

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA DE BIOSSENSORIAMENTO COM
ELETRODO A BASE DE NANOFIOS DE NIOBATO DE SÓDIO PARA DETECÇÃO
DE RNA VIRAL: PROPOSTA PARA APLICAÇÃO NA DETECÇÃO DE
SARS-CoV-2**

JESSICA GOTARDI

Porto Alegre, fevereiro de 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA DE BIOSSENSORIAMENTO COM
ELETRODO A BASE DE NANOFIOS DE NIOBATO DE SÓDIO PARA DETECÇÃO
DE RNA VIRAL: PROPOSTA PARA APLICAÇÃO NA DETECÇÃO DE
SARS-CoV-2**

Tese apresentada por Jessica Gotardi para
obtenção do TÍTULO DE DOUTORA em
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Diogo André Pilger
Coorientadora: Profa. Dra. Simone Cristina Baggio Gnoatto

Porto Alegre, fevereiro de 2024

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em nível de Doutorado e aprovada em 23 de fevereiro de 2024, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Gisele Aparecida Amaral Labat
Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

Prof. Dr. Klester dos Santos Souza
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Marina Siebert
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Gotardi, Jessica
DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA DE
BIOSSENSORIZAMENTO COM ELETRODO A BASE DE NANOFIOS DE
NIOBATO DE SÓDIO PARA DETECÇÃO DE RNA VIRAL: PROPOSTA
PARA APLICAÇÃO NA DETECÇÃO DE SARS-CoV-2 / Jessica
Gotardi. -- 2024.
221 f.
Orientador: Diogo André Pilger.

Coorientadora: Simone Cristina Baggio Gnoatto.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2024.

1. Biossensor. 2. Genossensor. 3. Óxido de nióbio.
4. SARS-CoV-2. 5. Diagnóstico. I. Pilger, Diogo André,
orient. II. Gnoatto, Simone Cristina Baggio,
coorient. III. Título.

Descrição

Este trabalho foi desenvolvido em colaboração entre o Laboratório Análises Bioquímicas e Citológicas (LABC) do Departamento Análises da Faculdade de Farmácia da UFRGS (coordenação Prof. Dr. Diogo André Pilger), Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica (LaFis) do Departamento de Produção de Matéria-Prima da Faculdade de Farmácia da UFRGS (coordenação Profa. Dra. Simone Gnoatto) e o Laboratório de Pesquisa em Corrosão (LAPEC) do Departamento de Metalurgia da UFRGS (coordenação Profa. Dra. Célia de Fraga Malfatti), com recursos advindos do PROEX/Capes (0534/2019), FAPERGS/PPSUS (Termo de Outorga 21/2551-0000070-8) e FAPERGS/FIOCRUZ 13/2022 (Termo de Outorga: 23/2551-0000502-6). A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Nair e Pedro, meus pais, que foram incansáveis durante toda minha formação moral e acadêmica, que me inspiraram todos os dias a, e ao me espelhar neles pude ter força e determinação para isso. Agradeço a eles todos os momentos de conforto e compreensão, além da fé depositada em mim.

Também gostaria de agradecer ao Maurício pelo companheirismo, conforto, compreensão e apoio durante todos os anos de convívio, sempre estando ao meu lado e me incentivando para atingir todos os meus e nossos sonhos.

Ao Adilar, amizade que o doutorado me proporcionou, que esteve presente em todos os momentos do meu doutorado, em grande parte das vezes colocando os meus problemas e necessidades na frente dos seus próprios interesses, sempre me dando suporte acadêmico e emocional para superar as dificuldades. Sem sua contribuição, certamente teria sido impossível a conclusão deste doutorado.

Aos amigos do LaFis, LABC e LAPEC, que me proporcionaram muitos momentos de alegria e descontração que ajudaram a rever os problemas e encontrar soluções para as dificuldades.

À Professora Célia de Fraga Malfatti, que disponibilizou o seu laboratório para que todo esse projeto pudesse ser desenvolvido. Não bastando o apoio material, sempre ofereceu suporte intelectual além de muitos incentivos pessoais.

À minha co-orientadora, professora Simone Cristina Baggio Gnoatto que me deu suporte em todos os momentos, lutando pelo projeto e pelas parcerias, além de entender e me apoiar nas situações pessoais que ocorreram neste tempo, sempre oferecendo soluções e visões positivas que possibilitaram a fluência harmônica do projeto. Não posso esquecer a sua grande contribuição para o meu crescimento como pesquisadora, desde os tempos de mestrado. Eternamente grata por todo o apoio.

Encerro os agradecimentos deixando meu reconhecimento e gratidão por todos os conselhos, críticas, correções e sugestões dadas pelo meu orientador, professor Diogo André Pilger. Além de agradecimentos pelas contribuições técnicas, que certamente foram decisivas para a organização e fechamento desta tese, agradeço em especial a confiança depositada em mim durante todo esse período. Fico extremamente lisonjeada de poder ter finalizado esta etapa do meu desenvolvimento sob sua orientação.

RESUMO

A partir de março de 2020 a doença causada pelo vírus SARS-CoV-2 tornou-se um problema de saúde pública e, apesar dos altos índices relatados, existe uma grande subnotificação evidenciando-se a necessidade de tecnologias de diagnóstico de amplo acesso, sensíveis e de baixo custo. Esta tese objetivou a revisão da literatura na área de biossensores eletroquímicos baseados em óxidos de nióbio, além de, considerando o cenário previamente exposto, desenvolver uma plataforma a base nanofios de niobato de sódio com sondas de ácidos nucleicos imobilizadas (genosensor) que possa ser empregada para a identificação de SARS-CoV-2 e que possa ser facilmente adaptada para qualquer outro patógeno. Através do artigo de revisão da literatura, foi possível verificar o potencial de aplicação de óxidos de nióbio como biossensores eletroquímicos, além da importância da nanoestruturação destes óxidos. Para o desenvolvimento da plataforma, foi realizada a construção de 3 tipos distintos de eletrodos suportando a camada de nanofios de niobato de sódio em diferentes coletores de corrente (Nb-NW, FTO-NW e Gf-NW; camada de nanofios de niobato de sódio suportada em *bulk* de nióbio, vidro condutor e bastão de grafite, respectivamente), metodologias de funcionalização e imobilização de sondas de fitas simples de DNA foram desenvolvidas, além da realização das caracterizações físico-química, morfológica e eletroquímica do dispositivo. Visando a simplificação da construção da plataforma, inicialmente a imobilização por interação eletrostática foi testada, sendo possível a visualização da resposta eletroquímica associada a quantidade de ácido nucleico, porém, foi possível verificar a fraca estabilidade da interação da *probe* com a superfície do eletrodo. Para ampliar esta estabilidade, a metodologia de funcionalização dos eletrodos foi padronizada recobrando a superfície dos nanofios com quitosana e glutaraldeído por *dip coating*, posteriormente imobilizando de forma covalente sondas de DNA modificadas com grupamento amina. Após a confirmação da estabilidade desta imobilização, o bloqueio da superfície foi realizado com BSA (albumina de soro bovino). Todas as etapas de construção foram caracterizadas por ensaios eletroquímicos de VC (voltametria cíclica) e EIE (espectroscopia de impedância eletroquímica), demonstrando que a funcionalização da superfície com quitosana gera diminuição da resistência do sistema, enquanto que a funcionalização com glutaraldeído, a imobilização da *probe* e o bloqueio dos sítios livres de glutaraldeído geram um aumento da resistência,

sempre em comparação com a etapa anterior de construção. Por fim, ensaios de hibridização foram realizados, demonstrando que foi possível detectar o fenômeno de formação dos híbridos constatado pela aparição de nova constante de tempo e aumento dos valores de resistência total do sistema encontrados por EIE. Entretanto, se faz necessária a otimização das condições para o aumento da seletividade do método. Resultados preliminares indicam a importância do tempo de incubação e da utilização de soluções tampão de hibridização, como SSPE (solução tampão fosfato de sódio salina EDTA) e SSC (solução tampão salina sódio citrato), durante o protocolo de hibridização. Além do artigo de revisão e desenvolvimento metodológico proposto, a partir desta tese também foi possível o pedido de depósito de patente para a proteção intelectual da aplicação e metodologia desenvolvida, além da elaboração de trabalhos complementares abordando a metodologia de retirada da camada de nanofios do *bulk* para a construção de diferentes configurações de eletrodos e a influência dos componentes do eletrólito na resposta eletroquímica de biossensores.

Palavras-chave: Biossensor; Genosensor; Óxido de nióbio; SARS-CoV-2; Diagnóstico.

ABSTRACT

As of March 2020, the disease caused by SARS-CoV-2 virus has become a public health problem and, despite the high rates reported, there is great underreporting, highlighting the need for widely accessible, sensitive, and low-cost diagnosis technologies. This thesis aimed to review the literature in the area of electrochemical biosensors based on niobium oxides, in addition to, considering the previously exposed scenario, developing a platform based on sodium niobate nanowires with immobilized nucleic acid probes (genosensor) that can be used to the identification of SARS-CoV-2 and that can be easily adapted to any other pathogen. Through the literature review article, it was possible to verify that the application of niobium oxides as electrochemical biosensors is promising, in addition to the importance of the nanostructuring of these oxides in biosensor construction. For the development of the platform, 3 different types of electrodes were fabricated supporting the layer of sodium niobate nanowires in different current collectors (Nb-NW, FTO-NW, and Gf-NW, sodium niobate layer supported on niobium bulk, conductive glass and graphite, respectively), functionalization and immobilization methodologies of single-stranded DNA probes were developed, in addition to physical-chemical, morphological and electrochemical characterizations of the device. Aiming to simplify the construction of the platform, immobilization by electrostatic interaction was initially tested, making it possible to visualize the electrochemical response associated with the amount of nucleic acid, however, it was possible to verify the poor stability of the interaction of the probe with the electrode surface. To increase this stability, the electrode functionalization methodology was standardized by covering the surface of the nanowires with chitosan and glutaraldehyde by dip coating, subsequently covalently immobilizing DNA probes modified with an amine group. After confirming the stability of this immobilization, the surface was blocked with BSA (bovine serum albumin). All construction stages were characterized by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy, demonstrating that surface functionalization with chitosan generates a decrease in system resistance, while functionalization with glutaraldehyde, immobilization of the probe, and glutaraldehyde free-site blocking generate an increase in resistance, always compared to the previous stage of construction. Finally, hybridization tests were carried out, demonstrating that it was possible to detect the phenomenon of hybrid formation as verified by the appearance

of a new time constant and an increase in the system's total resistance values found by electrochemical impedance spectroscopy. However, it is necessary to optimize the conditions to increase the selectivity of the method. Preliminary results indicate the importance of incubation time and the use of hybridization buffer solutions, such as SSPE (saline sodium phosphate EDTA buffer) and SSC (saline sodium citrate buffer), during the hybridization protocol. In addition to the review article and proposed methodological development, from this thesis it was also possible to request a patent deposit for the intellectual protection of the application and methodology developed, in addition to the elaboration of complementary works addressing the methodology for removing the nanowire layer from the bulk for the construction of different electrode configurations and the influence of electrolyte components on the electrochemical response of biosensors.

