhecimento biológicos, como anticorpos/antígeno, DNA/RNA e aptâmeros. Embora os biossensores possuam as vantagens inerentes as plataformas eletroquímicas, os mesmos carregam as limitações associadas a utilização de biorreceptores, que necessitam de laboratórios com nível de segurança adequados, apresentam alto custo e baixa estabilidade.

Assim, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos baseados na tecnologia de impressão química, são promissores no diagnóstico de COVID-19. Pois, em contraste com os sistemas de detecção biológica, oferecem vantagens como maior estabilidade, simplicidade e viabilidade para experimentos em laboratórios com classificação de biossegurança mais baixa. Essa última vantagem é alcançada ao empregar biomoléculas inativadas na impressão química, como o vírus inativado (El Sharif *et al.*, 2022; Hussein *et al.*, 2021) ou proteínas responsáveis pela ligação ao receptor (Ayankojo *et al.*, 2022; Raziq *et al.*, 2021; Zhang; Sun; Zhang, 2021).

Os Polímeros Impressos Molecularmente (MIPs) pertencem à categoria de materiais biomiméticos, que imitam o sistema de reconhecimento biológico baseado em afinidade, como o sistema antígeno/anticorpo. Em geral, os MIPs são polímeros que realizam reconhecimento específico ao formar cavidades complementares em tamanho e formato ao analito, resultando em alta sensibilidade e seletividade (Gast;

Sobek; Mizaikoff, 2019; Yarman; Kurbanoglu, 2022). Os monômeros comumente usados na eletrossíntese de polímeros condutores em sensores MIP são: pirrol, anilina, arginina, etilenodiamina, ácido 3-aminofenilborônico, fenol e derivados, tiofeno e derivados (Erdossy *et al.*, 2016). Dentre esses, o pirrol é relatado na literatura como uma excelente alternativa para impressão de biomoléculas, devido as suas propriedades intrínsecas como boa condutividade, possibilidade de utilizá-lo em uma ampla faixa de pH, principalmente em meio neutro, assim como, de prepara-lo em meio aquoso (Özkorucuklu; Şahin; Alsancak, 2008; Ramanavičius, A.; Ramanavičiene; Malinauskas, 2006).

Até o momento, foram relatados o desenvolvimento de alguns sensores eletroquímicos utilizando MIP para a detecção de SARS-CoV-2 (Amouzadeh Tabrizi *et al.*, 2022; Ayankojo *et al.*, 2022; Raziq *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2023; Zhang; Sun; Zhang, 2021; El Sharif *et al.*, 2022; Hashemi *et al.*, 2021; Hussein *et al.*, 2021). A impressão química tem sido comumente realizada utilizando os principais fragmentos presentes no vírus, como a proteína S, a proteína N e o RBD em polímeros eletropolimerizados. Ademais, abordagens de impressão molecular de vírus inteiros também foram descritas (Ferreira; Yamada-Ogatta; Tarley, 2023). Os limites de detecção alcançados estão na faixa de fg mL<sup>-1</sup> a poucos pg mL<sup>-1</sup>, valores suficientes para a detecção de SARS-CoV-2 em amostras clínicas fg mL<sup>-1</sup> a poucos pg mL<sup>-1</sup>, (Nascimento *et al.*, 2022; Seo *et al.*, 2020). Em geral, a preparação dos sensores relatados é demorada, fazem uso de eletrodos não descartáveis e, em alguns casos, a real aplicabilidade do método não foi investigada, uma vez que, amostras clínicas não foram analisadas. Além disso, apresentam diversas etapas de síntese envolvendo a utilização de nanopartículas metálicas e nanoestruturas de carbono, como o grafeno. Neste contexto, observa-se que ainda há uma demanda crescente pela obtenção de sensores baseados em tecnologia de impressão química, mais simples e altamente sensíveis, para o diagnóstico da COVID-19.

Portanto, destaca-se o caráter inovador desta tese, que consiste em desenvolver um novo método de detecção para proteína S do SARS-CoV-2 em amostra de saliva utilizando um sensor MIP de polipirrol descartável, por meio de um processo de síntese simplificado e rápido, assim como, investigar a utilização de uma etapa de pré-concentração controlada eletroquimicamente a fim de conferir alta detectabilidade ao método proposto.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PANDEMIA COVID-19

Transcorridos mais de três anos, a comunidade global ainda testemunha uma das mais severas pandemias, desencadeada pelo agente patogênico denominado SARS-CoV-2 (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), responsável pela doença denominada COVID-19. A designação formal da COVID-19 como pandemia, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), foi oficializada em março de 2020. Até a presente data, os registros confirmam a incidência de 775.251.779 infecções e 7.043.660 óbitos em todo o mundo (WHO, 2024). No Brasil, os dados notificados quanto aos casos confirmados ascendem a 38.806.622, acompanhados por um número de 712.205 óbitos, conforme constatado até 28 de dezembro de 2022 (Ministério da Saúde, 2024).

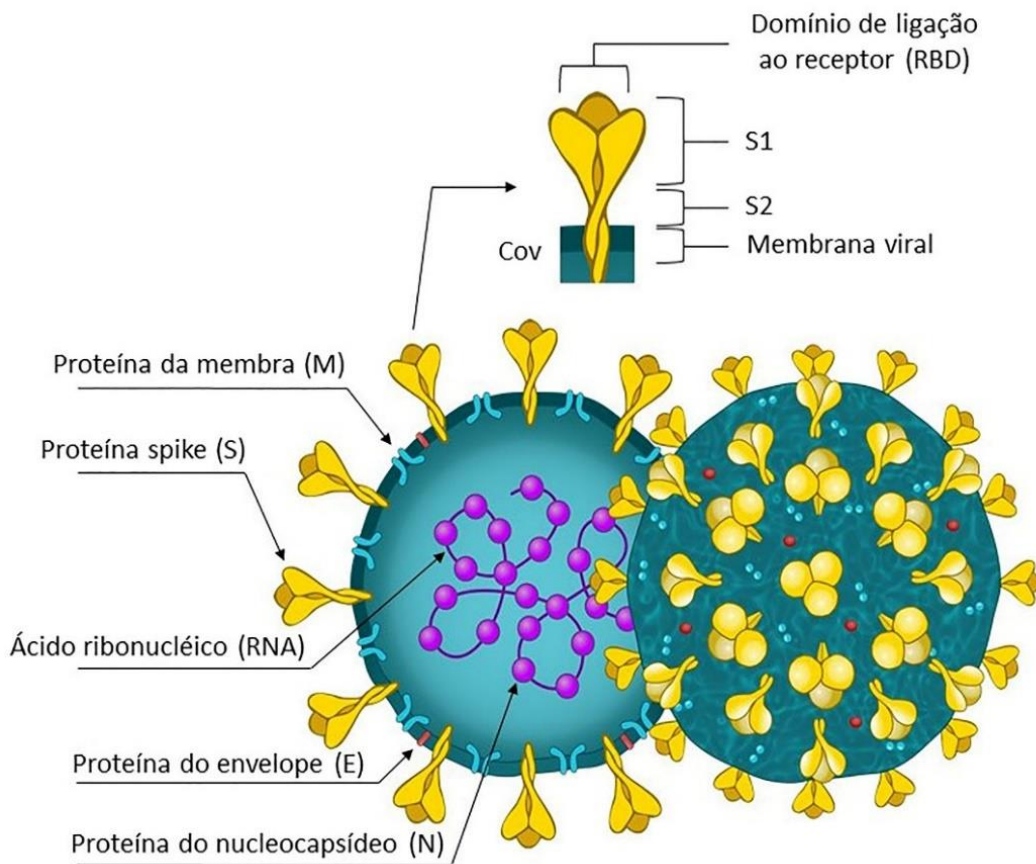
O agente viral demonstra uma elevada taxa de transmissibilidade e levava inicialmente o paciente a um estado de hospitalização que frequentemente resultava em óbito. A transmissão dos coronavírus costuma ocorrer pelo ar ou por contato pessoal com secreções contaminadas, como: gotículas de saliva, espirro, tosse, catarro, contato pessoal próximo, como toque ou aperto de mão, contato com objetos ou superfícies contaminadas, seguido de contato com a boca, nariz ou olhos (Lotfi; Hamblin; Rezaei, 2020). Sendo assim, a comunidade científica e médica global prontamente se mobilizou com o propósito de desenvolver vacinas, tratamentos e testes de diagnóstico.

Atualmente, embora tenha se observado a notória redução na taxa de letalidade associada à COVID-19, os casos de infecção continuam, cuja origem possivelmente esteja relacionada as novas variantes do SARS-CoV-2. Esses fatos evidenciam a contínua circulação do agente patogênico entre os países e, por conseguinte, indicam que ainda é de extrema importância os testes diagnósticos bem como a vigilância epidêmica.

### 2.1.1 SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 é um vírus pertencente à família dos coronavírus, que causa uma doença respiratória aguda grave (COVID-19). SARS-CoV-2 é um coronavírus com tamanhos que variam de 50 a 200 nm de diâmetro (Fabiani *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2020). Os principais componentes que formam sua estrutura são uma única fita de ácido ribonucléico (RNA) e quatro proteínas, a saber: proteína *spike* (S), proteína do nucleocapsídeo (N), proteína do envelope (E) e proteína da membrana (M) (Figura 1) (Bar-on *et al.*, 2020). Entre as 4 proteínas estruturais do coronavírus, as proteínas S e N são os principais imunógenos, sendo a proteína S responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira, enquanto a proteína N tem como principal função a replicação e transcrição do genoma viral (Mousavizadeh; Ghasemi, 2021; Pizzato *et al.*, 2022).

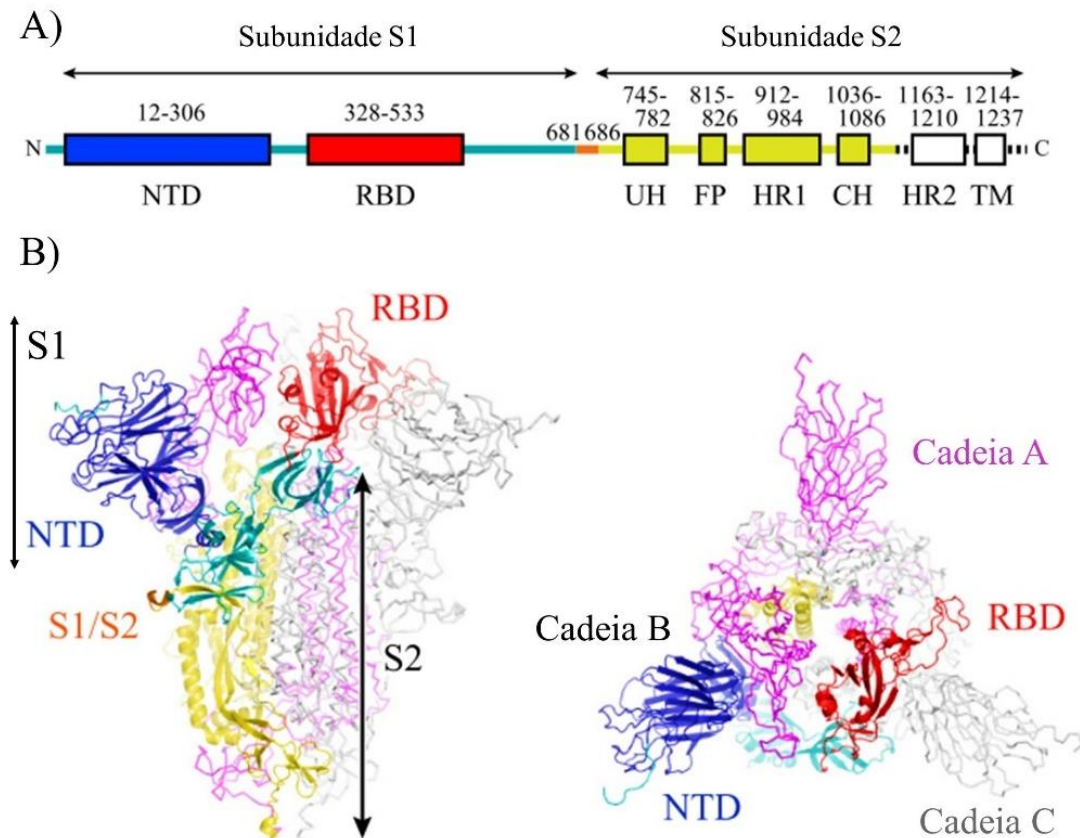
**Figura 1** – Estrutura típica da partícula viral SARS-CoV-2.

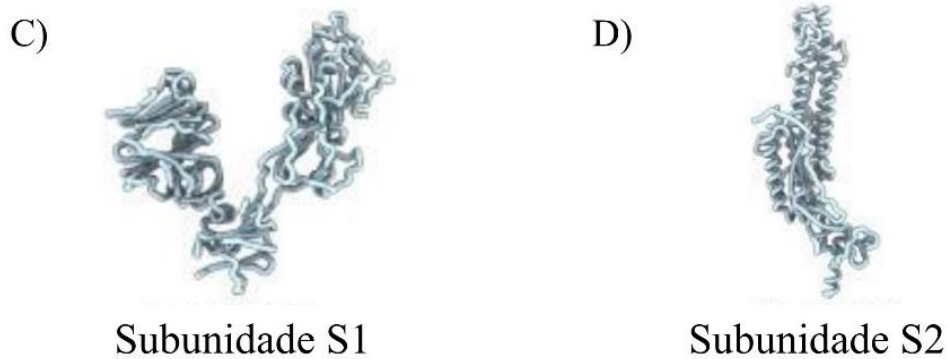


Fonte: Adaptado de (Pizzato *et al.*, 2022).

Portanto, a proteína S na superfície do vírus é um fator chave envolvido na infecção. É uma glicoproteína trimérica responsável pela entrada da carga viral e apresenta um tamanho que varia entre 9 a 15 nm (Abrego-Martinez *et al.*, 2022; Baron *et al.*, 2020; Rahmati *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2020). Semelhante a outros coronavírus, a proteína S de SARS-CoV-2 medeia o reconhecimento do receptor, ligação celular e fusão durante a infecção viral (Huang *et al.*, 2020; Mousavizadeh; Ghasemi, 2021). Possui dois domínios, denominados S1 e S2 (Figura 2). A subunidade S1 (14-685 resíduos) contém o RBD, que é principalmente responsável pela ligação do vírus ao receptor da célula hospedeira por meio da ligação com a ACE2, o domínio N-terminal (NTD) e duas pequenas subunidades, SD1 e SD2. A subunidade S2 (686–1273 resíduos) está intimamente relacionada à fusão do vírus e compõe a parte inferior da proteína S (Ayankojo *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2020; Mori *et al.*, 2021; Pramanick *et al.*, 2021).

**Figura 2** – Arquitetura de domínio de cada monômero e modelos de simulação da proteína S do SARSCoV-2 (A e B), juntamente com as subunidades S1 (C) e S2 (D) de SARS-CoV-2.





Fonte: Adaptado de (Filho, 2023; Mori *et al.*, 2021)

Devido à alta imunogenicidade da proteína S, o desenvolvimento de diagnósticos baseado no seu reconhecimento como indicador da infecção torna-se promissor. Além disso, a proteína S exibe diversidade de sequência de aminoácidos entre os coronavírus, permitindo a detecção específica de SARS-CoV-2 (Ayankojo *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2021; Nascimento *et al.*, 2022; Seo *et al.*, 2020).

A presença de SARS-CoV-2 pode ser encontrada em diferentes tipos de amostras clínicas. Dentre elas, os esfregaços nasofaríngeos são os métodos de amostragem mais utilizados. Isto se justifica principalmente pela elevada carga viral no trato respiratório superior, variando de  $10^4$  a  $10^7$  cópias por mL (Pan *et al.*, 2020). No entanto, estudos mostram que os níveis médios de RNA do SARS-CoV-2 foram similar e mais estáveis em amostras de esfregaços orofaríngeos (análogos da saliva) do que amostras nasais durante toda a infecção (Ning *et al.*, 2021). Isso sugere que a saliva pode representar uma amostra diagnóstica mais robusta do que os esfregaços nasais, tanto no início como no final da infecção.

Portanto, as amostras de saliva tornam-se atrativas uma vez que apresentam carga viral suficiente para serem utilizadas no diagnóstico de COVID-19. Além disso, a coleta é consideravelmente menos desconfortável comparada ao *swab* nasofaríngeo, podendo ser coletadas facilmente pelo próprio paciente, reduzindo a necessidade e até mesmo o risco de exposição dos profissionais de saúde. Bergevin e colaboradores descobriram que quando amostras nasais e de saliva foram analisadas em pacientes com sintomas por 10 dias, os resultados foram quase idênticos (95%) (Bergevin *et al.*, 2021). Ainda, alguns artigos mostraram que ~90% dos indivíduos infectados com SARS-CoV-2 carregam vírus detectáveis na saliva (Pasomsub *et al.*, 2021; To *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020).

## 2.2 MÉTODOS USUALMENTE EMPREGADOS NO DIAGNÓSTICO DE COVID-19

A técnica principal no diagnóstico da COVID-19, considerada a padrão ouro, é a RT-PCR, que apresenta um limite de detecção ~150 cópias por mL e uma taxa de falso-negativo que pode variar até 37 % (Arnaout *et al.*, 2020; Hong *et al.*, 2020; Mehmandoust *et al.*, 2022; Seo *et al.*, 2020). É uma técnica molecular que identifica o RNA viral por meio da transcrição reversa e amplificação do ácido nucléico, ou seja, uma quantificação direta do RNA (El Sharif *et al.*, 2022; Han *et al.*, 2021; Mehmandoust *et al.*, 2022). Contudo, devido ao longo tempo de resposta, técnicos qualificados e equipamentos caros, a RT-PCR apresenta limitações para fins de triagem quando se espera um diagnóstico rápido e de baixo custo (Ayankojo *et al.*, 2022; Ying *et al.*, 2020).

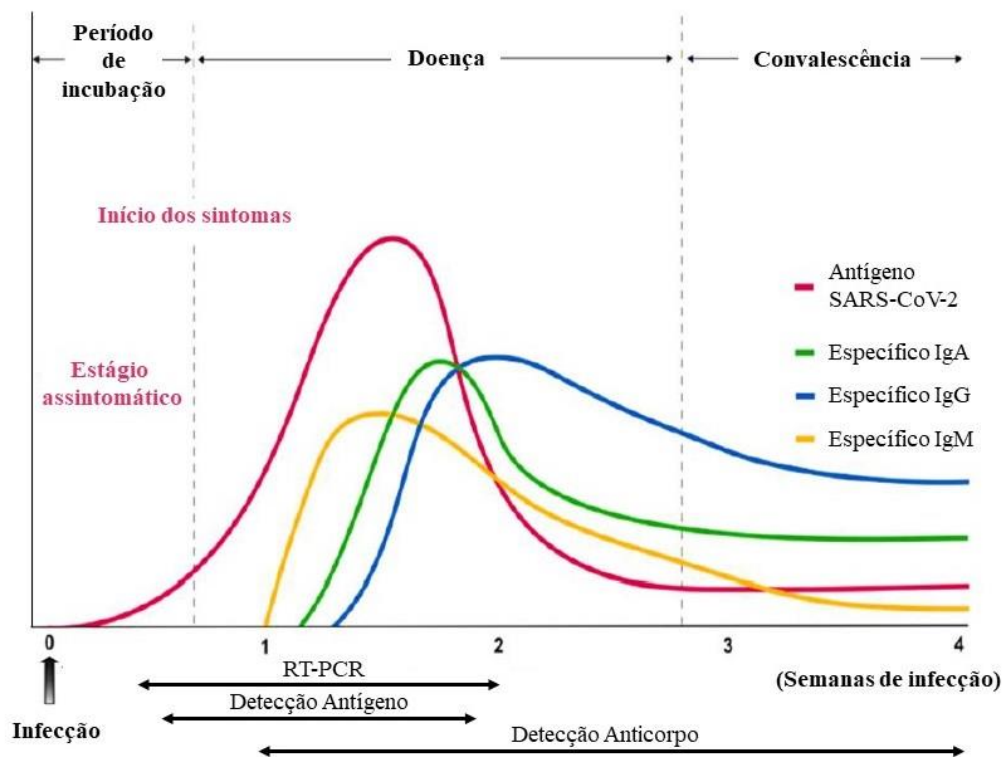
Nesse contexto, testes moleculares alternativos já bem estabelecidos para o diagnóstico de doenças infecciosas, LFT e LAMP, podem ser boas ferramentas no controle e diagnóstico da COVID-19. O LFT é um ensaio imunocromatográfico que utiliza anticorpos imobilizados na região de teste para detectar o antígeno coletado de amostras de *swabs* nasais e orais, fornecendo respostas em um curto espaço de tempo (15 a 30 minutos) (Ayankojo *et al.*, 2022). O LAMP é uma técnica mais recente que usa amplificação de ácido nucleico em uma única faixa de temperatura (60 a 65 °C), diferente do RT-PCR cuja reação ocorre em três temperaturas diferentes (etapas de desnaturação, anelamento e amplificação). Suas principais vantagens em relação ao RT-PCR são a simplicidade, a rapidez, o menor custo, a dispensa do uso de termociclador, essencial para o PCR convencional e, a possibilidade de trabalhar com amostras de saliva (Jiang *et al.*, 2020; Schellenberg; Ormond; Keynan, 2021).

Outra alternativa para a realização do diagnóstico de COVID-19 são os testes sorológicos, os quais se fundamentam na resposta imunológica do paciente. Sendo assim, esses testes detectam anticorpos formados após a infecção. Esses testes são realizados principalmente pelo teste sorológico imunoenzimático (ELISA, do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), que apresenta um tempo de análise de 1 a 5 horas e menor custo. No entanto, o uso desses testes pode não ser a melhor opção para o diagnóstico inicial da doença (Carter *et al.*, 2020; Tarassishin, 2021), pois o nível detectável dos anticorpos IgA e IgM é em torno do quinto dia após o início dos sintomas, seguidos do aumento dos níveis do anticorpo IgG (Lim; Bonanni, 2020;

Ying *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020). Além disso, assim como os testes de PCR, é necessário pessoal qualificado.

Uma representação esquemática da progressão clínica da infecção provocada pelo vírus SARS-CoV-2, bem como os períodos mais apropriados para a aplicação dos testes diagnósticos é apresentado na Figura 3.

**Figura 3** – Evolução clínica da COVID-19 e os testes utilizados por período de infecção.



Fonte: (Azkur *et al.*, 2020)(p. 1570).

De maneira geral, é possível observar que as principais desvantagens dos métodos comumente utilizados no diagnóstico da COVID-19 são atribuídas ao alto tempo de resposta, complexidade de análise, necessidade de profissionais qualificados, bem como ao custo por análise.

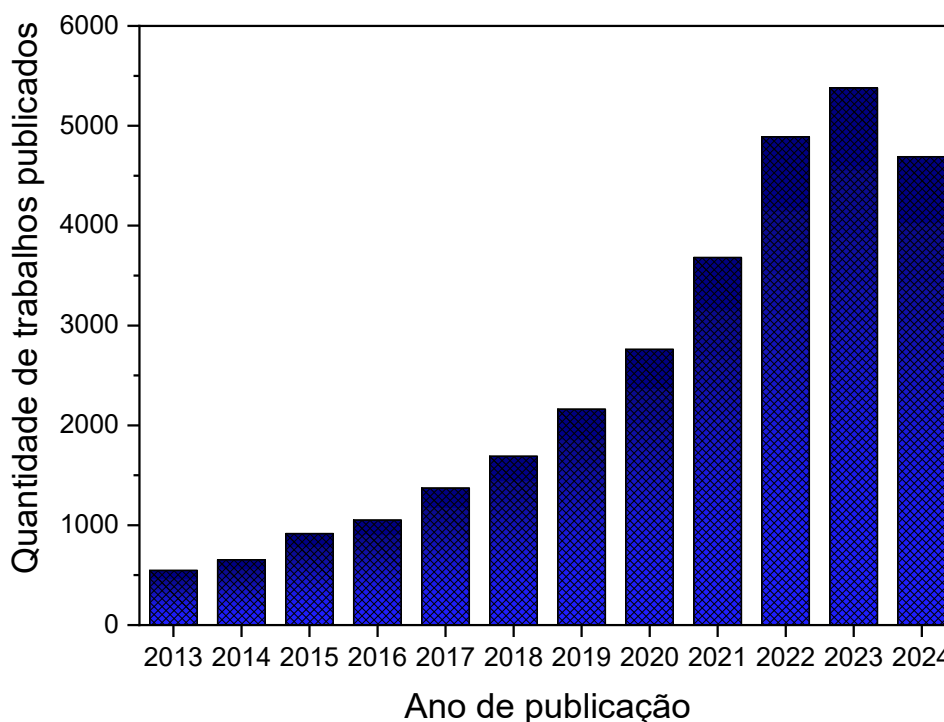
Em vista desses desafios inerentes, o uso de diagnósticos eletroquímicos empregando sensores modificados com componentes biológicos (imunossensores, aptassensores, genossensores e enzimáticos) e sensores quimicamente modificados (MIPs), mostram ser oportunos para superar esses inconvenientes, levando em consideração suas vantagens, como simplicidade operacional, detecção, custo-benefício, menor quantidade de amostra necessária ( $\mu\text{L}$  a  $\text{nL}$ ), tempos de resposta

mais rápidos (vários segundos a minutos) e capacidade de miniaturização. Além disso, assim como a técnica padrão-ouro, as técnicas eletroquímicas podem oferecer alta sensibilidade e seletividade e demonstrar seu grande potencial na detecção de diferentes vírus e seus respectivos anticorpos (Mahshid; Flynn; Mahshid, 2021).

### 2.3 MÉTODOS ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM BIORRECEPTORES PARA O DIAGNÓSTICO DE COVID-19

O desenvolvimento de plataformas eletroquímicas para o diagnóstico de doenças vem se tornando cada vez mais comum, como pode ser observado na Figura 4. Nos últimos 10 anos, um aumento significativo na quantidade de publicações relacionadas a sensores eletroquímicos no diagnóstico de doenças foi observado. Nota-se um aumento expressivo em 2022, possivelmente, uma boa contribuição desse aumento está relacionada às pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de sensores para COVID-19.

**Figura 4** – Número de trabalhos publicados por ano sobre sensores eletroquímicos para diagnóstico de doenças entre 2013 e 2024.



Fonte: Google Scholar. TÓPICO: “*electrochemical sensor*” and “*diagnosis*”. Acesso em: 20 de novembro de 2024.

Um sensor eletroquímico consiste em um dispositivo que fornece informações analíticas sobre uma amostra, transformando as informações associadas a uma reação eletroquímica entre um eletrodo e o analito, em um sinal elétrico qualitativo ou quantitativo. É, geralmente, constituído por três eletrodos: um eletrodo de referência, um eletrodo auxiliar e um eletrodo de trabalho que funciona como elemento de transdução na reação (Thevenot *et al.*, 2001).

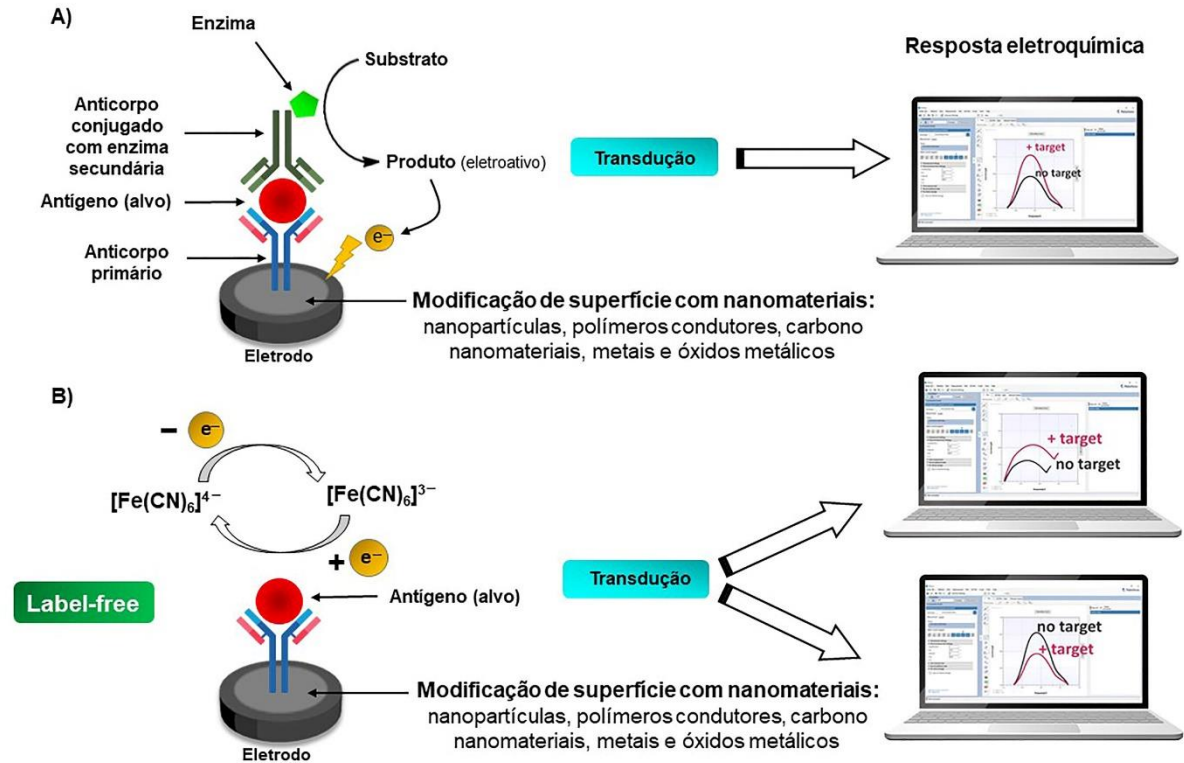
Levando em consideração uma aplicação prática, é altamente desejável a obtenção de plataformas eletroquímicas com alto poder de detecção. Para atingir alta sensibilidade, os sensores eletroquímicos podem ser modificados com biorreceptores, como enzimas, anticorpos, DNA ou RNA. O uso de biomoléculas como elementos de reconhecimento (biorreceptores) configura o dispositivo eletroquímico como um biossensor (Ferreira; Yamada-Ogatta; Teixeira Tarley, 2023).

De modo geral, os biossensores apresentam seletividade pronunciada, mas sua especificidade está diretamente relacionada à sua construção. Portanto, alguns fatores devem ser levados em consideração, como a escolha do biorreceptor, o método de imobilização, a escolha do substrato enzimático mais adequado, o transdutor, bem como a técnica eletroquímica. Dependendo do biorreceptor imobilizado no biossensor fabricado, este apresentará uma dada nomenclatura, como imunossensor, genossensor ou aptasensor (Ferreira; Yamada-Ogatta; Teixeira Tarley, 2023).

Os imunossensores, se baseiam na afinidade entre anticorpos (Ab) e antígenos (Ag). Assim, o elemento de reconhecimento imobilizado na superfície do eletrodo pode ser tanto um quanto o outro (Piro *et al.*, 2016). Nesta abordagem, a detecção pode ser indireta, usando um anticorpo secundário marcado com enzima, ou direta, sem o uso de marcadores (Figura 5).

A detecção indireta ocorre através de uma reação enzimática que leva à produção de uma molécula eletroativa, fornecendo um sinal eletroquímico Figura 5A. A detecção direta (sem marcadores, do inglês *label-free*) ocorre através do fenômeno físico que ocorre quando a espécie bioativa reconhece o substrato (Figura 5B). Por exemplo, em um biossensor impedimétrico, quando ocorre a interação entre o analito e o sítio de reconhecimento, há um bloqueio parcial da superfície eletroativa, resultando em um aumento na resistência à transferência de carga, permitindo a medição direta da capacitância ou resistência elétrica do eletrodo (Hryniewicz *et al.*, 2022; Mehmandoust *et al.*, 2022; Witt *et al.*, 2021).

**Figura 5** – Representação geral dos principais componentes de um imunossensor eletroquímico. O esquema descreve um imunossensor genérico baseado na detecção indireta (A) e direta (B).



Fonte: a própria autora.

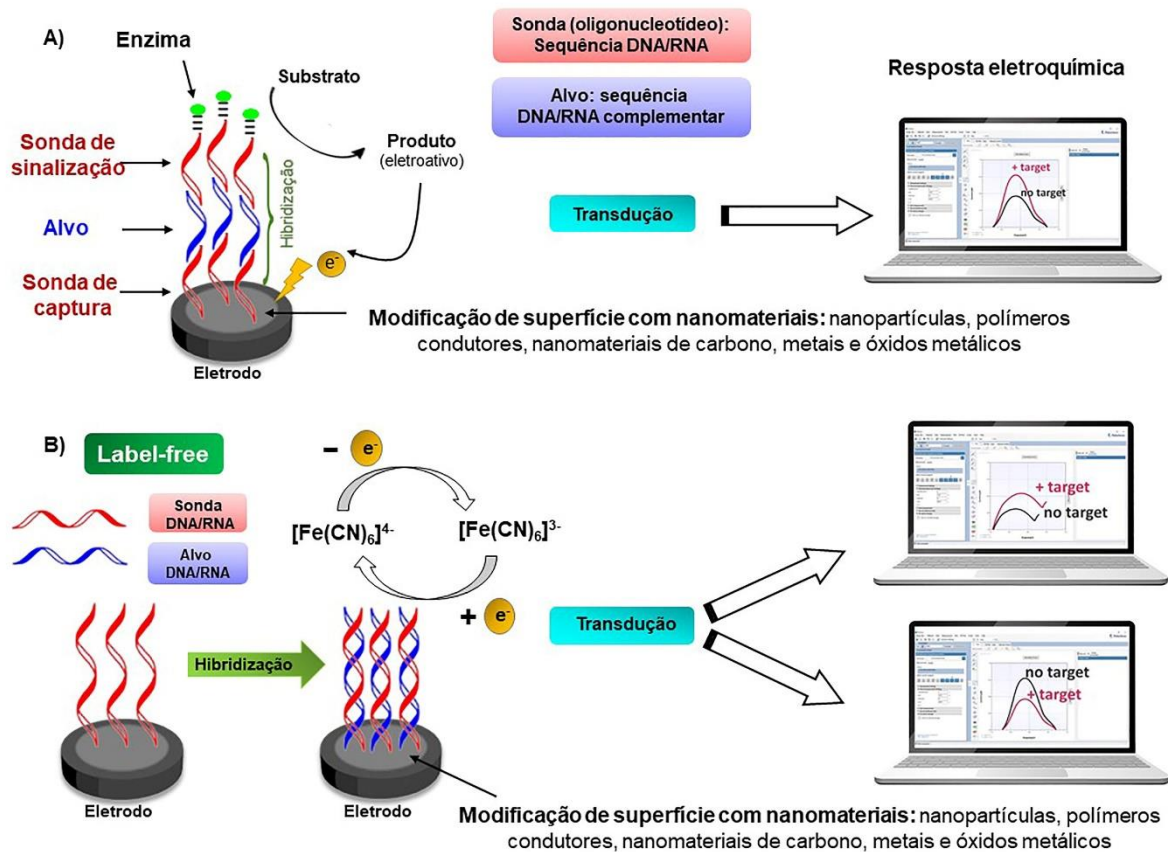
A utilização de ácidos nucleicos (DNA/RNA) como elementos de reconhecimento, oferecem algumas vantagens em relação aos imunossensores, como produção rápida, baixo custo, estabilidade a longo prazo, resistência a altas temperaturas, facilidade de modificação química após a síntese inicial e ausência de animais hospedeiros, evitando variações entre lotes (Kaushik *et al.*, 2018). O desenvolvimento de biossensores baseados em ácidos nucleicos tem aumentado significativamente, e são comumente conhecidos como genossensores e aptassensores.

Os genossensores, têm como princípio de afinidade a interação da fita simples de DNA (ssDNA) com sua fita complementar. Ocorre por hibridização do DNA, formando a conhecida dupla hélice (DNA de dupla hélice - dsDNA) que permite a detecção de genes alvo específicos. Neste sistema, o ssDNA atua como uma sonda (Kaushik *et al.*, 2018). O sinal analítico gerado por um genossensor vem da interação entre uma sonda (sequência específica), geralmente um pequeno oligonucleotídeo

sintético, e um transdutor (Figura 6). A sonda molecular funciona como elemento de bioreconhecimento e é capaz de detectar a sequência complementar de DNA ou RNA (Kaushik *et al.*, 2018; Paniel; Baudart, 2013).

Os métodos de detecção eletroquímica em genossensores podem ocorrer de duas formas: I) detecção direta, que é a medição da resposta elétrica da sequência alvo, causada pela oxidação ou redução de bases nitrogenadas durante a hibridização (Figura 6A); ou II) detecção indireta, na qual são monitorados compostos eletroativos ligados à dupla hélice (Figura 6B) (Kaushik *et al.*, 2018; Labuda *et al.*, 2010).

**Figura 6** – Representação geral dos principais componentes e princípio de detecção de biossensores eletroquímicos de ácidos nucleicos clássicos (A) e *label-free* (B).



Fonte: a própria autora.

Por fim, os biossensores que utilizam aptâmeros como elementos de identificação são denominados aptasensores. Os aptâmeros consistem em pequenos oligonucleotídeos ou peptídeos de cadeia simples (RNA ou ssDNA - DNA de fita simples), que se ligam à moléculas alvo específicas com alta seletividade e especificidade (Zhang; Lai; Juhas, 2019). A principal vantagem em usar aptâmeros

como molécula de reconhecimento está relacionado ao seu tamanho, normalmente de 2-3 nm em comparação aos anticorpos (12-15 nm de diâmetro) (Song *et al.*, 2020), o que contribui para um menor impedimento estérico na superfície da SARS-CoV-2 (65-125 nm de diâmetro) (Abrego-Martinez *et al.*, 2022). Esse recurso permite a ligação de mais elementos de reconhecimento na superfície do vírus, o que leva a melhores desempenhos de detecção. Além disso, os aptâmeros apresentam estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura, além de apresentarem custos de produção mais baixos que os anticorpos (Zhang; Lai; Juhas, 2019).

Diferentes estratégias podem ser utilizadas para obtenção de biossensores. Polímeros condutores, nanopartículas, partículas magnéticas, assim como, materiais carbonáceos são usados com o intuito de aumentar a área superficial, gerando assim mais sítios ativos e melhorando o desempenho eletroanalítico. Em nossa revisão, publicada recentemente, apresentamos com mais detalhes diversos biossensores desenvolvidos para a detecção de SARS-CoV-2, mostrando os principais desafios, estratégias para a imobilização dos elementos de reconhecimento e as técnicas eletroanalíticas comumente utilizadas (Ferreira; Yamada-Ogatta; Teixeira Tarley, 2023).