Keywords: Biosensor; Genosensor; Niobium Oxide; SARS-CoV-2; Diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Esquema organizacional do desenvolvimento do estudo apresentado nessa tese, o qual foi dividido em dois capítulos. 32
- Figura 2** Esquema ilustrativo da construção de um biossensor. Imagem elaborada pela autora utilizando a plataforma BioRender.com. 41
- Figura 3** Gráfico da aplicação de potencial em função do tempo **(A)**, voltamograma resultante de uma VC **(B)**. Imagem adaptada de Malhotra et al. [54]. 51
- Figura 4** Representação de Diagrama de Nyquist com seu circuito equivalente e propriedades do sistema. Imagem produzida pela autora. 53
- Figura 5** Imagem de amostra de placa de nióbio metálico recoberto por nanofios de niobato de sódio (a), eletrodo confeccionado com área geométrica delimitada por fita para galvanoplastia no sistema Nb-NW (b), FTO-NW (c), bastões de grafite sem nanofios à esquerda e com nanofios à direita (Gf e Gf-NW, respectivamente) (d). Imagens obtidas pela própria autora. 96
- Figura 6** Esquema do procedimento de imobilização por adsorção eletrostática. 98
- Figura 7** Representação dos protocolos realizados nas amostras confeccionadas para estudo da imobilização. 99
- Figura 8** Representação do protocolo de funcionalização com glutaraldeído. 101
- Figura 9** Representação da formação de ligação covalente entre o NH₂-ssDNA-probe com a superfície funcionalizada. 102
- Figura 10** Representação do protocolo de bloqueio com BSA dos grupamentos reativos livres. 103
- Figura 11** Resultado de voltametrias cíclicas em solução aquosa de Na₂SO₄ 1 M (pH ~5,7) de amostra de nanofios de niobato de sódio em bulk de nióbio metálico (Nb-NW) na faixa de potencial de OCP a -1.5 V versus Ag/AgCl (a) e na faixa de potencial entre os potenciais de evolução de hidrogênio e oxigênio (de -0,550 V até 0,7 V versus Ag/AgCl) (b). 109
- Figura 12** Resultado de voltametrias cíclicas obtidas em solução aquosa de Na₂SO₄ 1 M (pH 5,7) das amostras T0 (branco), T3 (com protocolo completo de imobilização e com 20 µL de solução mãe de ssDNA-probe), T4 (com protocolo parcial de imobilização sem solução tampão e com 20µL de solução mãe de ssDNA-probe), T5 (com protocolo parcial de imobilização somente com solução tampão) e T6 (com protocolo completo de imobilização e com 5µL de solução mãe de ssDNA-probe). 110
- Figura 13** Resultado de voltametrias cíclicas obtidas em solução aquosa de Na₂SO₄ 1 M (pH ~5,7) das amostras T0 (branco), T5 (protocolo de imobilização parcial apenas com tampão TE), T6 (com protocolo completo de imobilização e com 5µL de ssDNA-probe a 100 µM), T13 (com protocolo completo de imobilização e com 5µL de ssDNA-probe a 10 µM), T14 (com protocolo completo de imobilização e com 5µL de ssDNA-probe a 1 µM) e T15 (com protocolo completo de imobilização e com 5µL de ssDNA-probe a 100 nM). 111
- Figura 14** Resultados de microscopia ótica de amostra sem tratamento em aumento de 200x (a), aumento de 1000x e foco nas cordas micrométricas (b) e aumento de 1000x com foco nos nanofios (c). 112

Figura 15 Resultados de microscopia eletrônica de varredura de amostra de nanofios de niobato de sódio sem nenhum tratamento. Em destaque os nanofios (1) e as cordas micrométricas (2). A barra de escala representa 20 μm	113
Figura 16 Resultados de microscopias eletrônicas de varredura das amostras: T0 (a) e T6 (b). Em ambas as imagens a barra de escala representa 2 μm	113
Figura 17 Resultados de microscopias óticas de fluorescência da amostra imobilizada por interação eletrostática sem lavagem (a), após uma lavagem com água (b) e após duas lavagens com água (c) em aumento de 100x.	114
Figura 18 Resultado de microscopias óticas de fluorescência da amostra imobilizada por ligação covalente após uma lavagem (a), após duas lavagens (b), após três lavagens (c) e após mergulho em água por 30 minutos (d) em aumento de 100x..	116
Figura 19 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagramas de Nyquist (a) e diagrama de Bode-fase (b) em diferentes eletrólitos para amostras Nb-NW.	118
Figura 20 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica em solução de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 10 mM (1:1) em PBS das amostras de nióbio metálico (Nb) e de nanofios de niobato de sódio (Nb-NW): diagrama de Nyquist (a) e diagrama de Bode-fase (b).	119
Figura 21 Resultado de voltametria cíclica em $50\text{m V}\cdot\text{s}^{-1}$ em solução de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 10 mM (1:1) em PBS das amostras de nióbio metálico (Nb) e de nanofios de niobato de sódio (Nb-NW).	120
Figura 22 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagrama de Nyquist (a) e diagrama de Bode - fase (b) em solução de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 10 mM (1:1) em PBS das amostras Nb-NW e Nb-NW-Q-G.	121
Figura 23 Resultado de voltametria cíclica em $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ em solução de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 10 mM (1:1) em PBS das amostras: Nb-NW e Nb-NW-Q-G.	121
Figura 24 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, Diagrama de Nyquist (a), diagrama de Bode - fase (b) e diagrama de Bode - módulo (c) em solução de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 10 mM (1:1) em PBS das amostras Nb-NW-Q-G e Nb-NW-Q-G-IM.	123
Figura 25 Resultados de voltametria cíclica em $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ em solução de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 10mM (1:1) em PBS das amostras: Nb-NW-Q-G e Nb-NW-Q-G-IM.	124
Figura 26 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, Diagrama de Nyquist em solução de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 10 mM (1:1) em PBS de amostras Nb-NW-Q-G e Nb-NW-Q-G-IM com diferentes concentrações de NH_2 -ssDNA-probe imobilizada: 100 μM (a), 50 μM (b) e 10 μM (c).	125
Figura 27 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, Diagrama de Bode-fase em solução de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 10 mM (1:1) em PBS de amostras Nb-NW-Q-G e Nb-NW-Q-G-IM com diferentes concentrações de NH_2 -ssDNA-probe imobilizada: 100 μM (a), 50 μM (b) e 10 μM (c).	126

Figura 28 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, Diagrama de Nyquist em solução PBS de amostras Nb-NW-Q-G e Nb-NW-Q-G-IM (solução mãe de NH ₂ -ssDNA-probe a 100 μM).....	126
Figura 29 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica em PBS, diagrama de Nyquist de amostra Nb-NW-Q-G, Nb-NW-Q-G-IM e Nb-NW-Q-G-IM acondicionada seca em congelador (overnight).....	128
Figura 30 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica em PBS, diagrama de Nyquist das amostras Nb-NW-Q-G e Nb-NW-Q-G-IM acondicionada em solução PBS por overnight, por 80 horas e por 120 horas.....	128
Figura 31 Resultados de voltametria cíclica em 50 mV.s ⁻¹ da película de nanofios suportada em FTO (a) e Gf (b) em solução de K ₄ [Fe(CN) ₆]/K ₃ [Fe(CN) ₆] 10 mM (1:1) em PBS.....	129
Figura 32 Resultados de EIE do sistema FTO e FTO-NW em solução de K ₄ [Fe(CN) ₆]/K ₃ [Fe(CN) ₆] 10 mM (1:1) em PBS. Diagrama de Nyquist (a), diagrama de Bode - fase (b) e diagrama de Bode - módulo (c).....	130
Figura 33 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica do sistema Gf e Gf-NW em solução de K ₄ [Fe(CN) ₆]/K ₃ [Fe(CN) ₆] 10 mM (1:1) em PBS. Diagrama de Nyquist (a), diagrama de Bode - fase (b) e diagrama de Bode - módulo (c).....	131
Figura 34 Resultado de voltametria cíclica em 50mVs ⁻¹ (a) e resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagrama de Nyquist (b) das amostras FTO-NW, FTO-NW-Q e FTO-NW-Q-G em solução de K ₄ [Fe(CN) ₆]/K ₃ [Fe(CN) ₆] 10 mM (1:1) em PBS.	132
Figura 35 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagrama de Bode - fase (a) e diagrama de Bode - módulo (b) das amostras FTO-NW, FTO-NW-Q e FTO-NW-Q-G em solução de K ₄ [Fe(CN) ₆]/K ₃ [Fe(CN) ₆] 10 mM (1:1) em PBS.	132
Figura 36 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagrama de Nyquist completo(a) e aproximação da região de altas frequências do diagrama de Nyquist (b) das amostras Gf-NW, Gf-NW-Q e Gf-NW-Q-G em solução de K ₄ [Fe(CN) ₆]/K ₃ [Fe(CN) ₆] 10 mM (1:1) em PBS.	133
Figura 37 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagrama de Bode - fase (a) e diagrama de Bode - módulo (b) das amostras Gf-NW, Gf-NW-Q e Gf-NW-Q-G em solução de K ₄ [Fe(CN) ₆]/K ₃ [Fe(CN) ₆] 10 mM (1:1) em PBS.....	134
Figura 38 Resultados de voltametria cíclica em 50mVs ⁻¹ das amostras Gf-NW, Gf-NW-Q e Gf-NW-Q-G em solução de K ₄ [Fe(CN) ₆]/K ₃ [Fe(CN) ₆] 10 mM (1:1) em PBS.	134
Figura 39 Resultados de voltametria cíclica em 50 mV.s ⁻¹ (a), resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagrama de Nyquist diagrama de Nyquist (b), diagrama de Bode - fase (c) e diagrama de Bode - módulo (d) das amostras FTO-NW-Q-G e FTO-NW-Q-G-IM em solução de K ₄ [Fe(CN) ₆]/K ₃ [Fe(CN) ₆] 10 mM (1:1) em PBS.....	136
Figura 40 Resultados de voltametria cíclica em 50 mV.s ⁻¹ (a), resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagrama de Nyquist diagrama de Nyquist (b), diagrama de Bode - fase (c) e diagrama de Bode - módulo (d) do sistema Gf-NW-Q-G e Gf-NW-Q-G-IM em solução de K ₄ [Fe(CN) ₆]/K ₃ [Fe(CN) ₆] 10 mM (1:1) em PBS.....	137

Figura 41 Resultado de microscopias óticas de fluorescência da amostra com protocolo de hibridização utilizando DNA marcado com fluorescência, mas sem imobilização após uma lavagem (a), após duas lavagens (b), após três lavagens (c) e após mergulho em água por 30 minutos (d), em aumento de 100x.....	139
Figura 42 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagrama de Nyquist (a) e diagrama de Bode – fase (b) em solução de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM (1:1) em PBS das amostras Nb-NW-Q-G; Nb-NW-Q-G-BL e Nb-NW-Q-G-BL-IM.	140
Figura 43 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagrama de Nyquist (a) e diagrama de Bode – fase (b) em solução de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM (1:1) em PBS das amostras Nb-NW-Q-G; Nb-NW-Q-G-BL e Nb-NW-Q-G-BL-H.	141
Figura 44 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagrama de Nyquist (a) e diagrama de Bode – fase (b) em solução de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 1 mM (1:1) em PBS das amostras Nb-NW-Q-G; Nb-NW-Q-G-BL-H e Nb-NW-Q-G-BL-H (30°C).....	143
Figura 45 Resultados de voltametria cíclica em $50\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (a) resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagrama de Nyquist (b), diagrama de Bode – fase (c) e diagrama de Bode – módulo (d) em solução $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM (1:1) em PBS das amostras das amostras: FTO-NW-Q-G-IM e FTO-NW-Q-G-IM-BL.....	144
Figura 46 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagrama de Nyquist (a), diagrama de Bode - fase (b) e diagrama de Bode - módulo (c) em solução de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1:1) em PBS das amostras FTO-NW-Q-G-IM-BL e FTO-NW-Q-G-IM-BL-Hcomp.	146
Figura 47 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagrama de Nyquist (a), diagrama de Bode - fase (b) e diagrama de Bode - módulo (c) em solução de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1:1) em PBS das amostras FTO-NW-Q-G-IM-BL e FTO-NW-Q-G-IM-BL-Hncomp.	147
Figura 48 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagrama de Nyquist (a), diagrama de Bode – Fase (b) e diagrama de Bode – módulo (b) em solução de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1:1) em PBS das amostras FTO-NW-Q-G-IM-BL e FTO-NW-Q-G-IM-BL-Hcomp com incubação da hibridização por 30 minutos.	148
Figura 49 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagrama de Nyquist (a) e diagrama de Bode – módulo (b) das amostras FTO-NW-Q-G-IM-BL e FTO-NW-Q-G-IM-BL-Hcomp e diagrama de Nyquist (c) e diagrama de Bode – módulo (d) das amostras FTO-NW-Q-G-IM-BL e FTO-NW-Q-G-IM-BL-Hncomp em solução de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1:1) em PBS com incubação da hibridização por 60 minutos.	149
Figura 50 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagrama de Nyquist (a) e diagrama de Bode – módulo (b) da amostra FTO-NW-Q-G-IM-BL e FTO-NW-Q-G-IM-BL-Hcomp e diagrama de Nyquist (c) e diagrama de Bode – módulo (d) da amostra FTO-NW-Q-G-IM-BL e FTO-NW-Q-G-IM-BL-Hncomp em solução de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1:1) em PBS com imobilização de 100 nM de ssDNA-probe.....	151

Figura 51 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagrama de Nyquist em solução de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1:1) em PBS das amostras imobilizadas com ssDNA-probe 10 nM FTO-NW-Q-G-IM-BL e FTO-NW-Q-G-IM-BL-Hcomp (a), FTO-NW-Q-G-IM-BL e FTO-NW-Q-G-IM-BL-Hncomp (b) com ssDNA-probe 1 nM FTO-NW-Q-G-IM-BL e FTO-NW-Q-G-IM-BL-Hcomp (c), FTO-NW-Q-G-IM-BL e FTO-NW-Q-G-IM-BL-Hncomp (d) e com ssDNA-probe 100 pM FTO-NW-Q-G-IM-BL e FTO-NW-Q-G-IM-BL-Hcomp (e), FTO-NW-Q-G-IM-BL e FTO-NW-Q-G-IM-BL-Hncomp (f). 152

Figura 52 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagrama de Nyquist (a) e diagrama de Bode – módulo (b) da amostra FTO-NW-Q-G-IM-BL e FTO-NW-Q-G-IM-BL-Hcomp e diagrama de Nyquist (c) e diagrama de Bode – módulo (d) da amostra FTO-NW-Q-G-IM-BL e FTO-NW-Q-G-IM-BL-Hncomp em solução de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1:1) em PBS com incubação utilizando 20x SSPE e 10% SDS. 154

Figura 53 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, , diagrama de Nyquist (a) e diagrama de Bode – módulo (b) da amostra FTO-NW-Q-G-IM-BL e FTO-NW-Q-G-IM-BL-Hcomp e diagrama de Nyquist (c) e diagrama de Bode – módulo (d) da amostra FTO-NW-Q-G-IM-BL e FTO-NW-Q-G-IM-BL-Hncomp em solução de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1:1) em PBS com incubação utilizando 20x SSC. 155

Figura 54 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagrama de Nyquist (a) e diagrama de Bode – módulo (b) da amostra FTO-NW-Q-G-IM-BL e FTO-NW-Q-G-IM-BL-Hcomp e diagrama de Nyquist (a) e diagrama de Bode – módulo (b) da amostra FTO-NW-Q-G-IM-BL e FTO-NW-Q-G-IM-BL-Hncomp em solução de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1:1) em PBS com incubação utilizando 1x SSC. ... 156

Figura 55 Resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica, diagrama de Nyquist (a), diagrama de Bode – Fase (b) e diagrama de Bode – módulo (c) em solução de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mM (1:1) em PBS de amostra FTO-NW-Q-G-IM-BL e FTO-NW-Q-G-IM-BL-DNAcomp (hibridizada com DNA extraído de sangue humano)..... 157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Comparação das características entre principais metodologias empregadas no diagnóstico de COVID-19.	39
Tabela 2 Relação de parâmetros de hibridização utilizados por outros trabalhos. ...	49
Tabela 3 Lista das sequências de nucleotídeos indicadas pelo CDC e utilizadas para a confecção do biossensor.	97
Tabela 4 Nomenclatura e tratamento realizado nas amostras.....	100
Tabela 5 Parâmetros utilizados no processo de <i>dip coating</i> realizados no eletrodo bulk de nióbio e nas configurações de película suportada em FTO ou grafite.	101
Tabela 6 Valores de potencial de circuito aberto (OCP) da amostra Nb-NW encontrados para diferentes eletrólitos.....	117
Tabela 7 Potencial de circuito aberto em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 10 mM (1:1) em PBS das amostras Nb-NW e Nb-NW-Q-G.	120
Tabela 8 Potencial de circuito aberto em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 10 mM (1:1) em PBS das amostras: Nb-NW-Q-G e Nb-NW-Q-G-IM.....	122
Tabela 9 Resultados de $\Delta Z $ encontrados para as amostras com diferentes concentrações de DNA-probe imobilizadas (100 nM, 10 nM, 1 nM e 100 pM) comparando a amostra pós-hibridização com a amostra bloqueada.....	153

LISTA DE ABREVIATURAS

Z	Módulo da impedância
A	Nucleotídeo adenosina
AM	Azul de metileno
BSA	Albumina de soro bovino
C	Nucleotídeo citosina
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças
C_{dl}	Capacitância
cDNA	DNA complementar
CLIA	Imunoensaio de quimioluminescencia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECA2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
ECS	Eletrodo de referência de calomelano saturado
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
ELFA	Ensaio imunológico com revelação fluorescente
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimático
FAM	Fluoresceína
FEG	Canhão de emissão em campo
FTO	Vidro recoberto com óxido de estanho dopado com flúor
FTO-NW	Camada de nanofios de niobato de sódio suportada em FTO
G	Nucleotídeo guanina
Gf-NW	Camada de nanofios de niobato de sódio suportada em bastão de grafite
HCV	Vírus da hepatite C
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
i_{pa}	Corrente anódica
i_{pc}	Corrente catódica
ITO	Óxido de estanho dopado com índio
LAPEC	Laboratório de Pesquisa em Corrosão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Nb-NW	Camada de nanofios de niobato de sódio suportada no <i>bulk</i> de nióbio metálico

NH ₂	Grupamento amina
nsp	Proteínas não estruturais
OCP	Potencial de circuito aberto
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Fase de leitura aberta
PBS	Solução tampão-salina
pH	Potencial hidrogeniônico
PTH	Hormônio da paratireoide
PVM	Poli(éter metilo vinílico/Copolímero de ácido maleico)
R_{ct}	Resistência de transferência de carga
RNA	Ácido ribonucleico
R_s	Resistência associada ao sistema
RT-LAMP	Amplificação Isotermal Mediada por Loop com Transcrição Reversa
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição reversa
SARS-CoV-2	Síndrome respiratória aguda causada por coronavírus-2
SH	Grupamento tiol
SSC	Solução tampão salina sódio citrato
ssDNA	Fita simples de DNA
SSPE	Solução tampão fosfato de sódio salina EDTA
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Nucleotídeo timina
T_a	Temperatura de anelamento
TE	Tampão tris-EDTA
T_m	Temperatura de fusão
U	Nucleotídeo uracila
VC	Voltametria cíclica
Z_w	Impedância

Sumário

1. INTRODUÇÃO	25
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivos específicos	29
3. ORGANIZAÇÃO DA TESE	31
4. REVISÃO DA LITERATURA	33
4.1. COVID-19	33
4.2. O VÍRUS SARS-CoV-2	34
4.3. FERRAMENTAS DE DIAGNÓSTICO	34
4.3.1. Testes Rápidos	35
4.3.2. Testes Enzimáticos	36
4.3.3. Testes moleculares	37
4.3.4. Outros testes	39
4.4. BIOSSENSORES	41
4.4.1. Bioreceptores	42
4.4.1.1. Imobilização eletrostática do bioreceptor	42
4.4.1.2. Imobilização covalente do bioreceptor	44
4.4.1.2.1. Funcionalização de superfícies e ligações cruzadas	44
4.4.1.2.2. Necessidade de bloqueio da superfície	45
4.4.2. Genossensores	46
4.4.2.1. Utilização da hibridização em biossensores	48
4.4.3. Transdutores	49
4.5. DETECÇÃO ELETROQUÍMICA	50
4.5.1. Voltametria Cíclica	51
4.5.2. Espectroscopia de impedância eletroquímica	52
4.6. BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS NO DIAGNÓSTICO DE COVID-19	54
4.7. MATERIAIS UTILIZADOS NO BIOSSENSORIAMENTO E NIÓBIO	54
4.7.1. Óxidos de nióbio aplicados ao biossensoriamento eletroquímico	55
I. CAPÍTULO 1	57
1. Introduction	60
2. Electrodes biofunctionalization	62
3. Main electrochemical detection techniques in biosensors	64
4. Niobium-based oxides	66
4.1. Niobium Binary Oxides	66
4.2. Niobates	67
4.3. Other niobium-containing oxides	67
4.4. Main methods for obtaining nanostructured niobium oxides	67
5. The role of Niobium-containing oxides in electrochemical biosensors	69
5.1. Niobium-containing oxides in enzymatic biosensors	70

5.2. Niobium-containing oxides in immunosensors.....	74
5.3. Niobium-containing oxides in genosensors.....	77
5.4. Other niobium-containing oxides sensors.....	78
6. Conclusions and Outlook.....	79
7. REFERENCES.....	84
II. CAPÍTULO 2.....	95
II.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	97
II.1.1. Materiais.....	97
II.1.2. Montagem dos eletrodos de trabalho.....	97
II.1.3. Bioreceptores para identificação de SARS-CoV-2.....	99
II.1.4. Imobilização eletrostática do bioreceptor.....	99
II.1.5. Imobilização covalente do bioreceptor.....	102
II.1.5.1. Funcionalização com quitosana.....	102
II.1.5.2. Funcionalização com glutaraldeído.....	103
II.1.5.3. Imobilização covalente de ssDNA-probe.....	103
II.1.6. Bloqueio da superfície.....	104
II.1.7. Protocolos de hibridização.....	105
II.1.7.1. Hibridização com alteração de temperatura.....	105
II.1.7.2. Hibridização simplificada.....	106
II.1.7.3. Tempo de incubação.....	106
II.1.7.4. Concentração de NH ₂ -ssDNA-probe.....	106
II.1.7.5. Tampões de hibridização.....	106
II.1.8. Ensaio com DNA extraído de amostra de sangue.....	107
II.1.9. Caracterização morfológica e eletroquímica.....	107
II.1.10. Caracterização por microscopia de fluorescência.....	108
II.1.11. Avaliação do acondicionamento do eletrodo.....	109
II.1.12. Organização da seção experimental.....	109
II.2. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	111
II.2.1. Imobilização eletrostática.....	111
II.2.1.1. Caracterização eletroquímica.....	111
II.2.1.2. Caracterização morfológica.....	114
II.2.1.3. Avaliação da imobilização eletrostática por microscopia ótica de fluorescência.....	116
II.2.2. Imobilização covalente.....	117
II.2.2.1. Avaliação da imobilização por microscopia ótica de fluorescência.....	117
II.2.2.2. Caracterização Eletroquímica.....	118
II.2.2.2.1. Sistema Nb-NW.....	118
II.2.2.2.1.1. Efeito do eletrólito na resposta eletroquímica do sistema.....	118
II.2.2.2.1.2. Efeito da superfície nanoestruturada no comportamento eletroquímico do eletrodo	120
II.2.2.2.1.3. Efeito do procedimento de funcionalização no comportamento eletroquímico do	122
eletrodo	

II.2.2.2.1.4.	<i>Efeito do procedimento de imobilização no comportamento eletroquímico do eletrodo</i>	124
II.2.2.2.1.5.	<i>Avaliação do efeito de diferentes concentrações de NH₂-ssDNA-probe imobilizado</i>	126
II.2.2.2.1.6.	<i>Avaliação do acondicionamento de amostra imobilizada</i>	129
II.2.2.2.2.	<i>Sistemas FTO-NW e Gf-NW</i>	130
II.2.2.2.2.1.	<i>Efeito da superfície nanoestruturada no comportamento eletroquímico do eletrodo</i>	130
II.2.2.2.2.2.	<i>Efeito do procedimento de funcionalização no comportamento eletroquímico do eletrodo</i>	133
II.2.2.2.2.3.	<i>Efeito do procedimento de imobilização no comportamento eletroquímico do eletrodo</i>	137
II.2.3.	Bloqueio da superfície	140
II.2.3.1.	Caracterização eletroquímica	141
II.2.3.1.1.	<i>Sistema Nb-NW</i>	141
II.2.3.1.2.	<i>Sistema FTO-NW</i>	145
II.2.4.	Detecção do sinal de reconhecimento do ácido nucleico	147
II.2.4.1.	<i>Alteração do tempo de incubação do protocolo de hibridização</i>	149
II.2.4.2.	<i>Imobilização de diferentes concentrações de ssDNA-probe</i>	151
II.2.4.3.	<i>Utilização de solução tampão de hibridização</i>	155
II.2.4.4.	<i>Ensaio com DNA extraído de amostra de sangue</i>	159
II.3.	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES GERAIS	161
II.4.	PERSPECTIVAS	165
REFERÊNCIAS		167
ANEXO I		183
ANEXO II		185
ANEXO III		197
ANEXO IV		215

1. INTRODUÇÃO

Em março de 2020, a população mundial deparou-se com uma realidade até então pouco conhecida, pelo menos desde o surto de gripe espanhola em 1919: uma pandemia. Uma série de casos sintomáticos semelhantes aos de pneumonia viral levaram à internação de pacientes na província de Wuhan (China) no final de 2019. Amostras clínicas coletadas de pacientes permitiram a identificação e sequenciamento do material genético do patógeno causador, um vírus da família *coronaviridae*, denominado SARS-CoV-2 (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2*) [1]. A partir deste momento, a doença que já havia se espalhado pelo mundo, foi classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma pandemia, chamada COVID-19 [2].

A pandemia de coronavírus deixou clara a falta de preparo da sociedade para se organizar em tempos de crise, o que se provou com a dificuldade de manejo dos pacientes e falhas na tentativa de parar a disseminação do vírus [3], [4]. A comprovação desta limitação expressa-se pelos números observados ao longo deste período, com cerca de 773 milhões de casos confirmados e quase 7 milhões de mortes até final de janeiro de 2024 [5].