No geral, a fabricação de biossensores apresenta várias etapas no processo de síntese, o que leva a um tempo longo de preparo. Além disso, o desenvolvimento de biossensores apresenta como principal desvantagem o uso de materiais biológicos que possuem elevado custo, baixa estabilidade, e uma manipulação mais criteriosa. Sendo que, a imobilização desses elementos biológicos é uma etapa crucial na fabricação dos biossensores (Ferreira; Yamada-Ogatta; Teixeira Tarley, 2023).

Neste sentido, o emprego de materiais biomiméticos baseados na tecnologia de impressão molecular se configuram como elementos promissores para o desenvolvimento de dispositivos de análise rápida com o mesmo grau de seletividade que os materiais biológicos, porém com maior estabilidade, simplicidade e viabilidade de realização de experimentos em laboratórios com baixa classificação de biossegurança. Esta última vantagem pode ser alcançada por meio do uso de biomoléculas inativadas na impressão química, como vírus inativados (Gui *et al.*, 2018; Yarman; Kurbanoglu, 2022), uso de epítomos (Siqueira Silva *et al.*, 2021) ou proteínas responsáveis pela ligação ao receptor (Yarman *et al.*, 2021).

## 2.4 POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR COMO PLATAFORMA DE DETECÇÃO ELETROQUÍMICA PARA COVID-19

Os Polímeros Impressos Molecularmente (MIPs, do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*) pertencem à classe dos materiais biomiméticos, e sua aplicação no campo da bioanálise tem adquirido atenção ao longo dos anos. Na literatura, a versatilidade dos MIPs na impressão de moléculas menores e de macromoléculas é bem estabelecida. Percebe-se isso pelas diversas revisões disponíveis na literatura a respeito de sensores eletroquímicos baseados em MIP para a detecção de enzimas, proteínas, células, vírus e anticorpos (Akgönüllü *et al.*, 2023; Ali *et al.*, 2022; Bonatti; De Maria; Vozzi, 2021; Dong *et al.*, 2021; Ferreira; Yamada-Ogatta; Teixeira Tarley, 2023; Mazzotta; Di Giulio; Malitesta, 2022; Piletsky *et al.*, 2020; Tian *et al.*, 2022; Yoon *et al.*, 2020; Zaidi, 2021; Zhang *et al.*, 2023).

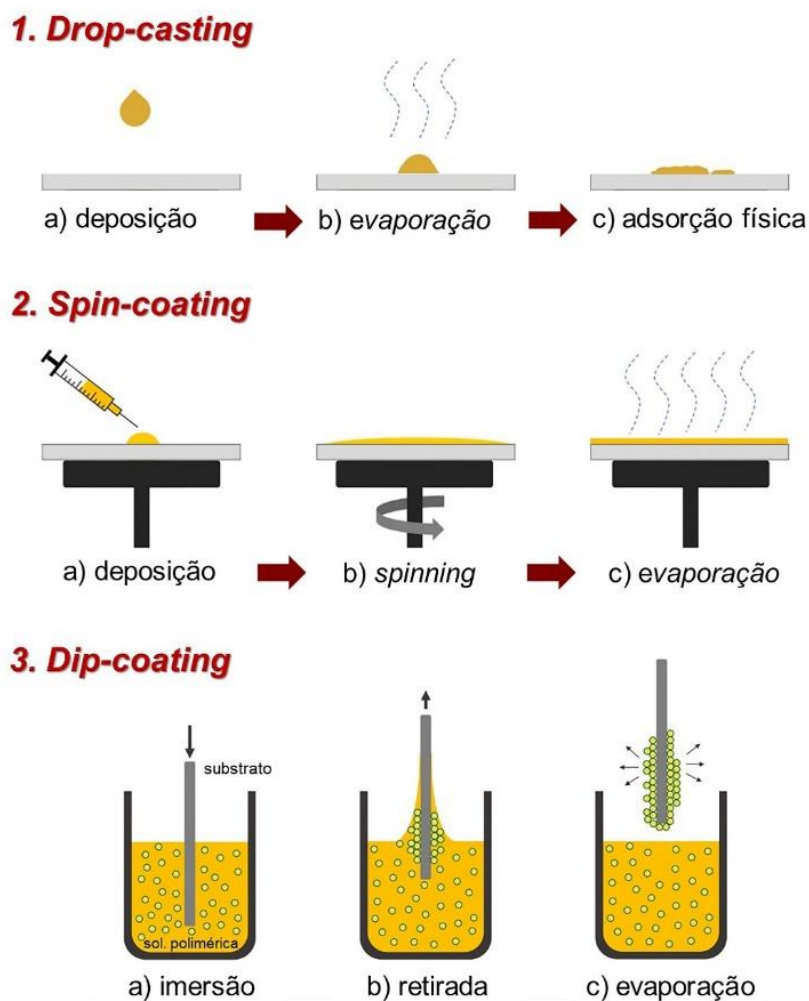
O interesse nesses materiais é atribuído principalmente à sua afinidade e capacidade de reconhecer seletivamente uma determinada molécula alvo (*template*), assemelhando-se aos receptores naturais. A alta afinidade seletiva dos MIPs é intrinsecamente atribuída à sua estrutura tridimensional e composição química, ou seja, a característica específica de reconhecimento dos MIPs está relacionada às cavidades formadas no polímero, que são complementares em tamanho e formato ao analito de interesse. Esta interação assemelha-se a sistemas de reconhecimento biológico baseados em afinidade, tais como os sistemas antígeno-anticorpo e enzima-substrato (Ferreira; Yamada-Ogatta; Teixeira Tarley, 2023; Tarley; Sotomayor; Kubota, 2005).

Resumidamente, a impressão molecular tradicional, ou *bulk synthesis*, os monômeros funcionais, reticuladores (*cross-linker*), iniciadores e a molécula molde são misturados no solvente porogênico desejado e a polimerização é executada seguida de secagem, moagem e peneiração para obter as partículas de tamanho adequado. Em seguida, o modelo é removido e o material obtido está pronto para uso. (Bonatti; De Maria; Vozzi, 2021; Gast; Sobek; Mizaikoff, 2019). Suas principais vantagens estão associadas à sua simplicidade e ao fato de não requerer equipamentos mais sofisticados. No entanto, as principais limitações estão relacionadas ao longo tempo de preparo, devido às várias etapas de síntese, como secagem, moagem e peneiração, à produção de apenas uma pequena fração do polímero original como material utilizável, à baixa homogeneidade nas formas e

tamanhos das partículas, o que se reflete no desempenho reprodutível dos receptores. Além disso, o consumo de solventes e reagentes são relativamente alto (Ali *et al.*, 2022; Bonatti; De Maria; Vozzi, 2021; Caldara *et al.*, 2023).

A integração de MIPs obtidos por esta rota de síntese na forma de filmes finos em sensores, pode ser realizada por diferentes métodos de deposição, sendo as mais usuais: *drop-casting*, *spin-coating* e *dip-coating* (Figura 7).

**Figura 7** – Representação esquemática do processo de diferentes métodos de deposição para integração de MIPs em aplicações de sensores.



Fonte: Adaptado de (Obregón; Rodríguez-González, 2022).

*Drop-casting*: é um método simples e rápido de deposição, no qual uma gota de suspensão polimérica é depositada sobre um substrato sólido, deixando-a “repousar e secar” para evaporar o solvente restante, deixando um filme. No entanto,

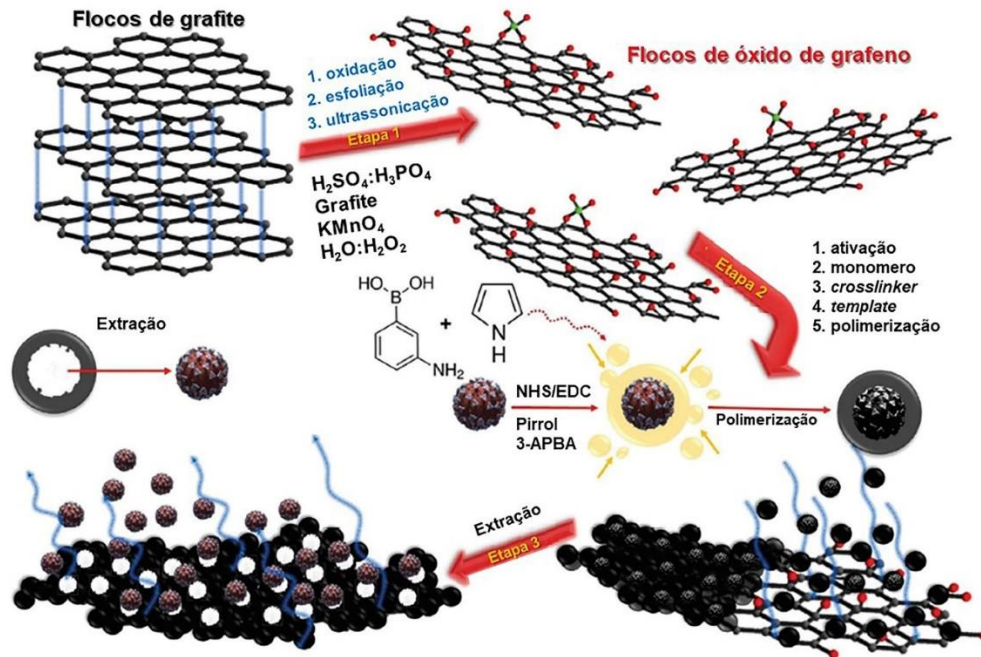
a falta de controle sobre a distribuição de partículas e a adesão limitada na superfície levam a limitações significativas em termos de reprodutibilidade (Caldara *et al.*, 2023).

*Spin-coating*: é um método de deposição mais preciso e reprodutível que o *drop-casting*. No *spin-coating*, o substrato é colocado em um *spinner*, que o gira a alta velocidade. A solução polimérica é então depositada no centro do substrato e espalha-se por ação da força centrífuga. O solvente evapora, deixando um filme uniforme. A principal desvantagem é seu maior custo em comparação ao *drop-casting* e *dip-coating*, pois requer um *spinner* (Caldara *et al.*, 2023; Obregón; Rodríguez-González, 2022).

*Dip-coating*: é um método de deposição no qual o substrato é imerso em uma solução polimérica e, em seguida, retirado. O processo pode ser dividido em três etapas principais: imersão, retirada e evaporação. Adequado para grandes áreas, mas também apresenta como limitações a baixa uniformidade do filme formado (Obregón; Rodríguez-González, 2022).

Um sensor baseado na impressão química para o vírus SARS-CoV-2 usando a polimerização em *bulk* foi relatado na literatura. Hashemi e colaboradores sintetizaram um MIP em flocos de óxido de grafeno (Hashemi *et al.*, 2021). Inicialmente, flocos de grafite foram oxidados a óxido de grafeno. Em seguida, os grupos funcionais à base de hidrogênio e os grupos carbonila do óxido de grafeno foram ativados através do complexo NHS/EDC, seguido pela adição de reticulador (ácido 3-aminofenilborônico, 3-APBA), monômero (pirrol) e molde (antígeno de vírus inteiro puro de SARS-CoV-2) (Figura 8). A polimerização ocorreu através da adição gota a gota do agente de oxidação, isto é,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , formando assim uma estrutura polimérica impressa com um molde viral preso dentro dela. O molde foi extraído usando uma solução 10% contendo ácido acético, acetona e etanol. Os autores usam GCE como eletrodo de trabalho, mas não descrevem o método de deposição utilizado. As medidas eletroquímicas foram realizadas por DPV e amperometria usando  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  como sonda redox. Os valores de LQ obtidos para as técnicas utilizadas foram de  $0,66 \text{ fg mL}^{-1}$  e  $12,01 \text{ fg mL}^{-1}$ , respectivamente. Os autores fazem a aplicação do sensor desenvolvido em amostras de plasma humano e uma concentração de  $2,3 \text{ fg mL}^{-1}$ , valor abaixo do LQ reportado.

**Figura 8** – Representação esquemática do processo da síntese do sensor MIP fabricado por Hashemi e colaboradores, por meio da síntese em *bulk*, para detecção do vírus SARS-CoV-2.



Fonte: (Hashemi *et al.*, 2021) (p. 3).

Embora os autores tenham alcançado limites de detecção e quantificação notáveis, pela descrição do procedimento experimental nota-se um tempo considerável para obtenção do material sintetizado. Dessa forma, uma outra estratégia muito usada no desenvolvimento de sensores eletroquímicos com impressão química, que permite a obtenção de filmes finos, é a eletropolimerização, conhecida também por síntese eletroquímica ou eletrossíntese. Nesta abordagem, não são necessários o uso de iniciador, bem como a necessidade de calor ou radiação UV, que podem causar alterações estruturais na biomolécula impressa, assim como, o uso de *cross-linking* (Erdossy *et al.*, 2016). A eletropolimerização refere-se ao uso de métodos eletroquímicos para polimerizar monômeros diretamente na superfície do eletrodo para a obtenção de filmes poliméricos sob condições de síntese controladas (Dong *et al.*, 2021).

Comparado à síntese em *bulk*, a eletropolimerização se destaca por algumas razões, sendo elas: possibilidade de trabalhar com pequenas quantidades da molécula molde, o que confere ao sensor um menor custo de fabricação; redução significativa do tempo de síntese, dispensando longas etapas de preparo, incluindo

secagem, moagem e lavagem exaustivas; melhor reprodutibilidade no preparo, uma vez que o filme polimérico é preparado diretamente na superfície do eletrodo; controle fácil sobre a espessura do filme e sua morfologia, através da configuração dos parâmetros da técnica eletroanalítica utilizada para a deposição do filme sobre o eletrodo de trabalho (Ali *et al.*, 2022; Dong *et al.*, 2021; Erdossy *et al.*, 2016).

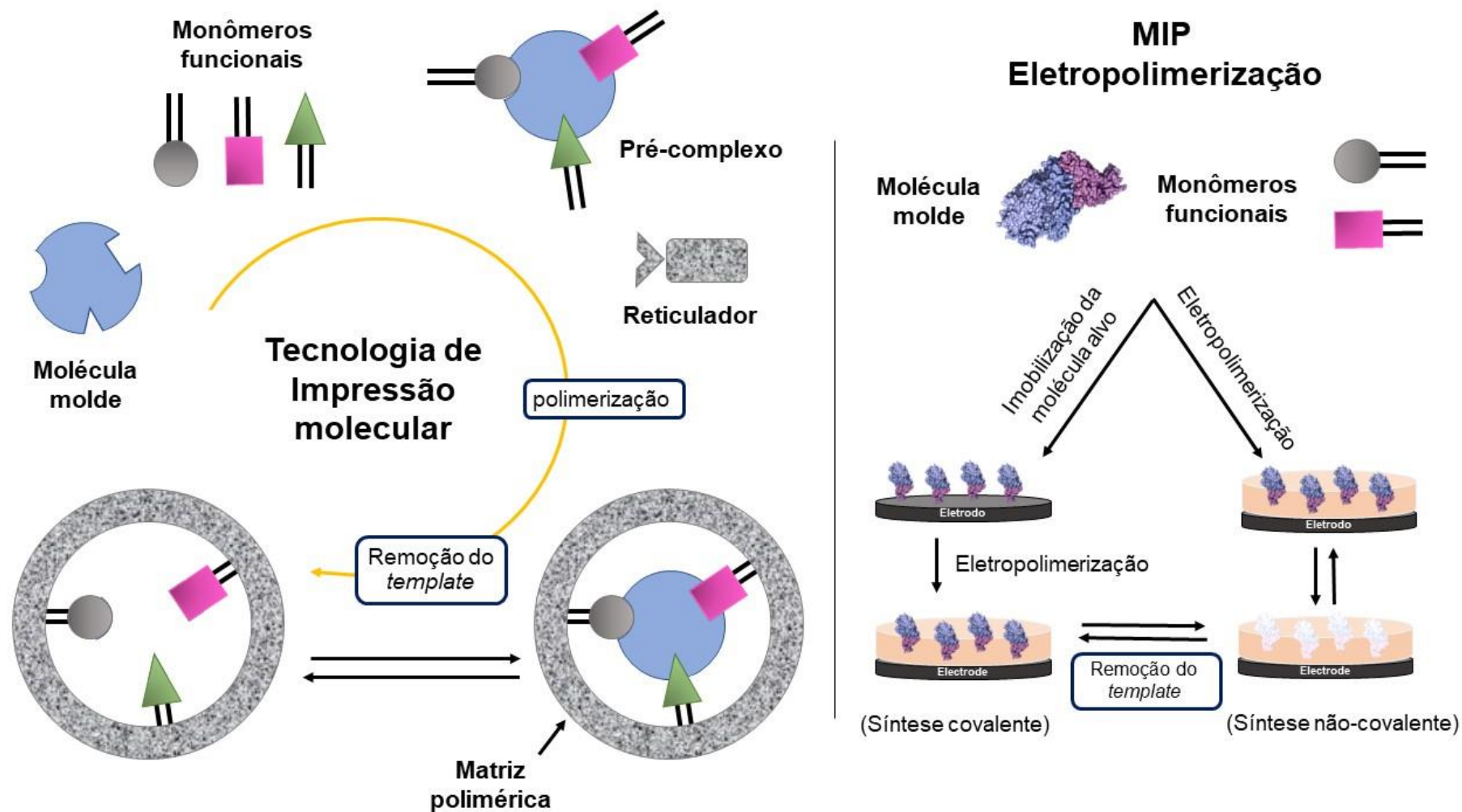
A escolha dos monômeros é crucial na preparação de MIPs, baseando-se na capacidade de estabelecer interações com a molécula molde de forma covalente ou não covalente (Ali *et al.*, 2022; Dong *et al.*, 2021; Parisi *et al.*, 2021). Existem três abordagens principais para sintetizar esses polímeros:

- *Síntese Covalente*: Ligações covalentes entre o molde e os monômeros funcionais durante a pré-polimerização, com clivagem química após a polimerização;
- *Síntese Semi-covalente*: Ligações covalentes durante a polimerização e interações não covalentes na religação;
- *Síntese Não-covalente*: Interações não-covalentes (ligações de hidrogênio, eletrostáticas,  $\pi$ - $\pi$  e hidrofóbicas) durante a polimerização e reconhecimento subsequente. Este método é amplamente utilizado devido à sua simplicidade experimental e à variedade de monômeros funcionais disponíveis.

Existem dois tipos principais de interações na impressão de glicoproteínas, covalentes e não covalentes. Para interações covalentes, o uso de ligantes de afinidade de boronato são frequentemente utilizados (Ayankojo *et al.*, 2022; Hashemi *et al.*, 2021; Yin *et al.*, 2023). Abordagens não covalentes usam interações hidrofílicas, hidrofóbicas, eletrostáticas e de quelação e forças de van der Waals para capturar as glicoproteínas modelo na cavidade de impressão (Ramanaviciene; Ramanavicius, 2004; Wang *et al.*, 2019). Como os MIPs são os anticorpos “plásticos” ou imitadores de anticorpos, inspirados no mecanismo natural de captura dos anticorpos, as interações não covalentes apresentam algumas vantagens atraentes, como cinética de ligação rápida e facilidade de remoção do modelo (Ali *et al.*, 2022; Ramanavičius *et al.*, 2022).

Na Figura 9 é apresentado de forma genérica do procedimento de síntese em *bulk* e por eletropolimerização (*via* ligação covalente e não-covalente).

**Figura 9** – Esquema representativo do processo de impressão molecular por *bulk* e por eletropolimerização.

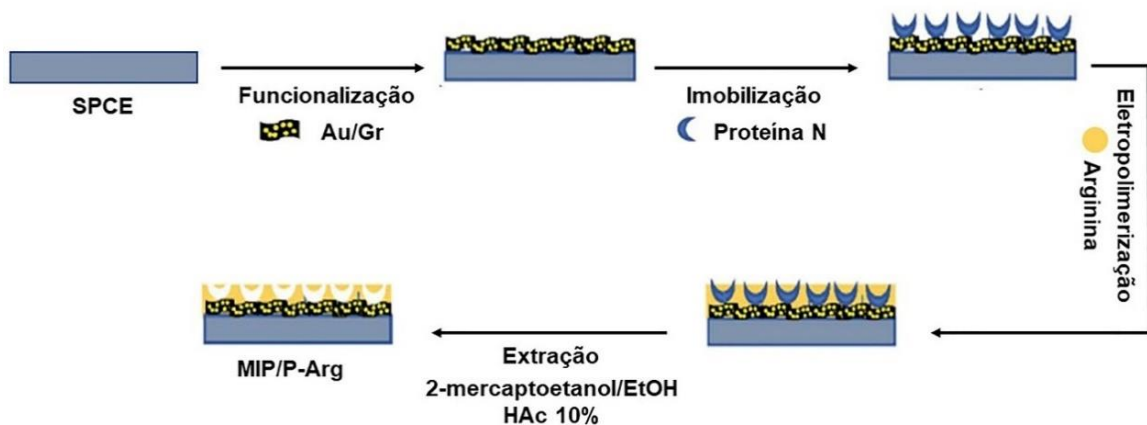


Fonte: a própria autora.

Alguns sensores eletroquímicos foram reportados na literatura, empregando a tecnologia de impressão química para o diagnóstico de COVID-19. Raziq e colaboradores relataram o primeiro sensor biomimético para a detecção da proteína N (Raziq *et al.*, 2021). O sensor-MIP foi preparado pela modificação do eletrodo de Au-TFE com filme de poli-*m*-fenilenodiamina (PmPD). Para a imobilização covalente da proteína N, o Au-TFE foi inicialmente modificado incubando-o por 30 min em uma solução etanólica contendo 4-aminotiofenol e posteriormente em solução de DTSSP em PBS por 30 min, para a criação da monocamada de ligante clivável. Assim, a proteína N foi imobilizada no sensor pela sua incubação em meio de PBS por 30 min. Em seguida, o filme de PmPD foi eletrodepositado e as impressões moleculares no filme foram geradas tratando o filme polimérico com solução etanólica de 2-mercaptoetanol, para clivagem das ligações S–S do DTSSP, seguido da lavagem com HAc 10%. As medidas foram realizadas com a técnica DPV usando sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e o LQ alcançado foi de  $2,2 \text{ pg mL}^{-1}$ . O sensor foi capaz de detectar a presença da proteína N em quatro amostras de *swab* nasofaríngeas de pacientes positivos de Covid-19. A concentração encontrada nas amostras variou de 2 a  $9 \text{ pg mL}^{-1}$ .

Zhang e colaboradores também relatam o desenvolvimento de um sensor para detecção de proteína N (Zhang, Sun; Zhang, 2021), conforme esquema apresentado na Figura 10.

**Figura 10** – Representação esquemática da síntese do sensor MIP/P-Arg baseado em L-arginina eletropolimerizada para detecção da proteína N, proposto por Zhang e colaboradores.

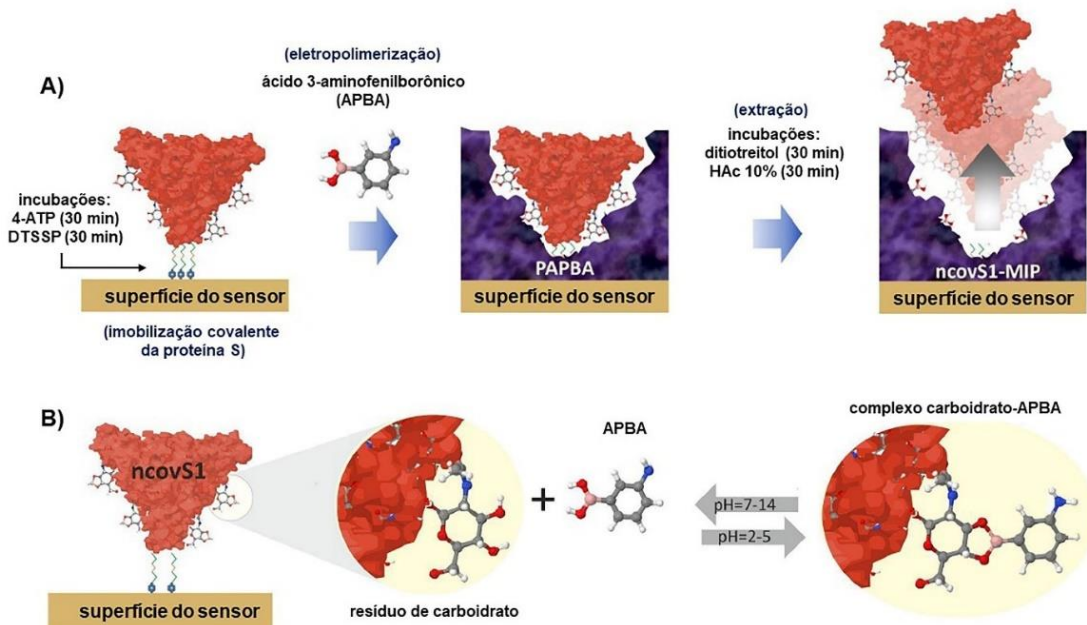


Fonte: adaptado de (Zhang; Sun; Zhang, 2021).

Os autores modificaram SPCEs revestindo-os com uma suspensão de nanohíbridos de ouro/grafeno (Au/Gr), seguido da imobilização covalente da proteína N. O eletrodo foi imerso em uma solução de L-arginina em PBS e 18 ciclos foram aplicados resultando no filme de poliarginina (P-Arg). A extração da proteína também foi realizada com solução etanólica de 2-mercaptoetanol, seguido da lavagem com HAc 10%. As medidas foram realizadas com a técnica DPV usando sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/4^-$  e o LD alcançado foi de  $0,15 \text{ pg mL}^{-1}$ . O sensor desenvolvido foi aplicado em amostras de saliva humana e amostras nasais artificiais, as mesmas foram enriquecidas e apresentaram taxas de recuperação entre 94 a 102%.

Ayankojo e colaboradores fabricaram um sensor MIP para o diagnóstico da proteína S SARS-CoV-2 usando eletrodos metálicos de película fina à base de ouro (Au-TFME) (Ayankojo *et al.*, 2022), conforme apresentado na representação esquemática na Figura 11.

**Figura 11** – Representação esquemática da síntese do ncovS1-MIP para detecção da proteína S desenvolvido por Ayankojo e colaboradores (A). Esquema mostrando a interação covalente dos grupos carboidratos (esferas vermelhas) da proteína S glicosilado com o grupo ácido borônico do ácido 3-aminofenilborônico (B).



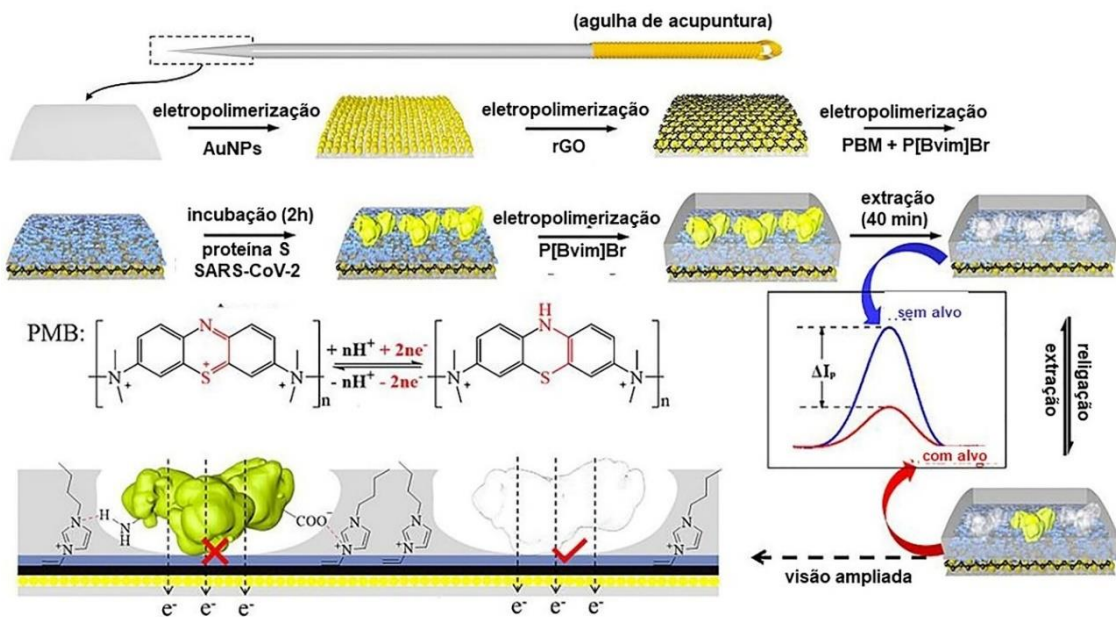
Fonte: adaptado de (Ayankojo *et al.*, 2022).

Para a síntese do MIP, inicialmente o eletrodo foi modificado com 4-ATP e DTSSP. Posteriormente, foi realizada a imobilização da proteína S em meio PBS. O

filme polimérico foi obtido pela eletrodeposição de uma fina película de ácido poli(3-aminofenilborônico) (APBA). Devido à capacidade do glicogênio  $-B(OH)_2$  de formar ligações covalentes reversíveis, o uso de APBA é adequado para o reconhecimento de proteínas (Erdossy *et al.*, 2016). A remoção da molécula molde foi realizada com ditioneitol, seguida de lavagem com ácido acético. As medidas foram realizadas por SWV com o auxílio da sonda redox  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  e, o sensor foi capaz de detectar proteína S em amostras de swab nasofaríngeo com um LQ de  $3,8 \text{ pg mL}^{-1}$ . A concentração encontrada nas amostras variou de 9 a  $21 \text{ pg mL}^{-1}$ .

Yang e colaboradores descrevem o desenvolvimento de um método eletroquímico utilizando uma agulha de acupuntura para detecção de proteína S (Yang *et al.*, 2023) (Figura 12).

**Figura 12** – Representação esquemática da síntese do MIP em agulha de acupuntura para detecção da proteína S proposta por Yang e colaboradores.



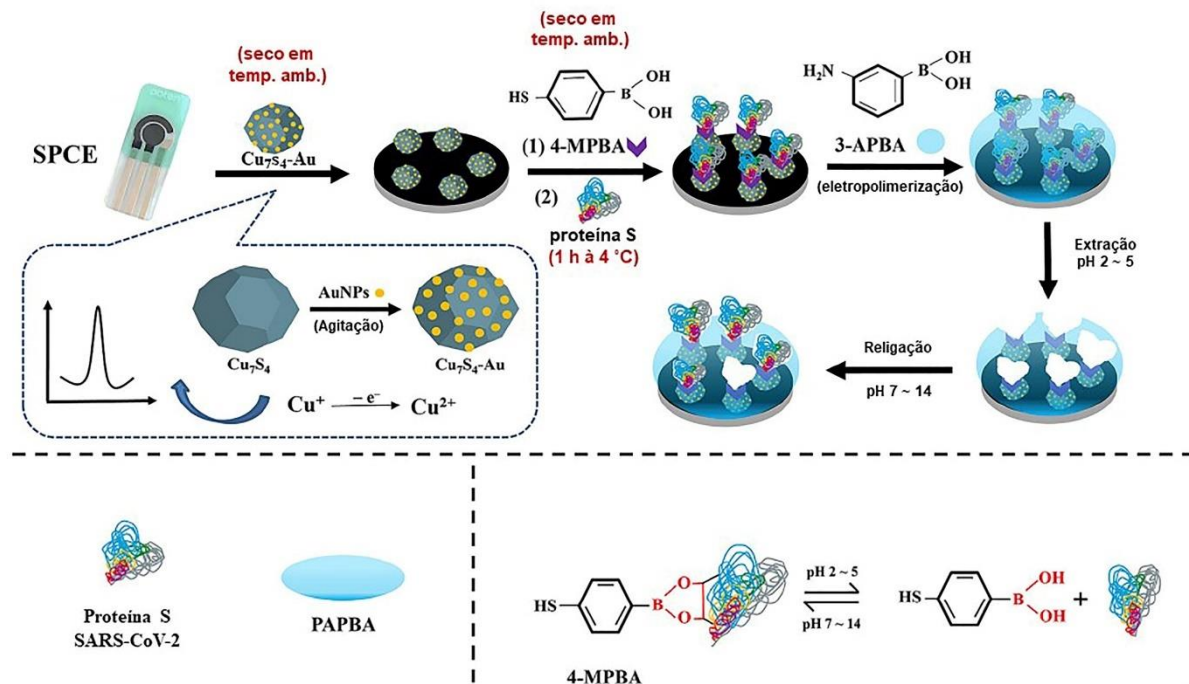
Fonte: adaptado de (Yang *et al.*, 2023).

Os autores usam uma agulha de acupuntura como eletrodo de trabalho e a modificam com AuNPs e rGO, seguido da eletropolimerização simultânea de azul de metileno (MB) e brometo de 1-vinil-3-butimidazólio ([Bvim]Br). O eletrodo modificado é incubado em uma solução de proteína S, e então o [Bvim]Br foi eletropolimerizado novamente na superfície do eletrodo. A molécula molde foi eluída com PBS 0,1 M (pH = 5,0) contendo 5% (v/v) de metanol. A detecção da proteína S foi realizada por SWV usando  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  como sonda redox. O sensor apresentou um LQ de  $100 \text{ pg mL}^{-1}$ .

A confiabilidade do sensor foi avaliada pela detecção de proteína em amostras de soro humano. As amostras foram enriquecidas e apresentaram uma faixa de recuperação de 94 a 102%.

Outra proposta diferente foi relatada para a detecção de proteína S por Yin e colaboradores, conforme representação esquemática na Figura 13. Os autores modificam um SPCE com  $\text{Cu}_7\text{S}_4$  decorado com AuNPs, que atua como uma sonda, e imobilizam a proteína S usando o ligante 4-MPBA (Yin *et al.*, 2023). O filme polimérico foi obtido pela eletropolimerização de 3-APBA. A molécula molde foi extraída usando  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . As medidas foram realizadas por DPV e um LQ de  $5,0 \text{ pg mL}^{-1}$  foi alcançado. O sensor foi aplicado em três amostras de soro humano e submetidas ao método de adição de padrão e apresentou uma faixa de recuperação de 99 a 102%.

**Figura 13** – Representação esquemática da síntese do sensor MIP baseado em 3-APBA eletropolimerizado para detecção da proteína S, proposto por Yin e colaboradores.



Fonte: adaptado de (Yin *et al.*, 2023).

Um sensor baseado em MIP para a detecção de SARS-CoV-2 RBD foi desenvolvido por Tabrizi e colaboradores usando eletrodos macroporosos impressos em tela de ouro (Tabrizi *et al.*, 2022). O MIP foi eletropolimerizado na superfície do eletrodo usando o-fenilenodiamina (monômero funcional) na presença de moléculas

SARS-CoV-2-RBD (modelo). A remoção do modelo foi realizada utilizando etanol alcalino. As medidas foram realizadas usando  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  como sonda redox através da técnica de EIS, e o sensor apresentou um valor LD de  $0,7 \text{ pg mL}^{-1}$ . O LQ não é apresentado, porém, o primeiro ponto da curva analítica foi de  $2,0 \text{ pg mL}^{-1}$ . O sensor foi aplicado em amostra de saliva humana enriquecidas com SARS-CoV-2 RBD em duas concentrações diferentes e comparado com resultados obtidos pelo teste de ELISA.

O uso de sensores baseados em MIP para a detecção do vírus inteiro de SARS-CoV-2 também foi relatado. Sharif e colaboradores desenvolveram um sensor eletroquímico para o reconhecimento seletivo de todo o vírus SARS-CoV-2 (El Sharif *et al.*, 2022). A deposição eletroquímica do MIP ocorreu na superfície do SPCE usando uma solução contendo N-hidroximetilacrilamida como monômero funcional, N,N'-metilenobisacrilamida como reticulador e pseudopartículas de SARS-CoV-2 como modelo. O vírus foi extraído eletroquimicamente usando uma solução de PBS. A técnica de EIS foi utilizada para avaliar as respostas eletroquímicas e o par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  foi utilizado como sonda. O sensor MIP mostrou um tempo de resposta de  $<10 \text{ min}$  com uma faixa dinâmica linear que foi encontrada como  $3,0-7,0 \log_{10} \text{ pfu mL}^{-1}$  e um LD de  $4,9 \log_{10} \text{ pfu mL}^{-1}$ . No geral, as amostras de saliva de pacientes positivos e negativos analisados tiveram uma concordância de 75% entre o método do sensor MIP e o método LAMP.

Entretanto, vale ressaltar a detecção de vírus inteiros baseadas em MIP ainda é um desafio, o que pode estar relacionado à grande dificuldade em produzir cavidades seletivas utilizando vírus inteiros como modelo, devido a arquitetura frágil, grandes dimensões e baixa estabilidade em solventes orgânicos (Sykora *et al.*, 2015). O processo de impressão requer um grande número de vírus puros, equipamentos e pessoal experiente para isolamento e purificação de amostras (Zaidi, 2021). Além disso, a formação de locais de ligação heterogêneos e uma maior probabilidade de reações cruzadas podem ocorrer devido ao número significativo de locais de interação e grupos funcionais na superfície viral (Yarman; Kurbanoglu, 2022).

Em geral, a preparação dos sensores relatados é demorada, fazem uso de eletrodos não descartáveis e em alguns casos a real aplicabilidade do método não foi investigada, ou seja, amostras clínicas não foram analisadas. Além disso, apresentam diversas etapas de síntese envolvendo a utilização de nanopartículas metálicas e nanoestruturas de carbono, como o grafeno.

Ademais, durante a elaboração do nosso artigo de revisão, constatou-se que a literatura apresenta um número significativamente maior de publicações no campo dos biossensores em comparação aos sensores baseados em tecnologia de impressão química para a detecção de SARS-CoV-2 (Ferreira; Yamada-Ogatta; Teixeira Tarley, 2023). Essas observações destacam o potencial para a exploração e aprimoramento de novas estratégias de síntese voltadas ao diagnóstico da COVID-19, visando alcançar maior eficiência em termos de simplicidade, sensibilidade e rapidez, tanto na síntese quanto na obtenção da resposta analítica.

## 2.5 MONÔMEROS ELETROATIVOS EMPREGADOS NA SÍNTESE DE MIPs - POLIPIRROL

Monômeros eletropolimerizáveis que podem ser depositados a partir de soluções aquosas, nas quais as biomoléculas, como proteínas, são preservadas em sua conformação natural são de grande interesse. Tampões que melhoram a estabilidade das proteínas podem servir como eletrólito suporte durante o processo de polimerização eletroquímica (Erdossy *et al.*, 2016).