O quadro de sintomas iniciais apresenta-se como uma síndrome gripal na maioria dos casos, porém, a manifestação clínica responsável pela grande notoriedade e caracterização da doença como uma pandemia é a síndrome respiratória aguda grave. A COVID-19 acomete, principalmente, o sistema respiratório, cardiovascular e gastrointestinal, porém sem sintomas específicos que possam assegurar um diagnóstico preliminar [6].

Devido à natureza da pandemia, na qual a contaminação ocorre principalmente entre indivíduos, a prevenção do contágio e a vacinação têm se mostrado como uma alternativa para prevenção de casos graves. Além disso, neste cenário, o diagnóstico rápido com identificação do agente etiológico é essencial para a diminuição da mortalidade associada [7].

No início da pandemia, quando a vacina ainda não havia sido desenvolvida, e apenas uma pequena parte da população havia sido infectada, um dos primeiros métodos utilizados foi a pesquisa de anticorpos específicos para o SARS-CoV-2, já que a intenção residia na tentativa de identificar indivíduos previamente expostos. Logo em seguida, os dois métodos principais mais empregados no diagnóstico direto

da infecção foram os testes imunológicos baseados em imunocromatografia de fluxo lateral (conhecido, popularmente, como teste rápido) [8] e a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real com Transcrição Reversa (RT-qPCR) [9].

Apesar de muito avanços que foram atingidos durante este período, como a melhora da qualidade dos testes rápidos e a universalização das técnicas moleculares, ainda vivemos um cenário de limitações relacionado à sensibilidade, custos e operacionalização/implantação destas metodologias. Além disso, reconhece-se que cada região possui uma realidade socioepidemiológica distinta e fatores sociais, econômicos e epidemiológicos devem ser analisados para a escolha da melhor alternativa [4]. Especificamente em relação ao Brasil, a falta de autonomia para a produção de insumos e flexibilidade para a construção de alternativas metodológicas expôs a realidade nacional relacionada à medicina diagnóstica.

Nas ciências, momentos como este geralmente proporcionam avanços tecnológicos importantes. Especialmente na área da engenharia biomédica os avanços científicos constantes instigam a criação de novos materiais, especialmente com a incorporação de nanomateriais, que estão sendo projetados e desenvolvidos visando suprir as necessidades e possibilitam ampliar as possibilidades na medicina diagnóstica [10]. No âmbito de detecção e prevenção de doenças, principalmente, técnicas de engenharia e biologia molecular são combinadas fornecendo alternativas geralmente mais acessíveis e com melhores resultados relacionados à sensibilidade, especificidade, tempo de execução, além de ampla adaptação à diferentes usos. Este é o caso dos biossensores [11].

Além das vantagens anteriormente mencionadas, os biossensores podem ser empregados laboratorialmente ou até em sistemas *point-of-care*, podendo ser empregados em larga escala, garantindo sua incorporação em sistemas complexos, como, por exemplo, o Sistema Único de Saúde (SUS), e atingindo até mesmo as populações mais desassistidas.

Tendo em vista esta necessidade de desenvolvimento de tecnologias que possam ser facilmente aplicadas até mesmo em áreas de alta vulnerabilidade, mas que possuam sensibilidade e especificidade capazes de prover um diagnóstico confiável, a proposta apresentada nessa tese busca o desenvolvimento de uma plataforma de diagnóstico baseada em biossensor eletroquímico com propriedades físico-químicas e analíticas inéditas na área de diagnóstico viral, o qual está sendo

desenvolvido a partir de óxidos nanoestruturados de nióbio obtidos pelo processo hidrotermal [12], biofuncionalizados com sequências curtas de fitas simples de DNA específicas e complementares ao ácido nucleico a ser detectado. Como modelo de aplicação, visa identificar o RNA de SARS-CoV-2, possibilitando o diagnóstico rápido da infecção pelo agente causador da pandemia de COVID-19.

De forma ampla, a intenção deste trabalho foi o desenvolvimento de um dispositivo que poderá ser utilizado a médio prazo, com custo relativamente baixo, especialmente considerando a incorporação de uma matéria-prima nacional [13] e que encontra amparo em programas de incentivo para a pesquisa e desenvolvimento de novos produtos que possam agregar valor ao material [14]. Ressalta-se, ainda, que o desenvolvimento desta plataforma de biossensor eletroquímico utilizando óxido a base de nióbio poderá contribuir fortemente para a inovação tecnológica nacional, uma vez que ainda não há relatos de biossensores com estas características. A utilização de nanofios de niobato de sódio como transdutor eletroquímico, bem como o desenvolvimento de metodologias de construção e biofuncionalização de eletrodos para aplicação posterior como biossensores eletroquímicos são fatores que evidenciam o impacto e a relevância do projeto.

Espera-se, por fim, que seja possível prospectar a ampliação da utilização desta plataforma para outros patógenos, sejam eles virais, bacterianos ou parasitários, também utilizando a detecção de material genético nas amostras clínicas, apenas alterando o elemento de reconhecimento do biossensor.

2. OBJETIVOS

Desenvolver uma plataforma para utilização como biossensor baseada em matriz de nanofios de niobato de sódio biofuncionalizada para a detecção de ácidos nucléicos visando futura aplicação para identificação de SARS CoV-2.

2.1. Objetivos específicos

- Obter eletrodos utilizando camada de nanofios de niobato de sódio;
- Avaliar diferentes coletores de corrente para suporte da camada de nanofios de niobato de sódio;
- Analisar a interferência de diferentes eletrólitos no desempenho da análise eletroquímica;
- Avaliar o efeito dos nanofios de niobato de sódio na construção do biossensor;
- Avaliar diferentes técnicas de imobilização do bioreceptor;
- Funcionalizar a superfície dos eletrodos;
- Imobilizar o bioreceptor na superfície do eletrodo;
- Caracterizar a morfologia e comportamento eletroquímico do biossensor confeccionado;
- Detectar sinal eletroquímico do reconhecimento de ácido nucleico (RNA) a partir da hibridização com o bioreceptor imobilizado.

3. ORGANIZAÇÃO DA TESE

Na parte inicial da tese é apresentada a revisão da literatura com os principais tópicos de apoio para auxiliar no entendimento do trabalho desenvolvido e que justificaram sua realização. Os resultados principais são apresentados em dois capítulos, conforme descrito na **Figura 1**. Os resultados complementares são apresentados nos anexos I, II e III.

O capítulo 1 refere-se ao manuscrito de revisão intitulado “*Electrochemical Biosensors Based on Niobium-containing Oxides: A Review*”, enquanto que no capítulo 2 são apresentados os principais resultados experimentais que foram desenvolvidos. Já, o Anexo I refere-se ao pedido de depósito de patente gerado a partir dos resultados obtidos nesta tese. Os resultados complementares estão apresentados nos anexos II e III: o Anexo II apresenta o manuscrito intitulado “*Self-supporting (free-standing) sodium niobate nanowires film*” e que aborda a metodologia desenvolvida para a retirada da camada de nanofios de niobato de sódio do substrato de nióbio metálico e sua caracterização. Por fim, o Anexo III apresenta o manuscrito intitulado “Efeito do eletrólito na detecção de ssDNA imobilizado em eletrodo funcionalizado de FTO para aplicação com biossensor eletroquímico” e que aborda o estudo da utilização de diferentes eletrólitos na construção do biossensor eletroquímico proposto.

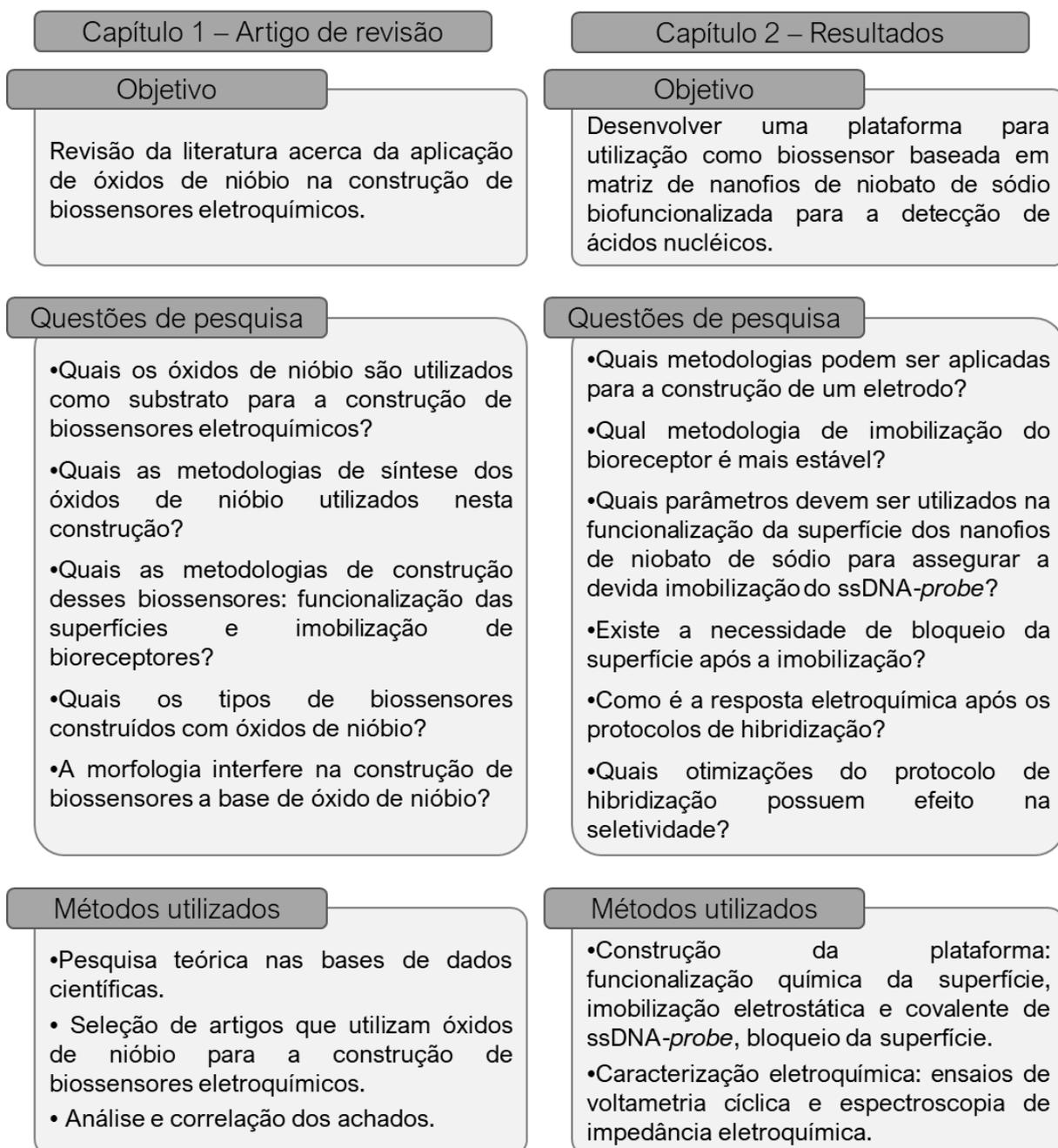


Figura 1 Esquema organizacional do desenvolvimento do estudo apresentado nessa tese, o qual foi dividido em dois capítulos.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. COVID-19

No dia 11 de março de 2020, a OMS declarou o surto da doença pelo vírus SARS-CoV-2, denominada COVID-19, como pandemia ao atingir mais de 100 países [2]. O surto teve origem na província de Wuhan na China no final do ano de 2019 [15] com o aparecimento de diversos casos com características de pneumonia viral. Em janeiro de 2020, o vírus foi isolado a partir de amostras de pacientes sintomáticos, o que contribuiu para sua caracterização genômica e sua identificação [1], possibilitando pesquisas mais aprofundadas sobre a infecção.

Desde o primeiro caso, no final de 2019 até janeiro de 2024, mais de 770 milhões de casos foram reportados com 7 milhões de mortes ocasionadas pela COVID-19 no mundo, distribuídas por todos os continentes. A Europa é o continente com maior prevalência, tendo 278 milhões de casos confirmados e 2,2 milhões de mortes; em segundo lugar está o oeste do pacífico (que inclui a China), com aproximadamente 208 milhões de casos e 419 mil mortes. As Américas ficam em terceiro lugar com 193 milhões de casos, porém, ficando em primeiro lugar considerando o número de vítimas fatais, com 2,99 milhões de mortes. O Brasil é o 6º país com maior número de casos confirmados no mundo, em torno de 37 milhões, porém, é o segundo em número de mortes, com mais de 700mil óbitos até o final de janeiro 2024 [5].

A COVID-19 é uma infecção viral que ocorre principalmente pela internalização do vírus mediada pelos receptores da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2) presentes em diversos tecidos de mamíferos, como pulmões, rins, coração, trato gastrointestinal e vasos sanguíneos [6]. Do ponto de vista clínico, acomete principalmente o trato respiratório com uma gama de manifestações que vão desde casos assintomáticos até fatais [16]. Os sinais e sintomas mais comuns da doença não são específicos e se apresentam, na sua maioria, como quadros gripais, incluindo febre, dor de cabeça, tosse, falta de ar e dor de garganta podendo evoluir para quadros de pneumonia viral inflamatória. Entretanto, alguns sintomas que chamaram a atenção e passaram a ser parte do diagnóstico clínico incluem, a perda de olfato e paladar, além de distúrbios gastrointestinais [7], [16].

4.2. O VÍRUS SARS-CoV-2

Taxonomicamente, o SARS-CoV-2 é um vírus pertencente à ordem Nidovirales, à família *Coronaviridae* e à subfamília *Coronavirinae*, mais proximamente relacionado aos beta-coronavírus. Possui genoma organizado em uma única fita positiva de RNA com menos de 30kb [6], capaz de codificar aproximadamente 50 proteínas com diferentes funções [17], sendo 16 proteínas não estruturais (do inglês, *non-structural protein*; nsp1 até nsp16), codificadas pela fase de leitura aberta (do inglês, *Open Reading Frame*; ORF) 1a/b na extremidade 5', gerando poliproteínas, proteínas acessórias e proteínas essenciais no processo de replicação viral. Além disso, existem proteínas estruturais codificadas por outras ORF's da extremidade 3': do envelope "E"; de membrana "M"; do nucleocapsídeo "N"; e a proteína *spike* "S", esta última de maior interesse para o entendimento da fisiopatologia da doença, pois é uma proteína transmembrana que facilita a ligação entre o envelope viral e o receptor da ECA2, processo que permite a fusão da membrana do vírus às células do hospedeiro, ocasionando sua internalização [6], [18]. Além disso, a região codificadora da proteína *spike* é a região do genoma em que ocorreram as principais mutações responsáveis pela passagem interespecies do vírus e dos diferentes genótipos já identificados nas infecções em humanos [6].

Porém, diferentemente do que ocorre para os outros coronavírus, nos quais há baixa capacidade de transmissão do vírus na fase de aparecimento dos primeiros sintomas nos indivíduos, o surto por SARS-CoV-2 demonstrou a capacidade de transmissão mesmo em estágio iniciais do desenvolvimento da doença [4].

4.3. FERRAMENTAS DE DIAGNÓSTICO

Por não possuir especificidade de sinais e sintomas, a COVID-19 pode ser facilmente confundida clinicamente com doenças causadas por outros vírus respiratórios de comum circulação, como influenza, parainfluenza, rinovírus, adenovírus, outros coronavírus, entre outros. Por este motivo, o quadro clínico deve ser associado a testes laboratoriais para o diagnóstico da doença e seu adequado manejo [19].

O diagnóstico de COVID-19 é realizado majoritariamente a partir do aparecimento do quadro clínico do paciente, caracterizado como Síndrome Gripal. Diretrizes do Ministério da Saúde do Brasil indicam a investigação clínico-

epidemiológica com anamnese e exame físico do paciente, considerando o histórico de contato com casos confirmados para COVID-19. Com essas informações registradas em prontuário, exames complementares devem ser indicados para a confirmação da infecção por SARS-CoV-2, podendo ser realizados por métodos de imageamento e testes laboratoriais. Estes últimos podem ser baseados em testes sorológicos, testes de antígeno, com uso de ferramentas de biologia molecular, ou mesmo a associação entre as técnicas[19].

A metodologia de imageamento indicada pelo Ministério da Saúde do Brasil é a tomografia computadorizada, na qual a observação da presença de opacidades em vidro fosco, sinal de halo reverso e outros achados de pneumonia são sugestivos de infecção por SARS-CoV-2 [19]. Apesar de estudos analisarem sua sensibilidade na detecção de COVID-19 [20] e na sua capacidade de diferenciação entre COVID-19 e outras doenças respiratórias [21], em função de seu custo, dificuldade de análise dos resultados e exposição do paciente à irradiação ionizante [22], ainda não há consenso na sua recomendação e no seu uso para diagnóstico da doença, sendo utilizada como complemento diagnóstico ou no acompanhamento de casos mais graves de acometimento pulmonar [23].

Os testes laboratoriais mais empregados para a identificação do vírus são aqueles que fazem a pesquisa direta de proteínas do vírus (antígeno) ou do seu ácido nucleico (biologia molecular). A pesquisa do antígeno pode ser realizada por testes rápidos ou enzimáticos, como serão abordados a seguir.

4.3.1. Testes Rápidos

Os testes baseados no princípio de imunocromatografia para detecção de antígenos, chamados de testes rápidos, além de portáteis, rápidos e de baixo custo, podem ser utilizados no diagnóstico *point-of-care* ou beira do leito em estágios iniciais da infecção [24]. Isto ocorre pois se baseiam na detecção de proteínas estruturais do SARS-CoV-2, como a proteína do nucleocapsídeo ou a proteína *spike*. Os testes mais amplamente aplicados no diagnóstico são os de fluxo lateral, tendo uma matriz polimérica construída em blocos, que induz a corrida da amostra biológica por capilaridade. O primeiro bloco é destinado para a inserção da amostra, que se encaminha para o bloco de conjugação, onde estão presentes anticorpos marcados, que reconhecem quando o antígeno está presente na amostra e se ligam a ele; a partir

daí continuam o fluxo até a região na qual, caso a amostra contenha o antígeno alvo, anticorpos de captura imobilizados, ligam-se gerando um complexo *anticorpo marcado-antígeno-anticorpo de captura*, gerando um produto de cor que pode ser visualizada sem auxílio de equipamentos [25].

Embora possuam características desejáveis para a aplicação de testes em massa, os testes rápidos de antígeno são mais recomendados em casos de triagem, visto que sua sensibilidade é bastante variável, podendo ir de 60% [26], [27], [28] a 98,1% [29], [30] (casos em que o paciente apresentava os sintomas há pelo menos 7 dias), dependendo do fornecedor e qualidade do teste. Por este motivo, resultados negativos em testes rápidos de detecção de antígeno de pacientes sintomáticos, devem ser confirmados por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos [27].

4.3.2. Testes Enzimáticos

Os testes enzimáticos funcionam baseados na detecção de antígenos presentes em uma amostra clínica por detecção indireta a partir de formação de cor ou fluorescência. Estes antígenos detectáveis são proteínas específicas expressas no vírus, como proteínas do nucleocapsídeo e a proteína *spike* [22]. Os testes enzimáticos possuem sensibilidade entre 50 e 100%, com especificidade de 95 a 100%; estes valores podem variar conforme condições de acondicionamento das amostras e o tempo decorrido entre a contaminação do paciente e a coleta da amostra, sendo recomendado de 6 a 14 dias após a aparição dos sintomas [31], [32], [33].

A principal metodologia empregada são os ensaios de imunoabsorção enzimático (do inglês, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA) e são realizados em placas com anticorpos imobilizados em sua superfície. Caso a amostra possua os antígenos alvo, eles se ligarão aos anticorpos e ficarão fixados; após a lavagem para a retirada de material não fixado, adiciona-se outro anticorpo normalmente marcado com uma enzima, adicionado seu substrato e convertido a uma substância colorida, que pode ser medida instrumentalmente, ampliando consideravelmente a sensibilidade do teste [34]. Este tipo de ensaio é considerado de rápida execução, levando em média de 35 a 60 minutos para obtenção de resultados, com bons resultados mesmo em amostras sem pré-tratamento [35]. Além disso, são

testes de alto rendimento, pois podem ser realizados em placas de 96 poços, otimizando o tempo de análise [26].

Ainda, com metodologia semelhante ao ELISA, o Imunoensaio de Quimioluminescência (CLIA) e Ensaio imunológico com revelação fluorescente (ELFA), também utilizam anticorpos imobilizados que reconhecem o antígeno alvo, porém, a marcação do anticorpo secundário não emite apenas cor, mas luz e fluorescência, que podem ser detectadas e quantificadas instrumentalmente [34].

4.3.3. Testes moleculares

De maneira geral, as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos destacam-se por sua sensibilidade, visto que são técnicas que multiplicam a quantidade de cópias do ácido nucleico alvo, ampliando o limite inferior de detecção. Em relação ao SARS-CoV-2, as técnicas moleculares apresentam sensibilidade que variam de 70 a 100% e especificidade reportada como 100%, o que também garante maior confiabilidade ao diagnóstico [22], [35].

Entre elas, duas têm apresentado maior destaque na área de diagnóstico de COVID-19:

a) O método considerado como referência para a identificação do SARS-CoV-2 atualmente é a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR). O método é considerado extremamente sensível e já permite detectar a presença do vírus nos primeiros dias após o contágio inicial (2 a 3 dias após aparição dos sintomas) [9], [36], [37]. A técnica de RT-qPCR permite que o RNA viral, presente em uma amostra clínica, normalmente swab orofaríngeo ou nasal, seja transcrito em seu DNA complementar (cDNA), com auxílio da enzima transcriptase reversa. Após, este cDNA é amplificado exponencialmente mediado pela ciclagem de temperatura gerando cópias, que são detectadas simultaneamente à amplificação [7], [26].

Os kits obtidos comercialmente para o diagnóstico de COVID-19 por RT-qPCR podem incluir a transcriptase reversa, as enzimas necessárias para amplificação, dois ou três conjuntos de primers, que são os responsáveis por se ligarem ao cDNA e sinalizarem as regiões de interesse para a amplificação, além de controles positivo, negativo e controle interno [38]. Como primers, podem ser utilizadas quaisquer sequências que sejam altamente conservadas para o genoma do alvo, mas que sejam

capazes de diferenciar de outros genótipos semelhantes. No caso do SARS-CoV-2, são utilizadas sequências ORF1ab, e sequências dos genes “N” e “E”, além da RNase P humana, como controle interno [26], [39], [40]. Ressalta-se que ao longo do período de utilização deste tipo de teste, a OMS tem recomendado alteração na sequência de primers em função das diversas mutações já identificadas e que caracterizam os diferentes genótipos do SARS-CoV-2.

b) O segundo método de amplificação de ácidos nucleicos que mais tem sido aplicado no diagnóstico de infecções COVID-19 é a Amplificação Isotermal Mediada por Loop com Transcrição Reversa (do inglês *Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification*; RT-LAMP). Esta técnica é uma variante da PCR, porém, não necessita de ciclagem de temperatura e realiza a transcrição do RNA em cDNA e sua amplificação posterior em uma temperatura fixa, geralmente em torno de 60-65°C [35] e consegue fazer a detecção do ácido nucleico após 5 dias o aparecimento dos sintomas [34]. Como uma das alternativas de subproduto da reação, forma-se pirofosfato de magnésio, que é utilizado na detecção do resultado, podendo ser realizado visualmente ou com auxílio de análises instrumentais, como turbidimetria ou fotometria [26]. Além de dispensar o uso de termocicladores, possibilita a obtenção de resultados mais rápidos com sensibilidade semelhante à obtida por RT-qPCR quando a amostra é coletada e extraída em condições adequadas [35], [41].

A **Tabela 1** resume as principais características que diferenciam as metodologias de testes rápidos de detecção de antígenos, testes enzimáticos para detecção de antígenos e RT-qPCR para detecção de ácido nucleico viral. É possível observar que o tempo entre o estabelecimento da infecção e a realização do teste é um grande diferencial entre as técnicas, na qual a RT-qPCR mostra um desempenho analítico superior aos demais testes, com resultados positivos em estágios iniciais do desenvolvimento da doença, de 2 a 3 dias após o aparecimento de sintomas. Entretanto, como outras técnicas moleculares, necessita de estrutura laboratorial complexa e profissionais altamente treinados [22], [26]. Tanto os testes moleculares quanto os enzimáticos buscam a detecção de antígenos, porém, estes últimos proporcionam resultados com menor tempo de análise, diminuindo a investigação laboratorial de um prazo de até 3 horas para menos de uma hora [32], [35]. Por fim, os testes rápidos para pesquisa de antígenos virais fazem uso de técnicas de diagnóstico

mais simples, podendo ser realizados em locais sem infraestrutura e com o menor tempo de obtenção de resultado, aproximadamente 20 minutos. Apresentam como grande limitação a sensibilidade analítica, dependendo da qualidade do fornecedor empregado [42], [43]. Sendo assim, é necessário que se faça uma análise completa da realidade em que o paciente se insere e sua condição clínica para que a melhor metodologia seja empregada. Outro aspecto que se destaca é o período de janela de identificação, tempo decorrido entre o contato inicial com o vírus e a identificação através do teste.