Alguns monômeros usualmente empregados são: pirrol, anilina, acrilamida, arginina, etilenodiamina, ácido 3-aminofenilborônico, fenilenodiamina, fenol e derivados, tiofeno e derivados (Erdossy *et al.*, 2016; Özkorucuklu; Şahin; Alsancak, 2008; Ramanavičius, A.; Ramanavičiene; Malinauskas, 2006). Entre os monômeros citados, o pirrol (Py) possui propriedades atrativas para impressão de biomoléculas devido à possibilidade de utilizá-lo em solução aquosa em pH neutro e por ser fácil a sua polimerização em diversos substratos aplicando baixos potenciais (Özkorucuklu; Şahin; Alsancak, 2008; Ramanavičius, A.; Ramanavičiene; Malinauskas, 2006).

As inúmeras pesquisas sobre MIPs baseados em polipirrol formados eletroquimicamente confirmam vantagens significativas dos MIPs baseados em PPy no design de sensores. MIPs baseados em polipirrol foram aplicados em projetos de sensores para a determinação de dopamina (Teng; Liu; Kan, 2017), testosterona (Liu *et al.*, 2017), serotonina (Yola; Atar, 2018), microcistina-LR (Zhang, JING; Xiong; Chen, 2017), proteína do vírus da leucemia bovina (BLV) (gp51) (Ramanavicius *et al.*, 2010) e bactéria – *Listeria monocytogenes* (Liustrovaite *et al.*, 2023). Ainda, no campo de bioanálises, estudos publicados anteriormente abordam que o polímero condutor polipirrol tem excelente compatibilidade com células-tronco (Vaitkuvienė *et al.*, 2014).

Os filmes de polipirrol (PPy) podem ser obtidos por síntese química ou eletroquímica. Na síntese química, o polipirrol é formado pela oxidação do anel de pirrol em uma solução aquosa ou orgânica. Os agentes oxidantes mais comumente usados são o persulfato de potássio e o cloreto de ferro. A reação ocorre em etapas, com a formação de um intermediário, o íon polipirrolil, que polimeriza para formar o polipirrol (Mao; Zhang, 2018; Pal *et al.*, 2020). Por sua vez, na síntese eletroquímica o polipirrol é formado pela redução do anel de pirrol em uma solução aquosa ou orgânica, em uma única etapa, com a formação direta do polipirrol (Sadki *et al.*, 2000).

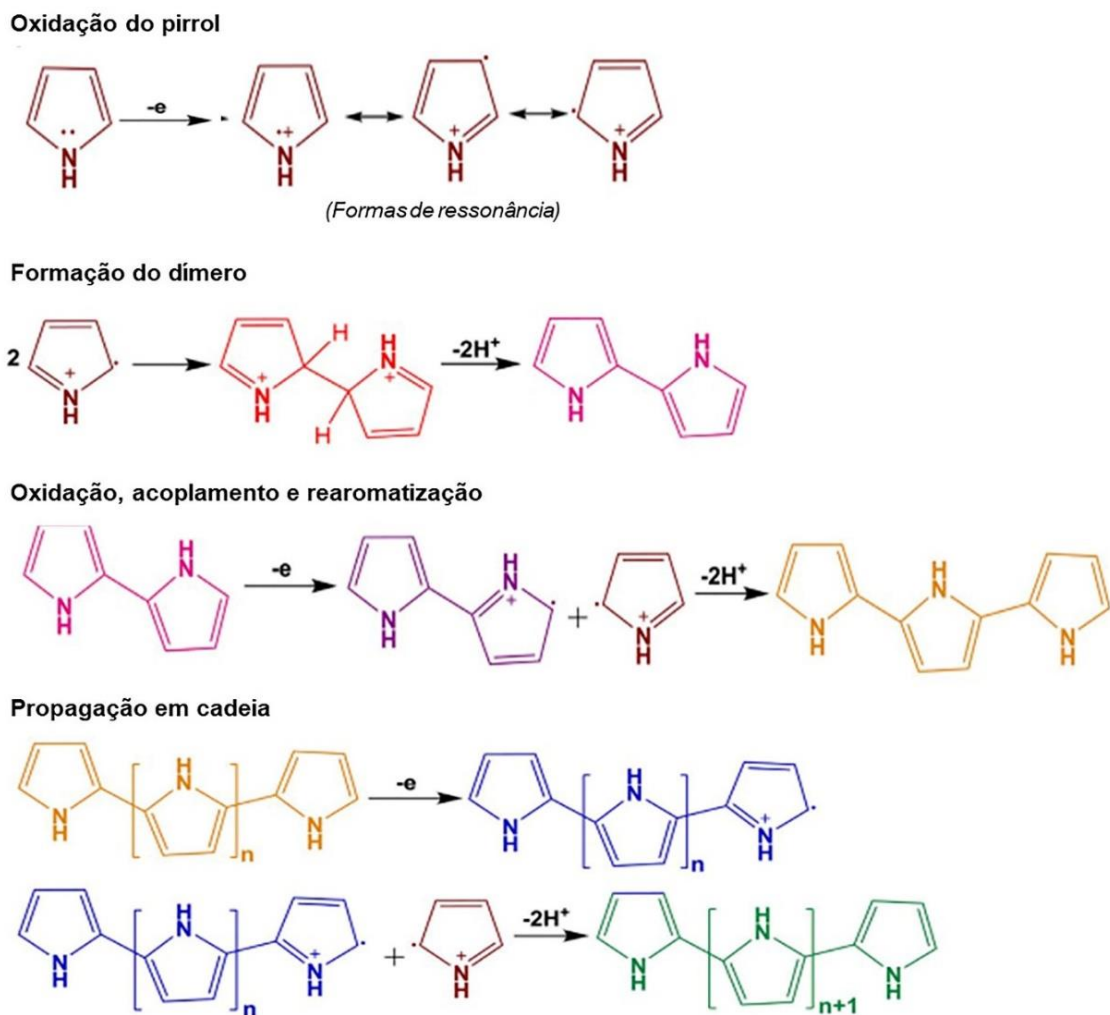
Portanto, a síntese eletroquímica é um método simples, rápido e controlável, sendo realizada por métodos potenciodinâmicos (voltametria cíclica), galvonostáticos (corrente constante) e potenciostáticos (potencial constante) (Zare *et al.*, 2021). Entre esses métodos, frequentemente, a CV é usada para induzir a polimerização do monômero funcional na superfície do eletrodo, e o crescimento do filme polimérico está diretamente relacionado ao número de ciclos sequenciais utilizados (Ferreira; Yamada-Ogatta; Teixeira Tarley, 2023; Ramanavicius; Oztekin; Ramanaviciene, 2014). Esta técnica oferece informações qualitativas sobre os processos redox na polimerização inicialmente, e é útil para caracterizar o filme polimérico formado (Luong *et al.*, 2020).

A reação de polimerização do PPy por CV é iniciada em potenciais acima de +0,6 V vs Ag/AgCl, pois, abaixo desse potencial, a reação é interrompida. Isso ocorre porque tal potencial é muito baixo para a geração de radicais catiônicos de pirrol, que são necessários para o início da reação de polimerização. Contudo, se em certo período do ciclo o potencial do eletrodo exceder +1,2 V vs Ag/AgCl, a eletrólise da água e/ou a superoxidação da camada de PPy formada é induzida. Este fenômeno não é desejável pois a superoxidação do PPy pode induzir a formação de um filme menos estável e reprodutível, como também facilitar o desprendimento do filme (Ramanavicius; Oztekin; Ramanaviciene, 2014).

Quanto ao mecanismo de eletropolimerização do PPy, existem algumas propostas, tais como o mecanismo de Diaz, o mecanismo de Kim, de Reynolds e de Pletcher (Sadki *et al.*, 2000). Sendo o mecanismo proposto por Diaz o mais aceito na literatura atual (Figura 14). Conforme Diaz e colaboradores, inicialmente ocorre a oxidação do monômero na superfície do eletrodo para formar um cátion-radical, que apresenta várias formas de ressonância. O cátion-radical reage com outro cátion-radical ou com um monômero neutro em solução. Em cada caso, leva-se à formação

de um dímero cátion-radical, que sofre uma dupla desprotonação para uma obtenção de uma molécula neutra. Os radicais do dímero são mais estáveis e tem um potencial de oxidação mais baixo em comparação aos monômeros e, em seguida, o crescimento da cadeia ocorre através de acoplamento preferencial entre os dímeros e monômeros (Sadki *et al.*, 2000; Zare *et al.*, 2021).

**Figura 14** – Representação esquemática da síntese eletroquímica do polipirrol.



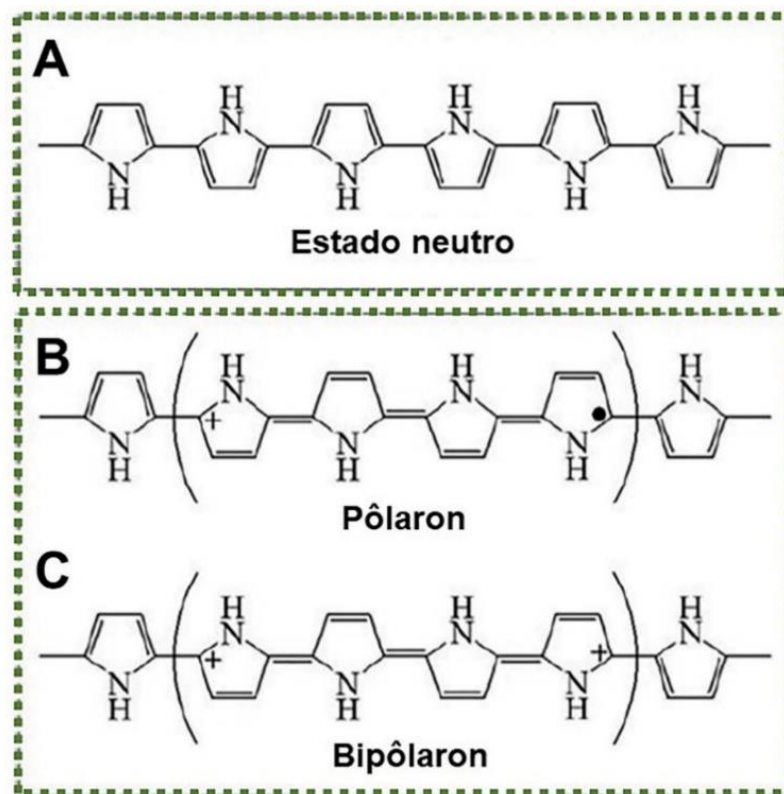
Fonte: (Zare *et al.*, 2021) (p. 3).

O PPy neutro (Figura 15a), é categorizado como um isolante, com um valor de *band gap* de 3,16 eV (Pal *et al.*, 2020). A remoção inicial de um elétron da cadeia leva a formação de um estado eletrônico denominado pôlaron (cátion radical), ao qual está associada a uma distorção da cadeia da forma aromática para a forma quinônica (Figura 15b). A estrutura quinônica tem energia de formação menor e maior afinidade

eletrônica que a forma aromática (Medeiros *et al.*, 2012; Zare *et al.*, 2021). Novamente, à medida que a oxidação prossegue, em altos estados de oxidação, outro elétron é removido do nível polarônico, resultando na formação de um bipôlaron (Figura 15c), que consiste em um par de cargas, isto é, um dicátion, com spin zero. À medida que o processo de oxidação avança, o polímero é cada vez mais oxidado e finalmente forma duas bandas estreitas de bipôlarons, resultando na redução do intervalo de bandas de 3,16 para 1,4 eV (Pal *et al.*, 2020).

Assim sendo, o PPy existe em três estados de oxidação, a saber, PPy neutro, o pôlaron de carga única (cátion radical) e o bipôlaron de carga dupla (dicátion) (Mao; Zhang, 2018). O mecanismo de condutividade do polipirrol pode ser explicado baseando-se na formação dos pôlarons e bipôlarons. O par de defeitos (bipôlaron) estende-se por três a quatro unidades monoméricas e é a movimentação dos bipôlarons que dá origem a condutividade do polipirrol (Mao; Zhang, 2018; Medeiros *et al.*, 2012; Zare *et al.*, 2021). Portanto, as propriedades eletroquímicas do PPy dependem fortemente de seu estado redox.

**Figura 15** – Estruturas de PPy neutro (A) e oxidado, nas formas pôlaron (B) e bipôlaron (C). +: carga; •: elétron desemparelhado.



Fonte: Adaptado de (Mao; Zhang, 2018).

Durante a eletrosíntese de MIPs, biomoléculas podem ser difundidas e aprisionadas na matriz polimérica, o que pode ser atribuído à interação entre o molde e o monômero funcional. Na eletropolimerização do PPy com a proteína S de SARS-CoV-2, a interação pode ser mediada por ligações de hidrogênio, as quais ocorrem entre o hidrogênio no grupo amino da estrutura da proteína S e o átomo de nitrogênio dos grupos pirrol (N-H), como por interações eletrostáticas e hidrofóbicas (Ramanaviciene; Ramanavicius, 2004; Zidarič *et al.*, 2023). A ramificação da cadeia e a reticulação em polipirrol geram uma matriz tridimensional com nichos contendo a molécula molde. Este processo de impressão cria um microambiente para o reconhecimento da molécula molde com base na seleção de forma e posicionamento dos grupos funcionais (Falone; Buffon; Stradiotto, 2022; Özkorucuklu; Şahin; Alsancak, 2008).

Na literatura, encontra-se um estudo que utiliza polipirrol eletropolimerizado no desenvolvimento de um sensor-MIP para a detecção da proteína S de SARS-CoV-2 (Ratautaite *et al.*, 2022). Nesse trabalho, os autores preparam o MIP por meio da eletropolimerização do Py na presença da proteína S e PBS, na superfície de um disco de platina (Pt). A extração do molde foi realizada pela incubação do sensor em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup> por 10 min. Utilizando a cronoamperometria como técnica de detecção, foi obtida uma curva analítica com faixa linear entre 5 µg mL<sup>-1</sup> a 25 µg mL<sup>-1</sup>. Entretanto, os testes de seletividade foram realizados apenas com BSA, e o sensor não foi aplicado em amostras clínicas.

Assim, embora este trabalho apresente algumas semelhanças com a proposta desta Tese, no que se refere ao uso do polipirrol e da tecnologia de impressão química, é fundamental destacar que o sensor desenvolvido não atingiu a sensibilidade necessária para aplicação em amostras clínicas. Em contrapartida, esta Tese, além de propor uma síntese simplificada, descreve uma estratégia que visa aprimorar a detectabilidade por meio de uma etapa de pré-concentração, utilizando um potencial que promove o acúmulo da proteína S no filme polimérico.

Ademais, é relevante observar que ainda existe uma lacuna no desenvolvimento de sensores MIP voltados ao diagnóstico da COVID-19, especialmente na busca por abordagens de síntese simplificada que, ao mesmo tempo, ofereçam uma elevada sensibilidade.

## 2.6 ESTRATÉGIAS USADAS PARA INCREMENTO DA DETECTABILIDADE DE SENSORES

Algumas estratégias podem ser adotadas para aprimorar a detectabilidade de plataformas eletroquímicas. Entre elas, a pré-concentração eletroquímica tem sido reportada na literatura, como a voltametria de redissolução (do inglês, *stripping voltammetry*). Essa estratégia está associada a reações eletroquímicas em que o analito é pré-concentrado seletivamente no eletrodo de trabalho, aplicando-se um potencial de deposição ou por adsorção antes da varredura e aquisição de sinal. Como consequência, observa-se um aumento da magnitude da corrente medida, com diminuição significativa dos limites de detecção alcançados para essas espécies químicas (Bard; Faulkner, 1994; Borrill; Reily; Macpherson, 2019).

As principais técnicas eletroquímicas que utilizam processos de pré-concentração incluem: voltametria de redissolução anódica, voltametria de redissolução catódica e voltametria de redissolução adsortiva. Nas duas primeiras, a etapa de pré-concentração consiste na eletrodeposição da espécie eletroativa sobre a superfície de um eletrodo de trabalho, em um potencial constante e controlado. Essa etapa é seguida por um período de repouso (equilíbrio) e, posteriormente, pela etapa de determinação, que envolve a redissolução da espécie previamente eletrodepositada de volta à solução (Bard; Faulkner, 1994; Borrill; Reily; Macpherson, 2019; Esmaeily *et al.*, 2021). Na voltametria de redissolução adsortiva, as espécies eletroativas são adsorvidas espontaneamente na superfície do eletrodo, sem a necessidade de aplicação de um potencial de acumulação.

Na literatura, a pré-concentração eletroquímica usando voltametria de redissolução anódica para determinação de íons metálicos (Borrill; Reily; Macpherson, 2019), voltametria de redissolução catódica para radioisótopos (Wu *et al.*, 2023) e voltametria de redissolução adsortiva foram relatadas (Angelis *et al.*, 2022; Toro; Marestoni; Sotomayor, 2015).

Recentemente, polímeros condutores eletropolimerizados têm sido empregados na pré-concentração eletroquímica de substâncias não eletroativas, que são convertidas em eletroativas por meio de interação com o polímero superoxidado (Esmaeily *et al.*, 2021; Ghoorchian *et al.*, 2020). Nessa abordagem, a eletropolimerização promove a pré-concentração da molécula, estabelecendo-se como um método de pré-concentração eletroquímica. Posteriormente, o

monitoramento da molécula é realizado por meio do registro de corrente com técnicas eletroanalíticas (Esmaeily *et al.*, 2021; Ghoorchian *et al.*, 2020).

O uso do PPy, embora já consolidado na extração em fase sólida e na modificação de sensores, também tem sido utilizado em uma nova perspectiva para SPE utilizando uma metodologia baseada em pré-concentração eletroquímica controlada, conhecida como EC-SPE (do inglês, *electrochemically controlled solid-phase extraction*) (De Lazzari *et al.*, 2019). Como mencionado, o filme de PPy apresenta variações nos estados de oxidação sob controle eletroquímico e, dessa forma, a capacidade de extração do polímero torna-se dependente do potencial aplicado de forma controlada (De Lazzari *et al.*, 2019; Mao; Zhang, 2018).

De acordo com a literatura, a adsorção de proteínas em filmes de PPy pode ocorrer através de diversas interações, como interações  $\pi$ , eletrostáticas, ácido-base, ligações de hidrogênio e troca iônica (De Lazzari *et al.*, 2019). Sendo que, a sua adsorção na superfície de filmes de PPy é governada principalmente por interações eletrostáticas e hidrofóbicas, que podem ser controladas por condições experimentais de adsorção, incluindo pH, força iônica, temperatura e aplicação de potencial (Benavidez *et al.*, 2015; García-álvarez; Vallet-Regí, 2021; Ramanaviciene; Ramanavicius, 2004). Portanto, essas interações do PPy mencionadas podem ser ajustadas sob controle eletroquímico, alterando o seu estado de oxidação. Esse fato, é evidenciado nos resultados experimentais obtidos nos trabalhos reportados por Benavides e colaboradores (Benavidez *et al.*, 2015; Benavidez; Garcia, 2013), que mostram um aumento na adsorção de proteínas por meio da aplicação de potencial por um período determinado.

Considerando as estratégias mencionadas e após uma extensa revisão da literatura, embora diversos métodos tenham sido propostos e aplicados com sucesso, não foram encontrados trabalhos que abordem a fabricação de um sensor MIP para diagnóstico de COVID-19 utilizando um processo de síntese simplificado com elevada detectabilidade. Além disso, não foram reportadas abordagens que empreguem a pré-concentração controlada eletroquimicamente para aprimorar a detectabilidade.

Portanto, destaca-se o caráter inovador desta tese, que consiste em desenvolver um novo método de detecção da proteína S do SARS-CoV-2 em amostras de saliva apenas diluídas, utilizando um sensor MIP de polipirrol descartável. Neste trabalho, é relatado um processo de síntese simplificado e rápido, empregando a abordagem não-covalente. Além disso, foi investigada a utilização de uma etapa de

pré-concentração controlada eletroquimicamente para conferir alta detectabilidade ao método proposto.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

A presente investigação envolve o desenvolvimento de um método voltamétrico para detecção de proteína S – SARS-CoV-2 em saliva utilizando um sensor biomimético de baixo custo, descartável e com alta sensibilidade. O sensor é fabricado usando um eletrodo impresso de carbono modificado com MIP baseado em filme de polipirrol eletropolimerizado e o aumento na detectabilidade é alcançada usando a pré-concentração controlada eletroquimicamente.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fabricar um sensor eletroquímico usando um eletrodo impresso de carbono modificado com um filme eletropolimerizado de polipirrol com impressão química para proteína S;
- Avaliar o efeito de impressão do sensor MIP/PPy em relação ao sensor controle (NIP/PPy);
- Caracterizar eletroquimicamente o sensor pelas técnicas de CV e EIS, e morfologicamente pelas técnicas de ângulo de contato, MEV e AFM;
- Otimizar as variáveis da etapa de pré-concentração;
- Avaliar a performance analítica do sensor, seletividade, repetibilidade e estabilidade do sensor MIP/PPy;
- Aplicar o sensor em amostras clínicas de saliva humana e análise da capacidade de diferenciação do sensor frente a amostras de pacientes saudáveis (não infectados) e doentes (infectados com SARS-CoV-2).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

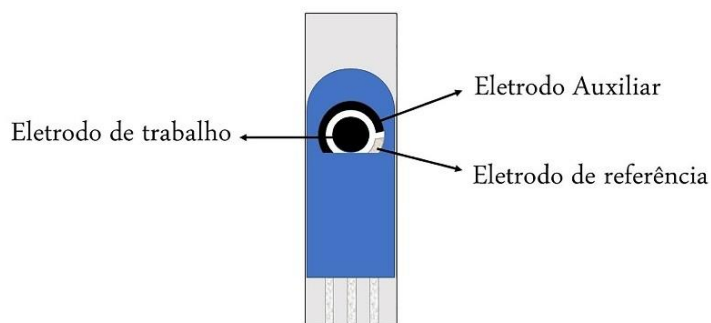
Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Ácido acético (HAc) ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\geq 99,7\%$ ), pirrol (Py) ( $\text{C}_4\text{H}_5\text{N}$ , 98%), ferrocianeto de potássio ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ), cloreto de potássio (KCl,  $\geq 99\%$ ), HSA (A1653), HlgG (56834), antitripsina plasmática humana (A6150), transferrina (T8158) e lisozima (62971) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). SDS ( $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ , 99%) foram adquiridos da Riedel-Haen (Charlotte, Carolina do Norte, EUA). Proteína *spike* subunidade S1 SARS-CoV-2 (aa14-683, peso molecular  $\sim 77,7$  kDa,  $\text{pI} \sim 5,9$ ) adquirida da Thermo Fischer Scientific. Tampão fosfato salino pH 7,3 (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) foi usado para preparar as soluções e na diluição das amostras. Todas as vidrarias e frascos utilizados neste trabalho foram previamente descontaminados em banho de  $\text{HNO}_3$  10% ( $\text{v v}^{-1}$ ) durante um período mínimo de 24h e depois enxaguadas com água deionizada. Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água ultrapura ( $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) proveniente do sistema de purificação ELGA PURELAB® Maxima (High Wycombe, Bucks, Reino Unido).

### 4.2 INSTRUMENTAÇÃO

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PalmSens 4 (Palm Instruments BV®, Houten, Holanda), controlado pelo software PSTrace 5.8 (Palm Instruments BV®) e o comportamento eletroquímico do filme polimérico foi avaliado usando uma sonda redox de ferricianeto de potássio na concentração  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e KCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ , como eletrólito suporte.

Os experimentos eletroquímicos foram realizados utilizando uma cela eletroquímica de vidro de compartimento único, com capacidade de 15,0 mL, contendo um eletrodo impresso de carbono (SPCE, do inglês *Screen-printed carbon electrode*) comercial, modelo DRP-110CNT da DropSens (Oviedo, Espanha). O substrato com dimensões de  $3,4 \times 1,0 \times 0,05 \text{ cm}$  apresenta um disco de 4 mm de diâmetro composto por um eletrodo de tinta de carbono como eletrodo de trabalho (com área geométrica de  $0,096 \text{ cm}^2$ ), eletrodo de tinta de carbono como eletrodo auxiliar e um eletrodo de tinta de prata como eletrodo pseudo-referência, conforme Figura 16.

**Figura 16** – Imagem ilustrativa de um eletrodo impresso de carbono.



**Fonte:** a própria autora.

As medidas de pH foram realizadas com um pHmetro (Metrohm® 826, Herisau, Switzerland).

Para as medidas de ângulo de contato estático, o procedimento foi realizado pela técnica da gota séssil (Yuan, et al., 2013). Uma gota de água ultrapura (3  $\mu\text{L}$ ) foi colocada sobre a superfície do eletrodo de trabalho, com ajuda de uma microseringa, e uma imagem da gota foi fotografada no plano transversal. Posteriormente, o ângulo de contato da gota com a superfície foi medido usando o software de livre acesso *Image J*. As imagens foram capturadas no plano transversal com uma câmera de celular de 12 megapixels, fixado em um suporte apropriado.

As características morfológicas da superfície do SPCE foram avaliadas por imagens de MEV usando um microscópio eletrônico de varredura modelo Quanta 200 (Philips-FEI *Company, Scientific and Technical Instruments*, Oregon, EUA), com voltagem de aceleração de 25 kV. Para esta análise, os materiais foram dispersos em uma fita dupla face e recobertos com uma fina camada de ouro (30 nm) utilizando um equipamento Bal-Tec SCD *Sputter Coatter* Leica® (Nova Iorque, EUA). As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálises (LMEM) na Central Multiusuária da Universidade Estadual de Londrina.

As características topográficas da superfície do SPCE foi realizada por AFM no instrumento Nanosurf FlexAFM. O cantilever utilizado foi o modelo Tap190AI-G (BudgetSensors) em modo sem contato, com raio de ponta  $\sim 10$  nm, frequência de ressonância de 190 kHz e velocidade de varredura de 1 linha/segundo. O software de livre acesso Gwyddion foi utilizado para o processamento das imagens e para o cálculo da raiz quadrada média da rugosidade (RMS). As análises foram realizadas

no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálises (LMEM) na Central Multiusuária da Universidade Estadual de Londrina.

### 4.3 PREPARAÇÃO DO SENSOR ELETROQUÍMICO

#### 4.3.1 Ativação do eletrodo

Foram avaliados 3 procedimentos diferentes para a ativação eletroquímica da superfície do eletrodo, conforme descrito abaixo:

- SPCE foi ativado por VC, em KCL 0,1 mol L<sup>-1</sup>, na faixa de potencial de -1,7 V a 1,7 V, por 40 ciclos, com velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup> (Silva, BÁRBARA V.M. *et al.*, 2016).
- SPCE foi ativado por VC, em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>, na faixa de potencial de 0 V a 1,5 V, por 15 ciclos, com velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup> (Janjani *et al.*, 2022; Serrano *et al.*, 2020).
- SPCE foi ativado por VC, em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>, na faixa de potencial de -0,3 V a 1,2 V, por 15 ciclos, com velocidade de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup> (Ramanaviciene; Ramanavicius, 2004).

Em cada procedimento, o SPCE foi mergulhado em 10,0 mL de solução de ativação e realizado as varreduras conforme descritas à cima. Em seguida, o eletrodo foi lavado com água ultra pura e a ativação foi avaliada por CV na faixa de potencial de -0,3 a 0,8V em uma taxa de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup> e step de potencial de 5 mV e por EIS em um intervalo de frequência de 100 kHz to 0.01 Hz e amplitude potencial de 10 mV, usando 10,0 mL de sonda redox de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 5,0 mmol L<sup>-1</sup> em KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>, como eletrólito suporte.

#### 4.3.2 Construção do sensor MIP/PPy

O SPCE previamente ativado foi submetido a deposição eletroquímica do filme de PPy. A otimização dos parâmetros da eletrossíntese baseou-se nas condições relatadas em artigos publicados na literatura. Assim sendo, em condições otimizadas, a eletropolimerização foi conduzida com 80 µL de uma solução desaerada contendo

0,3 mol L<sup>-1</sup> de Py, 40 µg mL<sup>-1</sup> de proteína S e 0,01 mol L<sup>-1</sup> de KCl, em PBS 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,3) (Ma *et al.*, 2017; Ramanavicius *et al.*, 2010; Zeng; Huang; Ma, 2017). Essa solução foi previamente preparada e mantida sob refrigeração à 4 °C por 30 min, antes de seu uso. A eletropolimerização sucedeu por CV na faixa de potencial de -0,2 V a 1,2 V, por 4 ciclos, com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup> (Kan *et al.*, 2012; Rebelo *et al.*, 2019; Wang; Zhu; Zhang, 2014; Zeng; Huang; Ma, 2017).

Após a eletropolimerização, o eletrodo modificado foi incubado em 10,0 mL da solução extratora (10% HAc e 0,2% SDS) por 1 h para a remoção da proteína S incorporada (Ayankojo *et al.*, 2022; Navakul *et al.*, 2021). Como controle, o NIP/PPy foi preparado e tratado exatamente da mesma maneira. As etapas da construção do sensor eletroquímico são mostradas na Figura 17.

Cada etapa da preparação do sensor foi caracterizada por CV na faixa de potencial de -0,3 a 0,8 V em uma taxa de varredura de 50 mV s<sup>-1</sup> e *step* de potencial de 5 mV e por EIS em um intervalo de frequência de 100 kHz a 0,01 Hz e amplitude potencial de 10 mV, usando 10,0 mL de sonda redox de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 5,0 mmol L<sup>-1</sup> em KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>, como eletrólito suporte.



#### 4.4 ENSAIOS DE RELIGAÇÃO DA PROTEÍNA S

Os ensaios de religação da proteína S foram realizados sob duas condições. Sob condições otimizadas, na primeira 5  $\mu\text{L}$  de 10  $\text{ng mL}^{-1}$  de proteína S preparada em PBS 50  $\text{mmol L}^{-1}$  foram depositados na superfície do sensor MIP/PPy e deixados secar por 40 min. O volume de 5  $\mu\text{L}$  usado, foi escolhido com intuito da gota ficar apenas sobre o eletrodo de trabalho, garantindo que toda massa de proteína S usada para a religação fosse seca sobre o filme polimérico. Na segunda, 30  $\mu\text{L}$  de 100  $\text{fg mL}^{-1}$  de proteína S preparada em PBS 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$  foram depositados sobre a superfície do sensor MIP/PPy e uma etapa de pré-concentração foi realizada aplicando um potencial controlado de 0,6 V por 1 minuto, utilizando a técnica de cronoamperometria. Ao final de cada ensaio de religação o eletrodo foi enxaguado com água ultrapura e o monitoramento da religação da proteína S foi realizado mergulhando o sensor MIP/PPy em 10,0 mL de solução de KCl 1,0  $\text{mol L}^{-1}$  contendo 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . A corrente de pico anódico foi medida usando voltametria de pulso voltamétrico (DPV, do inglês *Differential pulse voltammetry*) na faixa de potencial de -0,2 a 0,5 V (taxa de varredura de 100  $\text{mV s}^{-1}$ , com potencial de passo de 5 mV, amplitude de pulso de 100 mV e tempo de pulso de 5,0 s).

#### 4.5 PERFORMANCE ANALÍTICA DO SENSOR MIP/PPY

A resposta do sensor para a proteína S foi obtida calculando a variação das correntes de pico anódico da sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , como segue:

$$\Delta I = I_0 - I \quad (1)$$

onde  $I_0$  e  $I$  representa, respectivamente, as medidas antes e depois do ensaio de religação com solução de proteína S ou das amostras clínicas. O sinal referente ao branco (PBS) foi subtraído das medidas realizadas.

A curva analítica foi construída pelo método de calibração externa a partir das respostas obtidas após a religação de diferentes concentrações de proteína S em 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$  de PBS. O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com a recomendação da IUPAC (Long; Winefordner, 1983), definida como:

$$LD = 3std/m \quad (2)$$

$$LQ = 10std/m \quad (3)$$

onde *std* é o desvio padrão de 10 determinações em branco e *m* é a inclinação da curva analítica.

#### 4.6 ENSAIOS DE SELETIVIDADE, ESTABILIDADE E REUSABILIDADE

A seletividade do sensor MIP/PPy em relação à proteína S foi avaliada comparando as respostas da religação de outras proteínas como HSA (67 kDa, pl 4,7), HlgG (152 kDa, pl 8,8), antitripsina (52 kDa, pl 4,4), transferrina (80 kDa, pl 5,5) e lisozima (13 kDa, pl 10,7) nas mesmas concentrações utilizadas para proteína S (100 fg mL<sup>-1</sup>) em 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de PBS e utilizando a etapa de adsorção em potencial controlado.

A estabilidade de MIP/PPy também foi investigada por um período de 14 dias por meio da fabricação de vários sensores. Os sensores foram armazenados a 4 °C e as respostas obtidas, ao longo dos dias avaliados, foram comparadas com a resposta inicial (t = 1), realizada no mesmo dia que os sensores foram fabricados.

A fim de verificar a reutilização do sensor MIP/PPy, a sua reusabilidade foi investigada. Neste intuito, após a primeira religação o eletrodo foi submetido novamente ao processo de remoção da molécula molde usando HAc e SDS por 1 hora e em seguida realizada uma segunda religação.

#### 4.7 PREPARAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

A coleta das amostras foi realizada em tubos Falcon de 50 mL após alguns minutos do paciente ingerir um copo com água, que teve como objetivo facilitar a amostragem, evitando qualquer tipo de tratamento prévio e minimizando a presença de possíveis resíduos alimentares (Fabiani *et al.*, 2021). Um volume de aproximadamente 5,0 mL de saliva foi coletado. As amostras foram analisadas por RT-PCR pelos alunos do Laboratório de Microbiologia coordenado pela Prof<sup>a</sup> Sueli Fumie Yamada-Ogatta, sendo conduzido de acordo com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina

– CEP/UEL e do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CEPE), orientação (CAAE: 32492720.9.0000.5231). A escolha da amostragem clínica deveu-se à maior simplicidade e menor desconforto na coleta.

Para a detecção eletroquímica, as amostras de saliva foram diluídas 200 vezes com 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de PBS (pH 7,3). Foram analisadas dez amostras clínicas de pacientes saudáveis e três amostras de pacientes infectados pelo vírus SARS-CoV-2. As amostras negativas foram enriquecidas com duas concentrações diferentes de solução padrão de proteína S (65 e 100 fg mL<sup>-1</sup>) e os resultados de recuperação foram avaliados. As amostras analisadas, foram posteriormente armazenadas a -80 °C.

#### 4.8 ANÁLISE DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

A detecção eletroquímica foi realizada depositando uma alíquota de 30 µL da amostra diluída na superfície do sensor MIP/PPy. A etapa de adsorção/pré-concentração foi realizada aplicando um potencial de 0,6 V por 1 min. Após a religação da proteína S, o eletrodo foi enxaguado com água deionizada e submetido a medições de DPV na sonda redox. As amostras foram analisadas em duplicata (n = 2).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PREPARAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO SENSOR MIP/PPY

#### 5.1.1 Ativação do eletrodo

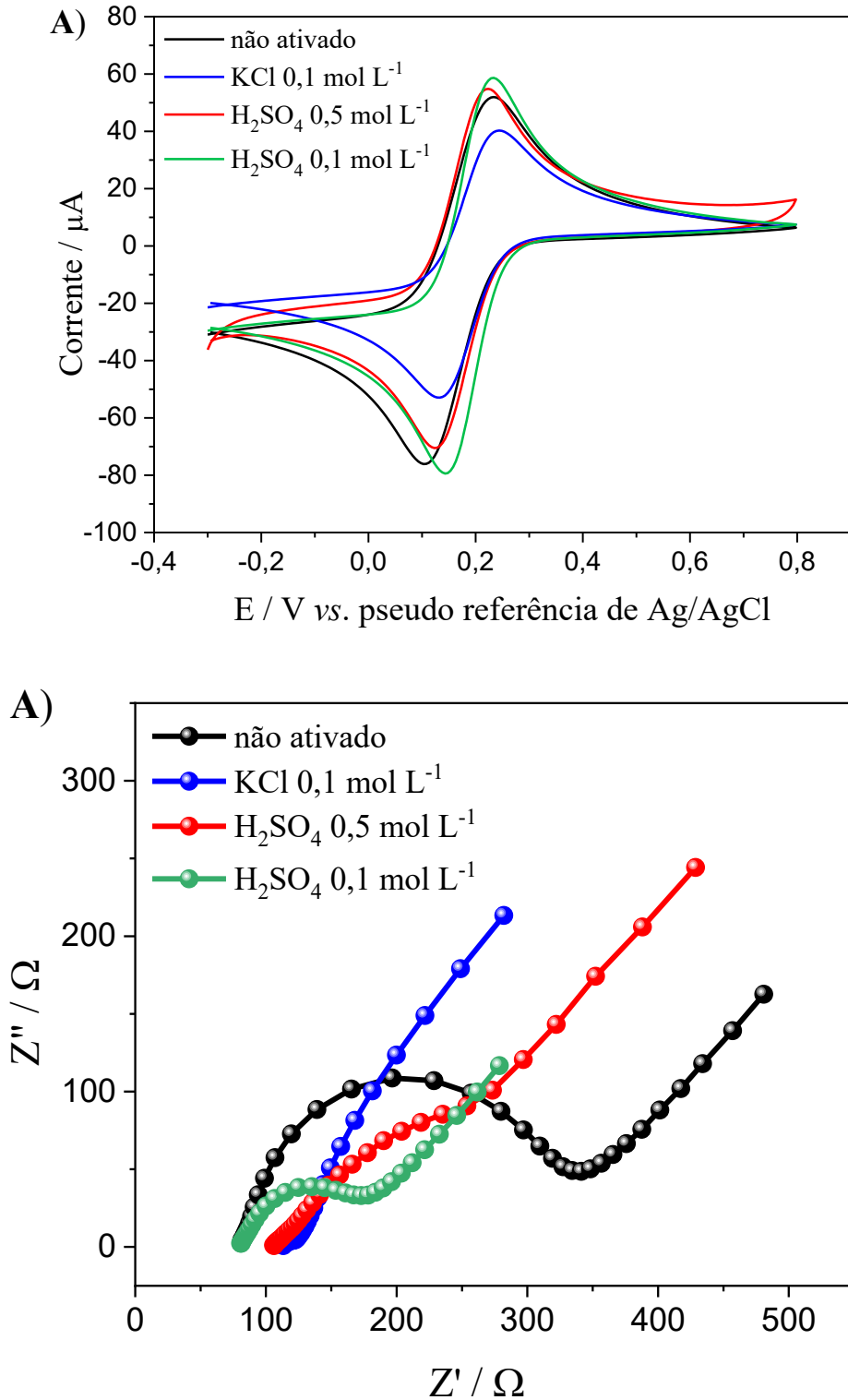
O conceito de ativação em eletrodos de carbono está relacionado com a presença de grupos funcionais em sua superfície, por exemplo, hidroxílicos e carboxílicos, que atuam como mediadores nos processos de troca eletrônica entre eletrodo e espécie eletroativa (Churinsky; Grgicak, 2014).