Tabela 1 Comparação das características entre principais metodologias empregadas no diagnóstico de COVID-19.

	ANTÍGENO (RÁPIDO)	ENZIMÁTICOS	RT-QPCR
Seletividade	Baixa a alta	Média a alta	Alta
Especificidade	Alta	Alta	Alta
Janela de identificação	7 dias após aparição dos sintomas	6 a 14 dias após aparição dos sintomas	2 a 3 dias após aparição dos sintomas
Estrutura laboratorial	<i>Point-of-care</i>	Infraestrutura complexa	Infraestrutura complexa
Tempo para o resultado	20 minutos	Menos de 1 hora	Aproximadamente 3 horas

4.3.4. Outros testes

Alguns achados laboratoriais podem ser utilizados como suporte no diagnóstico de COVID-19, como linfocitopenia, elevação da Proteína C reativa e da Velocidade de Hemossedimentação. A procalcitonina também é um marcador de infecção que comumente apresenta-se elevado. Além destes, um teste que tem se destacado principalmente em ambiente hospitalar é a detecção do Fragmento D-dímero, um marcador de fibrinólise que tem demonstrado associação com o quadro de pneumonia inflamatória e trombose pulmonar [44]. Todos estes fatores podem estar associados à severidade com que a COVID-19 acomete o paciente e, por este motivo, devem ser utilizados no acompanhamento da progressão da doença [16].

No início da pandemia os testes baseados em imunocromatografia para detecção de IgM ou IgG tornaram-se uma alternativa diagnóstica amplamente utilizada, nos quais os resultados eram obtidos em até 20 minutos. São testes que fazem a detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 e não detectam o vírus diretamente [8]. Como eram, inicialmente, uma das poucas alternativas laboratoriais, acabaram difundindo-se na tentativa de identificação de contato com o vírus. Atualmente, são mais utilizados para fins de pesquisa ou para levantamentos epidemiológicos [26]. Apesar da fácil execução e custo acessível, possuem uma limitação bastante importante que é o período de janela imunológica, tempo decorrido entre o contato inicial com o vírus e a produção dos anticorpos com consequente identificação do teste positivo. Estima-se que seus resultados indiquem o contato com o agente infeccioso apenas a partir de 7 a 14 dias após a exposição ou de 3 a 5 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas [45]. Quando realizados antes destes períodos, os testes podem apresentar resultado negativo mesmo que o paciente esteja com infecção ativa e capaz de disseminar o vírus [46], [47]. Estes testes podem trazer informações sobre a progressão da doença, casos de indivíduos que nunca entraram em contato com o vírus, levantamento de casos assintomáticos ou avaliação da eficácia da capacidade imunogênica pós-vacinação. Entretanto, não é uma metodologia indicada para o diagnóstico de doença ativa, visto que a quantidade de anticorpos produzidos nos primeiros dias de infecção pode ser insuficiente para sua detecção [26], [48], [49].

No decorrer da pandemia, muitas técnicas foram empregadas no diagnóstico de COVID-19, porém, nenhuma pode ser considerada ideal para todos os casos. Em um cenário de pandemia, em que todos os países foram atingidos, não há apenas um método que possa ser utilizado, e, por mais que a sensibilidade e a especificidade sejam atributos essenciais no diagnóstico, fatores sociais, epidemiológicos e econômicos devem ser levados em consideração na escolha do método a ser adotado [4], [48]. Neste sentido, o desenvolvimento de novas alternativas laboratoriais, amplas, de custo acessível e com bons valores preditivos positivo e negativo ganham importância. A pandemia impulsionou o desenvolvimento deste trabalho e o desenvolvimento de uma plataforma que pudesse não só contribuir para esta questão específica, mas que também permitisse aplicação diagnóstica mais ampla.

4.4. BIOSSENSORES

Entre novas alternativas metodológicas que vêm sendo desenvolvidas na área diagnóstica, os biossensores apresentam vantagens que vêm se destacando frente a outros métodos, como baixo custo de análise, portabilidade, possibilidade de análises quantitativas, alta sensibilidade e especificidade [22]. Apresentam-se como uma alternativa por dispensarem a necessidade de profissionais altamente qualificados e estrutura laboratorial complexa, além de serem capazes de apresentar resultados rápidos e quantitativos [50], [51]. Diversos exemplos são utilizados comumente no dia-a-dia, entre eles estão os testes imunocromatográficos, já discutidos anteriormente.

Os biossensores são dispositivos capazes de detectar analitos em amostras biológicas variadas. Tipicamente, como representado na **Figura 2**, um biossensor consiste em um bioreceptor (elemento que é responsável por interagir com o analito alvo), um transdutor (elemento que transforma o sinal gerado pela interação do bioreceptor com o analito em um sinal resposta) e, por fim, um dispositivo que lê o sinal transmitido pelo transdutor, trata os dados e disponibiliza o resultado para o operador [52].

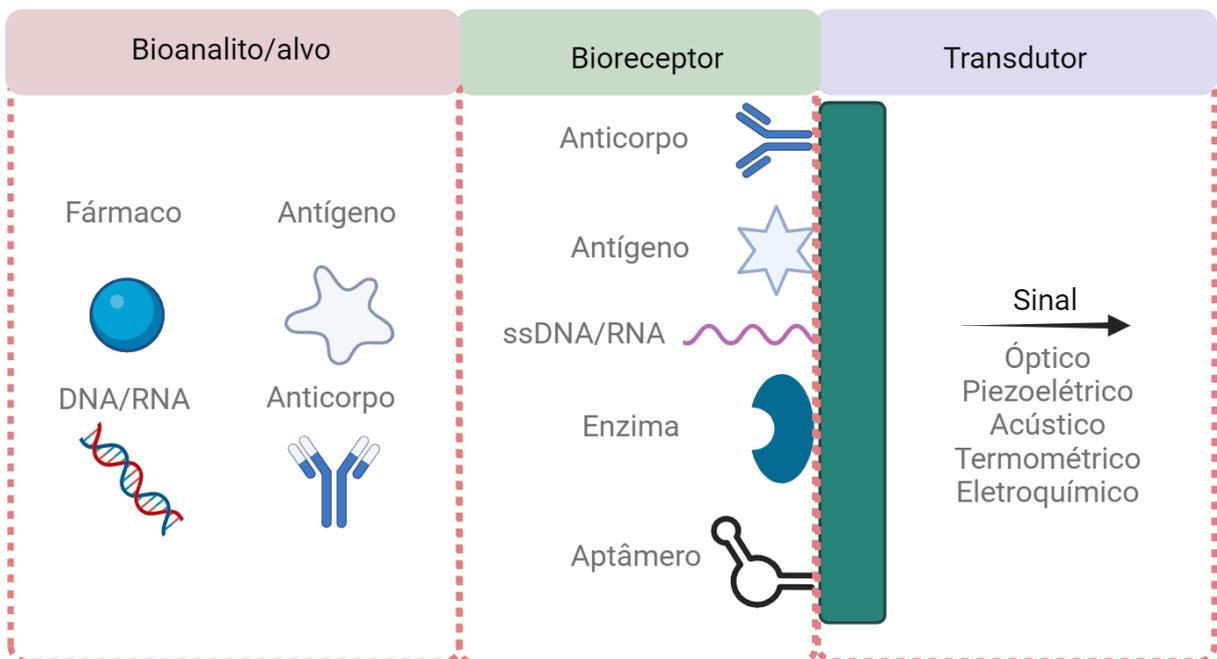


Figura 2 Esquema ilustrativo da construção de um biossensor. Imagem elaborada pela autora utilizando a plataforma BioRender.com.

4.4.1. Bioreceptores

O bioreceptor é o componente que irá interagir com o alvo ou analito presente na amostra e produzir uma interferência na superfície do sensor capaz de gerar sinal mensurável. O funcionamento do biossensor depende da interação do bioreceptor com o alvo escolhido e da tradução em um sinal, indicando a presença, ou até mesmo a quantidade, desse analito na amostra. Entre os analitos que podem ser avaliados estão as proteínas, os anticorpos, os ácidos nucleicos ou qualquer outro componente biológico ou metabólico [53] e, dependendo do analito alvo, escolhe-se o bioreceptor mais adequado. Neste sentido, os biossensores podem ser classificados como:

- Enzimáticos: utilizam enzimas como bioreceptor e o sinal detectado é gerado a partir da reação de catálise do substrato;
- Imunossensores: utiliza o sistema antígeno-anticorpo para geração de sinal, tanto o antígeno quanto o anticorpo podem estar imobilizados;
- Aptassensores: utilizam aptâmeros para a identificação do alvo, ocorrendo um fenômeno semelhante à ligação antígeno-anticorpo;
- Genossensores: utilizam ácidos nucleicos imobilizados para a detecção de hibridização com o alvo na amostra.

Os genossensores despertam o interesse na área de biossensoriamento pois são considerados de baixo custo, alta especificidade e rápido reconhecimento dos alvos. Em geral, o bioreceptor é uma fita simples de ácido nucleico (comumente DNA, devido sua maior estabilidade em relação ao RNA), que irá hibridizar com o ácido nucleico alvo (podendo ser DNA ou RNA). O bioreceptor comumente é uma sequência curta, com cerca de 20 a 30 bases, e escolhida de acordo com o alvo de interesse, de forma que seja complementar à sequência-alvo, presente na amostra [54].

4.4.1.1. Imobilização eletrostática do bioreceptor

Como parte fundamental de um biossensor está a etapa de imobilização do elemento que irá interagir com o alvo desejado gerando o sinal resposta. Em um genossensor, o bioreceptor é uma fita simples de ácido nucleico, geralmente DNA (*ssDNA-probe*), que deverá ser complementar à sequência alvo que se deseja identificar (*DNA-target*). Ainda, existe a necessidade de uma imobilização que permita a aproximação do *DNA-target* à superfície, para que haja a hibridização [55].

A metodologia de imobilização por interações eletrostáticas é a mais simples dentre as técnicas de imobilização, pois se utiliza de características físico-químicas da superfície do eletrodo e das moléculas de DNA, como as cargas negativas dessa molécula, fornecida pelos grupamentos fosfatos [56], [57], [58].

Alguns trabalhos utilizam o auxílio de filmes poliméricos catiônicos recobrendo a superfície do transdutor para a disponibilização de cargas positivas e interação com o *ssDNA-probe*. Diferentes opções de polímeros têm sido utilizadas para esta finalidade como quitosana [59], poli-L-lisina [60], polipirrol [61] e polianilina [62], [63]. Todos os polímeros citados são matrizes que disponibilizam grupamentos amina (NH_2) para auxiliar na adsorção eletrostática e imobilização do bioreceptor. Porém, gera a necessidade de uma etapa de funcionalização prévia no desenvolvimento do sensor.

Estratégias sem a necessidade de recobrimento polimérico prévio da superfície também são utilizadas, como o tratamento eletroquímico da superfície aplicando potencial no eletrodo. A diferença de potencial favorece a disponibilização de cargas positivas para a interação com o DNA [64]. Ainda, a utilização de nanoestruturas pode auxiliar nesta adsorção eletrostática, pois os óxidos nanoestruturados permitem a existência de planos eletroativos com mais regiões favoráveis à imobilização do *ssDNA*, quando comparados a um filme fino não nanoestruturado [65].

Existem poucos estudos sobre a imobilização por adsorção eletrostática em superfícies de nióbio ou óxidos de nióbio, ainda assim, Choi e colaboradores [66] realizaram a imobilização de *ssDNA* em uma superfície porosa de óxido de nióbio, apenas controlando o pH com solução tampão pH 7,4, e tempo do processo de imobilização. A interação demonstrou-se bastante estável, mesmo após lavagens, devido à interação das cargas negativas do DNA com as cargas positivas da superfície do óxido utilizado, além da morfologia porosa ter favorecido o aprisionamento das fitas de DNA.

A imobilização por adsorção eletrostática, além de fraca e passível de dessorção mesmo em condições brandas, como pH neutro ou temperatura ambiente (20-25 °C), gera interações não específicas entre a superfície e a molécula de DNA, imobilizando em posições aleatórias, o que pode prejudicar a eficiência da hibridização posterior [57], [67]. Por estas razões métodos de imobilização que pudessem promover uma interação estável, sem obstruir a flexibilidade estrutural do

DNA e que permitissem as modificações conformacionais naturais no processo de hibridização e formação da dupla hélice foram desenvolvidos [67].