As superfícies dos eletrodos impresso não podem ser limpas por abrasão, sendo aplicados comumente procedimentos eletroquímicos que promovem a oxidação do eletrodo de trabalho. A ativação eletroquímica é realizada pela redução ou oxidação dos grupos funcionais na superfície, fazendo uso de técnicas como a voltametria cíclica (Churinsky; Grgicak, 2014). Esta etapa, aumenta a quantidade de grupos funcionais carbono-oxigênio na superfície e remove possíveis contaminantes da superfície (Cui *et al.*, 2001). A magnitude e a reversibilidade do sinal são melhoradas porque há um aumento na quantidade de sítios ativos no eletrodo (Wang *et al.*, 1996). Portanto, o procedimento de ativação promove o aprimoramento da cinética de transferência de carga na superfície do eletrodo, como a melhor adesão do polímero devido a adição dos grupos funcionais (Churinsky; Grgicak, 2014).

Assim, visando a ativação da superfície do SPCE, foram avaliados diferentes procedimentos de ativação, usando KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Após o procedimento de ativação, os eletrodos ativados e o eletrodo não ativado foram avaliados por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica mergulhando os eletrodos em uma cela eletroquímica contendo 10,0 mL da sonda redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 5 mmol L<sup>-1</sup> com eletrólito suporte KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>. O aumento dos valores de corrente de pico (*I<sub>p</sub>*) com o eletrodo ativado, como a redução da resistência da solução (*R<sub>s</sub>*) e da resistência à transferência de carga (*R<sub>ct</sub>*), são fatores que podem ser relacionados a um aumento da área superficial eletroativa proporcionada pelo pré-tratamento eletroquímico (Cui *et al.*, 2001).

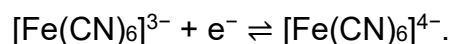
Na Figura 18 são apresentados os voltamogramas cíclicos e os espectros de impedância para os tratamentos de ativação realizados.

**Figura 18** – Voltamogramas cíclicos (A) e diagramas de Nyquist (B) para os eletrodos impressos de carbono, não ativado e ativados com KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 e 0,5 mol L<sup>-1</sup> em sonda redox. Condições de medidas: ferricianeto de potássio 5,0 mmol L<sup>-1</sup> e KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> como eletrólito suporte, velocidade de varredura na CV de 50 mV s<sup>-1</sup> e intervalo de frequência na EIS de 100 kHz a 0.01 Hz.



Fonte: a própria autora.

Após as ativações, o perfil voltamétrico da sonda se mantém constante, e observa-se uma redução na corrente capacitiva dos eletrodos impressos. Quanto ao comportamento do eletrodo em solução de ferricianeto, durante a varredura de potencial foi observado nos voltamogramas o perfil característico ao par redox:



As correntes de pico anódico ( $I_{pa}$ ) e catódico ( $I_{pc}$ ), as relações de  $I_{pa}/I_{pc}$  e  $\Delta E_p$ , assim como os valores de  $R_s$  e  $R_{ct}$  para o par redox nos eletrodos não ativado e ativado estão resumidos na Tabela 1.

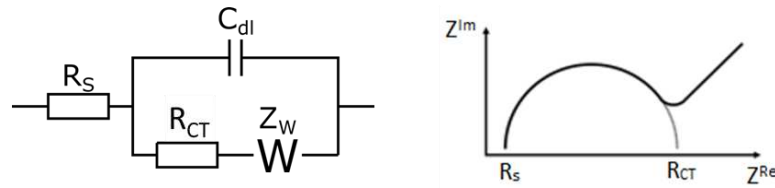
**Tabela 1** – Parâmetros voltamétricos e de impedância eletroquímica para os SPCEs não ativado e ativados com KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 e 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Condições de medidas: ferricianeto de potássio 5,0 mmol L<sup>-1</sup> em KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>.

Eletrodo	$I_{pa}$ (μA)	$I_{pc}$ (μA)	$I_{pa}/I_{pc}$	$\Delta E_p$ (mV)	$R_s$ (Ω)	$R_{ct}$ (Ω)
Não Ativado	65,683	70,590	0,930	131	120,2	305,7
Ativado KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup>	50,050	51,865	0,965	113	115,3	248,3
Ativado H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup>	78,039	78,830	0,989	89	103,6	143,3
Ativado H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 mol L <sup>-1</sup>	68,875	70,032	0,983	100	123,6	161,8

Fonte: a própria autora.

Para os três tratamentos foi observado melhorias nas características eletroquímicas do SPCE, como a redução nos valores de  $\Delta E_p$  e  $R_{ct}$ . Embora os valores observados para  $\Delta E_p$  foram superiores ao valor de referência para sistemas reversíveis (59 mV) (Greef; Peattie; Peter, 1990), a razão  $I_{pa}/I_{pc}$  foi próxima de 1, indicando que são sistemas reversíveis.

A EIS é uma técnica eficaz para monitorar as propriedades de interface de eletrodos modificados. Geralmente, o espectro de impedância inclui uma parte semicircular e uma parte linear. A parte linear em frequências mais baixas corresponde ao processo de difusão, enquanto o diâmetro do semicírculo em frequências mais altas é equivalente à resistência de transferência de cargas que revela a cinética de transferência de elétrons da sonda redox e pode ser estimada usando o circuito equivalente de Randles (Carvalho; Andrade; Bueno, 2006), conforme mostrado a seguir:



onde  $R_s$  representa a resistência da solução,  $R_{ct}$  representa a resistência à transferência de carga,  $C_{dl}$  se refere à capacitância da dupla camada elétrica e  $Z_w$  se refere à impedância de Warburg, associada à difusão das espécies eletroativas da solução em direção à superfície do eletrodo. Ao lado, é mostrado uma representação do modelo de um espectro de impedância eletroquímica (gráfico de Nyquist), ilustrando o sinal de impedância real ( $Z^{Re}$ ) e impedância imaginária ( $Z^{Im}$ ) para determinação de  $R_{ct}$  (Hernández *et al.*, 2020).

Dentre os tratamentos avaliados, a ativação com KCl foi o procedimento menos favorável, não sendo alcançado melhorias no processo de transferência eletrônica, o que pode estar relacionado ao potencial e a quantidade de ciclos superiores empregados. A ativação com ácido sulfúrico em ambas as concentrações resultou em melhorias significativas no processo de transferência eletrônica, conforme evidenciado pela redução expressiva no valor de  $R_{ct}$ . A condição de ativação com  $H_2SO_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , variando o potencial de eletrodo de  $-0,3 \text{ V}$  a  $1,2 \text{ V}$ , apresentou o maior ganho de corrente. Além disso, a análise do diagrama de Nyquist revelou uma redução no semicírculo após a ativação com  $H_2SO_4$  a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , corroborando com os resultados obtidos na voltametria cíclica. Portanto, esta condição foi selecionada para as próximas etapas.

### 5.1.2 Efeito da concentração do pirrol na eletropolimerização

Visando a determinação da proteína S em amostras clínicas, a otimização da síntese do MIP é fundamental para que o sensor alcance a melhor sensibilidade analítica. Os principais parâmetros otimizados foram a concentração do monômero e da molécula molde, a concentração da proteína S utilizada na etapa de religação, o número de ciclos, bem como o tempo de remoção da molécula molde.

Inicialmente, a concentração do monômero na eletropolimerização foi

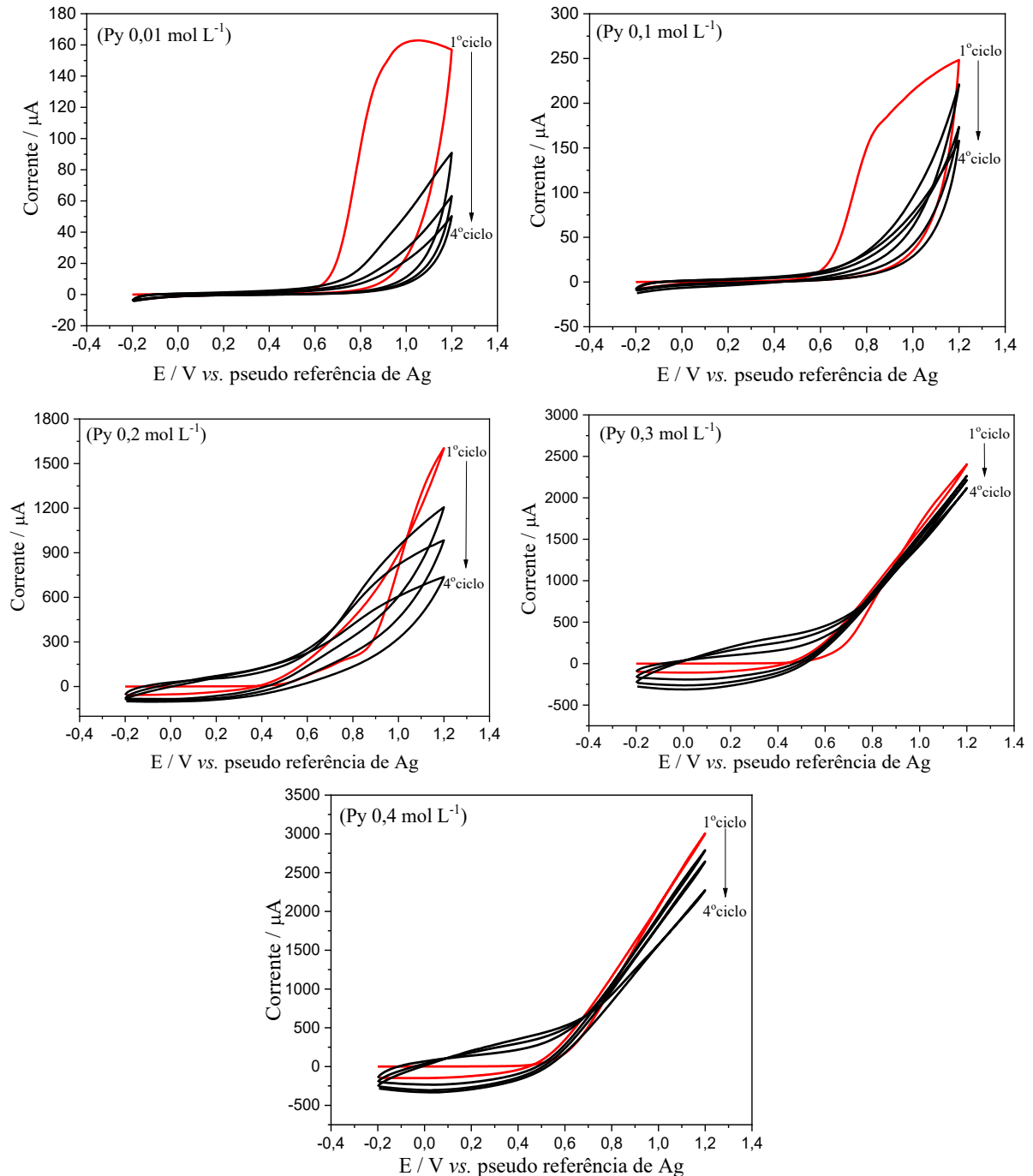
investigada, pois influencia diretamente a espessura e a quantidade do molde impresso na matriz polimérica (Kan *et al.*, 2012). Para este experimento, os MIPs foram preparados em soluções contendo  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  de proteína S como modelo sob diferentes concentrações de Py ( $0,01$  a  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ) e utilizando 4 ciclos de varredura de  $-0,2$  a  $1,2 \text{ V}$ . A remoção da proteína S foi realizada com solução de HAc  $10,0\%$  (v/v) contendo SDS  $0,2\%$  (m/v) durante 2 h e o ensaio de religação foi realizado com  $5,0 \mu\text{L}$  de  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  proteína S, que foi incubada durante 40 min na superfície do eletrodo.

Potenciais superiores a  $1,2 \text{ V}$  foram evitados na síntese do filme, pois, segundo a literatura, este potencial induz a eletrólise da água e/ou superoxidação da camada PPy formada. Esses fenômenos são indesejáveis uma vez que conduzem à formação de uma película de PPy facilmente destacável da superfície do eletrodo. Além disso, é relatado a formação de uma camada de PPy menos reprodutível, estável e de menor condutividade (Ramanavicius; Oztekin; Ramanaviciene, 2014; Ramanavičius, A.; Ramanavičiene; Malinauskas, 2006).

Na Figura 19 são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos na eletropolimerização dos MIPs usando diferentes concentrações de Py, sendo o primeiro ciclo identificado pela cor vermelha e os demais ciclos obtidos pela cor preta.

A formação do PPy é confirmada nos voltamogramas pela presença de um pico de oxidação em  $0,8 \text{ V}$ , correspondente à formação de cátions radicais do pirrol. Esses cátions contribuem para o crescimento do filme polimérico (Falone; Buffon; Stradiotto, 2022; Zeng; Huang; Ma, 2017). O processo de redução correspondente não é observado nos voltamogramas cíclicos, indicando um sistema irreversível. Com o aumento do número de ciclos, há uma diminuição na intensidade da corrente anódica evidenciando o crescimento contínuo do filme polimérico (Falone; Buffon; Stradiotto, 2022; Zeng; Huang; Ma, 2017). Essa diminuição no sensor MIP/PPy também pode ser atribuída à presença da proteína S, um molde não eletroativo, que ao ser aprisionada na matriz polimérica, torna o processo de eletrodeposição mais difícil a cada novo ciclo (Chen *et al.*, 2012; Özkorucuklu; Şahin; Alsancak, 2008). Durante a eletropolimerização a proteína atua como um dopante, compensando o excesso de cargas positivas na cadeia do polipirrol promovendo um equilíbrio.

**Figura 19** – Voltamogramas cíclicos obtidos durante a eletropolimerização dos sensores MIP/PPy em diferentes concentrações do pirrol. Condições de síntese: KCl  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , PBS  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 7,3), proteína S  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  e 4 ciclos na eletropolimerização. Faixa de potencial aplicada entre  $-0,2$  a  $1,2 \text{ V}$ , velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .



Fonte: a própria autora.

A proteína *spike* subunidade S1 usada como modelo, em pH 7,3 assume uma conformação estável na forma aberta, com locais de potencial eletrostático negativo e resíduos de aminoácidos que formam ligações de hidrogênio essenciais (Mori *et al.*,

2021; Pramanick *et al.*, 2021; Xie *et al.*, 2022). Assim, com base neste princípio, o aprisionamento da proteína durante a eletrossíntese pode ocorrer de forma mais organizada, possivelmente mediada por interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio. As interações de hidrogênio da glicoproteína *spike* do SARS-CoV-2 podem ocorrer entre os grupos aminas da proteína com os grupos –NH no anel pirrol e com grupos carboxila, carbonila e hidroxila parcialmente formados durante a oxidação parcial da estrutura PPy na eletropolimerização (Ratautaite *et al.*, 2023; Zidarič *et al.*, 2023).

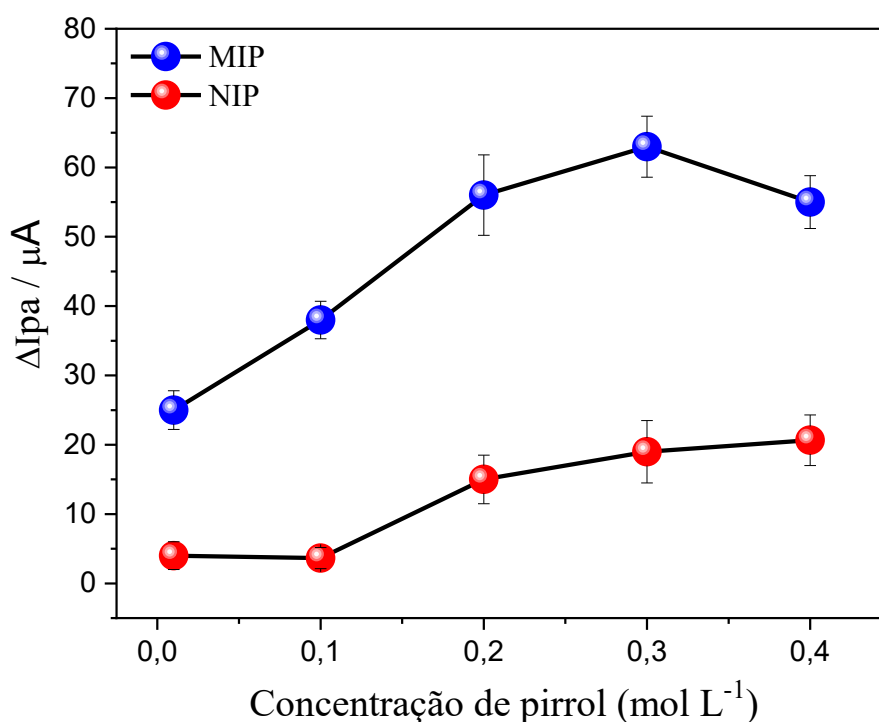
Outra observação referente a Figura 19, é a mudança do perfil voltamétrico conforme o aumento da concentração do monômero. Em concentrações maiores de pirrol, a resolução do pico de oxidação torna-se menos definida e um aumento nas correntes faradaica e capacitiva é observado. Essas variações podem ser atribuídas à influência da concentração do monômero na espessura do filme e na quantidade de moléculas depositadas na matriz polimérica, o que causa alterações no comportamento eletroquímico (Kan *et al.*, 2012).

A resposta analítica para os sensores MIP/PPy e NIP/PPy foi monitorada por DPV usando sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  após a religação da proteína S. Para todas as concentrações de monômero investigadas, a variação de corrente após a religação foi maior no MIP/PPy do que no NIP/PPy, o que indica que os locais de impressão foram criados para o modelo (Figura 20). A concentração ideal de Py foi encontrada em  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ . Em concentrações mais baixas, forma-se um filme polimérico mais fino e espera-se que uma quantidade menor de proteína S tenha sido impressa, dando assim origem a interações pouco eficazes no ensaio de religação devido a formação de menos sítios de reconhecimento (Wang *et al.*, 2014). Trabalhos que avaliaram a deposição de filmes poliméricos utilizando balança de quartzo, mostram que filmes obtidos em concentrações menores de monômero apresentam um massa polimérica deposita menor do que em concentrações maiores (Schweiger *et al.*, 2015).

Por outro lado, concentrações mais elevadas de monômero podem levar à formação de filmes com maior espessura, dificultando o processo de remoção da molécula molde. Além disso, um filme mais espesso pode gerar alguns dos locais de reconhecimento que não são facilmente acessíveis (Nezhadali; Mehri; Shadmehri, 2018). Outra justificativa seria a proporção entre monômero e molécula molde. Em concentrações maiores, pode haver um excesso de Py em solução, tornando a quantidade de proteína S insuficiente para interagir com todos os monômeros Py e

formar as cavidades de reconhecimento, o que diminui a sensibilidade do eletrodo à detecção da proteína S (Falone; Buffon; Stradiotto, 2022).

**Figura 20** – Valores de delta de corrente em função da concentração de pirrol usada na eletropolimerização dos sensores MIP/PPy e NIP/PPy (n = 3). Condições: proteína S 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , KCl 0,01  $\text{mol L}^{-1}$ , PBS 50  $\text{mmol L}^{-1}$  (pH 7,3) e 4 ciclos na eletropolimerização; religação com 100  $\text{ng mL}^{-1}$  de proteína S; medias em sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  em KCl 1,0  $\text{mol L}^{-1}$ .

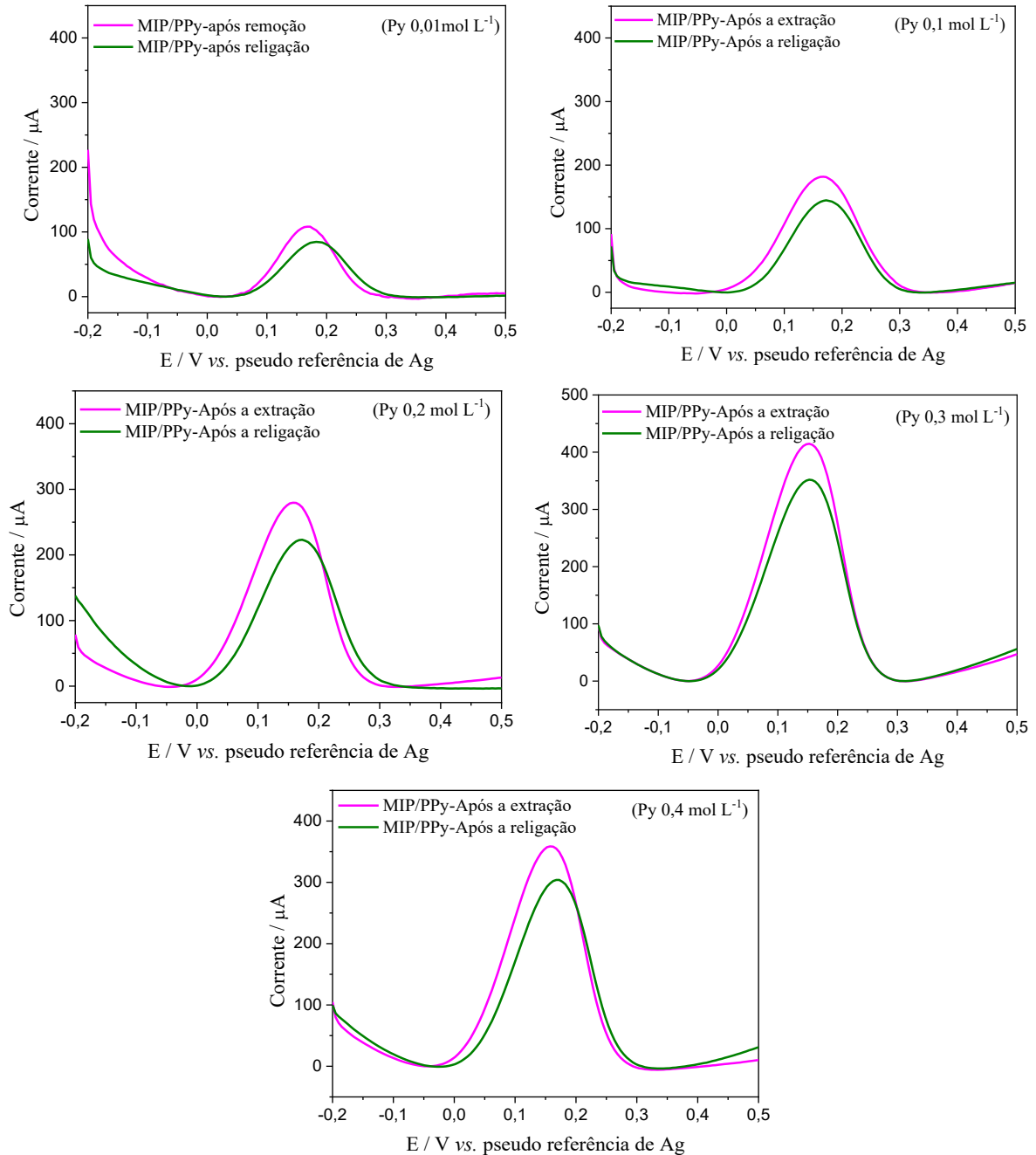


Fonte: a própria autora.

As afirmações mencionadas são confirmadas pelos voltamogramas na Figura 21. À medida que a concentração de Py aumenta, há um aumento significativo nas correntes de pico anódico do sensor MIP/PPy após a remoção da proteína S, que está relacionado a maior quantidade de sítios de reconhecimento gerados, resultante da espessura do depósito e da quantidade de molécula impressa na matriz polimérica (Wang *et al.*, 2014).

Quando a proteína é religada ocorre um bloqueio na transferência eletrônica da sonda redox, o que leva a uma redução da corrente observada. Essa variação é mais significativa nos MIP/PPy formados com maiores concentrações de pirrol, corroborando com o indicativo desses filmes possuírem à presença de um maior número de sítios de interação. Portanto, 0,3  $\text{mol L}^{-1}$  Py foi definido como a concentração ideal para os experimentos posteriores.

**Figura 21** – Voltamogramas de pulso diferencial para sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  antes e após religação de  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  de proteína S em sensores MIP/PPy fabricados com diferentes concentrações de Py. Condições: sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$   $5 \text{ mmol L}^{-1}$  em  $\text{KCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ .

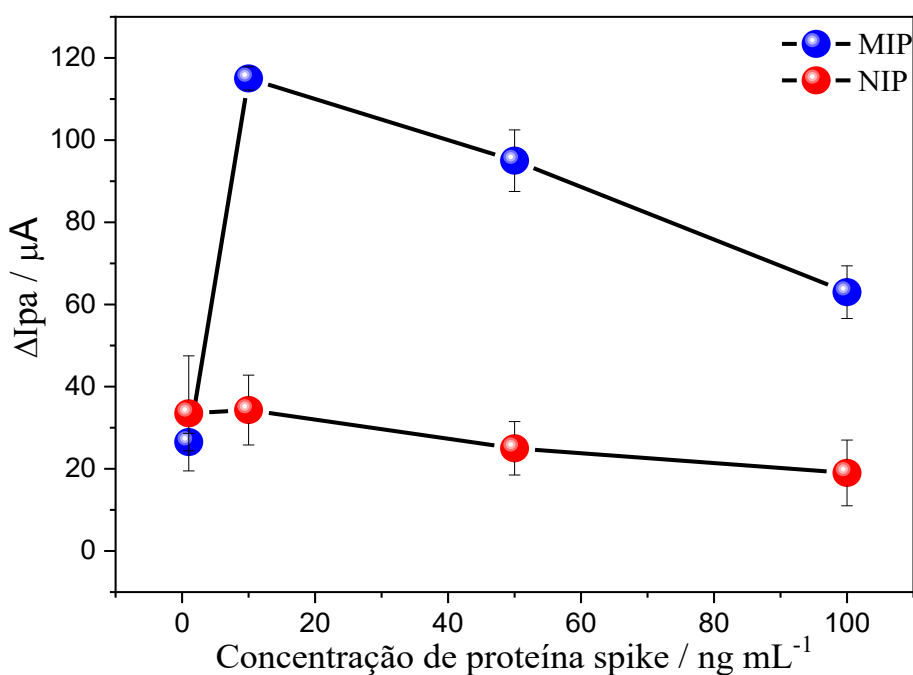


**Fonte:** a própria autora.

### 5.1.3 Efeito da concentração da proteína S na religação

A concentração de proteína S na etapa de religação foi investigada na faixa de 1 a 100 ng mL<sup>-1</sup> (Figura 22). Como observado, existe uma forte dependência entre a concentração de religação no reconhecimento seletivo do sensor MIP/PPy, mas, quase nenhuma para o NIP/PPy. Esses resultados evidenciam que a resposta no sensor NIP/PPy é atribuída à existência de ligações não específicas, tendo em vista à ausência de sítios impressos. Ao reduzir a concentração inicialmente utilizada de proteína S para 10 ng mL<sup>-1</sup> foi observado um aumento na variação de corrente. Estes resultados indicam que em concentrações mais elevadas de proteína S (100 ng mL<sup>-1</sup>) pode levar à má orientação da proteína em direção aos locais impressos, tornando a religação seletiva menos eficaz. Como a concentração de 10 ng mL<sup>-1</sup> apresentou a melhor resposta, ela foi adotada em experimentos subsequentes.

**Figura 22** – Valores de delta de corrente em função da concentração de proteína S na etapa de religação para os sensores MIP/PPy e NIP/PPy (n = 3). Condições: Py 0,3 mol L<sup>-1</sup>, proteína S 40 µg mL<sup>-1</sup>, KCl 0,01 mol L<sup>-1</sup>, PBS 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,3) e 4 ciclos na eletropolimerização; medidas em sonda redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 5,0 mmol L<sup>-1</sup> em KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>.

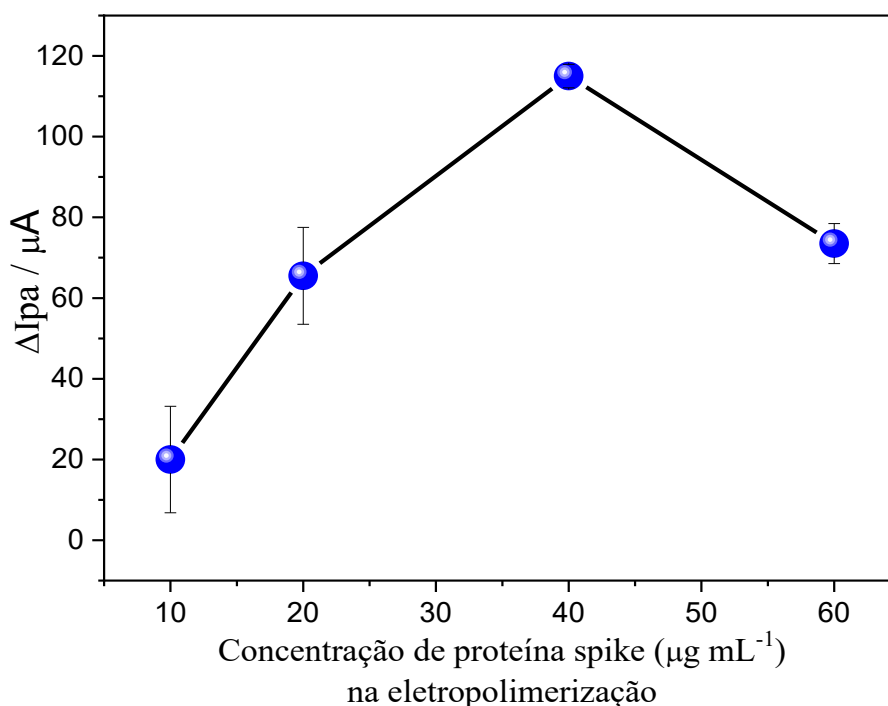


Fonte: a própria autora.

#### 5.1.4 Efeito da concentração da proteína S na eletropolimerização

A relação entre o monômero e o molde é determinada experimentalmente e pode variar dependendo da técnica de polimerização e das propriedades específicas do molde e do sistema em estudo (Ramanavičius, A.; Ramanavičienė; Malinauskas, 2006). Portanto, a otimização experimental é fundamental para alcançar uma taxa ideal de incorporação eficiente e controlada de biomoléculas no filme de PPy. Neste sentido, a otimização da concentração da molécula molde na eletropolimerização do sensor MIP/PPy foi estudada na faixa de 10 a 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 23.

**Figura 23** – Valores de delta de corrente em função da concentração de proteína S usada na eletropolimerização do sensor MIP/PPy (n = 3). Condições: Py 0,3 mol  $\text{L}^{-1}$ , KCl 0,01 mol  $\text{L}^{-1}$  e PBS 50 mmol  $\text{L}^{-1}$  (pH 7,3), 4 ciclos de eletropolimerização; religação realizada com 10 ng  $\text{mL}^{-1}$  proteína S; sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5,0 mmol  $\text{L}^{-1}$  em KCl 1,0 mol  $\text{L}^{-1}$ .



Fonte: a própria autora.

Como observado, a variação de corrente de pico anódico aumenta com o incremento na concentração de proteína S até atingir o valor ótimo de 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Em concentrações inferiores a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a quantidade de proteína S é provavelmente

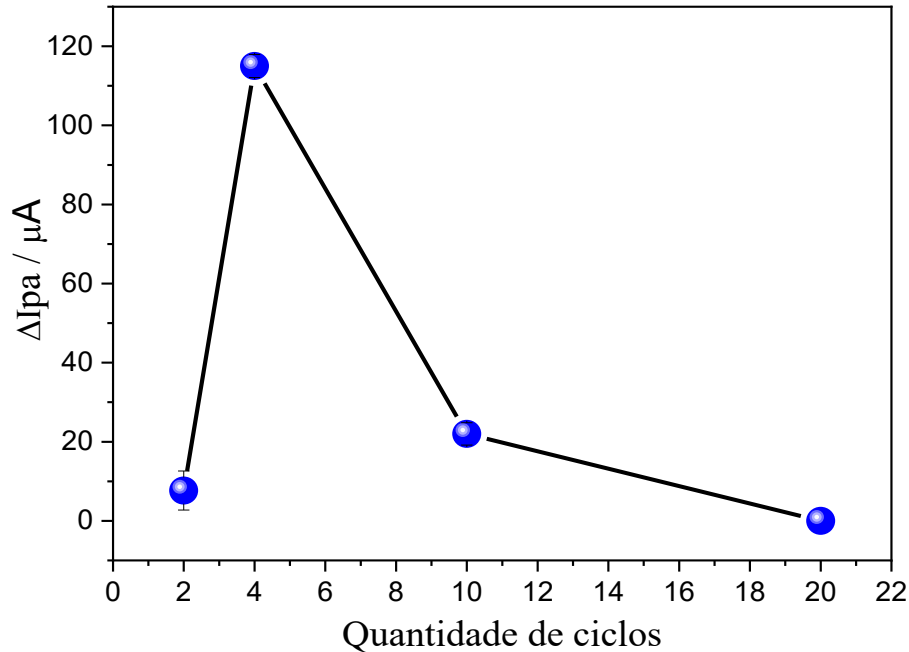
insuficiente para interagir com o Py e formar cavidades de reconhecimento. No entanto, em concentrações superiores a  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ , o desempenho analítico do sensor é reduzido devido ao desequilíbrio na proporção entre monômero e molécula molde. Isso parece resultar na orientação inadequada da proteína S durante a eletropolimerização, diminuindo o número de locais de reconhecimento. Adicionalmente, uma maior quantidade de proteína S pode levar o aprisionamento dos moldes muito próximos uns dos outros, e, após a lavagem, os sítios de reconhecimento formados podem não apresentar formas tridimensionais adequadas ao modelo, mas sim cavidades largas devido à junção desses sítios próximos, reduzindo a capacidade de reconhecimento. Resultados semelhantes foram relatados na literatura (Nezhadali; Mehri; Shadmehri, 2018; Ratautaite *et al.*, 2022).

#### 5.1.5 Efeito do número de ciclos na eletropolimerização

Outro parâmetro que impacta diretamente a espessura do filme é o número de ciclos utilizados (Devkota *et al.*, 2018; Falone; Buffon; Stradiotto, 2022). Conforme mostrado na Figura 24, a maior variação de corrente obtida após a religação da proteína S, usando o sensor MIP/PPy, foi alcançada quando o mesmo foi sintetizado usando 4 ciclos de varredura.

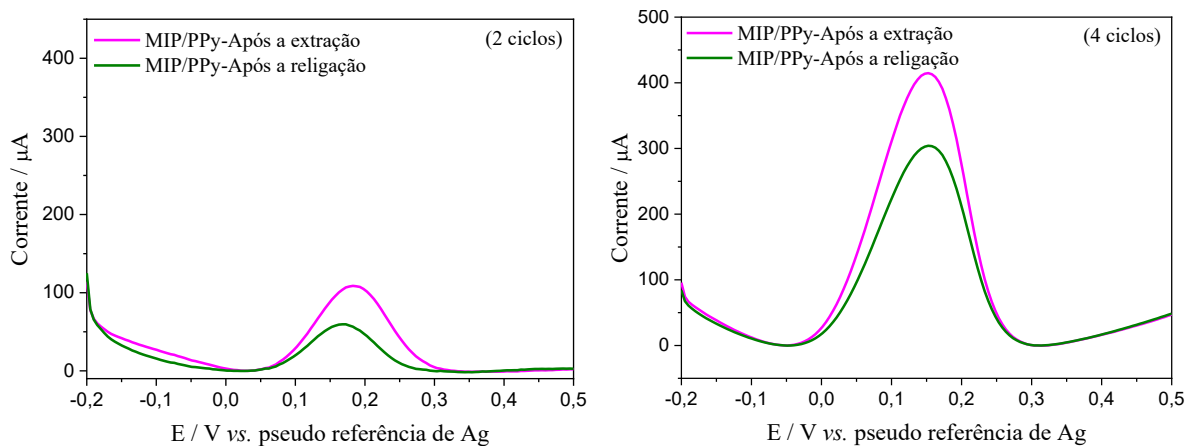
A resposta analítica está relacionada a quantidade de sítios de reconhecimentos formados e disponíveis no filme polimérico. Sendo assim, 2 ciclos foram insuficientes para criar um número adequado de cavidades impressas, por produzir um filme mais fino (Ayankojo *et al.*, 2022). Isso pode ser confirmado pelos voltamogramas na Figura 25, que após o processo de remoção da molécula molde a corrente registrada pelo MIP/PPy não foi expressiva. Consequentemente, após a religação a variação da corrente também não foi muito significativa.

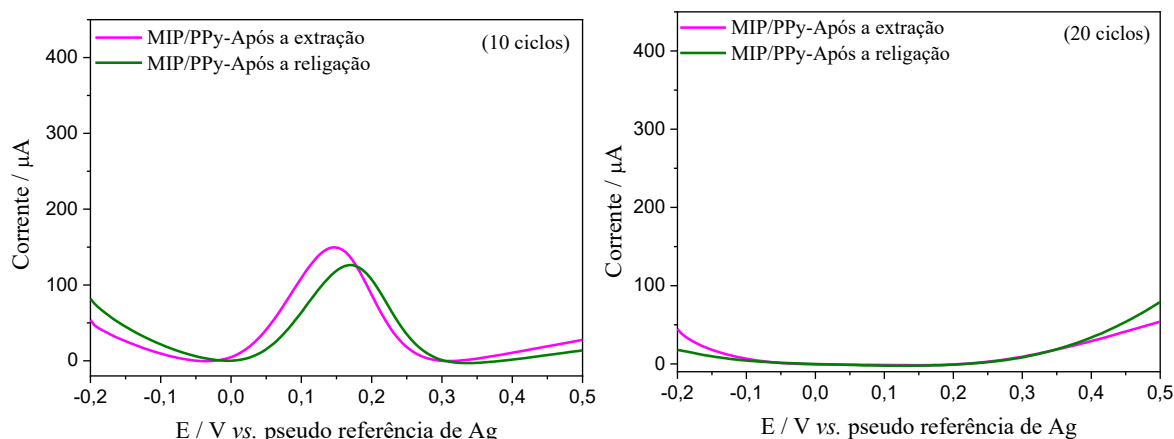
**Figura 24** – Valores de delta de corrente em função do número de ciclos empregado na eletropolimerização do sensor MIP/PPy (n = 3). Condições: Py 0,3 mol L<sup>-1</sup>, proteína S 40 µg mL<sup>-1</sup>, KCl 0,01 mol L<sup>-1</sup> e PBS 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,3) na eletropolimerização; religação com 10 ng mL<sup>-1</sup> proteína S, medidas em sonda redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 5,0 mmol L<sup>-1</sup> em KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>.