4.4.1.2. *Imobilização covalente do bioreceptor*

Diferentemente da imobilização por adsorção eletrostática, a imobilização via ligação covalente possui boa estabilidade, devido à forte ligação entre o DNA e a superfície, permite a flexibilidade da molécula de DNA e proporciona a orientação vertical do DNA, resultando numa melhor eficiência do processo de hibridização [57].

As técnicas de imobilização por ligações covalentes exigem modificações na fita de DNA que dependem da superfície na qual será realizada a imobilização. Tipicamente utilizam-se fitas de DNA com modificações tiol (SH) ou amina (NH₂) na extremidade 3' ou 5', que tem a função de se ligar diretamente na superfície do metal, ou então em grupamentos superficiais induzidos especialmente para esta finalidade [57], [68].

A modificação tiol é majoritariamente utilizada para formação de monocamadas de DNA nos casos em que a superfície de imobilização possui ouro em sua constituição. Isto porque o grupamento tiol possui alta afinidade e forma ligações covalentes de fácil execução e alta reprodutibilidade com ouro [69], [70], [71].

Para os demais tipos de superfícies a metodologia mais amplamente utilizada é a ligação covalente por grupos amina. Para isso a fita de DNA-*probe* é modificada com grupamentos amino-terminais (-NH₂) em uma das extremidades, que se ligará com os grupamentos químicos disponíveis na superfície do eletrodo, provenientes de funcionalização prévia da superfície [56].

4.4.1.2.1. *Funcionalização de superfícies e ligações cruzadas*

A funcionalização de superfícies é uma estratégia para facilitar a imobilização de bioreceptores, pois é responsável por fornecer grupamentos químicos que serão utilizados como sítio de ligação da biomolécula.

A quitina é o segundo polímero natural mais abundante do planeta, perdendo apenas para celulose, está presente no exoesqueleto de insetos e crustáceos e em alguns fungos. Apesar de ser muito abundante na natureza, é um polímero de difícil manuseio por conta de sua solubilidade, porém sua N-desacetilação gera a quitosana, um derivado polimérico com grupos amina livres solúvel em meios ácidos com pH próximo a 6 [72].

A quitosana age como um pseudo-plástico, podendo formar filmes que têm potencial para o recobrimento de superfícies [73], [74]. A qualidade e espessura dos filmes formados possuem alta relação com a viscosidade da solução mãe de quitosana utilizada, que, por sua vez, depende do grau de N-desacetilação de quitina utilizado no processo de sua fabricação [72].

Utilizada para a disponibilização de aminas superficiais [59], [74], [75], sua utilização em recobrimento de superfícies é bastante explorada e pode ser aplicada não somente para imobilização por adsorção eletrostática, mas por ligações covalentes também [76], [77], [78]. Ainda, sua associação com outros reagentes, como o glutaraldeído para a formação de ligações cruzadas também é uma solução bastante simples, de baixo custo e de fácil execução.

O glutaraldeído é um dialdeído linear, com 5 carbonos muito utilizado em imobilização de biomoléculas por agir como um agente reticulante (*crosslinker*) [79], ou seja, ele promove a ligação entre dois grupamentos de interesse que não reagiriam entre si, como por exemplo entre grupamentos aminas [80], [81], [82].

Helali *et. al* (2007) [80] desenvolveram um imunossensor eletroquímico feito de eletrodo de nióbio/óxido de nióbio, obtido por anodização, funcionalizado com 3-aminopropiltriétoxisilano e glutaraldeído com imobilização covalente do anticorpo de fragmento Fab k47 para detecção de atrazina. Por meio de ensaios de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 5mM em PBS pH 7,0, os autores demonstraram que o biossensor proposto foi capaz de detectar atrazina em baixos níveis de concentração, de até 50µg/ml.

4.4.1.2.2. Necessidade de bloqueio da superfície

Ainda, uma característica de biossensores muito encontrada na literatura, é a probabilidade de imobilização inespecífica. Isso é, quando realizado o protocolo de hibridização, ao invés de ocorrer a fixação do DNA-*target* por hibridização com a *probe*, ocorre a imobilização dele na superfície, gerando um sinal falso.

Diversos substratos podem necessitar da etapa de bloqueio na construção do biossensor. Em seu trabalho, Oliveira e colaboradores [83] utilizam eletrodo de ouro recoberto com poli(éter metilo vinílico/Copolímero de ácido maleico) (PVM), e nanopartículas de ouro funcionalizadas com cisteína são ancoradas neste filme polimérico, por fim, a enzima é imobilizada a partir da ligação com a cisteína.

Entretanto, imobilização do substrato pode ocorrer nos sítios livres do filme de PVM. Para bloquear estes sítios de possíveis ligações, os autores fazem a incubação do eletrodo (já com a enzima imobilizada) em solução de albumina de soro bovino (BSA) 0,2% em PBS por 20 minutos a 25°C.

Chen e colaboradores [84] reportaram o bloqueio da superfície como um processo vital para a construção de seu imunossensor para detecção de hormônio da paratireoide (do inglês, *Parathyroid Hormone*; PTH). Em seu trabalho, os autores utilizam eletrodo de carbono, com nanotubos de carbono e ouro, e um anticorpo anti-PTH. O trabalho realizou um estudo para a escolha do melhor agente de bloqueio, adicionando o agente na superfície do eletrodo e incubando-o por 30 minutos. Entre os reagentes utilizados estão tiocianato de potássio, polietilenoglicol, álcool polivinílico, soro humano e BSA. Dentre seus achados, observaram que o melhor reagente para a realização do bloqueio é o soro humano, seguido do BSA.

4.4.2. Genossensores

As evoluções tecnológicas que ocorreram no último século influenciaram intensamente o desenvolvimento de pesquisas e ações voltadas para a atenção à saúde. As áreas de fisiopatologia, de tratamento e de diagnóstico de doenças tiveram avanços incomensuráveis [85]. Avanços que se refletiram no aumento da expectativa de vida da população mundial, de uma média global de 46,5 anos em 1950 para 71 anos em 2021 [86].

Entre os avanços que podemos destacar como essencial na medicina moderna têm-se a descoberta do DNA pelo bioquímico suíço Johann Friedrich Miescher (1844-1895), e depois, a elucidação da sua estrutura tridimensional e seu significado para a transferência de informações em organismos vivos, iniciada pela imagem de cristalografia gerada pela química britânica Rosalind Franklin e seu colega Raymon Gosling, onde pela primeira vez foi possível a observação com resolução satisfatória da molécula de DNA. Posteriormente, levando em consideração as medidas e anotações realizadas pela Dra. Franklin, Francis Crick (1916-2004), James Watson (1928-atual) e Maurice Wilkins (1916-2004) conseguiram propor a teoria da dupla hélice de DNA em 1953, e receberam o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1962 [87], [88]. Essas descobertas originaram a era da biologia molecular, possibilitando os estudos da interação entre RNA, DNA e tradução proteica [89].

Atualmente, a detecção de material genético é bastante utilizada na área de diagnóstico de patologias, devido à sua grande especificidade. Essa detecção geralmente se baseia na ligação de uma fita simples de ácido nucleico de sequência conhecida, com o ácido nucleico presente na amostra a ser analisada, fenômeno chamado de hibridização.

No contexto de detecção de ácidos nucleicos, a hibridização é o fenômeno que ocorre quando os nucleotídeos (bases nitrogenadas) de uma fita de RNA/DNA liga-se aos nucleotídeos complementares, presente em outra fita de RNA/DNA. Fundamentalmente existem 5 tipos de nucleotídeos que ocorrem naturalmente, são eles: Adenosina (A), Guanina (G), Timina (T), Citosina (C) e Uracila (U), onde A possui afinidade por T (em DNA) ou U (em RNA), e G possui afinidade por C, e vice versa. Essa afinidade ocorre pela capacidade doadora ou aceptora de ligações de hidrogênio entre essas bases, na qual A e T/U interagem por 2 ligações de hidrogênio, enquanto G e C conseguem interagir por 3 ligações de hidrogênio, quando em uma sequência mais longa, as sucessivas interações entre as bases de duas fitas distintas, gera uma ligação forte e estável, formando a dupla hélice [90].

A interação se dá por ligações de hidrogênio, que são muito estáveis em condições normais, entretanto essa estabilidade pode ser afetada por alguns fatores, como a força iônica do meio no qual a dupla fita se encontra e a temperatura [90]. A temperatura de fusão (do inglês, *melting temperature*; T_m) é a temperatura em que 50% do material genético encontra-se na forma de dupla fita. Essa é uma propriedade que pode ser calculada levando-se em consideração o percentual das bases G/C e A/T, por terem diferentes números de ligações de hidrogênio, sendo que quanto maior o percentual G/C, maior será a tendência de elevação da T_m . Além disso, outra propriedade importante para o fenômeno de hibridização é a temperatura de anelamento (T_a), que é a temperatura em que se inicia o pareamento entre as bases, geralmente ligeiramente menor que a T_m [90], [91], [92], [93].

A força iônica encontrada em soluções refere-se à quantidade de íons dissolvidos no meio. Cátions divalentes, como magnésio (Mg^{+2}), podem reagir com os oligonucleotídeos, já os cátions monovalentes, como sódio (Na^+) em concentrações de 1 a 2 M podem atuar fornecendo estabilidade para a dupla fita interferindo e modificando a T_m em até 20°C [90], [91], [92].

Sabe-se que é exatamente nestes fatores que algumas técnicas de biologia molecular fundamentam-se. Por exemplo, a PCR, conforme já apresentada no item 4.3.3, emprega ciclagens de temperatura para romper essas ligações (desnaturar) ou favorecer a ligação entre as sequências (anelamento ou hibridização), bem como utiliza de soluções tampão, que além de regularem o pH, fornecem uma concentração iônica ideal para a realização da técnica [39], [94], [95].

4.4.2.1. Utilização da hibridização em biossensores

No contexto de biossensores baseados na detecção de ácidos nucleicos, é necessário, fundamentalmente, que a *probe* interaja e se ligue com o alvo, gerando a hibridização. Para isso, diversos protocolos foram reportados na literatura, e as principais variáveis ajustadas são a temperatura e o tempo.

Mahmoodi e colaboradores [96] propuseram a construção de um biossensor para detecção do vírus HPV-18 utilizando eletrodo de ouro e DNA modificado com grupamento tiol como bioreceptor. Neste trabalho, os autores realizam a hibridização mergulhando o eletrodo em solução contendo o DNA-*target* em PBS 0,5M, pH 7,0, por 15 minutos a 42 °C. Neste protocolo a detecção se deu por voltametria de pulso diferencial utilizando o sal sódico monoidratado do ácido antraquinona-2-sufônico como marcador redox.

Sheta e colaboradores [63] utilizam eletrodo de carbono funcionalizados com polímero derivado da anilina e imobilização eletrostática de DNA-*probe*. Neste trabalho, não foi reportado a temperatura em que a hibridização foi conduzida, porém o tempo ideal para a detecção foi estudado, e testes foram realizados entre 15 e 120 minutos, demonstrando que 60 minutos foi suficiente para atingir a saturação. Isso foi constatado pois os ensaios realizados acima deste tempo não tiveram modificação na resposta eletroquímica. Para a detecção, os autores utilizaram ensaios de EIE empregando $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ 5mM (1:1) em KCl 0,1M.

Gokce e colaboradores [97] propuseram a construção de um biossensor impedimétrico utilizando eletrodo de óxido de estanho dopado com índio (do inglês *indium tin oxyde*; ITO) funcionalizado com nanofibras de poliuretano/ácido poli-m-antranílico e, como bioreceptor, utilizaram NH_2 -ssDNA-*probe*. A hibridização foi realizada incubando o DNA-*target* com o biossensor por 1 hora, sem menção sobre a temperatura utilizada. A detecção foi realizada por EIE em PBS pH 7,4.

Patel e colaboradores [69] construíram um biossensor para detecção de DNA de *Vibrio cholerae* utilizando eletrodo de ouro e com ssDN-*probe* modificado com grupamento tiol como bioreceptor. A hibridização foi realizada por apenas 5 minutos sem menção à temperatura utilizada. Para detecção foram realizados ensaios de voltametria cíclica (VC) e EIE utilizando o marcador redox azul de metileno.

Sun e colaboradores [70] utilizaram nanopartículas de ouro e ssDNA-*probe* modificado com grupamento tiol para a confecção de um biossensor para detecção de *Staphylococcus aureus*. Para a hibridização, o ssDNA-*target* foi adicionado à superfície do eletrodo e incubado por 30 minutos a 37 °C. Neste protocolo a detecção se deu por voltametria de pulso diferencial utilizando azul de metileno como marcador redox.