Fonte: a própria autora.

**Figura 25** – Voltamogramas de pulso diferencial para sonda redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> referente ao estudo da quantidade de ciclos na eletropolimerização para obtenção do sensor MIP/PPy em resposta à religação de 10 ng mL<sup>-1</sup> proteína S (n = 3). Condições: Py 0,3 mol L<sup>-1</sup>, proteína S 40 µg mL<sup>-1</sup>, KCl 0,01 mol L<sup>-1</sup> e PBS 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,3) na eletropolimerização; medidas em sonda redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 5,0 mmol L<sup>-1</sup> em KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>.





Fonte: a própria autora.

Com 10 ciclos, provavelmente o filme formado apresenta uma espessura maior. A formação de um filme mais espesso dificulta a remoção da molécula molde por estar mais profundamente aprisionada, gerando uma quantidade menor de cavidades impressas e que podem ser menos acessíveis ao processo de reconexão, o que justifica a diminuição da sensibilidade do sensor MIP/PPy (Falone; Buffon; Stradiotto, 2022; Kan *et al.*, 2012; Nezhadali; Mehri; Shadmehri, 2018). Assim, é possível observar nos voltamogramas, para o filme obtido com 10 ciclos, correntes inferiores após a remoção e religação da proteína S. Este comportamento é semelhante quando foi utilizado uma maior concentração de Py na eletropolimerização.

Ademais, ao utilizar 20 ciclos a espessura MIP/PPy tende a ser muito maior, dando origem a um filme não condutor com ausência de corrente de pico para a sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . Mesmo assim, a religação foi realizada, porém nenhum sinal foi observado. Portanto, pode-se afirmar que na espessura conferida com 4 ciclos, a proteína S foi adequadamente aprisionada no filme, gerando locais de reconhecimento de alta afinidade após a remoção do modelo. Com base nos resultados alcançados, 4 ciclos de varredura foram adotados como condição ideal.

#### 5.1.6 Otimização do tempo de remoção da molécula molde

Uma etapa crucial no preparo de um MIP é a remoção da molécula molde. Apesar da molécula alvo ser incorporada no polímero obtido, é frequente a dificuldade em removê-la de forma a criar as cavidades específicas (Tarley; Sotomayor; Kubota,

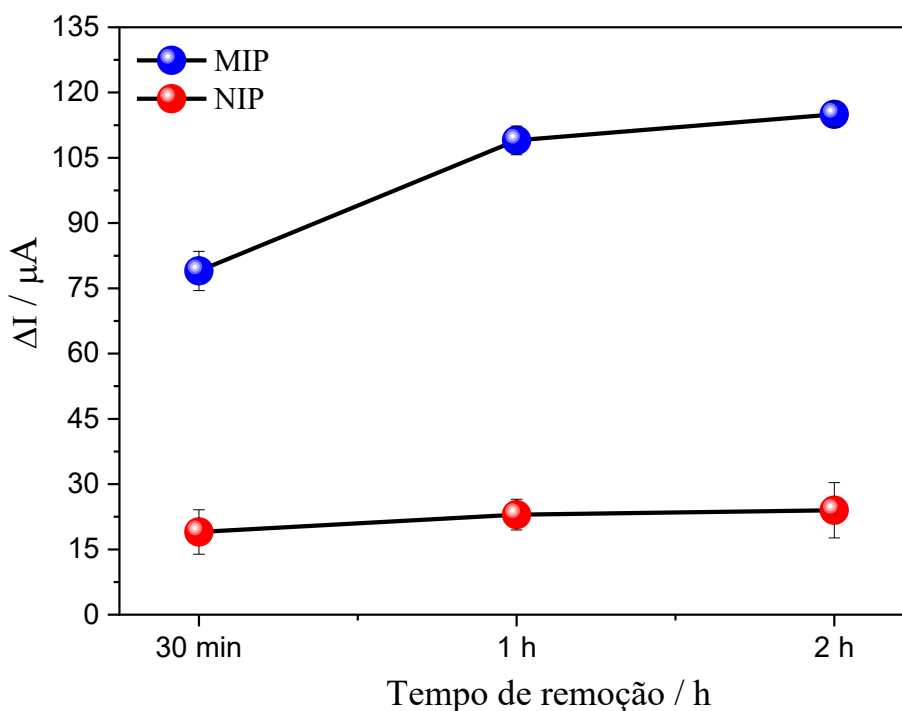
2005). Desta forma é necessário estudar as condições que garantam uma remoção eficiente.

Para a remoção da molécula molde em sensores eletroquímicos algumas estratégias são utilizadas: oxidação-redução do molde no polímero pela aplicação de potencial eletroquímico, com uso de solventes que interagem fortemente com o polímero e podem levar ao inchaço da espinha dorsal necessária para a liberação do modelo (El Sharif *et al.*, 2022; Erdossy *et al.*, 2016), uso de solventes ácidos ou básicos para interromper as interações eletrostáticas entre proteína e polímero (Lorenzo *et al.*, 2011) ou pela remoção fisicamente assistida (*via* ultrassom, micro-ondas ou extrações líquidas pressurizadas) (Mazouz *et al.*, 2020; Özkorucuklu; Şahin; Alsancak, 2008). Neste trabalho, foi avaliada a remoção da proteína S usando uma solução ácida de HAc 10% (v/v) contendo 0,2% (m/v) de SDS e o tempo de remoção da molécula molde investigado foi na faixa de 30 minutos a 2 horas.

O ácido acético é responsável por promover a remoção pela repulsão eletrostática entre o filme e a proteína S, enquanto o SDS é responsável pela desnaturação proteica. Esse procedimento é bem estabelecido e frequentemente empregado no desenvolvimento de sensores MIP (Ayankojo *et al.*, 2022; Cennamo *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2012; Navakul *et al.*, 2021; Raziq *et al.*, 2021; Zeng; Huang; Ma, 2017).

Conforme mostrado na Figura 26, é possível observar que o tempo de remoção da molécula molde influencia no desempenho analítico do sensor MIP/PPy, enquanto quase nenhuma variação é observada no NIP/PPy. Este perfil de resposta é um forte indicativo da formação das cavidades impressas no MIP, sendo que 1 hora foi suficiente para remover a proteína S da rede polimérica e para criar cavidades de religação.

**Figura 26** – Valores de delta de corrente obtidos no estudo do efeito do tempo de remoção da proteína S usando HAc 10% e SDS 0,2% para os sensores MIP/PPy e NIP/PPy (n = 3). Condições: Py 0,3 mol L<sup>-1</sup>, proteína S 40 µg mL<sup>-1</sup>, KCl 0,01 mol L<sup>-1</sup>, PBS 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,3) e 4 ciclos na eletropolimerização; religação com 10 ng mL<sup>-1</sup> de proteína S; medidas em sonda redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 5,0 mmol L<sup>-1</sup> em KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>.



Fonte: a própria autora.

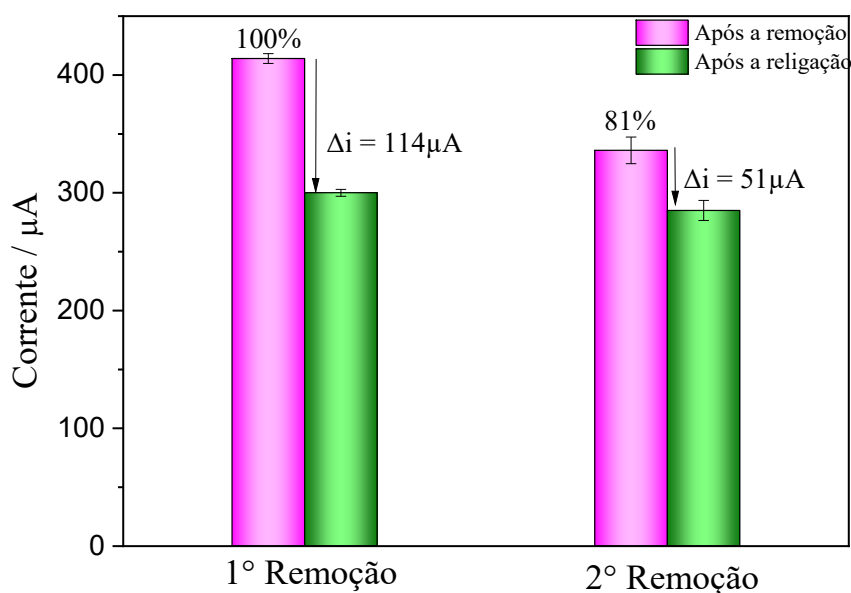
## 5.2 AVALIAÇÃO DA REUSABILIDADE DO SENSOR MIP/PPY

Após otimizar todos os parâmetros da construção do sensor MIP/PPy, a reusabilidade do sensor foi avaliada submetendo o eletrodo a uma segunda etapa de remoção e religação. Para a religação foram usados 5 µL de 10 ng mL<sup>-1</sup> de proteína S. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 27.

A partir da análise dos resultados é possível observar que após a segunda etapa de remoção o sensor não apresentou o mesmo desempenho. A eficiência de remoção da proteína S no segundo procedimento foi de 81% comparado a primeira vez. Adiante, ao submeter o sensor à segunda religação, foi observado uma redução na variação de corrente de aproximadamente 50% em relação a primeira vez, indicando que uma menor quantidade de proteína S foi religada no sensor,

provavelmente, devido a menor disponibilidade de sítios de interação após a segunda lavagem com HAc e SDS. Resultados semelhantes foram obtidos por Szunerits e colaboradores, que relatam que a tentativa de regenerar a superfície do sensor desenvolvido para detecção de SARS-CoV-2 resultou em diminuição do desempenho e, além disso, reportam que essa redução teve um grande efeito principalmente nas amostras negativas, com respostas falsas positivas (Szunerits *et al.*, 2022). Dessa forma, a intenção de reutilizar o sensor foi descartada.

**Figura 27** – Valores de corrente obtidos para proteína S no estudo de reusabilidade do sensor MIP/PPy (n = 3). Condições: tempo de remoção de 2 h, religação com 10 ng mL<sup>-1</sup> de proteína S, medidas em ferricianeto de potássio 5,0 mmol L<sup>-1</sup> em KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>.



Fonte: a própria autora.

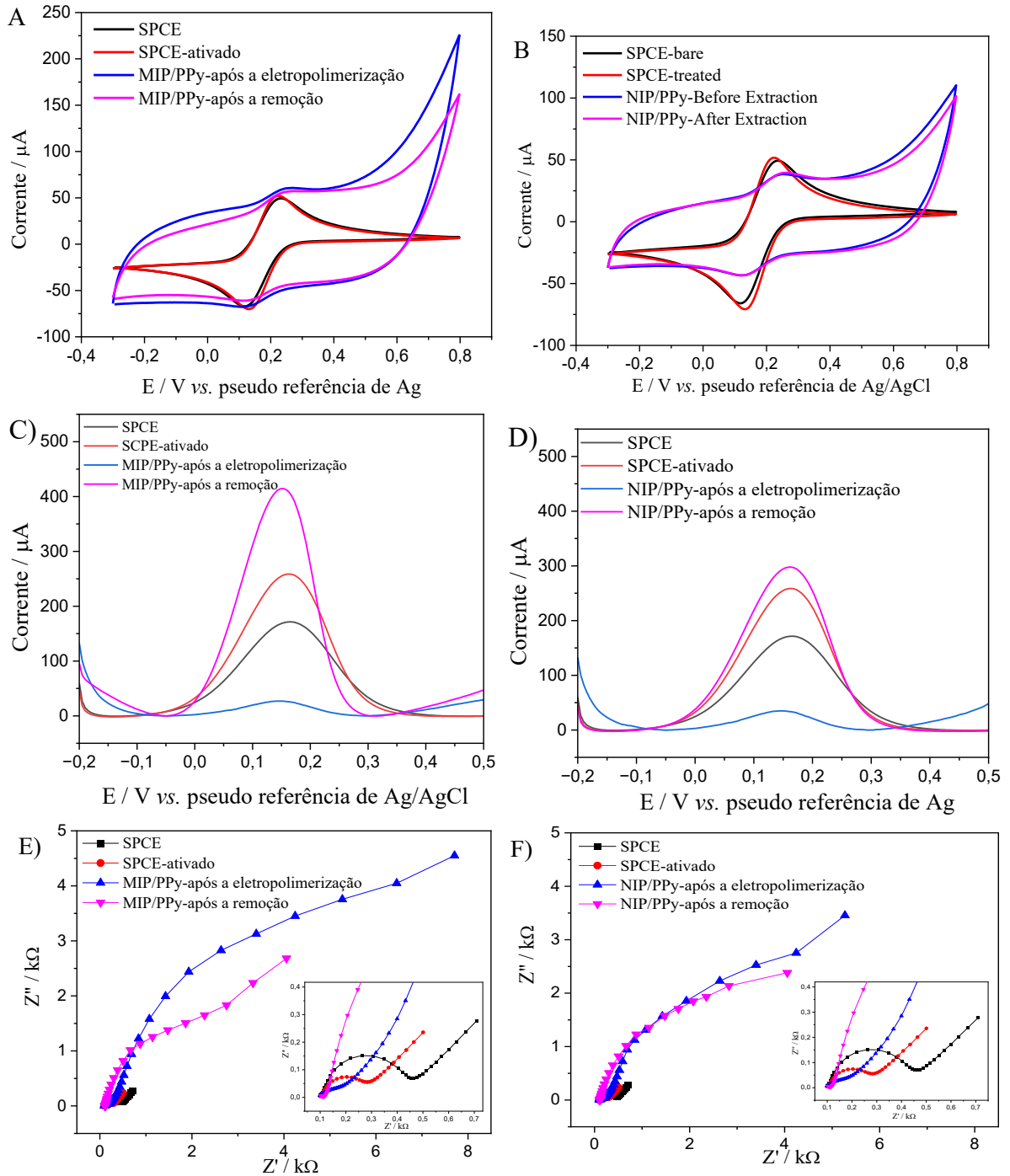
### 5.3 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

O comportamento eletroquímico dos sensores MIP/PPy e NIP/PPy foi avaliado após cada etapa de síntese por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica, no potencial de meia onda, utilizando a sonda [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> na concentração de 5 mmol L<sup>-1</sup> em KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>. A voltametria de pulso diferencial usada como técnica de detecção também foi utilizada para caracterizar os sensores, uma vez que proporciona uma melhor visualização dos resultados obtidos pela voltametria cíclica (Figura 28).

Conforme mencionado anteriormente, na Sessão 5.1.1, foi observado um aumento nas correntes de pico nos voltamogramas cíclicos para o SPCE após a ativação com  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Após a eletropolimerização, o sensor MIP/PPy mostrou uma camada superficial altamente capacitiva, o que evidencia a formação do filme polimérico (Figura 28A). Esse aumento está relacionado à estrutura e propriedades do material polimérico. Filmes de polipirrol geralmente apresentam uma área superficial efetiva significativamente maior do que eletrodos de carbono. Essa maior área superficial, proporciona uma maior interação com o eletrólito e, conseqüentemente, ampliando a corrente capacitiva. A presença da proteína S, aprisionada na superfície do filme polimérico, por se tratar de uma molécula não eletroativa, também pode aumentar a corrente capacitiva (Tabrizi *et al.*, 2022; Hashemi *et al.*, 2021; Ramanavicius *et al.*, 2010), o que justifica a corrente capacitiva mais expressiva no sensor MIP/PPy comparado ao sensor NIP/PPy (Figura 28B). Outro fator importante é que, durante a polimerização eletroquímica do polipirrol, íons do eletrólito são incorporados ao filme. Esses íons podem ser adsorvidos e dessorvidos de forma reversível durante os processos de carga e descarga, contribuindo ainda mais para a resposta capacitiva do material (Ates, 2011; Schalenbach *et al.*, 2023).

Após a remoção da proteína S, foi observado um leve aumento na corrente de pico, bem como uma redução da corrente capacitiva nos voltamogramas cíclicos. Comportamento semelhante foi identificado no sistema NIP/PPy, embora com um aumento de corrente mais sutil. Isso ocorre porque a remoção da molécula molde facilita a transferência eletrônica pela sonda redox na superfície do filme polimérico, favorecendo o aumento da corrente.

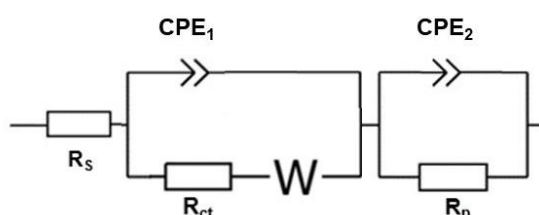
**Figura 28** – Voltamogramas cíclicos, voltamogramas de pulso diferencial e diagramas de Nyquist para sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  referente as etapas de fabricação dos sensores MIP/PPy (A, C e D) e NIP/PPy (B, D e F). Condições: eletropolimerização realizada com Py  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ , proteína S  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ , 4 ciclos; religação com  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  de proteína S; medidas em sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$   $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em KCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ .



Fonte: a própria autora.

A partir dos voltamogramas de pulso diferencial, é possível visualizar essas alterações no comportamento eletroquímico com maior clareza. Na voltametria cíclica, a corrente capacitiva pode ser significativa, especialmente em superfícies de eletrodos com grandes áreas ou em sistemas com altos valores de capacitância, podendo dificultar a detecção de picos de corrente associados aos processos redox, reduzindo, assim, a sensibilidade da técnica. No entanto, na voltametria de pulso diferencial, como a corrente é medida antes e no final de cada pulso, a corrente capacitiva é minimizada, resultando em uma melhor separação entre a corrente faradaica (associada aos processos redox) e a corrente capacitiva, o que proporciona maior sensibilidade e resolução para detectar pequenos picos de corrente redox (Bard; Faulkner, 1994). Dessa forma, o aumento da corrente observado após a ativação e após a lavagem para remover a molécula molde é mais evidente na DPV (Figura 28C e 28D). O aumento da corrente após a remoção da proteína S é atribuído ao surgimento das cavidades impressas no polímero, que favorece o processo de difusão e a transferência eletrônica da sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  (Wang *et al.*, 2014).

A capacidade de transferência eletrônica na superfície dos sensores foi avaliada por espectroscopia de impedância eletroquímica. Os valores de resistência à transferência de carga ( $R_{ct}$ ), equivalentes ao diâmetro do semicírculo dos espectros de impedância (Carvalho; Andrade; Bueno, 2006), após as etapas de eletropolimerização e a remoção da molécula molde, foram obtidos por meio do ajuste dos dados experimentais usando o circuito equivalente a seguir:



No circuito,  $R_s$  representa a resistência da solução, enquanto  $R_{ct}$  refere-se à resistência de transferência de carga de alta frequência na interface polímero|eletrólito.  $R_p$  é a resistência do polímero. O elemento  $Z_w$  é identificado como o elemento de difusão Warburg, e CPE representa o elemento de fase constante (Hallik *et al.*, 2006; Kulandaivalu; Zainal; Sulaiman, 2016). A capacitância da dupla camada elétrica ( $C_{dl}$ ) foi substituída por CPE, que descreve um comportamento de capacitor não ideal. Outrossim, no caso de superfícies macro–microheterogêneas, ou

seja, ásperas ou porosas, o seu uso é necessário para compensar a não homogeneidade geométrica e energética da superfície do eletrodo (Ramanavicius *et al.*, 2010). Isso se aplica aos sensores desenvolvidos no presente trabalho devido à morfologia e rugosidade do filme polimérico, como mostrados mais adiante nas imagens de MEV e AFM.

Os valores extraídos dos gráficos das Figuras 28E e 28F foram dispostos na Tabela 2, e a precisão dos dados ajustados com o gráfico é determinada com base no  $X^2$ , que representa a soma dos quadrados das diferenças entre os pontos teóricos e experimentais, além de limitar o erro percentual no valor de cada elemento nos circuitos equivalentes ao mínimo (Kulandaivalu; Zainal; Sulaiman, 2016). Os valores do  $X^2$  no trabalho atual estão na faixa de  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$ , indicando um bom ajuste.

De forma geral, observa-se que a formação do filme e a presença da proteína não afetam significativamente os valores de  $R_s$ , uma vez que esse valor reflete a resistência global do eletrólito em torno do eletrodo, e não localmente próximo à superfície do eletrodo onde o filme e a proteína S estão presentes. As diferenças observadas nos espectros de impedância eletroquímica após a eletropolimerização confirmam a deposição do filme de PPy nos sensores. A maior resistência à transferência de carga ( $R_{ct}$ ) no sensor MIP/PPy, em comparação ao NIP/PPy (6383  $\Omega$ ), é atribuída à presença da proteína S aprisionada no filme polimérico. Os valores mais elevados de  $W$  e os valores mais baixos de  $CPE_1$  também estão relacionados à presença da proteína, pois as proteínas aumentam a resistência à difusão iônica nas interfaces eletrodo|solução e as características estruturais e químicas das proteínas aumentam a espessura média da dupla camada, o que reduz os valores de capacitância (Ramanavicius *et al.*, 2010).

Por outro lado, quando a proteína S é removida do sensor MIP/PPy, após a lavagem com HAc e SDS, e as cavidades impressas são formadas, observa-se uma redução no diâmetro do semicírculo. Os valores de  $R_{ct}$  e  $W$  diminuem de 8797  $\Omega$  para 4124  $\Omega$  e de 4277  $\Omega$  para 2201  $\Omega$ , respectivamente, e a capacitância aumenta de 456,7  $\mu F$  para 561,3  $\mu F$ .

No sensor NIP/PPy, por não conter cavidades impressas, a variação nos valores de  $R_{ct}$  após o processo de lavagem foi mais sutil. Os valores de  $R_{ct}$  observados para NIP/PPy - após eletropolimerização, e para o NIP-PPy - após remoção, foram de 6383  $\Omega$  e 5206  $\Omega$ , respectivamente.

**Tabela 2** – Valores de resistências (R), capacitância (Q), resistência à difusão (W) e valor estatístico  $X^2$  para cada etapa de fabricação dos sensores MIP/PPy e NIP/PPy. Condições: sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5 mmol L<sup>-1</sup> em eletrólito suporte KCl 1 mol L<sup>-1</sup>.

Eletrodo	$R_s$ ( $\Omega$ )	$C_{dl}/CPE_1$ $Q_1$ ( $\mu\text{F}$ )	$R_{ct}$ ( $\Omega$ )	$W$ ( $\Omega$ )	$R_p$ ( $\Omega$ )	$CPE_2$ $Q_2$ ( $\mu\text{F}$ )	$X^2$
SPCE não ativado	120,2	82,0	305,7	1454	-	-	$2,2 \times 10^{-2}$
SPCE ativado	115,3	110,0	143,3	1120	-	-	$2,1 \times 10^{-2}$
MIP/PPy-após eletropolimerização	298,2	156,7	8797	4277	88,41	61,3	$3,8 \times 10^{-2}$
MIP/PPy-após remoção	257,4	261,3	4124	2201	77,59	49,0	$2,3 \times 10^{-3}$
NIP/PPy-após eletropolimerização	278,1	233,0	6383	3180	69,49	54,8	$4,6 \times 10^{-2}$
NIP/PPy-após remoção	262,3	255,5	5206	2977	61,84	46,0	$6,0 \times 10^{-2}$

$R_s$ : resistência da solução;  $R_{ct}$ : resistência de transferência de carga na interface polímero|eletrólito;  $R_p$ : resistência do polímero;  $C_{dl}$ : capacitância da dupla camada elétrica; CPE: elemento de fase constante.

**Fonte:** a própria autora.

Portanto, os resultados obtidos fornecem evidências robustas do aprisionamento da proteína na superfície do filme do sensor MIP/PPy durante a eletropolimerização, bem como da sua remoção subsequente à lavagem, em concordância com os dados obtidos até o momento.

#### 5.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

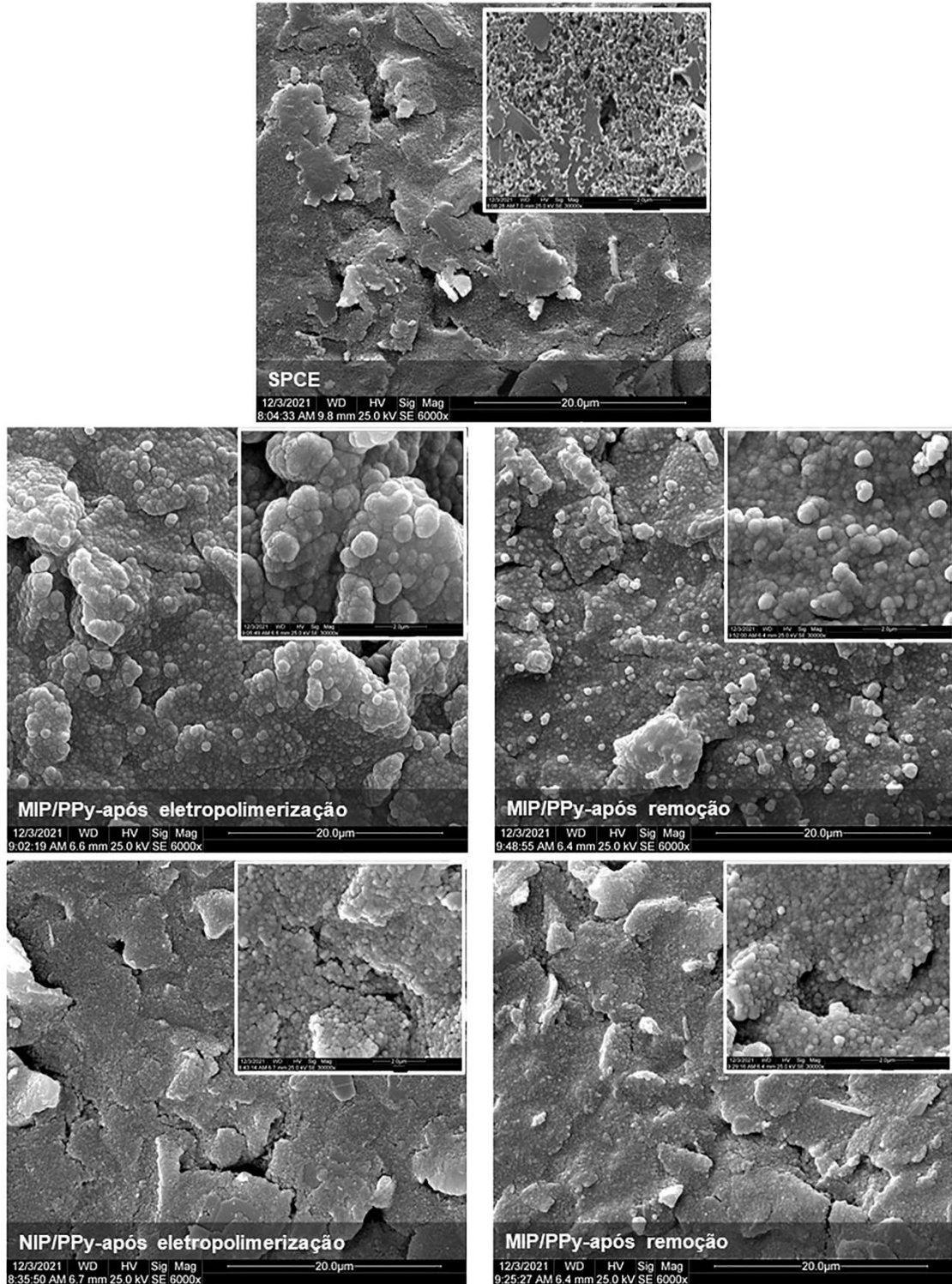
As micrografias obtidas da superfície do eletrodo de trabalho para o MIP/PPy e o NIP/PPy após a eletropolimerização e a remoção da proteína S são mostradas na Figura 29.

A análise por MEV mostra que o SPCE não modificado exibe uma superfície irregular. Após o processo de eletropolimerização, observa-se o surgimento de uma camada com partículas esféricas, características dos filmes de PPy (Rahmati *et al.*, 2021). De acordo com Lim e colaboradores (2013), o PPy puro apresenta uma superfície rugosa com uma aparência bulbosa.

As mudanças morfológicas superficiais foram mais acentuadas no MIP/PPy, podendo estar relacionado a influência da proteína S na morfologia do filme polimérico durante a eletropolimerização. O NIP/PPy exibiu mudanças morfológicas mais súteis, porém, a formação do filme polimérico em sua superfície também é visualizada pelo aparecimento de uma camada com partículas esféricas.

As irregularidades superficiais foram apenas suavizadas após a eletropolimerização, sugerindo a formação de um filme fino. Mesmo após a lavagem com HAc 10% (v/v) e SDS 0,2% (m/v), o filme manteve sua estrutura, indicando que o tratamento ácido utilizado para remover a proteína S não comprometeu a integridade do filme polimérico resultante.

**Figura 29** – Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos eletrodos SPCE sem modificação, MIP /PPy e NIP/PPy após a eletropolimerização e, após a remoção para o MIP/PPy e NIP/PPy. Ampliações de 6.000 vezes e 30.000 vezes.

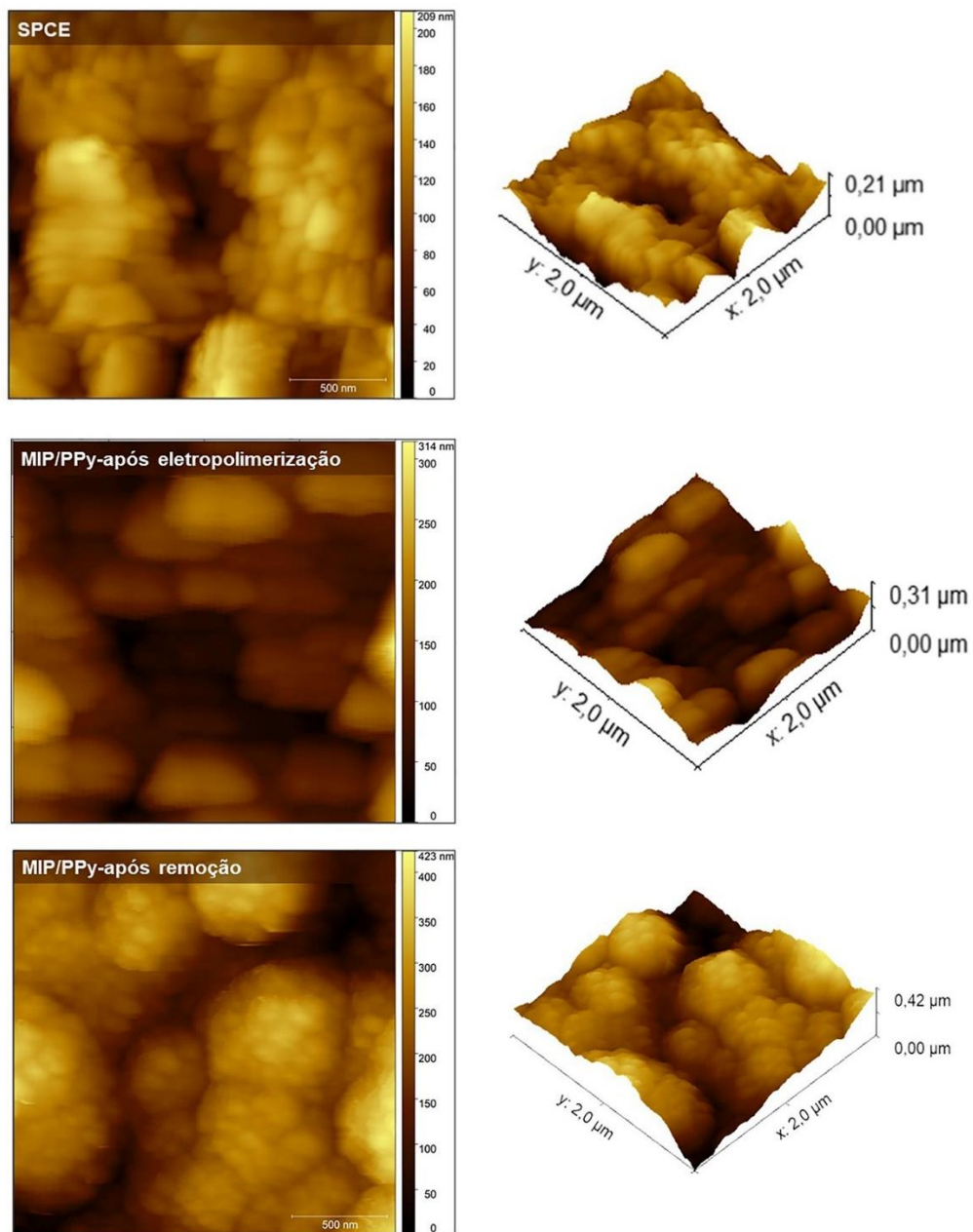


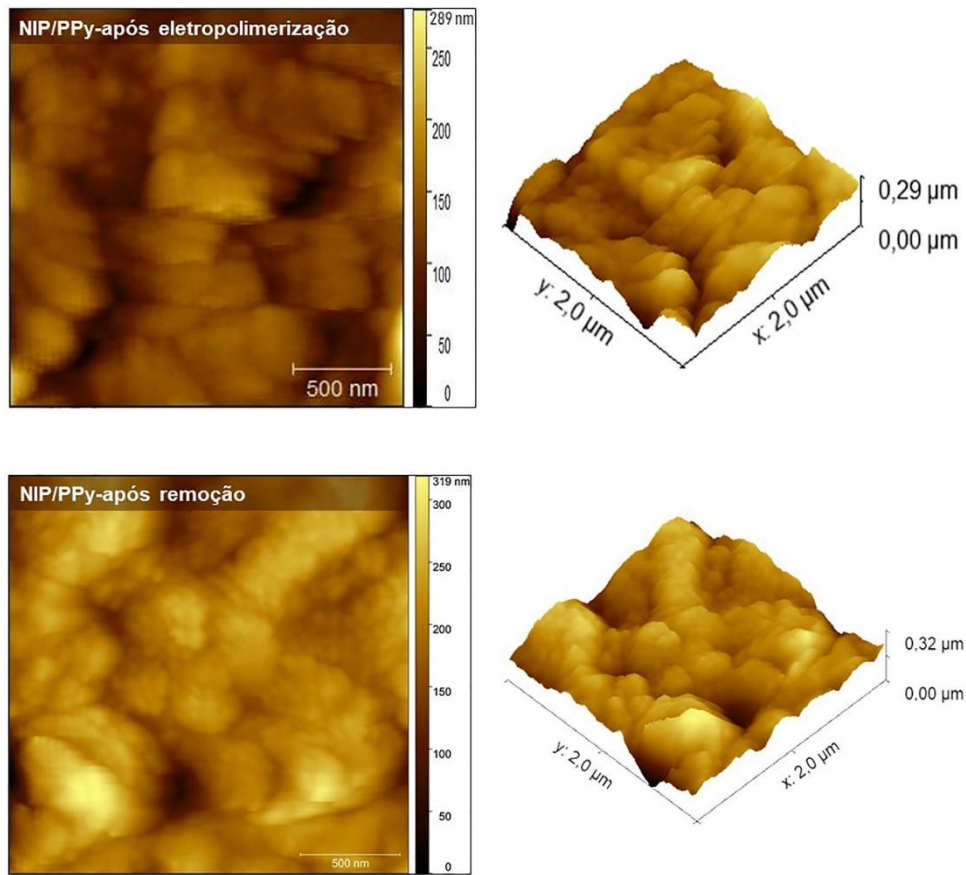
Fonte: a própria autora.

### 5.5 CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA

A topografia superficial dos eletrodos MIP/PPy e NIP/PPy foi investigada por AFM (Figura 30), e a análise estatística dos dados obtidos das imagens está resumida na Tabela 3. A rugosidade da superfície foi avaliada calculando o valor da raiz quadrada média (RMS) sobre uma área de  $2 \times 2 \mu\text{m}$ .

**Figura 30** – Imagens de microscopia de força atômica dos eletrodos SPCE sem modificação, MIP/PPy e NIP/PPy após a eletropolimerização e, MIP/PPy e NIP/PPy após a remoção.





**Fonte:** a própria autora.

O SPCE exibiu uma superfície irregular, semelhante às imagens MEV, com rugosidade de  $33,05 \pm 1,45$  nm, valor consistente com dados relatados na literatura (Zidarič *et al.*, 2023).

Após a eletropolimerização, observou-se aumento no valor de RMS do MIP/PPy ( $42,69 \pm 3,57$  nm) em comparação ao SPCE não modificado ( $30,66 \pm 3,94$  nm), indicando a formação de uma matriz polimérica na superfície do SPCE (Zhang; Sun; Zhang, 2021; Zidarič *et al.*, 2023). Contudo, o NIP/PPy ( $33,05 \pm 1,45$  nm) apresentou rugosidade semelhante a este último. Além disso, foram observadas estruturas circulares, semelhantes às imagens MEV.

A rugosidade da MIP/PPy após a remoção da proteína S apresentou um aumento expressivo de  $42,69 \pm 3,57$  para  $75,54 \pm 2,31$  nm, sendo um indicativo da remoção bem-sucedida da proteína S da matriz polimérica (Aghoutane *et al.*, 2020; Waffo *et al.*, 2018). Por outro lado, o NIP/PPy lavado apresentou apenas um ligeiro aumento na rugosidade, com valor de  $36,06 \pm 3,54$  nm. O aumento da rugosidade pode representar maior área de superfície ativa, resultando em correntes de pico mais

elevadas nos voltamogramas e uma menor resistência à transferência de carga nos espectros de impedância eletroquímica (Schalenbach *et al.*, 2023), o que corrobora com os resultados obtidos na caracterização eletroquímica. Também é demonstrada pela análise de AFM a prova de conceito na criação de cavidades impressas no MIP/PPy.

A altura máxima do pico ( $S_p$ ) e a altura máxima do pico ao vale ( $R_t$ ) são outros parâmetros que fornecem informações sobre o processo de impressão química da proteína S (Tabela 3). Os valores de  $S_p$  e  $R_t$  para MIP/PPy após a eletropolimerização foram de  $209,4 \pm 6,15$  e  $310,1 \pm 5,89$  nm, respectivamente, seguidos por um aumento proeminente de  $211,2 \pm 7,92$  nm e  $419,2 \pm 5,23$  nm, respectivamente, após a remoção da proteína S. Para o NIP/PPy não foram observadas grandes diferenças nos valores de  $S_p$  e  $R_t$ , antes e depois da remoção da proteína S, o que denota que o MIP/PPy possui poros mais profundos que o NIP/PPy (Hashemi *et al.*, 2021).

**Tabela 3** – Resumo dos dados obtidos na análise de AFM para SPCE, MIP/PPy e NIP/PPy antes e após a remoção da molécula molde.

Eletrodo	Rugosidade quadrática média (RMS)/(nm)	Rugosidade média (Sa)/(nm)	Altura máxima do pico (Sp)/(nm)	Profundidade máxima do vale (Sv)/(nm)	Altura máxima do pico a vale (Rt)/(nm)
SPCE	30,66 ± 3,94	22,57 ± 3,79	95,8 ± 4,67	112,9 ± 5,16	207,7 ± 1,91
MIP/PPy após eletropolimerização	42,69 ± 3,57	33,79 ± 3,40	209,4 ± 6,15	106,6 ± 5,80	310,1 ± 5,89
MIP/PPy após etapa de remoção	75,54 ± 2,31	60,09 ± 7,42	211,2 ± 7,92	217,1 ± 9,39	419,2 ± 5,23
NIP/PPy após eletropolimerização	33,05 ± 1,45	24,24 ± 5,71	116,5 ± 5,02	164,4 ± 6,79	287,2 ± 3,11
NIP/PPy após etapa de remoção	36,06 ± 3,54	27,37 ± 7,46	118,3 ± 3,46	204,3 ± 6,01	315,5 ± 4,53

**Fonte:** a própria autora.

## 5.6 ÂNGULO DE CONTATO

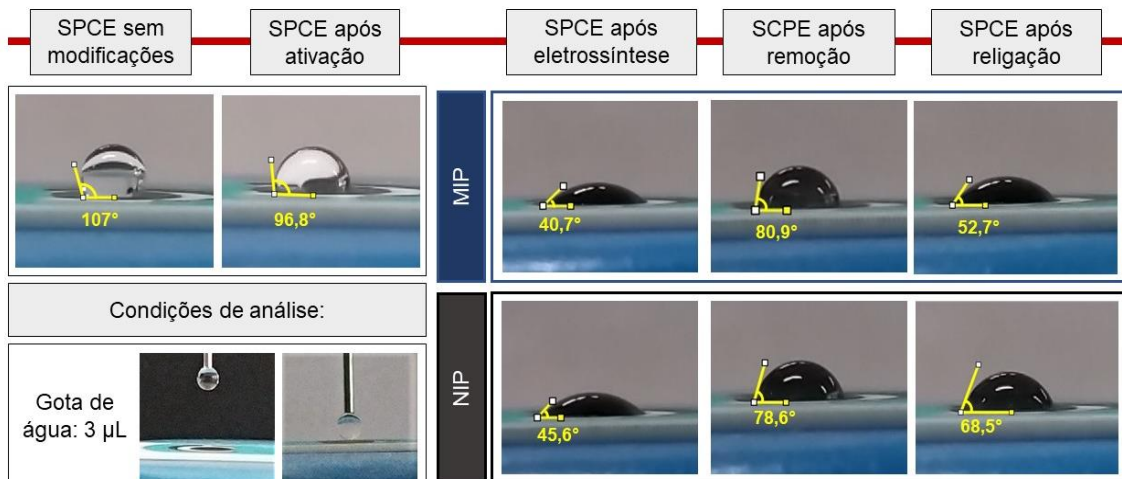
Os resultados obtidos na medição do ângulo de contato ( $\theta$ ), permitiram acompanhar a evolução de cada etapa da síntese e classificar as superfícies dos sensores MIP/PPy e NIP/PPy como hidrofóbicas ( $\theta \geq 90^\circ$ ) ou hidrofílicas ( $\theta < 90^\circ$ ) (Hebbar; Isloor; Ismail, 2017; Yuan; Lee, 2013), sendo que, a hidrofilicidade/hidrofobicidade pode ser utilizada como um parâmetro físico-químico pertinente para avaliar a biocompatibilidade de um material projetado. Um polímero com caráter mais hidrofóbico é uma propriedade de interesse, com evidências crescentes demonstrando o impacto significativo que essas interações hidrofóbicas têm com membranas lipídicas e proteínas (Pearce; O'Reilly, 2021)

Conforme ilustrado na Figura 31, o SPCE demonstra um caráter hidrofóbico, e mesmo após a ativação com ácido sulfúrico esse caráter foi mantido. Após a eletropolimerização, observou-se que o filme de PPy puro (NIP/PPy) revelou ter uma superfície com caráter hidrofílico. Na presença da proteína S, o caráter hidrofílico é ligeiramente mais pronunciado. Os resultados obtidos são consistentes com os valores encontrados na literatura (Azioune *et al.*, 2002; Mahmoodian; Pourabbas; Mohajerzadeh, 2015). O ângulo de contato pode ser influenciado por diversos fatores, sendo eles: o substrato utilizado, a presença de dopantes, a metodologia de síntese usada, as condições para a eletrodeposição do filme, a morfologia e a presença de biomoléculas como a molécula molde (Aparna *et al.*, 2022; Azioune *et al.*, 2002; Mahmoodian; Pourabbas; Mohajerzadeh, 2015; Schweiger *et al.*, 2015; Teh; Lin, 2005). Além disso, na literatura é relatado um caráter mais hidrofílico para filmes de PPy obtidos na presença de tampão fosfato e KCl (Azioune *et al.*, 2002; Schweiger *et al.*, 2015).

As superfícies dos filmes demonstram uma maior propensão à hidrofobicidade após a lavagem com HAc 10% (v/v) e SDS 0,2% (m/v). Possivelmente, durante o processo de remoção, íons cloretos e fosfatos presentes são eliminados, reduzindo a hidrofilicidade da superfície dos sensores. A remoção desses íons permitem uma maior exposição do sistema  $\pi$ -conjugado, característico de polímeros condutores, o que também contribui para a maior tendência hidrofóbica (Okuzaki; Kondo; Kunugi, 1999). Além disso, o aumento das propriedades hidrofóbicas de uma superfície pode ocorrer com o aumento da rugosidade. Superfícies mais rugosas possuem uma área de interface sólido-líquido maior, o que resulta em maior energia líquida, podendo

levar ao aumento do ângulo de contato (Burton; Bhushan, 2005). Os valores de rugosidade obtidos por meio da análise de AFM indicam um aumento da rugosidade após a remoção da proteína S do filme polimérico, corroborando com o aumento do ângulo de contato após essa etapa. Mesmo assim, o caráter hidrofílico é mantido ( $\theta < 90^\circ$ ), uma vez que o par solitário de elétrons de valência no nitrogênio poderia induzir ligações de hidrogênio entre o pirrol heterocíclico e as moléculas de água, o que auxilia no umedecimento do PPy (Teh; Lin, 2005).

**Figura 31** – Fotografias da gota de água estática sobre superfície dos eletrodos e seus respectivos valores dos ângulos de contato obtidos após cada etapa de fabricação dos sensores MIP/PPy e NIP/PPy.



Fonte: a própria autora.

Após a religação com  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  de proteína S, a redução do ângulo de contato foi mais acentuada no sensor MIP/PPy. A proteína S possui em sua estrutura uma distribuição variada de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos (Mori *et al.*, 2021). Dessa forma, pode-se inferir que o caráter mais hidrofílico pode estar relacionado à orientação preferencial dos locais com maior tendência hidrofóbica da proteína em direção aos sítios de reconhecimento na superfície do sensor MIP/PPy, deixando seus locais mais hidrofílicos na interface da proteína adsorvida (Pandey, 2020; Sahihi; Farauto, 2022). No sensor NIP/PPy uma pequena redução no ângulo de contato foi observada ( $\Delta\theta = 10$ ), provavelmente relacionado às ligações não específicas. Portanto, com os resultados da análise de ângulo de contato é possível inferir que interações hidrofóbicas contribuem para a interação entre o filme polimérico e a

proteína S, e a maior variação do ângulo evidencia a presença de impressão química no sensor MIP/PPy.

#### 5.7 OTIMIZAÇÃO DA PRÉ-CONCENTRAÇÃO CONTROLADA ELETROQUIMICAMENTE DA PROTEÍNA S NO SENSOR MIP/PPY

Os resultados obtidos até o momento demonstram que o sensor MIP/PPy apresenta melhor resposta analítica à proteína S, quando comparado ao sensor NIP/PPy, o que é atribuído às cavidades impressas. No entanto, a detectabilidade do sensor sob condições otimizadas (na faixa de  $\text{ng mL}^{-1}$ ) não é suficiente para detectar a proteína S em amostras de saliva, a qual encontra-se na faixa de  $\text{fg mL}^{-1}$  a alguns  $\text{pg mL}^{-1}$  (Nascimento *et al.*, 2022). Assim, a fim de superar essa desvantagem, foi aplicado uma etapa de pré-concentração eletroquímica controlada durante a religação da proteína S, para melhorar significativamente a detectabilidade do método proposto.

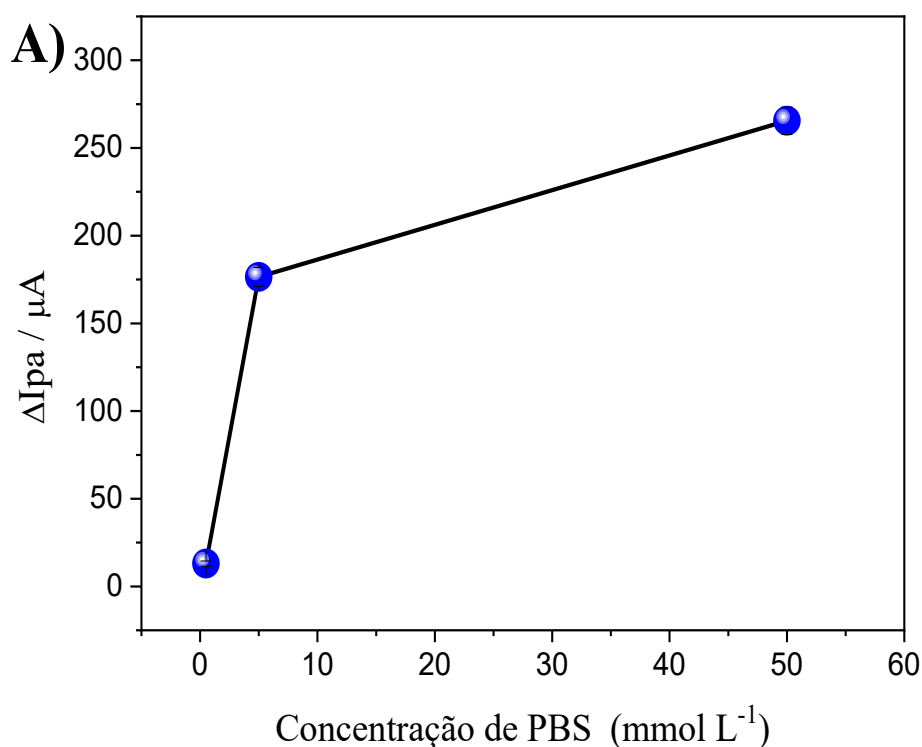
Pensando no valor do pH usado nos ensaios de religação da proteína S, de 7,3, provavelmente há uma grande contribuição de interações eletrostáticas entre o filme polimérico e a molécula de interesse. Essas interações provavelmente ocorrem pelas cargas positivas presente na superfície do filme PPy com os resíduos de aminoácidos carregados negativamente nas cadeias laterais da proteína S, levando em consideração o pKa do filme PPy que se encontra na faixa de 9-11 (Pei; Qian, 1991) e o ponto isoelétrico da proteína S de  $\sim 5,9$  (Areo *et al.*, 2021; Pandey, 2020). Além disso, sabe-se que utilizando uma pré-concentração controlada eletroquimicamente é possível controlar os estados de oxidação do filme PPy e torná-lo carregado positivamente, o que favoreceria ainda mais as interações eletrostáticas (De Lazzari *et al.*, 2019). Ademais, o uso de pré-concentração controlada eletroquimicamente promove a polarização da superfície do filme e pode induzir interações dipolo-dipolo entre a proteína S adsorvida e a proteína S em solução. Esta hipótese foi observada na adsorção de albumina sérica bovina (BSA) em eletrodos de carbono opticamente transparentes (OTCE) (Benavidez; Garcia, 2013).

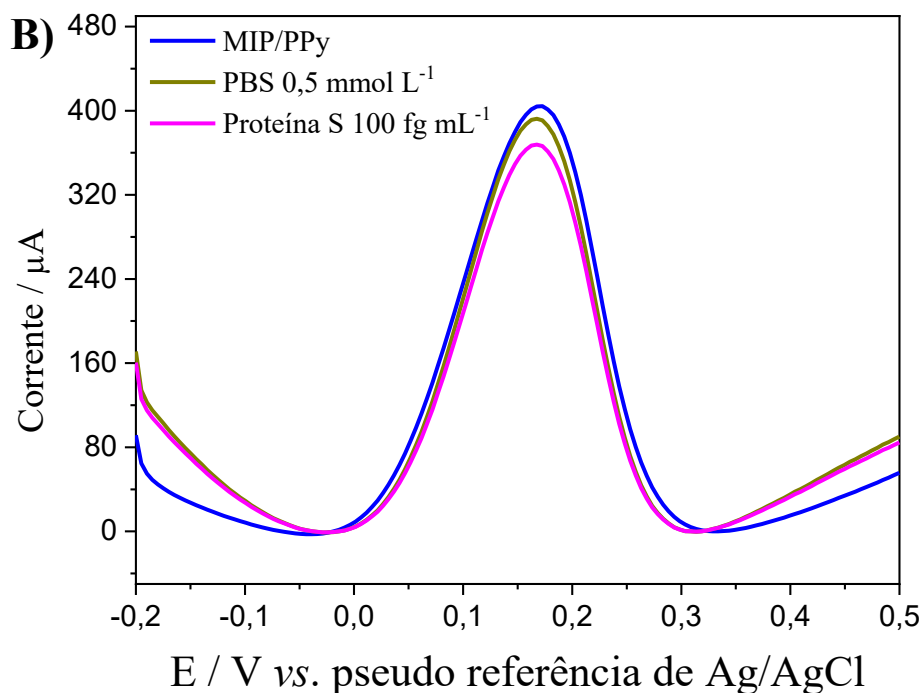
Dessa forma, os estudos iniciais da etapa de pré-concentração foram realizados com intuito de avaliar a influência do potencial aplicado sobre o ganho de sensibilidade na religação do analito alvo. Assim, inicialmente, o potencial de +0,5 V foi escolhido devido o PPy estar totalmente oxidado neste potencial (De Lazzari *et al.*, 2019). O critério de escolha do volume da solução de proteína S utilizado na religação,

por essa abordagem, levou em consideração um volume mínimo que cobrisse os três eletrodos presentes no *designer* do eletrodo impresso. Portanto, foram depositando 30  $\mu\text{L}$  de solução contendo 100  $\text{fg mL}^{-1}$  de proteína S preparada em PBS 50  $\text{mmol L}^{-1}$  e o potencial de +0,5 V foi aplicado durante 1 minuto (De Lazzari *et al.*, 2019).

Nesse primeiro teste, notou-se que ao diminuir substancialmente a concentração de proteína S, o branco analítico, isto é, o PBS na concentração de 50  $\text{mmol L}^{-1}$ , apresentou uma contribuição significativa no sinal analítico obtido, conforme a variação de corrente observada após sua leitura. Sendo assim, a influência do branco analítico foi investigada de forma mais abrangente. As concentrações estudadas de PBS na solução de religação variaram de 50 a 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$  e conforme os resultados alcançados (Figura 32), a concentração de 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$  (pH = 7,3) apresentou a menor contribuição no sinal analítico, sendo esta escolhida para dar continuidade na otimização da pré-concentração.

**Figura 32** – A) Valores de delta de corrente em função da concentração do tampão usado na pré-concentração da proteína S no sensor MIP/PPy. Condições: +0,5 V por 1 minuto (n = 3). B) Voltamogramas de pulso diferencial para sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  após religação com tampão e da proteína S. Religação com PBS 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$  e de 100  $\text{fg mL}^{-1}$  de proteína S em PBS 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$  (n = 3).





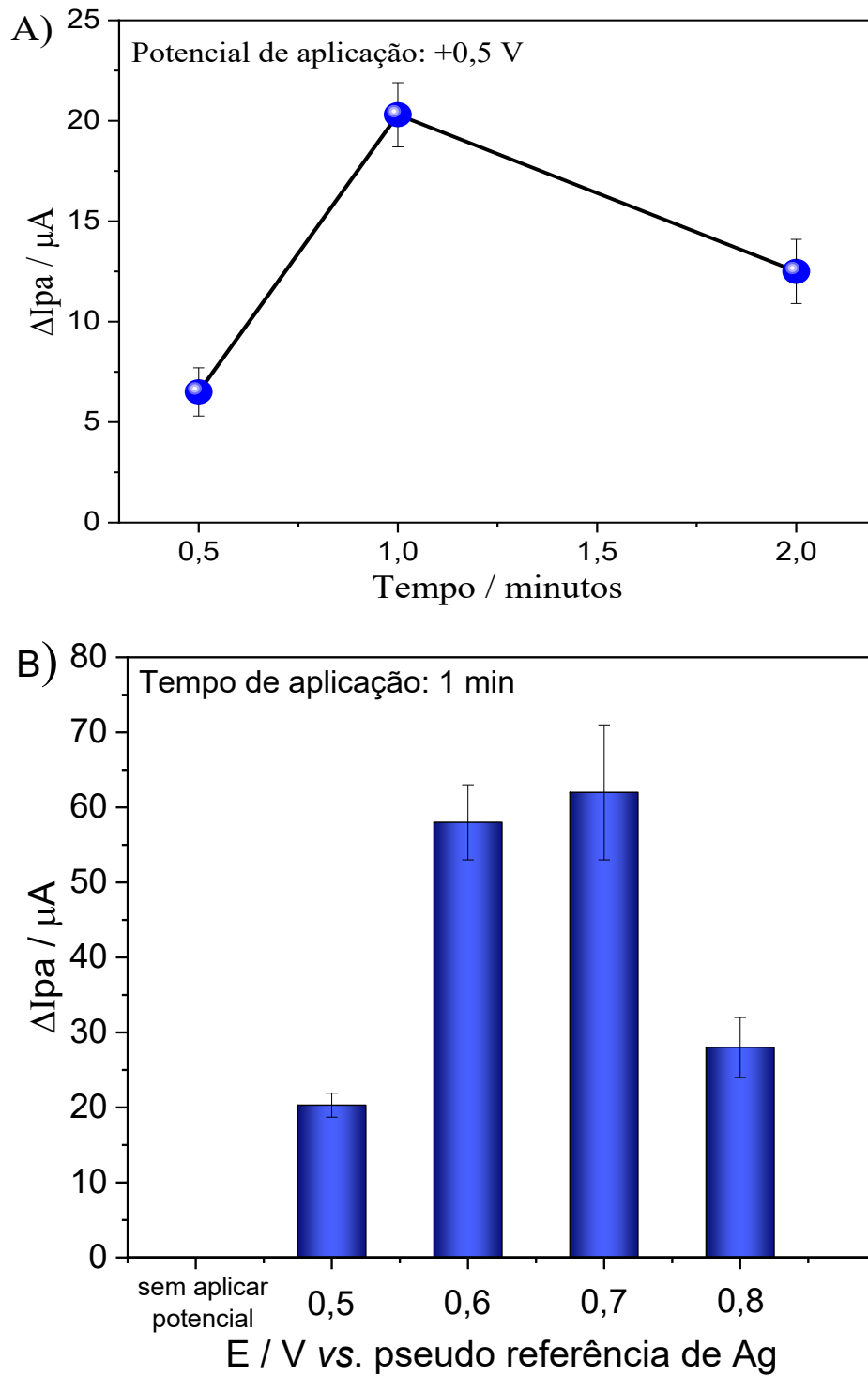
Fonte: a própria autora.

Dando continuidade à otimização da pré-concentração, o tempo e o potencial aplicado foram investigados de forma mais aprofundada, e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 33.

Em relação ao tempo de pré-concentração, observou-se que o intervalo de um minuto apresentou a melhor resposta (Figura 33A). Entretanto, tanto para tempos mais curtos quanto para tempos mais longos, a variação de corrente após a religação da proteína S foi menor. No caso de dois minutos, houve um aumento na resposta do branco analítico, resultando em uma redução na variação de corrente para a proteína S ao subtrair seu sinal da resposta obtida.

Para avaliar adequadamente a influência do potencial aplicado na pré-concentração da proteína S, foi realizado um experimento sem a aplicação de potencial, no qual 30  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 100 fg mL<sup>-1</sup> de proteína S também foram depositados. O objetivo foi determinar se o sensor MIP/PPy seria capaz de detectar essa concentração sem a aplicação do potencial. Os resultados confirmaram que o ganho de detectabilidade do sensor é atribuído à pré-concentração controlada eletroquimicamente (Figura 33B).

**Figura 33** – Valores de delta de corrente em função do tempo de acumulação (A) e do potencial aplicado (B) na pré-concentração de  $100 \text{ fg mL}^{-1}$  de proteína S no sensor MIP/PPy ( $n = 4$ ). Condições: sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$   $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em KCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ .

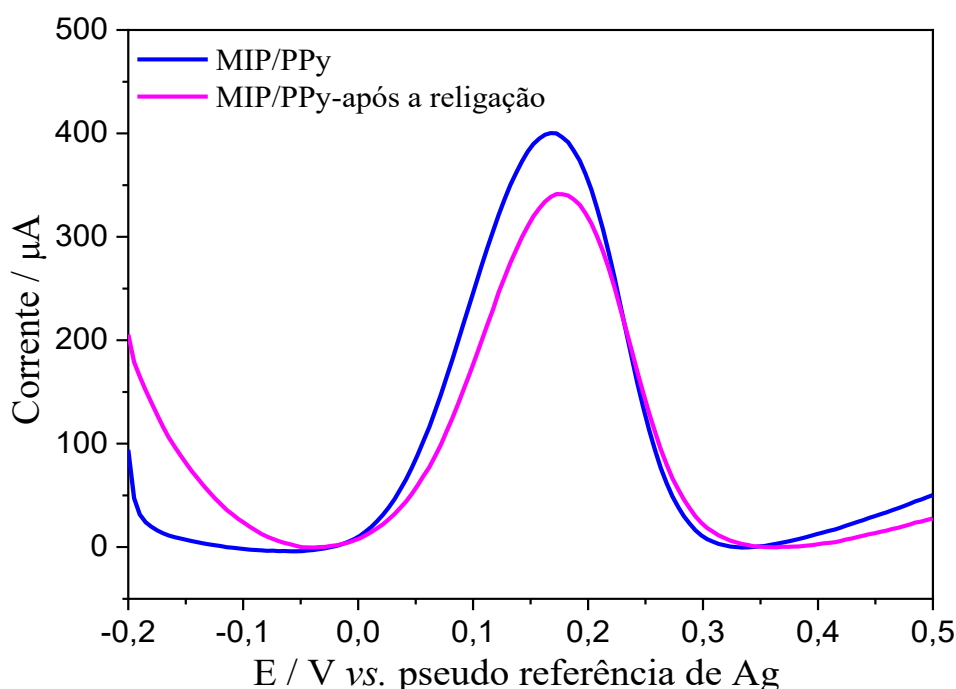


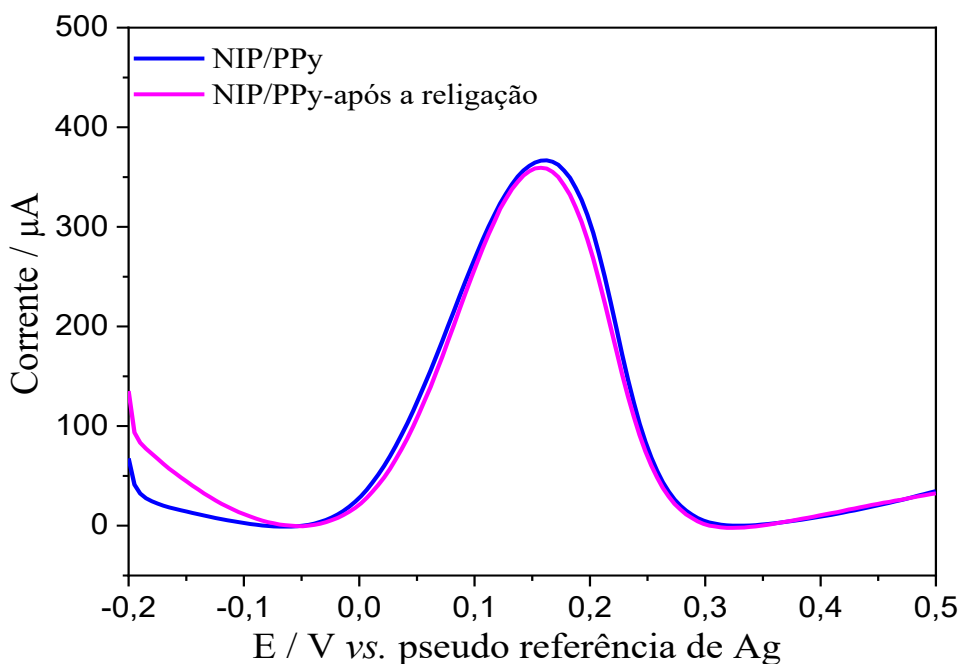
Fonte: a própria autora.

A maior variação de corrente de pico anódico foi obtida utilizando os potenciais de +0,6 V e +0,7 V. Entretanto, ao aplicar o potencial de +0,8 V, o branco analítico apresentou novamente uma contribuição significativa na resposta, o que reduziu a variação de corrente da proteína S ao descontá-lo do sinal analítico. Como o desvio padrão relativo (RSD, %) ao utilizar +0,6 V foi menor (8,6%) em comparação às medições com +0,7 V (14,5%), o potencial de +0,6 V foi considerado ideal para a religação. Resultados semelhantes foram relatados para a pré-concentração de outras biomoléculas, como a glicoproteína gp51 do vírus da leucemia bovina em eletrodos modificados com filme de PPy, utilizando detecção amperométrica pulsada com o mesmo potencial (Ramanaviciene; Ramanavicius, 2004).

Por fim, foi realizada a pré-concentração da proteína S no sensor NIP/PPy para verificar a contribuição das cavidades impressas no MIP/PPy. O perfil voltamétrico correspondente à pré-concentração de  $100 \text{ fg mL}^{-1}$  de proteína S em  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  PBS (pH = 7,3), aplicando um potencial de +0,6 V por um minuto para o MIP/PPy e o NIP/PPy, é apresentado na Figura 34.

**Figura 34** – Voltamogramas de pulso diferencial para sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  em  $\text{KCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$  após a pré-concentração de  $100 \text{ fg mL}^{-1}$  de proteína S para o MIP/PPy e o NIP/PPy.





Fonte: a própria autora.

Os resultados obtidos indicam que, mesmo após a pré-concentração, o NIP/PPy não apresentou variação de corrente significativa em resposta à religação do analito, o que reafirma a presença de sítios de ligação específicos no MIP/PPy. Dessa forma, a impressão química foi confirmada em ambas as condições, com e sem o procedimento de pré-concentração.

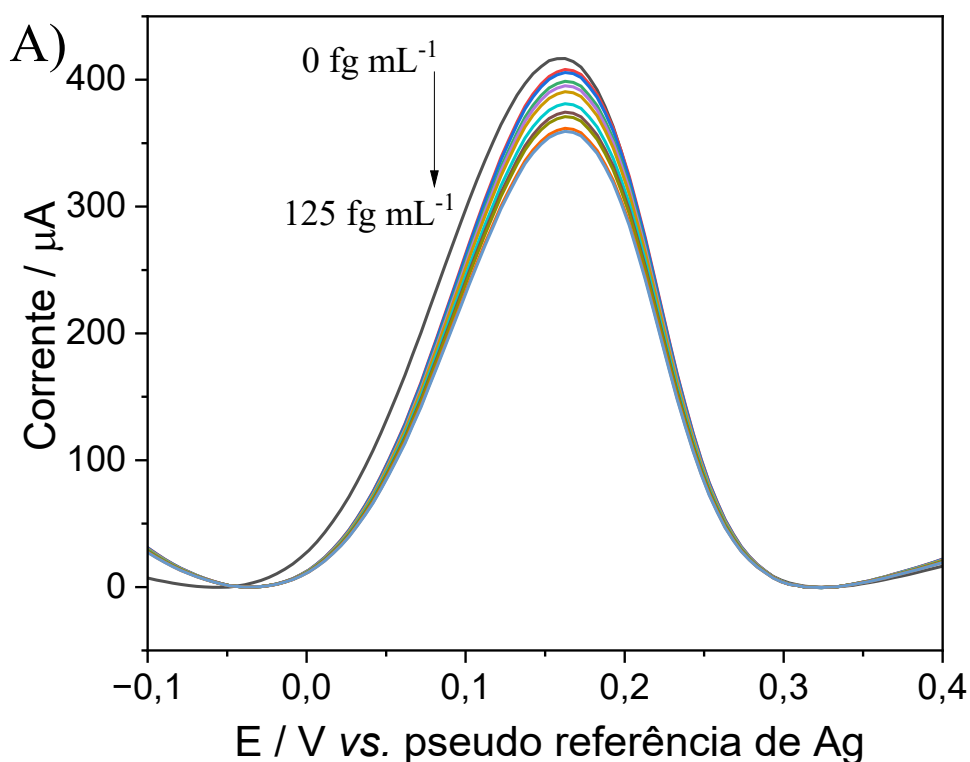
## 5.8 DESEMPENHO ANALÍTICOS DO SENSOR MIP/PPY

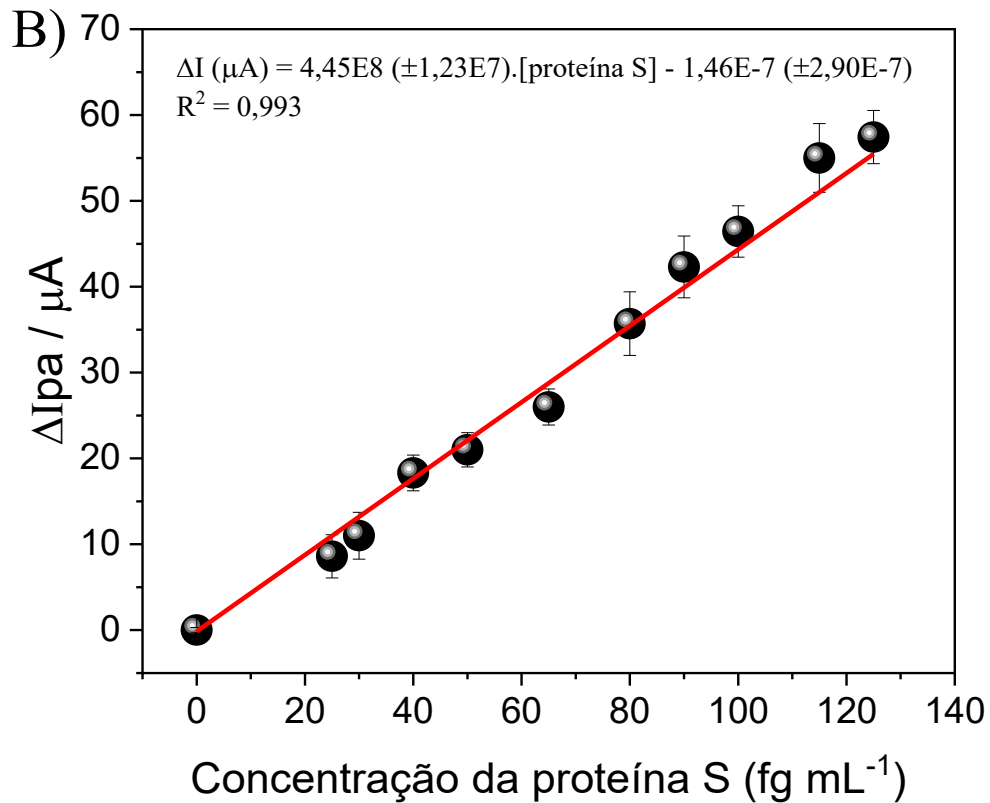
A curva analítica foi construída por meio da leitura de soluções contendo diferentes concentrações de proteína S. Para cada concentração foi usado um sensor MIP/PPy, previamente fabricado. A faixa de concentração do analito foi de 25 a 125 fg mL<sup>-1</sup>, conforme ilustra a Figura 35.

O sensor MIP/PPy apresentou uma resposta linear com o aumento da concentração de proteína S até 125 fg mL<sup>-1</sup>. A regressão linear pode ser descrita pela equação  $\Delta I (\mu A) = 4,50 \times 10^8 (\pm 0,02) [\text{proteína S SARS-CoV-2}] (\text{fg mL}^{-1}) - 4,2 \times 10^{-8} (\pm 2,32)$  com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,996. O ajuste do modelo linear aos dados foi avaliado por análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95% e obteve-se um  $F_{\text{calculado}} (MS_{\text{Regression}}/MS_{\text{Residue}})$  de 1038,42 superior ao  $F_{1,28} = 4,20$  tabelado, confirmando uma forte relação linear entre os dados e que o modelo

linear se ajusta aos resultados experimentais (Neto; Scarminio; Bruns, 2010). Também não foi observado falta de ajuste do modelo, uma vez que o  $F_{\text{calculado}} = 1,22$  ( $MS_{\text{Lack of fit}}/MS_{\text{Pure error}}$ ) foi menor que o valor tabelado de  $F_{8,20} = 2,45$  (Neto; Scarminio; Bruns, 2010). O sensor proporcionou limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) estimados em  $6,8 \text{ fg mL}^{-1}$  ( $0,1 \text{ fmol L}^{-1}$ ) e  $22,5 \text{ fg mL}^{-1}$  ( $0,3 \text{ fmol L}^{-1}$ ), respectivamente.

**Figura 35** – Voltamogramas de pulso diferencial (A) após religação de diferentes concentrações de proteína S (25, 30, 40, 50, 65, 80, 90, 100, 115, 125  $\text{fg mL}^{-1}$ ). Curva analítica (B) para proteína S utilizando o sensor MIP/PPy ( $n = 3$ ). Condições: sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$   $5 \text{ mmol L}^{-1}$  em eletrólito suporte KCl  $1 \text{ mol L}^{-1}$ .





Fonte: a própria autora.

Como os métodos moleculares, em geral, apresentam seus LDs na unidade de cópias por mL, o valor de LD encontrado para o sensor fabricado foi convertido para esta unidade, utilizando a equação relatada por Tabrizi e colaboradores (2022). De acordo com a literatura, cada SARS-CoV-2 tem entre 25 e 40 proteínas *spike* em sua superfície (Laue *et al.*, 2021), portanto, o LD do sensor MIP/PPy proposto foi encontrado como sendo  $1,5\text{--}2,4 \times 10^3$  cópias por mL, usando a equação (1):

$$\text{cópias por mL} = \frac{\text{molaridade proteína S de SARS-CoV-2}}{\text{número de spikes no vírus}} + \text{número de avogadro} \quad (1)$$

O reconhecimento da proteína S pelo sensor MIP foi avaliado por meio da estimativa da constante de dissociação de equilíbrio ( $K_D$ ) com o número máximo correspondente de sítios de ligação presentes no filme ( $B_{MAX}$ ) conforme descrito por Karimian (2014).

O reconhecimento entre um receptor específico e um analito alvo fornece informações sobre a seletividade e saturabilidade em sistemas biológicos, sendo a ocupação do receptor quantificada de acordo com a Lei da Ação de Massa. Esse

modelo estabelece a relação entre a concentração do ligante, ocupação do receptor e a constante de dissociação (Heuvel, 2018).

Durante a captura do analito pelo receptor (fase de associação) interações não específicas causadas pela presença de impurezas na solução do analito também são muito prováveis de ocorrer. Portanto, a lavagem posterior é realizada com intuito de remover os analitos e componentes restantes que não estão fortemente ligados na superfície do sensor. Esta fase é chamada de fase de dissociação. Após esta fase ter sido concluída com sucesso, o sinal obtido mostrará um estado estável. O equilíbrio é alcançado quando as taxas de associação e dissociação são iguais. As constantes de equilíbrio de associação e dissociação representam a afinidade da interação entre receptor e analito (ligante) (Nurrohman; Chiu, 2024).

A constante  $K_D$  é fundamental na descrição de interações entre moléculas, como de ligantes e receptores, pois reflete a sua afinidade. Matematicamente,  $K_D$  é definido como a concentração do ligante livre na qual metade dos sítios de ligação estão ocupados. Valores baixos de  $K_D$  indicam uma alta afinidade, ou seja, as moléculas tendem a permanecer ligadas, enquanto valores altos indicam uma baixa afinidade, sugerindo que o complexo ligante-receptor é menos estável e se dissocia rapidamente. Uma faixa típica para os valores de  $K_D$  em biossensores é de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$ . Dessa forma, um  $K_D$  baixo significa que o sensor possui alta sensibilidade para detectar até concentrações mínimas do analito alvo (Nurrohman; Chiu, 2024).

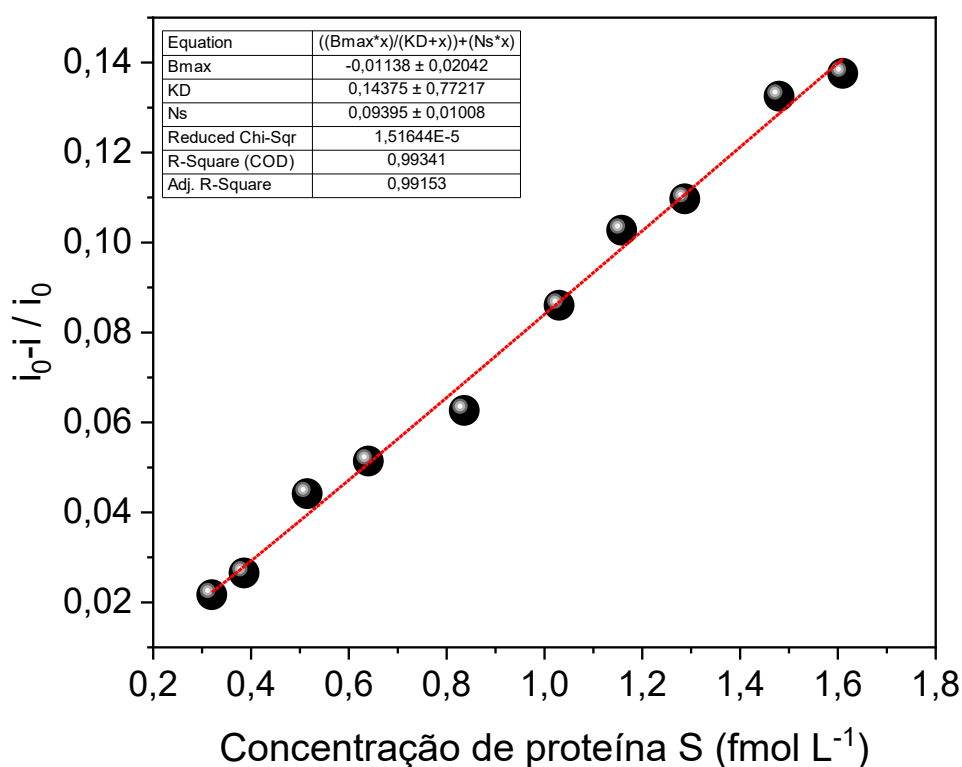
A isoterma de ligação do receptor sintético (sensor MIP/PPy) para a proteína S (Figura 36), foi ajustada usando a equação (2):

$$\frac{i_0 - i}{i_0} = \frac{B_{MAX} \cdot c}{K_D + c} + N_S \cdot c \quad (2)$$

onde  $K_D$  representa a dissociação de equilíbrio,  $B_{MAX}$  o número máximo correspondente de sítios de ligação presentes no filme,  $c$  é a concentração do alvo, e  $N_S$  a constante de ligação para a adsorção não específica. Esta equação refere-se a um modelo matemático baseado na isoterma de Langmuir para dois tipos de ligação simultânea: nos sítios de reconhecimento específico dentro do filme polimérico e na superfície do eletrodo devido à adsorção não específica (Karimian; Turner; Tiwari, 2014). Para ajustar o modelo aos dados experimentais e determinar os valores finais dos parâmetros  $B_{max}$ ,  $K_D$  e  $N_S$ , foi necessário inicialmente atribuir valores estimativos

para esses parâmetros. Os valores iniciais utilizados para a construção do modelo foram:  $B_{\max} = -0,01738$ ,  $K_D = 0,16282$  e  $N_s = 0,08221$ . Esses valores foram escolhidos com base em testes preliminares e na compreensão do comportamento experimental esperado. Com o modelo construído, o ajuste dos parâmetros foi realizado utilizando técnicas de regressão não linear, de modo a minimizar os desvios entre os valores teóricos previstos pelo modelo e os dados experimentais observados.

**Figura 36** – Isoterma de ligação do sensor MIP/PPy em diferentes concentrações de proteína S SARS-CoV-2 (0,32; 0,39; 0,52; 0,64; 0,84; 1,03; 1,16; 1,29; 1,48; 1,61  $\text{fmol L}^{-1}$ ). Condições: sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5  $\text{mmol L}^{-1}$  em eletrólito suporte KCl 1  $\text{mol L}^{-1}$ .



Fonte: a própria autora.

O valor de  $K_D$  para o sensor MIP/PPy foi  $0,14 \text{ fmol L}^{-1}$ , o que indica uma alta afinidade entre o sensor MIP e a proteína S, sendo superior às interações de anticorpos e ACE2 com a proteína S, conforme exemplificado a seguir.

Velappan e colaboradores (2022), descreveram o isolamento de 18 anticorpos humanos de cadeia única anti-SARS-CoV-2, cujos valores de  $K_D$  para RBD variaram de  $\sim 4$  a  $900 \text{ nmol L}^{-1}$ , determinados por ressonância plasmônica de superfície (SPR, do inglês *Surface plasmon resonance*), técnica que permite o monitoramento em

tempo real dos eventos de ligação (Bognár, 2022). Pinto e colaboradores (2020) investigaram diversos anticorpos monoclonais direcionados contra a proteína S do SARS-CoV-2 e estimaram os valores de  $K_D$  usando um modelo de ajuste global (Octet), relatam afinidade com a proteína S com  $K_D < 1 \text{ pmol L}^{-1}$  para RBD e  $K_D = 15 \text{ pmol L}^{-1}$  para proteína S. Bognár e colaboradores (2022) também avaliaram uma abordagem para a geração de *microarrays* baseado em MIP para reconhecimento do RBD da proteína S em chips de SPR. Eles estimaram os valores de  $K_D$  em diferentes matrizes (PBS, saliva, tampão de extração), obtendo valores na faixa de  $1,6 - 60 \text{ nmol L}^{-1}$ , que excedem a afinidade de RBD para seu alvo natural, a ACE2, cujas constantes de dissociação variaram de  $4,7 \text{ nmol L}^{-1}$  a  $15 \text{ nmol L}^{-1}$ .

Uma comparação das características do sensor proposto com outros sensores e biossensores eletroquímicos desenvolvidos para detecção de proteína S de SARS-CoV-2 é apresentada na Tabela 4. É possível destacar, de modo geral, a maior simplicidade na preparação do sensor, menor tempo de resposta e baixo LD comparado à maioria dos sensores relatados na literatura.

Essas vantagens estão atreladas ao sucesso na impressão química da proteína S empregando uma eletrossíntese em apenas uma única etapa, sem a necessidade de funcionalizações adicionais usando nanomateriais, levando a um processo de fabricação mais rápido, simples e com menor custo quando comparado com outros sensores. A estratégia de pré-concentração eletroquímica utilizada permitiu um tempo de resposta rápido, sendo viável a aplicação do sensor em análises de *point-of-care*, além de conferir uma melhora significativa na detectabilidade do sensor eletroquímico.

**Tabela 4** – Comparação do sensor MIP/PPy com outros sensores e biossensores eletroquímicos para detecção da proteína S do SARS-CoV-2.

	Eletrodo	Técnica	Tempo de síntese <sup>1</sup>	LQ	Tempo de incubação <sup>2</sup>	Ref.
<i>Sensores-MIP</i>						
PPy	SPCE	DPV	2 h 52 min (4 etapas)	22,5 fg mL <sup>-1</sup>	1 min	Este trabalho
PAPBA	Au-TFME	SWV	~ 3 h (7 etapas)	3,8 pg mL <sup>-1</sup>	15 min	(Ayankojo <i>et al.</i> , 2022)
P[Bvim]Br/ rGO/AuNPs	AN	SWV	3 h 30 min* (7 etapas)	100 pg mL <sup>-1</sup>	30 min	(Yang <i>et al.</i> , 2023)
PAPBA	SPCE	DPV	~ 13 h (10 etapas)	5,0 pg mL <sup>-1</sup>	30 min	(Yin <i>et al.</i> , 2023)
PPy	Pt	Amperometria	1 h 20 min (6 etapas)	5,0 µg mL <sup>-1**</sup>	> 1 min	(Ratautaite <i>et al.</i> , 2022)
<i>Biossensores</i>						
Anticorpo IgM	GO-ePAD	SWV	~ 3 h (6 etapas)	1,0 ng mL <sup>-1**</sup>	45 min	(Yakoh <i>et al.</i> , 2021)
MOFs/ ACE2	SPCE	EIS	- (4 etapas)*	100 fg mL <sup>-1</sup>	5 min	(Mehmandoust <i>et al.</i> , 2022)
MBs-ACE2/ ACE2-AuNPs	SPCE	DPV	~ 1 h* (3 etapas)	0,9 ag mL <sup>-1**</sup>	1 h	(Nascimento <i>et al.</i> , 2022)
MBs/Mab e Pab anti- proteína N/Pab anti-rabbit- AP	SPCE	DPV	1h 30 min* (4 etapas)	40 ng mL <sup>-1**</sup>	30 min	(Fabiani <i>et al.</i> , 2021)

<sup>1</sup>Tempo estimado e número de etapas de preparo para obtenção do sensor, conforme relatado pelos autores na seção experimental.

<sup>2</sup>Tempo de incubação do sensor com amostra antes da medição eletroquímica.

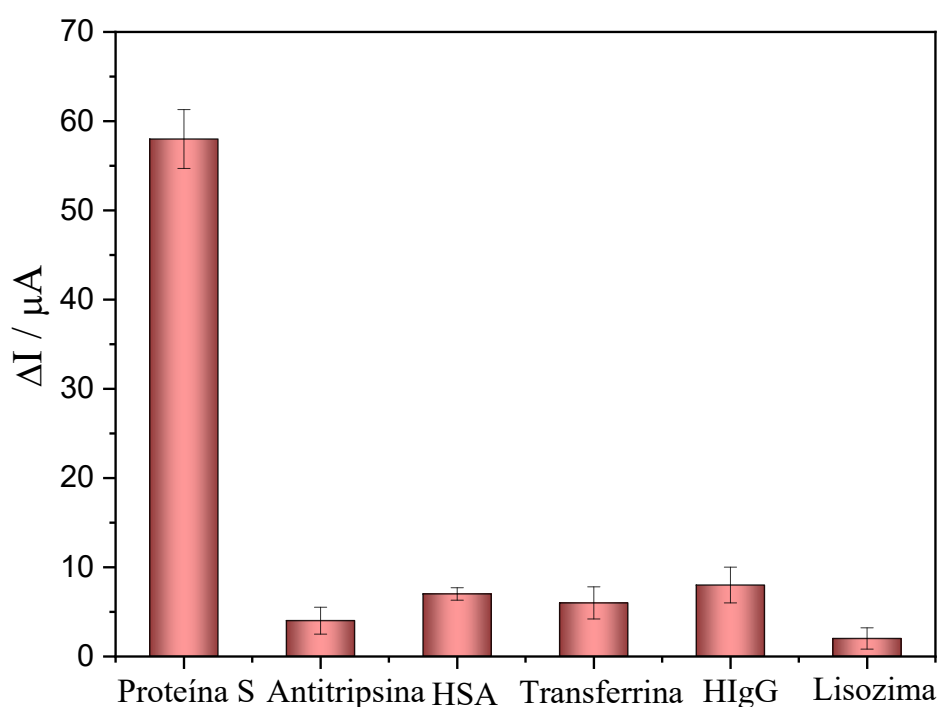
\*Tempo estimado e número de etapas de síntese apenas para fabricação do sensor, não considerando a síntese dos materiais utilizados na modificação do eletrodo.

\*\* Concentração do primeiro ponto da curva usado como referência, uma vez que os autores não relataram o LQ.

PAPBA: ácido poli(3-aminofenilborônico); P[Bvim]Br: brometo de poli(1-vinil-3-butylimidazolio); APTMS: (3-Aminopropil)trimetoxissilano; PPy: polipirrol; MBS: esferas magnéticas; rGO: óxido de grafeno reduzido; GO: óxido de grafeno; MOF: estruturas organometálicas; ACE2: enzima conversora de angiotensina 2; AP: fosfato alcalino; Pab: anticorpo policlonal.; Mab: anticorpo monoclonal; ePAD: dispositivo analítico eletroquímico baseado em papel; Au-TFME: eletrodo metálico de película fina de ouro; AN: agulha de acupuntura; Pt: platina; SPCE: eletrodos de carbono serigrafados; BDD: eletrodo de diamante dobrado com boro.

A capacidade do MIP/PPy de reconhecer seletivamente a proteína S foi avaliada pela exposição do sensor a outras proteínas (antitripsina, HAS, transferrina, HlgG e lisozima). A escolha dessas proteínas foi baseada no ponto isoelétrico, peso molecular e possível presença em amostras clínicas. Na Figura 37, observa-se que a resposta para a proteína S foi muito maior do que para as outras proteínas analisadas, demonstrando que o sensor MIP/PPy apresenta boa seletividade. Mesmo para a transferrina, que possui ponto isoelétrico e massa molecular próximos ao da proteína S, o sensor MIP/PPy apresentou resposta superior para o analito de interesse. A transferrina consiste em duas subunidades idênticas que diferem da estrutura trimerizada da proteína S do SARS-CoV-2, o que sugere que as cavidades impressas apresentam interação não apenas em tamanho, mas também pelo arranjo dos grupos funcionais (Pandey, 2020; Silva *et al.*, 2021).

**Figura 37** – Valores de delta de corrente obtidos para diferentes proteínas em comparação a proteína S no estudo de seletividade do sensor MIP/PPy (n = 3). Condições: sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5 mmol L<sup>-1</sup> em eletrólito suporte KCl 1 mol L<sup>-1</sup>.

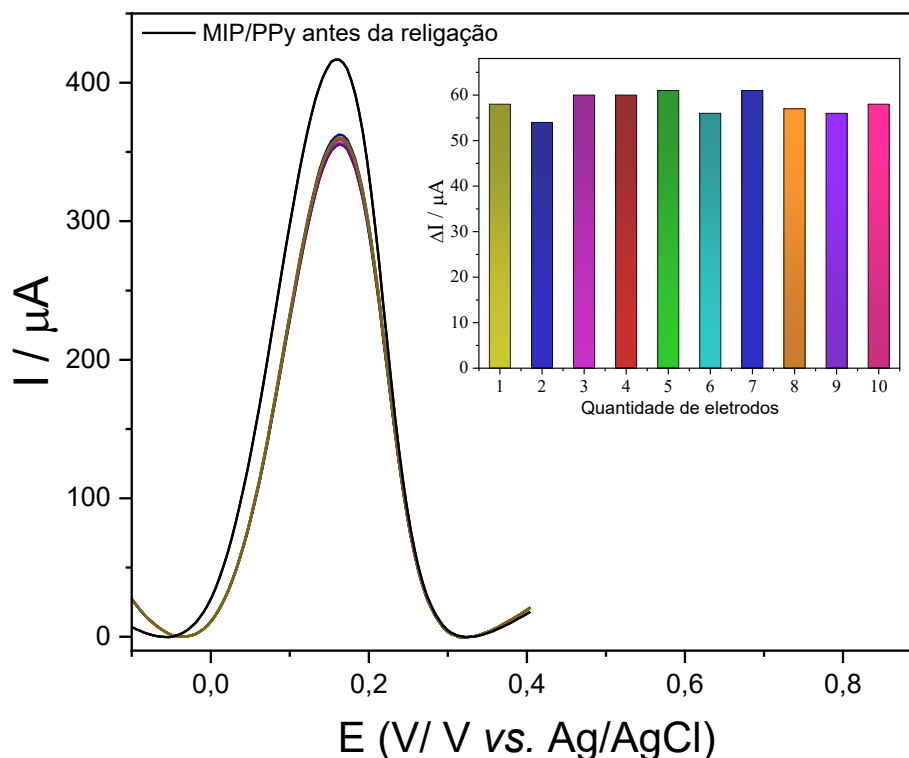


Fonte: a própria autora.

A repetibilidade da preparação do sensor foi avaliada utilizando dez sensores MIP/PPy na determinação de proteína S na concentração de 100 fg mL<sup>-1</sup>. As medidas

apresentaram perfil voltamétrico e correntes similares, com RSD de 2,8% no processo de religação, o que indica boa repetibilidade.

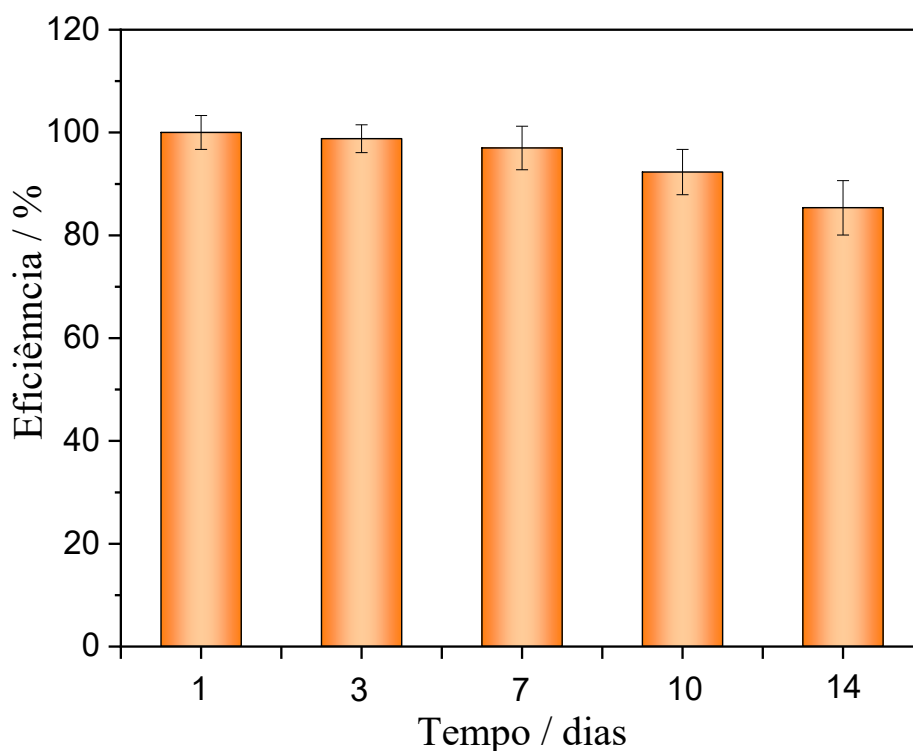
**Figura 38** – Voltamogramas cíclicos e valores de delta de corrente de 10 sensores MIP/PPy após a religação de  $100 \text{ fg mL}^{-1}$  de proteína S. Condições: sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$   $5 \text{ mmol L}^{-1}$  em eletrólito suporte KCl  $1 \text{ mol L}^{-1}$ .



Fonte: a própria autora.

A estabilidade do armazenamento do sensor MIP/PPy também foi investigada. O termo "estabilidade" refere-se à variação nos sinais de detecção durante o armazenamento de longo prazo (Sari *et al.*, 2022). Assim, para este estudo vários sensores foram preparados e armazenados sob refrigeração ( $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por 14 dias. As medidas ( $n = 3$ ) para detecção de  $100 \text{ fg mL}^{-1}$  de proteína S, foram realizadas em 5 períodos diferentes (1, 3, 7, 10 e 14 dias), sendo a leitura do dia 1 realizada no mesmo dia em que o sensor foi fabricado. Conforme observado na Figura 39, durante o tempo de armazenamento estudado, o sensor MIP/PPy apresentou uma eficiência de 85% após 14 dias, em relação a resposta obtida no primeiro dia, o que representa uma redução de apenas 15% no sinal de corrente.

**Figura 39** – Valores das porcentagens obtidas no estudo de estabilidade do sensor MIP/PPy (n = 3) por 14 dias. Condições: religação com  $100 \text{ fg mL}^{-1}$  de proteína S; medidas em sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$   $5 \text{ mmol L}^{-1}$  em eletrólito suporte KCl  $1 \text{ mol L}^{-1}$ .

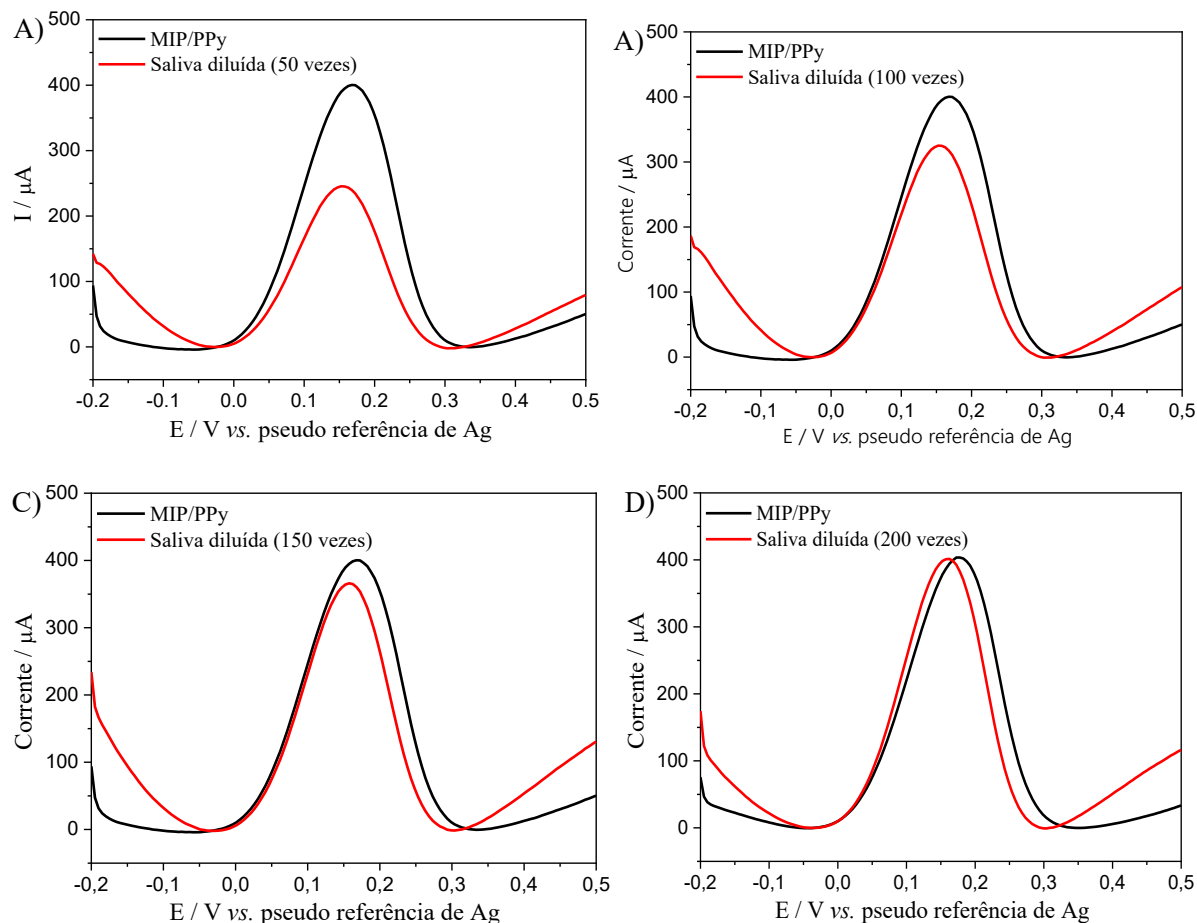


Fonte: a própria autora.

### 5.9 APLICAÇÃO DO SENSOR EM AMOSTRAS DE SALIVA

Foi avaliada a aplicação prática do sensor MIP/PPy para a análise de amostras de saliva. Inicialmente, investigou-se a influência da matriz na resposta analítica, uma vez que a saliva é composta por água, substâncias orgânicas, proteínas, enzimas e sais minerais, conferindo-lhe uma certa complexidade (Fini, 2020). Para tanto, uma amostra negativa para COVID-19 foi diluída em diferentes proporções utilizando PBS  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 7,3) e submetida ao processo de pré-concentração. Conforme ilustrado na Figura 40, foi possível quantificar o SARS-CoV-2 em amostras de saliva sem interferências da matriz apenas com a diluição da amostra (em 200 vezes). Esse resultado demonstra que, além da alta detectabilidade proporcionada pela pré-concentração e do reconhecimento específico pelo MIP/PPy, a simples diluição da saliva se mostrou uma solução eficaz para contornar o efeito de matriz, constituindo-se, portanto, um ponto forte deste estudo.

**Figura 40** – Voltamogramas de pulso diferencial para sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5  $\text{mmol L}^{-1}$  em solução  $\text{KCl}$  1  $\text{mol L}^{-1}$  para o sensor MIP/PPy após incubação de saliva diluída em 0,5  $\text{mmol L}^{-1}$  PBS ( $n = 3$ ). Diluições de A) 50 vezes, B) 100 vezes, C) 150 vezes e D) 200 vezes.



Fonte: a própria autora.

Posteriormente, o sensor MIP/PPy foi aplicado em dez amostras coletadas de pacientes saudáveis, que foram enriquecidas com concentrações de 65 e 100  $\text{fg mL}^{-1}$  de proteína S. De acordo com os resultados alcançados na Tabela 5, os valores de recuperação variaram de 91% e 103% e os baixos valores de RSD demonstram a viabilidade do sensor para análise livre de interferências de amostras de saliva diluídas.

**Tabela 5** – Porcentagem de recuperação de proteína S em saliva de pacientes saudáveis em ensaios de adição e recuperação, em detecção voltamétrica empregando o sensor MIP/PPy (n = 2).

Amostra	Adicionado (fg mL <sup>-1</sup> )	Encontrado (fg mL <sup>-1</sup> )	RSD (%)	Recuperação (%)
S1	0	-	-	-
	65	62 ± 3,7	4,4	96
	100	102 ± 3,3	3,2	102
S2	0	ND	-	-
	65	60 ± 3,5	5,8	92
	100	95 ± 2,4	2,5	95
S3	0	ND	-	-
	65	64 ± 2,7	4,2	98
	100	103 ± 3,2	3,1	103
S4	0	ND	-	-
	65	59 ± 2,5	4,2	91
	100	99 ± 3,0	3,0	99
S5	0	ND	-	-
	65	60 ± 3,1	5,2	92
	100	98 ± 4,3	4,4	98
S6	0	ND	-	-
	65	63 ± 2,5	4,0	97
	100	101 ± 2,9	2,9	101
S7	0	ND	-	-
	65	61 ± 2,2	3,5	94
	100	97 ± 3,5	3,6	97
S8	0	ND	-	-
	65	62 ± 2,3	3,7	96
	100	99 ± 4,2	4,2	99
S9	0	ND	-	-
	65	60 ± 3,2	5,3	92
	100	101 ± 4,1	4,1	101
S10	0	ND	-	-
	65	60 ± 2,8	4,7	92
	100	103 ± 2,8	2,7	103

ND: não detectado.

**Fonte:** a própria autora.

Por fim, o sensor MIP/PPy foi aplicado em três amostras de saliva de pacientes infectados com SARS-CoV-2, previamente validadas por RT-PCR, utilizando amostras de *swab* nasofaríngeo. As concentrações encontradas para proteína

S nas amostras positivas analisadas e as respectivas variações de correntes obtidas estão resumidas na Tabela 6.

**Tabela 6** – Concentração de proteína S encontrada em saliva de pacientes infectados com COVID-19 empregando o sensor MIP/PPy (n = 2).

Paciente (Ct <sup>a</sup> )	Respostas ( $\Delta I$ , $\mu A$ )	Concentração de proteína S (fg mL <sup>-1</sup> )*	Concentração de proteína S (cópias por mL)
S11 (27)	31 ± 3,5	13.600 ± 6,3	2,7–4,2 x 10 <sup>6</sup>
S12 (26)	34 ± 3,0	14.200 ± 8,7	2,9–4,7 x 10 <sup>6</sup>
S13 (22)	38 ± 2,5	15.200 ± 7,9	3,2–5,1 x 10 <sup>6</sup>

<sup>a</sup> Valores de *cycle threshold* determinado por RT-PCR. \*Concentração após multiplicar pelo fator de diluição (200 vezes).

**Fonte:** a própria autora.

A variação observada na resposta do sensor pode estar relacionada à carga viral nas amostras, que pode variar dependendo do ciclo viral do paciente infectado pelo SARS-CoV-2 (Xavier *et al.*, 2020). Os valores *cycle threshold* (Ct) obtidos no teste RT-PCR são indicativos da carga viral dos indivíduos. O Ct é uma medida semiquantitativa que indica a quantidade de ciclos necessários para que o sinal de fluorescência ultrapasse um determinado limite de detecção, indicando a presença do material genético viral. Quanto menor o valor de Ct, ou seja, menor o número de ciclos necessários para que o sinal de fluorescência ultrapasse o limite de detecção, maior é a quantidade de material genético presente na amostra. Assim, existe uma relação inversamente proporcional entre os valores de Ct e a carga viral (Sarkar; Sinha; Sarkar, 2020; Tom; Mina, 2020). Em geral, indivíduos com alta carga viral apresentam valores de Ct < 20, Ct de 33–35 está associado a baixa infecciosidade e Ct = 40 sendo o ponto de corte entre indivíduos positivamente e negativamente identificados (Szunerits *et al.*, 2022).

Os valores de concentração da proteína S presentes nas amostras de saliva analisadas neste trabalho são semelhantes aos resultados reportados na literatura. Nascimento e colaboradores (2022), por exemplo, identificaram uma faixa de concentração predominante entre 5.000 e 20.000 fg mL<sup>-1</sup> em 16 amostras de saliva analisadas por um sensor eletroquímico desenvolvido. Da mesma forma, Ning e colaboradores (2021) analisaram 43 amostras de saliva, obtendo uma média de 3,8 x 10<sup>6</sup> cópias por mL em uma nova abordagem de detecção baseada em CRISPR (do

inglês, *Cluster of Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), validada pela técnica de RT-PCR.

Portanto, a detecção de SARS-CoV-2 foi realizada com sucesso em amostras de saliva. Os resultados obtidos ressaltam a eficiência do método analítico, demonstrando o potencial da utilização do sensor desenvolvido no diagnóstico da COVID-19.

## 6. CONCLUSÕES

O presente trabalho descreve o desenvolvimento de um novo sensor biomimético utilizando tecnologia de impressão química baseada em filme de polipirrol para a detecção da proteína *spike* do SARS-CoV-2. A fabricação do sensor MIP/PPy envolveu um processo de eletrossíntese rápido, simples e reprodutível.

As caracterizações eletroquímicas e morfológicas do eletrodo, realizadas por meio das técnicas de voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e ângulo de contato, foram fundamentais para compreender a formação do filme de polipirrol, confirmar a criação dos sítios específicos, e avaliar a interação da proteína S com o filme polimérico sobre a superfície do eletrodo de trabalho. A pré-concentração controlada eletroquimicamente permitiu alcançar alta detectabilidade, tornando o sensor capaz de detectar concentrações no nível fg mL<sup>-1</sup> em amostras de saliva, uma matriz que é facilmente coletada e mais fácil de manusear em comparação com espécimes nasofaríngeos coletados por meio de swabs.

O diagnóstico de COVID-19 usando o sensor MIP/PPy em amostras de saliva foi viabilizado utilizando um pequeno volume de 30 µL, com preparo mínimo da amostra, envolvendo apenas diluição, com um tempo de resposta rápido facilitado pela pré-concentração por meio da aplicação de um potencial de +0,6V por 1 minuto. A seletividade do MIP/PPy em relação à proteína S em comparação ao polímero não impresso (NIP/PPy) foi destacada, demonstrando excelente seletividade para a proteína S em relação a outras proteínas, incluindo HSA, IgG, antitripsina, transferrina e lisozima. Além disso, o sensor foi capaz de quantificar a proteína S em três amostras de saliva positivas para COVID-19, previamente analisadas por RT-PCR, demonstrando ser uma ferramenta promissora no diagnóstico do SARS-CoV-2. A análise de um volume maior de amostras permitiria a determinação de parâmetros clínicos como taxas de verdadeiro negativo e verdadeiro positivo, a curva Receiver Operating Characteristic (ROC) e o valor de corte. Não obstante, com os dados obtidos é possível demonstrar o potencial das estratégias empregadas no desenvolvimento do sensor MIP/PPy para o diagnóstico da COVID-19, que também podem ser exploradas para o diagnóstico de outras doenças.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABREGO-MARTINEZ, Juan Carlos *et al.* Aptamer-based electrochemical biosensor for rapid detection of SARS-CoV-2: Nanoscale electrode-aptamer-SARS-CoV-2 imaging by photo-induced force microscopy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 195, n. June 2021, p. 113595, 2022. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113595.
- AGHOUTANE, Youssra *et al.* Development of a molecularly imprinted polymer electrochemical sensor and its application for sensitive detection and determination of malathion in olive fruits and oils. **Bioelectrochemistry**, v. 132, p. 107404, 2020. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2019.107404.
- AKGÖNÜLLÜ, Semra *et al.* Molecularly Imprinted Polymer-Based Sensors for Protein Detection. **Polymers**, v. 15, n. 3, p. 629, 2023. DOI: 10.3390/polym15030629.
- ALI, Muhammad Mujahid *et al.* Molecular imprinting of glycoproteins: From preparation to cancer theranostics. **Theranostics**, v. 12, n. 5, p. 2406–2426, 2022. DOI: 10.7150/thno.69189.
- AMOUZADEH TABRIZI, Mahmoud *et al.* An ultrasensitive molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensor for the determination of SARS-CoV-2-RBD by using macroporous gold screen-printed electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 196, n. October 2021, p. 113729, 2022. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113729.
- ANGELIS, Pedro Nunes *et al.* Development of a Novel Molecularly Imprinted Polyvinylimidazole/Functionalized Carbon Black Nanocomposite-based Paste Electrode for Electrochemical Sensing of Imazethapyr in Rice Samples. **Electroanalysis**, v. 34, n. 5, p. 854–862, 2022. DOI: 10.1002/elan.202100360.
- APARNA *et al.* Molecularly imprinted conducting polymer based sensor for Salmonella typhimurium detection. **Bioelectrochemistry**, v. 147, n. April, p. 108211, 2022. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2022.108211.

AREO, Oluwatoyin *et al.* Single-particle characterization of SARS-CoV-2 isoelectric point and comparison to variants of interest. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, p. 3–8, 2021.

DOI: 10.3390/microorganisms9081606.

ARNAOUT, Ramy *et al.* SARS-CoV2 Testing: The Limit of Detection Matters. **bioRxiv**, v. 1, p. 131144–131159, 2020. DOI: 10.1101/2020.06.02.131144.

ATES, Murat. Progress in Organic Coatings Review study of electrochemical impedance spectroscopy and equivalent electrical circuits of conducting polymers on carbon surfaces. **Progress in Organic Coatings**, v. 71, n. 1, p. 1–10, 2011. DOI: 10.1016/j.porgcoat.2010.12.011.

AYANKOJO, Akinrinade George *et al.* Molecularly imprinted polymer based electrochemical sensor for quantitative detection of SARS-CoV-2 spike protein. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 353, p. 131160, 2022a. DOI: 10.1016/j.snb.2021.131160.

AYANKOJO, Akinrinade George *et al.* Molecularly imprinted polymer based electrochemical sensor for quantitative detection of SARS-CoV-2 spike protein. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 353, 2022b. DOI: 10.1016/j.snb.2021.131160.

AZIOUNE, Ammar *et al.* Hydrophobic protein-polypyrrole interactions: The role of van der Waals and Lewis acid-base forces as determined by contact angle measurements. **Langmuir**, v. 18, n. 4, p. 1150–1156, 2002. DOI: 10.1021/la010444o.

AZIOUNE, Ammar *et al.* Interactions and conformational changes of human serum albumin at the surface of electrochemically synthesized thin polypyrrole films. **Electrochimica Acta**, v. 50, n. 7–8, p. 1661–1667, 2005. DOI: 10.1016/j.electacta.2004.10.014.

AZKUR, Ahmet Kursat *et al.* Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of

- immunopathological changes in COVID-19. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 75, n. 7, p. 1564–1581, 2020. DOI: 10.1111/all.14364.
- BAR-ON, Yinon M *et al.* SARS-CoV-2 ( COVID-19 ) by the numbers. **eLife**, v. 9, p. e57309–e57323, 2020.
- BARD, Allen J.; FAULKNER, Larry R. *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*. [S.l: s.n.], 1994.
- BENAVIDEZ, Tomás E. *et al.* Adsorption of soft and hard proteins onto OTCEs under the influence of an external electric field. **Langmuir**, v. 31, n. 8, p. 2455–2462, 2015. DOI: 10.1021/la504890v.
- BENAVIDEZ, Tomás E.; GARCIA, Carlos D. Potential-assisted adsorption of bovine serum albumin onto optically transparent carbon electrodes. **Langmuir**, v. 29, n. 46, p. 14154–14162, 2013. DOI: 10.1021/la4029657.
- BERGEVIN, Marco Andres *et al.* Validation of saliva sampling as an alternative to oropharyngeal swab for detection of SARS-CoV-2 using unextracted rRT-PCR with the Allplex 2019-nCoV assay. **Journal of Medical Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 1–6, 2021. DOI: 10.1099/JMM.0.001404.
- BOGNÁR, Zsófia *et al.* Peptide epitope-imprinted polymer microarrays for selective protein recognition. Application for SARS-CoV-2 RBD protein. **Chemical Science**, v. 13, n. 5, p. 1263–1269, 2022. DOI: 10.1039/d1sc04502d.
- BONATTI, Amedeo Franco; DE MARIA, Carmelo; VOZZI, Giovanni. Molecular imprinting strategies for tissue engineering applications: A review. **Polymers**, v. 13, n. 4, p. 548, 2021. DOI: 10.3390/polym13040548.
- BORRILL, Alexandra J.; REILY, Nicole E.; MACPHERSON, Julie V. Addressing the practicalities of anodic stripping voltammetry for heavy metal detection: A tutorial review. **Analyst**, v. 144, n. 23, p. 6834–6849, 2019. DOI: 10.1039/c9an01437c.

BOS, Martin A *et al.* Influence of the electric potential of the interface on the adsorption of proteins. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 3, p. 91–100, 1994. DOI: 10.1016/0927-7765(93)01109-5.

BURTON, Zachary; BHUSHAN, Bharat. Hydrophobicity, adhesion, and friction properties of nanopatterned polymers and scale dependence for micro- and nanoelectromechanical systems. **Nano Letters**, v. 5, n. 8, p. 1607–1613, 2005. DOI: 10.1021/nl050861b.

CAJIGAS, Sebastian *et al.* Electrochemical genosensor for the specific detection of SARS-CoV-2. **Talanta**, v. 245, p. 123482, 2022. DOI: 10.1016/j.talanta.2022.123482.

CALDARA, Manlio *et al.* Deposition Methods for the Integration of Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) in Sensor Applications. **Advanced Sensor Research**, v. 2, n. 7, p. 2200059, 2023. DOI: 10.1002/adsr.202200059.

CARTER, Linda J. *et al.* Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. **ACS Central Science**, v. 6, n. 5, p. 591–605, 2020. DOI: 10.1021/acscentsci.0c00501.

CARVALHO, Liliane A. De; ANDRADE, Adalgisa R. De; BUENO, Paulo R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 796–804, 2006. DOI: 10.1590/s0100-40422006000400029.

CENNAMO, Nunzio *et al.* Proof of concept for a quick and highly sensitive on-site detection of sars-cov-2 by plasmonic optical fibers and molecularly imprinted polymers. **Sensors**, v. 21, n. 5, p. 1–17, 2021. DOI: 10.3390/s21051681.

CHEN, Hong-jun *et al.* Surface-imprinted chitosan-coated magnetic nanoparticles modified multi-walled carbon nanotubes biosensor for detection of bovine serum albumin. **Sensors and Actuators B**, v. 163, p. 76–83, 2012. DOI:

10.1016/j.snb.2012.01.010.

CHURINSKY, Candace; GRGICAK, Catherine. The Effect of Repeated Activation on Screen-Printed Carbon Electrode Cards. **ECS Transactions**, v. 61, n. 26, p. 1–8, 2014. DOI: 10.1149/06126.0001ecst.

CUI, G. *et al.* Effect of pre-treatment on the surface and electrochemical properties of screen-printed carbon paste electrodes. **Analyst**, v. 126, n. 8, p. 1399–1403, 2001. DOI: 10.1039/b102934g.

DE LAZZARI, Adriana C. *et al.* Polypyrrole nanotubes for electrochemically controlled extraction of atrazine, caffeine and progesterone. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 7, p. 398–406, 2019. DOI: 10.1007/s00604-019-3545-z.

DEVKOTA, Lavaraj *et al.* Electrochemical determination of tetracycline using AuNP-coated molecularly imprinted overoxidized polypyrrole sensing interface. **Electrochimica Acta**, v. 270, p. 535–542, 2018. DOI: 10.1016/j.electacta.2018.03.104.

DONG, Chengya *et al.* Molecularly imprinted polymers by the surface imprinting technique. **European Polymer Journal**, v. 145, n. September 2020, p. 110231, 2021. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2020.110231.

EL SHARIF, H. F. *et al.* Evaluation of electropolymerized molecularly imprinted polymers (E-MIPs) on disposable electrodes for detection of SARS-CoV-2 in saliva. **Analytica Chimica Acta**, v. 1206, p. 339777, 2022. DOI: 10.1016/j.aca.2022.339777.

EL SHARIF, H F *et al.* Evaluation of electropolymerized molecularly imprinted polymers (E-MIPs) on disposable electrodes for detection of SARS-CoV-2 in saliva. **Analytica Chimica Acta**, v. 1206, p. 339777, 2022.

ERDOSSY, Júlia *et al.* Trends in Analytical Chemistry Electrosynthesized molecularly imprinted polymers for protein recognition. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p.

179–190, 2016.

ESMAEILY, Zahra *et al.* Electropolymerization as an electrochemical preconcentration approach for the determination of melamine in milk samples. **Electrochimica Acta**, v. 390, p. 138897, 2021. DOI: 10.1016/j.electacta.2021.138897.

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**, v. 171, n. October 2020, p. 112686, 2021. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112686.

FALONE, Max Fabrício; BUFFON, Edervaldo; STRADIOTTO, Nelson Ramos. Molecularly imprinted electrochemical sensor for monitoring mercaptan sulfur in aviation biofuel. **Fuel**, v. 307, n. May 2021, p. 121783, 2022. DOI: 10.1016/j.fuel.2021.121783.

FERREIRA, Milena do Prado; YAMADA-OGATTA, Sueli Fumie; TEIXEIRA TARLEY, César Ricardo. Electrochemical and Bioelectrochemical Sensing Platforms for Diagnostics of COVID-19. **Biosensors**, v. 13, n. 3, p. 336–361, 2023. DOI: 10.3390/bios13030336.

FILHO, L I O D E Mesquita. Vinícius Santos de Sousa. **Tese**, p. 1–52, 2023.

FINI, Maryam Baghizadeh. Oral saliva and COVID-19. **Oral Oncology**, v. 108, n. May, p. 104821, 2020. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2020.104821.

GARCÍA-ÁLVAREZ, Rafaela; VALLET-REGÍ, María. Hard and soft protein corona of nanomaterials: Analysis and relevance. **Nanomaterials**, v. 11, n. 4, p. 888–913, 2021. DOI: 10.3390/nano11040888.

GAST, Manuela; SOBEK, Harald; MIZAIKOFF, Boris. Advances in imprinting strategies for selective virus recognition a review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 114, p. 218–232, 2019. DOI: 10.1016/j.trac.2019.03.010.

GHOORCHIAN, Arash *et al.* Absorbance-based Spectroelectrochemical Sensor for Determination of Ampyra Based on Electrochemical Preconcentration. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 324, p. 128723, 2020. DOI: 10.1016/j.snb.2020.128723.

GREEF, R.; PEATTIE, Roderick; PETER, L.M.. Instrumental methods in electrochemistry. **E. Horwood, New York**, 1990.

GRIESHABER, Dorothee *et al.* Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensor**, v. 8, p. 1400–1458, 2008.

GUI, Rijun *et al.* Recent advances and future prospects in molecularly imprinted polymers-based electrochemical biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 100, n. August 2017, p. 56–70, 2018. DOI: 10.1016/j.bios.2017.08.058.

HALLIK, Allan *et al.* Analysis of electrochemical impedance of polypyrrole|sulfate and polypyrrole|perchlorate films. **Synthetic Metals**, v. 156, n. 5–6, p. 488–494, 2006. DOI: 10.1016/j.synthmet.2006.02.004.

HAN, Mi Seon *et al.* RT-PCR for SARS-CoV-2: quantitative versus qualitative. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 165, 2021. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30424-2.

HASHEMI, Seyyed Alireza *et al.* Graphene-Based Femtogram-Level Sensitive Molecularly Imprinted Polymer of SARS-CoV-2. **Advanced Materials Interfaces**, v. 8, n. 24, p. 1–12, 2021. DOI: 10.1002/admi.202101466.

HAWKINS, Daniel M.; STEVENSON, Derek; REDDY, Subrayal M. Investigation of protein imprinting in hydrogel-based molecularly imprinted polymers (HydroMIPs). **Analytica Chimica Acta**, v. 542, n. 1 SPEC. ISS., p. 61–65, 2005. DOI: 10.1016/j.aca.2005.01.052.

HEBBAR, R. S.; ISLOOR, A. M.; ISMAIL, A. F. *Contact Angle Measurements*. [S.l.]: Elsevier B.V., 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63776->

5.00012-7>.

HERNÁNDEZ, HERRERA, Héctor *et al.* Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): A Review Study of Basic Aspects of the Corrosion Mechanism Applied to Steels. **Electrochemical Impedance Spectroscopy 1.**, p. 137–144, 2020.

HEUVEL, J. P.V. Receptor Theory and the Ligand-Macromolecule Complex. **Comprehensive Toxicology, Third Edition: Volume 1-15**, v. 8, p. V8-18-V8-43, 2018. DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.95603-4.

HONG, Ke *et al.* Prolonged presence of viral nucleic acid in clinically recovered COVID-19 patients was not associated with effective infectiousness. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, n. 1, p. 2315–2321, 2020. DOI: 10.1080/22221751.2020.1827983.

HRYNIEWICZ, B M *et al.* Development of polypyrrole (nano)structures decorated with gold nanoparticles toward immunosensing for COVID-19 serological diagnosis. **Material Today Chemistry**, v. 24, p. 100817, 2022.

HU, C. C.; CHU, C. H. Electrochemical impedance characterization of polyaniline-coated graphite electrodes for electrochemical capacitors - Effects of film coverage/thickness and anions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 503, n. 1–2, p. 105–116, 2001. DOI: 10.1016/S0022-0728(01)00385-0.

HUANG, Yuan *et al.* Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 41, n. 9, p. 1141–1149, 2020. DOI: 10.1038/s41401-020-0485-4.

HUSSEIN, Heba A. *et al.* SARS-CoV-2-Impedimetric Biosensor: Virus-Imprinted Chips for Early and Rapid Diagnosis. **ACS Sensors**, v. 6, n. 11, p. 4098–4107, 2021. DOI: 10.1021/acssensors.1c01614.

JANJANI, Prachi *et al.* Bimetallic Mn/Fe MOF modified screen-printed electrodes for

non-enzymatic electrochemical sensing of organophosphate. **Analytica Chimica Acta**, v. 1202, p. 339676, 2022. DOI: 10.1016/j.aca.2022.339676.

JIANG, Minghua *et al.* Development and Validation of a Rapid, Single-Step Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) System Potentially to Be Used for Reliable and High-Throughput Screening of COVID-19. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. June, p. 1–6, 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00331.

KAN, Xianwen *et al.* Molecularly imprinted polymers based electrochemical sensor for bovine hemoglobin recognition. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 168, p. 395–401, 2012a. DOI: 10.1016/j.snb.2012.04.043.

KAN, Xianwen *et al.* Molecularly imprinted polymers based electrochemical sensor for bovine hemoglobin recognition. **Sensors and Actuators B : Chemical**, v. 168, p. 395–401, 2012b. DOI: 10.1016/j.snb.2012.04.043.

KARIMIAN, Najmeh; TURNER, Anthony P.F.; TIWARI, Ashutosh. Electrochemical evaluation of troponin T imprinted polymer receptor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 59, p. 160–165, 2014. DOI: 10.1016/j.bios.2014.03.013.

KAUSHIK, Ajeet Kumar *et al.* Electrochemical SARS-CoV-2 Sensing at Point-of-Care and Artificial Intelligence for Intelligent COVID-19 Management. **ACS Applied Bio Materials**, v. 3, p. 7306–7324, 2020. DOI: 10.1021/acsabm.0c01004.

KAUSHIK, Mahima *et al.* Emerging Trends in Advanced Nanomaterials Based Electrochemical Genosensors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 31, p. 3697–3709, 2018. DOI: 10.2174/1381612824666181109154919.

KULANDAIVALU, Shalini; ZAINAL, Zulkarnain; SULAIMAN, Yusran. Influence of Monomer Concentration on the Morphologies and Electrochemical Properties of PEDOT, PANI, and PPy Prepared from Aqueous Solution. **International Journal of**

**Polymer Science**, v. 2016, p. 1–12, 2016. DOI: 10.1155/2016/8518293.

LABUDA, Jan *et al.* Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n. 5, p. 1161–1187, 2010. DOI: 10.1351/PAC-REP-09-08-16.

LAUE, Michael *et al.* Morphometry of SARS-CoV and SARS-CoV-2 particles in ultrathin plastic sections of infected Vero cell cultures. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-82852-7.

LEE, Jong Hwan *et al.* A novel rapid detection for SARS-CoV-2 spike 1 antigens using human angiotensin converting enzyme 2 (ACE2). **Biosensors and Bioelectronics**, v. 171, n. July 2020, p. 112715, 2021. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112715.

LI, C M *et al.* Electrochemical thin film deposition of polypyrrole on different substrates. **Surface & Coatings Technology**, v. 198, p. 474–477, 2005. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2004.10.065.

LI, Lu *et al.* Surface molecularly imprinted polymers-based electrochemical sensor for bovine hemoglobin recognition. **Analyst**, v. 138, n. 22, p. 6962–6968, 2013. DOI: 10.1039/c3an01435e.

LIM, Rachel Rui Xia; BONANNI, Alessandra. The potential of electrochemistry for the detection of coronavirus-induced infections. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 133, p. 116081, 2020. DOI: 10.1016/j.trac.2020.116081.

LIM, Y. S. *et al.* Preparation and characterization of polypyrrole/graphene nanocomposite films and their electrochemical performance. **Journal of Polymer Research**, v. 20, n. 6, 2013. DOI: 10.1007/s10965-013-0156-y.

LIU, Weilu *et al.* Molecularly imprinted polymers on graphene oxide surface for EIS sensing of testosterone. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 92, p. 305–312, 2017. DOI: 10.1016/j.bios.2016.11.007.

LIUSTROVAITE, Viktorija *et al.* Towards Electrochemical Sensor Based on Molecularly Imprinted Polypyrrole for the Detection of Bacteria—*Listeria monocytogenes*. **Polymers**, v. 15, n. 7, 2023. DOI: 10.3390/polym15071597.

LONG, Gary L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of Detection A Closer Look at the IUPAC Definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 712A–724A, 1983.

LOPES, Frederico *et al.* Molecularly imprinted electrochemical sensor prepared on a screen printed carbon electrode for naloxone detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 243, p. 745–752, 2017. DOI: 10.1016/j.snb.2016.12.031.

LORENZO, Rosa A. *et al.* To remove or not to remove? The challenge of extracting the template to make the cavities available in molecularly imprinted polymers (MIPs). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 7, p. 4327–4347, 2011. DOI: 10.3390/ijms12074327.

LOTFI, Melika; HAMBLIN, Michael R.; REZAEI, Nima. COVID-19: Transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities. **Clinica Chimica Acta**, v. 508, n. April, p. 254–266, 2020. DOI: 10.1016/j.cca.2020.05.044.

LUONG, John H.T. *et al.* Recent advances of conducting polymers and their composites forelectrochemical biosensing applications. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 11, n. 4, 2020. DOI: 10.3390/JFB11040071.

MA, Ya *et al.* A multi-walled carbon nanotubes based molecularly imprinted polymers electrochemical sensor for the sensitive determination of HIV-p24. **Talanta**, v. 164, n. August 2016, p. 121–127, 2017. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.11.043.

MAHMOODIAN, Mehrnoosh; POURABBAS, Behzad; MOHAJERZADEH, Shams. Effect of anionic dopants on thickness, morphology and electrical properties of polypyrrole ultra-thin films prepared by in situ chemical polymerization. **Thin Solid Films**, v. 583, n. 1, p. 255–263, 2015. DOI: 10.1016/j.tsf.2015.03.043.

MAHSHID, Sahar Sadat; FLYNN, Sarah Elizabeth; MAHSHID, Sara. The potential application of electrochemical biosensors in the COVID-19 pandemic: A perspective on the rapid diagnostics of SARS-CoV-2. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 176, n. December 2020, p. 112905–112926, 2021. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112905.

MAO, Jifu; ZHANG, Ze. Polypyrrole as Electrically Conductive Biomaterials: Synthesis, Biofunctionalization, Potential Applications and Challenges. **Cutting-Edge Enabling Technologies for Regenerative Medicine. Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1078, p. 347–370, 2018.

MAZOUZ, Zouhour *et al.* Biosensors and Bioelectronics Computational approach and electrochemical measurements for protein detection with MIP-based sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 151, n. September 2019, p. 111978, 2020. DOI: 10.1016/j.bios.2019.111978.

MAZZOTTA, Elisabetta; DI GIULIO, Tiziano; MALITESTA, Cosimino. *Electrochemical sensing of macromolecules based on molecularly imprinted polymers: challenges, successful strategies, and opportunities*. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2022. v. 414.

MEDEIROS, E S *et al.* Uso de Polímeros Condutores em Sensores. Parte 1: Introdução aos Polímeros Condutores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, p. 62–77, 2012.

MEHMANDOUST, Mohammad *et al.* Electrochemical immunosensor for rapid and highly sensitive detection of SARS-CoV-2 antigen in the nasal sample. **Talanta**, v. 240, n. December 2021, p. 123211, 2022. DOI: 10.1016/j.talanta.2022.123211.

*Ministério da Saúde - COVID-19 NO BRASIL*. Disponível em: <[https://infoms.saude.gov.br/extensions/covid-19\\_html/covid-19\\_html.html](https://infoms.saude.gov.br/extensions/covid-19_html/covid-19_html.html)>.

MOJSOSKA, Biljana *et al.* Rapid SARS-CoV-2 detection using electrochemical

immunosensor. **Sensors (Switzerland)**, v. 21, n. 2, p. 1–11, 2021. DOI: 10.3390/s21020390.

MORI, Takaharu *et al.* Elucidation of interactions regulating conformational stability and dynamics of SARS-CoV-2 S-protein. **Biophysical Journal**, v. 120, n. 6, p. 1060–1071, 2021. DOI: 10.1016/j.bpj.2021.01.012.

MOUSAVIZADEH, Leila; GHASEMI, Sorayya. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 54, n. 2, p. 159–163, 2021. DOI: 10.1016/j.jmii.2020.03.022.

NASCIMENTO, Evair D. *et al.* COVID-19 diagnosis by SARS-CoV-2 Spike protein detection in saliva using an ultrasensitive magneto-assay based on disposable electrochemical sensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 353, n. October 2021, p. 131128, 2022. DOI: 10.1016/j.snb.2021.131128.

NAVAKUL, Krongkaew *et al.* Enhancing sensitivity of QCM for dengue type 1 virus detection using graphene-based polymer composites. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 413, n. 24, p. 6191–6198, 2021. DOI: 10.1007/s00216-021-03410-8.

NETO, BENÍCIO BARROS SCARMINIO, IEDA SPACINO BRUNS, Roy Edward. *Como fazer experimentos-: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 4. ed. [S.l.: s.n.], 2010. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=FDnT9ygeOccC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Como+fazer+experimentos:+pesquisa+e+desenvolvimento+na+ciência+e+na+indústria&ots=EI4vUalRCw&sig=oS1ppMxWBFojGmNXrr5Kf5ekmkl#v=onepage&q=Como+fazer+experimentos%3A+pesquisa+e>>.

NEZHADALI, Azizollah; MEHRI, Leili; SHADMEHRI, Raham. Determination of methimazole based on electropolymerized-molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite sensor. **Materials Science and Engineering C**, v. 85, p. 225–232,

2018. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.099.

NING, Bo *et al.* A smartphone-read ultrasensitive and quantitative saliva test for COVID-19. **Science Advances**, v. 7, n. 2, p. 19–23, 2021. DOI: 10.1126/sciadv.abe3703.

NURROHMAN, Devi Taufiq; CHIU, Nan Fu. Unraveling the Dynamics of SARS-CoV-2 Mutations: Insights from Surface Plasmon Resonance Biosensor Kinetics. **Biosensors**, v. 14, n. 2, p. 99, 2024. DOI: 10.3390/bios14020099.

OBREGÓN, Sergio; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, Vicente. Photocatalytic TiO<sub>2</sub> thin films and coatings prepared by sol–gel processing: a brief review. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 102, n. 1, p. 125–141, 2022. DOI: 10.1007/s10971-021-05628-5.

OKUZAKI, Hidenori; KONDO, Takamitsu; KUNUGI, Toshio. Characteristics of water in polypyrrole films. **Polymer**, v. 40, n. 4, p. 995–1000, 1999. DOI: 10.1016/s0032-3861(98)00319-x.

OPAS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. *Histórico da pandemia de COVID-19*. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19>>.

ÖZKORUCUKLU, Sabriye Perçin; ŞAHİN, Yücel; ALSANCAK, Güleren. Voltammetric behaviour of sulfamethoxazole on electropolymerized- molecularly imprinted overoxidized polypyrrole. **Sensors**, v. 8, n. 12, p. 8463–8478, 2008. DOI: 10.3390/s8128463.

PAL, Tanvi *et al.* *Chapter 8 - Characteristics of Conducting Polymers. Handbook of nanocomposite supercapacitor material I: Characteristics*. [S.l.: s.n.], 2020. v. 300.

PALEČEK, Emil; BARTOŠÍK, Martin. Electrochemistry of nucleic acids. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 6, p. 3427–3481, 2012. DOI: 10.1021/cr200303p.

PAN, Yang *et al.* Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 4, p. 411–412, 2020. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30113-4.

PANDEY, Lalit M. Surface engineering of personal protective equipments (PPEs) to prevent the contagious infections of SARS-CoV-2. **Surface Engineering**, v. 36, n. 9, p. 901–907, 2020. DOI: 10.1080/02670844.2020.1801034.

PANIEL, Nathalie; BAUDART, Julia. Colorimetric and electrochemical genosensors for the detection of Escherichia coli DNA without amplification in seawater. **Talanta**, v. 115, p. 133–142, 2013. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.04.050.

PARISI, Ortensia Ilaria *et al.* Design and development of plastic antibodies against SARS-CoV-2 RBD based on molecularly imprinted polymers that inhibit in vitro virus infection. **Nanoscale**, v. 13, n. 40, p. 16885–16899, 2021. DOI: 10.1039/d1nr03727g.

PASOMSUB, E *et al.* Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, p. 285.e1-285.e4, 2021.

PEARCE, Amanda K.; O'REILLY, Rachel K. Polymers for Biomedical Applications: The Importance of Hydrophobicity in Directing Biological Interactions and Application Efficacy. **Biomacromolecules**, v. 22, n. 11, p. 4459–4469, 2021. DOI: 10.1021/acs.biomac.1c00434.

PEI, Qibing; QIAN, Renyuan. Protonation and deprotonation of polypyrrole chain in aqueous solutions. **Synthetic Metals**, v. 45, n. 1, p. 35–48, 1991. DOI: 10.1016/0379-6779(91)91845-2.

PILETSKY, Stanislav *et al.* Molecularly Imprinted Polymers for Cell Recognition. **Trends in Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 368–387, 2020. DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.10.002.

PINTO, Dora *et al.* Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal

SARS-CoV antibody. **Nature**, v. 583, n. 7815, p. 290–295, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2349-y.

PIRO, Benoit *et al.* Comparison of electrochemical immunosensors and aptasensors for detection of small organic molecules in environment, food safety, clinical and public security. **Biosensors**, v. 6, n. 1, p. 7, 2016. DOI: 10.3390/bios6010007.

PIZZATO, Massimo *et al.* SARS-CoV-2 and the Host Cell: A Tale of Interactions. **Frontiers in Virology**, v. 1, n. January, p. 1–29, 2022. DOI: 10.3389/fviro.2021.815388.

PRAMANICK, Ishika *et al.* Conformational flexibility and structural variability of SARS-CoV2 S protein. **Structure**, v. 29, n. 8, p. 834–845.e5, 2021. DOI: 10.1016/j.str.2021.04.006.

RAHMATI, Zeinab *et al.* An electrochemical immunosensor using SARS-CoV-2 spike protein-nickel hydroxide nanoparticles bio-conjugate modified SPCE for ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 antibodies. **Microchemical Journal**, v. 170, n. January, p. 106718, 2021.

RAMANAVICIENE, Almira; RAMANAVICIUS, Arunas. Molecularly imprinted polypyrrole-based synthetic receptor for direct detection of bovine leukemia virus glycoproteins. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 6, p. 1076–1082, 2004. DOI: 10.1016/j.bios.2004.05.014.

RAMANAVICIUS, A. *et al.* Electrochemical impedance spectroscopy of polypyrrole based electrochemical immunosensor. **Bioelectrochemistry**, v. 79, n. 1, p. 11–16, 2010. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2009.09.013.

RAMANAVICIUS, A.; OZTEKIN, Y.; RAMANAVICIENE, A. Electrochemical formation of polypyrrole-based layer for immunosensor design. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 197, p. 237–243, 2014. DOI: 10.1016/j.snb.2014.02.072.

RAMANAVIČIUS, A.; RAMANAVIČIENE, A.; MALINAUSKAS, A. Electrochemical sensors based on conducting polymer-polypyrrole. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 27, p. 6025–6037, 2006. DOI: 10.1016/j.electacta.2005.11.052.

RAMANAVIČIUS, Simonas *et al.* Electrochemically Deposited Molecularly Imprinted Polymer-Based Sensors. **Sensors**, v. 22, n. 3, 2022. DOI: 10.3390/s22031282.

RATAUTAITE, Vilma *et al.* Evaluation of the interaction between SARS-CoV-2 spike glycoproteins and the molecularly imprinted polypyrrole. **Talanta**, v. 253, n. September 2022, p. 123981, 2023. DOI: 10.1016/j.talanta.2022.123981.

RATAUTAITE, Vilma *et al.* Molecularly imprinted polypyrrole based sensor for the detection of SARS-CoV-2 spike glycoprotein. **Electrochimica Acta**, v. 403, p. 139581, 2022. DOI: 10.1016/j.electacta.2021.139581.

RAZIQ, Abdul *et al.* Development of a portable MIP-based electrochemical sensor for detection of SARS-CoV-2 antigen. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 178, n. January, p. 113029, 2021. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113029.

REBELO, S C R *et al.* Analytica Chimica Acta Molecularly imprinted polymer SPE sensor for analysis of CA-125 on serum. v. 1082, p. 126–135, 2019. DOI: 10.1016/j.aca.2019.07.050.

RICCI, Francesco; ADORNETTO, Gianluca; PALLESCHI, Giuseppe. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 74–83, 2012. DOI: 10.1016/j.electacta.2012.06.033.

SADKI, Saïd *et al.* The mechanisms of pyrrole electropolymerization. **Chemical Society Reviews**, v. 29, n. 5, p. 283–293, 2000. DOI: 10.1039/a807124a.

SAHIHI, Mehdi; FARAUDO, Jordi. Molecular Dynamics Simulations of Adsorption of SARS-CoV-2 Spike Protein on Polystyrene Surface. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 62, n. 16, p. 3814–3824, 2022. DOI:

10.1021/acs.jcim.2c00562.

SARI, Arum Kurnia *et al.* The optimization of an electrochemical aptasensor to detect RBD protein S SARS-CoV-2 as a biomarker of COVID-19 using screen-printed carbon electrode/AuNP. **Journal of Electrochemical Science and Engineering**, v. 21, n. 1, p. 219–235, 2022. DOI: 10.5599/jese.1206.

SARKAR, Bidisa; SINHA, Rabindra NATH; SARKAR, Kamalesh. Initial Viral Load of a COVID-19-Infected Case Indicated by its Cycle Threshold Value of Polymerase Chain Reaction Could be used as a Predictor of its Transmissibility - An Experience from Gujarat, India. **Indian Journal of Community Medicine**, v. 45, n. 3, p. 278, 2020. DOI: 10.4103/ijcm.IJCM.

SCHALENBACH, Maximilian *et al.* How microstructures, oxide layers, and charge transfer reactions influence double layer capacitances. Part 1: impedance spectroscopy and cyclic voltammetry to estimate electrochemically active surface areas (ECSAs). **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 26, n. 19, p. 14288–14304, 2023. DOI: 10.1039/d3cp04743a.

SHELLENBERG, John J.; ORMOND, Margaret; KEYNAN, Yoav. Extraction-free RT-LAMP to detect SARS-CoV-2 is less sensitive but highly specific compared to standard RT-PCR in 101 samples. **Journal of Clinical Virology**, v. 136, n. November 2020, p. 104764, 2021. DOI: 10.1016/j.jcv.2021.104764.

SCHWEIGER, Bianca *et al.* Electropolymerized molecularly imprinted polypyrrole film for sensing of clofibrac acid. **Sensors**, v. 15, n. 3, p. 4870–4889, 2015. DOI: 10.3390/s150304870.

SEO, Giwan *et al.* Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor-Based Biosensor. **ACS nano**, v. 14, n. 4, p. 5135–5142, 2020. DOI:

10.1021/acsnano.0c02823.

SERRANO, Verónica M. *et al.* In-situ production of Histamine-imprinted polymeric materials for electrochemical monitoring of fish. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 311, n. September 2019, p. 127902, 2020. DOI: 10.1016/j.snb.2020.127902.

SHARMA, Piyush S. *et al.* Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 10, p. 3177–3204, 2012. DOI: 10.1007/s00216-011-5696-6.

SILVA, André M.N. *et al.* Human transferrin: An inorganic biochemistry perspective. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 449, p. 214186, 2021. DOI: 10.1016/j.ccr.2021.214186.

SILVA, Bárbara V.M. *et al.* An ultrasensitive human cardiac troponin T graphene screen-printed electrode based on electropolymerized-molecularly imprinted conducting polymer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 978–985, 2016. DOI: 10.1016/j.bios.2015.10.068.

SIQUEIRA SILVA, Matheus *et al.* Rational selection of hidden epitopes for a molecularly imprinted electrochemical sensor in the recognition of heat-denatured dengue NS1 protein. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 191, n. June, 2021. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113419.

SONG, Yanling *et al.* Discovery of Aptamers Targeting the Receptor-Binding Domain of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 14, p. 9895–9900, 2020. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c01394.

SYKORA, Sabine *et al.* Virus-like particles as virus substitutes to design artificial virus-recognition nanomaterials. **Chemical Communications**, v. 51, n. 12, p. 2256–2258, 2015. DOI: 10.1039/c4cc08843c.

SZUNERITS, Sabine *et al.* Plasmonic Approaches for the Detection of SARS-CoV-2 Viral Particles. **Biosensors**, v. 12, n. 7, p. 548, 2022. DOI: 10.3390/bios12070548.

TABRIZI, Mahmoud Amouzadeh *et al.* An ultrasensitive molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensor for the determination of SARS-CoV-2-RBD by using macroporous gold screen-printed electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 196, p. 113729, 2022. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113729.

TABRIZI, Mahmoud Amouzadeh; ACEDO, Pablo. An Electrochemical Impedance Spectroscopy-Based Aptasensor for the Determination of SARS-CoV-2-RBD Using a Carbon Nanofiber–Gold Nanocomposite Modified Screen-Printed Electrode. **Biosensors**, v. 12, n. 3, p. 142, 2022. DOI: 10.3390/bios12030142.

TARASSISHIN, Leonid. The Evolution of the Enzyme Immunoassay/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Proteomics and Genomics Research**, v. 2, n. 3, p. 13–17, 2021. DOI: 10.14302/issn.2326-0793.jpgr-21-3917.

TARLEY, César Ricardo Teixeira; SOTOMAYOR, Maria Del Pilar Taboada; KUBOTA, Lauro Tatsuo. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) no desenvolvimento de sensores químicos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1087–1101, 2005. DOI: 10.1590/s0100-40422005000600025.

TEH, Kwok Siong; LIN, Liwei. MEMS sensor material based on polypyrrole-carbon nanotube nanocomposite: Film deposition and characterization. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 15, n. 11, p. 2019–2027, 2005. DOI: 10.1088/0960-1317/15/11/005.

TENG, Ying; LIU, Fen; KAN, Xianwen. Voltammetric dopamine sensor based on three-dimensional electrosynthesized molecularly imprinted polymers and polypyrrole nanowires. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 8, p. 2515–2522, 2017. DOI:

10.1007/s00604-017-2243-y.

THEVENOT, Daniel R. *et al.* Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification (Technical Report). **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, p. 121–131, 2001. DOI: 10.1351/pac199971122333.

TIAN, Ruizhen *et al.* Recent development in the design of artificial enzymes through molecular imprinting technology. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 10, n. 35, p. 6590–6606, 2022. DOI: 10.1039/d2tb00276k.

TO, Kelvin Kai Wang *et al.* Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 841–843, 2020. DOI: 10.1093/cid/ciaa149.

TOM, Michael R.; MINA, Michael J. To Interpret the SARS-CoV-2 Test, Consider the Cycle Threshold Value. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 16, p. 2252–2254, 2020. DOI: 10.1093/cid/ciaa619.

TORO, Maricely Janette Uria; MARESTONI, Luiz Diego; DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR, Maria. A new biomimetic sensor based on molecularly imprinted polymers for highly sensitive and selective determination of hexazinone herbicide. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 208, p. 299–306, 2015. DOI: 10.1016/j.snb.2014.11.036.

TSAI, Tien Chun *et al.* Modification of platinum microelectrode with molecularly imprinted over-oxidized polypyrrole for dopamine measurement in rat striatum. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 171–172, p. 93–101, 2012. DOI: 10.1016/j.snb.2011.07.052.

VAITKUVIENE, Aida *et al.* Some biocompatibility aspects of conducting polymer polypyrrole evaluated with bone marrow-derived stem cells. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 442, p. 152–156, 2014. DOI:

10.1016/j.colsurfa.2013.06.030.

VELAPPAN, Nileena *et al.* Healthy humans can be a source of antibodies countering COVID-19. **Bioengineered**, v. 13, n. 5, p. 12598–12624, 2022. DOI: 10.1080/21655979.2022.2076390.

WAFFO, A. F.T. *et al.* Fully electrochemical MIP sensor for artemisinin. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 275, n. February, p. 163–173, 2018. DOI: 10.1016/j.snb.2018.08.018.

WANEKAYA, Adam; SADIK, Omowunmi A. Electrochemical detection of lead using overoxidized polypyrrole films. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 537, n. 1–2, p. 135–143, 2002. DOI: 10.1016/S0022-0728(02)01261-5.

WANG, Dawei *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 11, p. 1061–1069, 2020. DOI: 10.1001/jama.2020.1585.

WANG, Fei; ZHU, Lihua; ZHANG, Jingdong. Electrochemical sensor for levofloxacin based on molecularly imprinted polypyrrole-graphene-gold nanoparticles modified electrode. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 192, p. 642–647, 2014. DOI: 10.1016/j.snb.2013.11.037.

WANG, Joseph *et al.* *Analyst*, March 1996, Vol. 121 (345-350) 345. **Analyst**, v. 121, p. 345–350, 1996.

WANG, Pan *et al.* Double affinity integrated MIPs nanoparticles for specific separation of glycoproteins: A combination of synergistic multiple bindings and imprinting effect. **Chemical Engineering Journal**, v. 358, p. 143–152, 2019. DOI: 10.1016/j.cej.2018.09.168.

WANG, Zonghua *et al.* An ionic liquid-modified graphene based molecular imprinting electrochemical sensor for sensitive detection of bovine hemoglobin. **Biosensors and**

**Bioelectronics**, v. 61, p. 391–396, 2014. DOI: 10.1016/j.bios.2014.05.043.

WHO. COVID-19 Epidemiological Update. n. April 2024, 2024.

WITT, Suzanne *et al.* Boron doped diamond thin films for the electrochemical detection of SARS-CoV-2 S1 protein. **Diamond and Related Materials**, v. 118, n. April, p. 108542, 2021. DOI: 10.1016/j.diamond.2021.108542.

WU, Kanglin *et al.* Electrochemical sensor modified with poly(toluidine blue) for monitoring trace uranium in natural water by stripping voltammetry. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 332, n. 10, p. 3893–3901, 2023. DOI: 10.1007/s10967-023-09121-x.

XAVIER, Analucia R *et al.* COVID-19: manifestações clínicas e laboratoriais na infecção pelo novo coronavírus COVID-19: clinical and laboratory manifestations in novel coronavirus infection. **J Bras Patol Med Lab**, v. 56, p. 1–9, 2020.

XIE, Yixin *et al.* The pH Effects on SARS-CoV and SARS-CoV-2 Spike Proteins in the Process of Binding to hACE2. **Pathogens**, v. 11, n. 2, p. 238, 2022. DOI: 10.3390/pathogens11020238.

YAKOH, Abdulhadee *et al.* Paper-based electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: Detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 176, n. November 2020, p. 112912, 2021. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112912.

YANG, Xu *et al.* Molecularly imprinted miniature electrochemical biosensor for SARS-CoV-2 spike protein based on Au nanoparticles and reduced graphene oxide modified acupuncture needle. **Bioelectrochemistry**, v. 151, n. January, p. 108375, 2023. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2023.108375.

YARMAN, Aysu *et al.* Simple and robust: The claims of protein sensing by molecularly imprinted polymers. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 330, p. 129369, 2021.

DOI: 10.1016/j.snb.2020.129369.

YARMAN, Aysu; KURBANOGLU, Sevinc. Molecularly Imprinted Polymer-Based Sensors for SARS-CoV-2: Where Are We Now? **Biomimetics**, v. 7, n. 2, p. 58–79, 2022. DOI: 10.3390/biomimetics7020058.

YIN, Zheng-zhi *et al.* A surface molecularly imprinted electrochemical biosensor for the detection of SARS-CoV-2 spike protein by using Cu<sub>7</sub>S<sub>4</sub>-Au as built-in probe. **Bioelectrochemistry**, v. 152, p. 108462, 2023. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2023.108462.

YING, Liu *et al.* Diagnostic Indexes of a Rapid IgG/IgM Combined Antibody Test for SARS-CoV-2. **MedRxiv**, p. 1–13, 2020.

YOLA, Mehmet Lütfi; ATAR, Necip. A novel detection approach for serotonin by graphene quantum dots/two-dimensional (2D) hexagonal boron nitride nanosheets with molecularly imprinted polymer. **Applied Surface Science**, v. 458, p. 648–655, 2018. DOI: 10.1016/j.apsusc.2018.07.142.

YOON, Jinho *et al.* Highly sensitive biosensors based on biomolecules and functional nanomaterials depending on the types of nanomaterials: A perspective review. **Materials**, v. 13, n. 2, p. 1–21, 2020. DOI: 10.3390/ma13020299.

YUAN, Yuehua; LEE, T. Randall. *Surface Science Techniques. Chapter 1. Contact Angle and Wetting Properties*. [S.l: s.n.], 2013. v. 51.

ZAIDI, Shabi Abbas. An overview of bio-inspired intelligent imprinted polymers for virus determination. **Biosensors**, v. 11, p. 89, 2021. DOI: 10.3390/bios11030089.

ZARE, Ehsan Nazarzadeh *et al.* Electroconductive multi-functional polypyrrole composites for biomedical applications. **Applied Materials Today**, v. 24, p. 101117, 2021. DOI: 10.1016/j.apmt.2021.101117.

ZENG, Qi; HUANG, Xi; MA, Meihu. A Molecularly Imprinted Electrochemical Sensor

Based on Polypyrrole / Carbon Nanotubes Composite for the Detection of S-ovalbumin in Egg White. **Int. J. Electrochem. Sci.**, v. 12, p. 3965–3981, 2017. DOI: 10.20964/2017.05.61.

ZHANG, Jing; XIONG, Zhanbing; CHEN, Zhidong. Ultrasensitive electrochemical microcystin-LR immunosensor using gold nanoparticle functional polypyrrole microsphere catalyzed silver deposition for signal amplification. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 246, p. 623–630, 2017. DOI: 10.1016/j.snb.2017.02.134.

ZHANG, Tao; SUN, Lina; ZHANG, Yiyuan. Highly sensitive electrochemical determination of the SARS-COV-2 antigen based on a gold/graphene imprinted poly-arginine sensor. **Analytical Methods**, v. 13, n. 47, p. 5772–5776, 2021. DOI: 10.1039/d1ay01478a.

ZHANG, Yan *et al.* Molecularly Imprinted Nanomaterials with Stimuli Responsiveness for Applications in Biomedicine. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 918, 2023. DOI: 10.3390/molecules28030918.

ZHANG, Yang; LAI, Bo Shiun; JUHAS, Mario. Recent advances in aptamer discovery and applications. **Molecules**, v. 24, n. 5, p. 941, 2019. DOI: 10.3390/molecules24050941.

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**, v. 327, n. July 2020, 2021. DOI: 10.1016/j.snb.2020.128899.

ZHAO, Juanjuan *et al.* Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients with Novel Coronavirus Disease 2019. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 16, p. 2027–2034, 2020. DOI: 10.1093/cid/ciaa344.

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

10.1056/nejmoa2001017.

ZIDARIČ, Tanja *et al.* The development of an electropolymerized, molecularly imprinted polymer (MIP) sensor for insulin determination using single-drop analysis.

**Analyst**, v. 148, n. 5, p. 1102–1115, 2023. DOI: 10.1039/d2an02025d.