A **Tabela 2** traz a relação de parâmetros utilizados pelos autores citados, ressaltando as principais variáveis ajustadas nos protocolos de hibridização reportados na literatura.

Tabela 2 Relação de parâmetros de hibridização utilizados por outros trabalhos.

Método de hibridização	Temperatura	Tempo	Referência
Incubação do eletrodo na solução contendo DNA- <i>target</i>	42 °C	15 minutos	[96]
Não citado	Não citado	60 minutos	[63]
Incubação do eletrodo na solução contendo DNA- <i>target</i>	Não citado	60 minutos	[97]
Incubação do eletrodo na solução contendo DNA- <i>target</i>	Não citado	5 minutos	[69]
Adição do DNA- <i>target</i> à superfície do eletrodo	37 °C	30 minutos	[70]

4.4.3. Transdutores

A escolha do transdutor define o tipo de biossensor a ser desenvolvido, a partir do sinal que será gerado, podendo ser térmico, que detecta diferenças de temperatura; piezoelétrico, sensível a mudanças de massa na superfície do sensor;

óptico, capaz de detectar mudanças de cor ou emissão de luz geradas durante a análise; ou eletroquímico, que serão explorados a seguir [98], [99].

Dentre os biossensores, os eletroquímicos vêm se destacando como um dos mais utilizados, devido às suas particularidades como baixo custo do equipamento, possibilidade de determinação simultânea de diferentes analitos e análise de amostras complexas [100]. Existem diversos métodos de transdução de sinal eletroquímico, podendo ser classificados como:

- Amperométricos: detectam correntes elétricas geradas no sistema durante análise em um valor fixo de potencial;
- Potenciométricos: detectam diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho (sensor) e eletrodo de referência;
- Condutimétricos: detectam a diferença na condutividade do eletrólito, causada em decorrência das reações analisadas;
- Voltamétricos: detectam diferenças nas correntes elétricas geradas no sistema ocasionadas por variações controladas de potencial;
- Impedimétricos: analisam resistividade e capacitância da superfície do sensor ao aplicar uma perturbação senoidal (de potencial ou corrente alternada) em diferentes frequências.

Um exemplo de biossensor eletroquímico amplamente utilizado na medicina, é a medida da glicemia do tipo *point-of-care*, na qual se utiliza um sensor eletroenzimático, funcionalizado com a enzima glicose oxidase que, em contato com a glicose presente no sangue analisado, realiza a oxidação do substrato gerando um sinal elétrico que é recebido pelo aparelho e convertido em um valor de glicose livre [101].

4.5. DETECÇÃO ELETROQUÍMICA

A hibridização gerada pelo reconhecimento do alvo (RNA/DNA presente na amostra) pelo bioreceptor (fita simples de cDNA imobilizada no eletrodo) gera perturbações na superfície do biossensor que podem ser detectadas a partir de técnicas eletroquímicas. Dentre elas, as mais aplicadas são técnicas voltamétricas e impedimétricas.

4.5.1. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica simples e que apresenta grande versatilidade nos estudos de espécies eletroativas, sendo uma das técnicas voltamétricas mais utilizadas na detecção de patógenos [102]. Consiste na aplicação de uma faixa de potencial no eletrodo de forma cíclica com velocidade de varredura constante, e leitura das correntes geradas a partir desta perturbação [103], como pode ser observado na **Figura 3**.

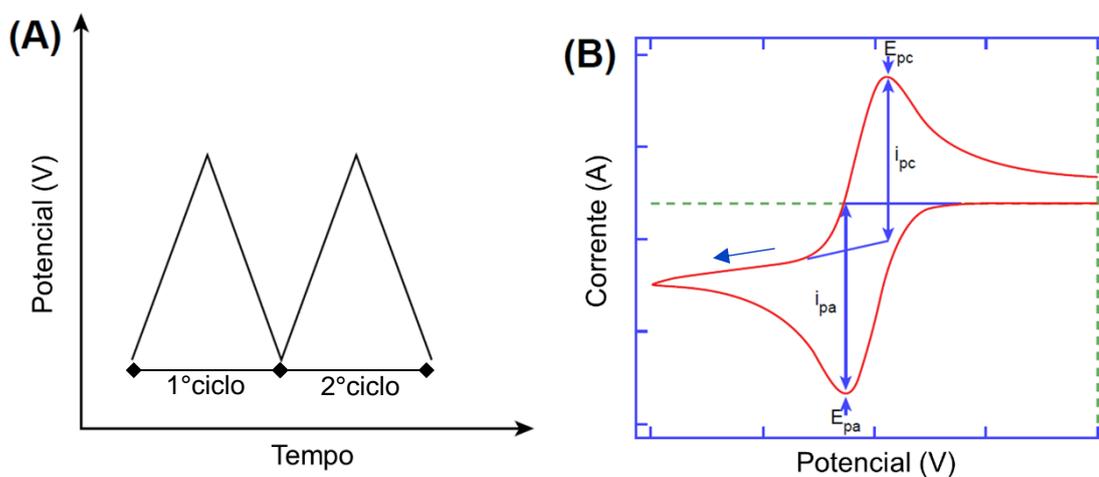


Figura 3 Gráfico da aplicação de potencial em função do tempo **(A)**, voltamograma resultante de uma VC **(B)**. Imagem adaptada de Malhotra *et al.* [54].

Os picos de corrente gerados na varredura, observados no voltamograma representado na **Figura 3B**, normalmente ocorrem em decorrência de fenômenos reversíveis de oxidação e redução de espécies durante a análise. Quando o potencial é varrido no sentido de potenciais mais positivos, tem-se a corrente anódica (i_{pa}), onde ocorre o fenômeno de oxidação, processo limitado pela capacidade de difusão das espécies até a superfície do sensor. Na sequência, ocorre a inversão da varredura, indo para potenciais negativos, nos quais favorece reversão dos fenômenos, conseqüentemente redução das espécies e gera-se a corrente catódica (i_{pc}) [54], [104], [105].

Quando utilizada para a detecção de hibridização em biossensores, com frequência utilizam-se marcadores redox, como o azul de metileno (AM) ou o par ferrocianeto de potássio/ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$) que interagem de formas distintas com DNA em fita simples ou dupla. O AM é capaz de

interagir com as bases guaninas do DNA fita simples, já quando a hibridização ocorre, essa interação ocorre de maneira menos intensa pois existe um impedimento das bases. Desta forma, ocorre a diminuição da corrente máxima dos picos gerados durante a VC [106], [107]. A utilização do par $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ é bastante utilizada em genossensores pois a oxirredução do $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ dá-se próxima à superfície do substrato, gerando picos bem definidos por VC. Quando adicionado o DNA, os grupamentos fosfato de seu esqueleto agem afastando as moléculas negativas da superfície do sensor, ocasionando uma diminuição na oxirredução do par $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$, conseqüentemente há diminuição na corrente máxima dos picos, que se torna ainda maior na presença da hibridização, visto que a repulsão gerada pela dupla fita de DNA é mais intensa [108], [109].

4.5.2. Espectroscopia de impedância eletroquímica

As técnicas eletroquímicas visam analisar as espécies eletroativas que se formam durante as reações eletroquímicas que ocorrem na superfície do sensor. Para isso, a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é uma poderosa ferramenta para a obtenção de respostas de biossensores [110], pois as reações eletroquímicas ocorrem na interface do sensor com o eletrólito de suporte, chamada de dupla camada elétrica, por meio da geração de corrente iônica proporcionada pelo par redox, apresentando uma resistência de transferência de carga (R_{ct}) e uma capacitância (C_{dl}). Afastando-se da dupla camada elétrica, encontra-se o *bulk* da solução eletrólito, que possui uma resistência associada ao sistema (R_s), além do movimento de íons que são transportados através de difusão, resultando em transporte de massa pelo eletrólito que origina uma impedância (Z_w). Em consequência das propriedades do sistema, caracterizadas pela medida de EIE, é possível representar a solução e os fenômenos eletroquímicos que ali ocorrem por um circuito elétrico equivalente, apresentado na **Figura 4** [103], [111].

Resumidamente, em uma célula eletroquímica ocorrem interações entre o eletrodo, as espécies redox e o eletrólito, ocasionando fenômenos de modificações nas concentrações das espécies eletroativas, de transferência de carga e de transferência de massa do *bulk* do eletrólito para a superfície do eletrodo sob influência da resistência do eletrólito [112].

A EIE consiste na aplicação de sinais senoidais, geralmente de corrente alternada, em valores de frequência distintos e a impedância é medida. A resposta a essas perturbações possibilita a obtenção dos diagramas de Bode e Nyquist, mais utilizados na literatura para uma análise preliminar dos resultados. O diagrama de Nyquist (apresentado na **Figura 4**), é construído pela divisão das partes imaginária e real da impedância, e, cada ponto do diagrama representa um valor de impedância na frequência aplicada e possui um ângulo em relação à origem dos eixos X, Y. Este ângulo é apresentado no diagrama de Bode – fase, enquanto a magnitude de impedância $|Z|$ (módulo da impedância) é representado pelo diagrama de Bode – módulo, os dois em função da frequência aplicada em cada ponto [112], [113].

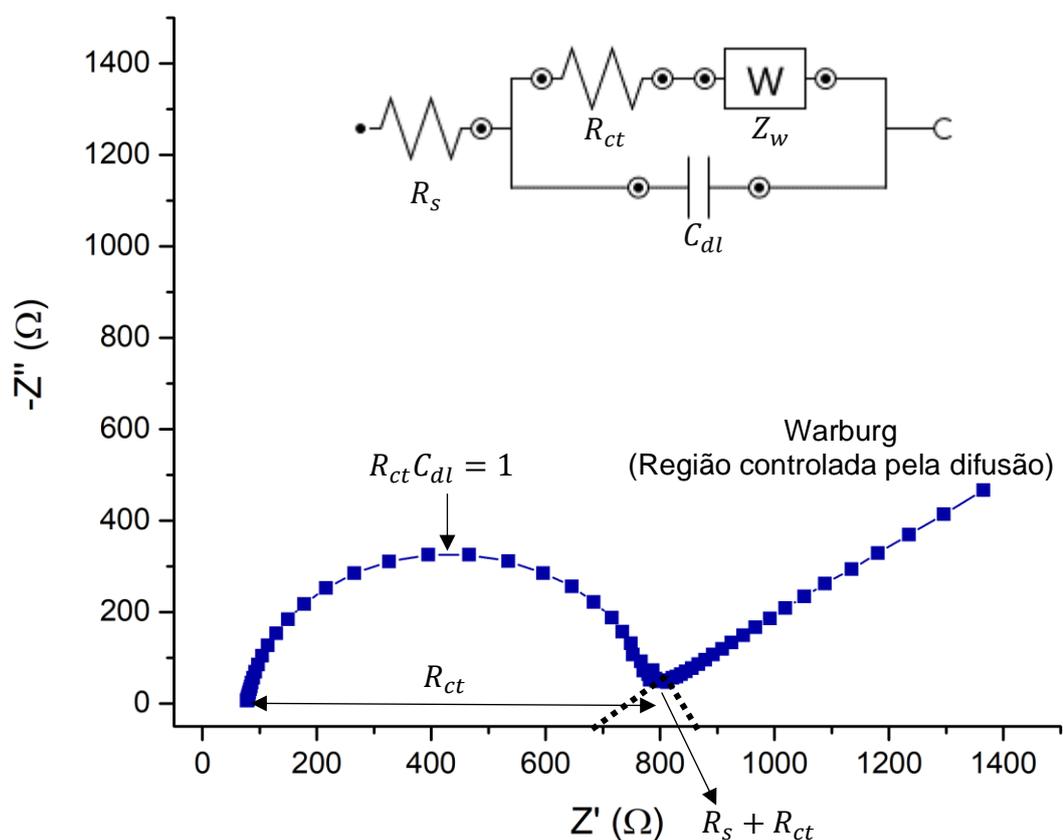


Figura 4 Representação de Diagrama de Nyquist com seu circuito equivalente e propriedades do sistema. Imagem produzida pela autora.

A EIE aplicada a genossensores eletroquímicos pode revelar os fenômenos de modificação superficial gerados a partir da biofuncionalização ou da resposta de hibridização. Em geral, espera-se que cada modificação realizada na superfície do

eletrodo introduza dificuldades de interação na região de interface do sensor com o eletrólito, aumentando a resistência geral do sistema [114], [115].

4.6. BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS NO DIAGNÓSTICO DE COVID-19

No cenário da pandemia de COVID-19, a área de biossensores eletroquímicos se fortaleceu ainda mais, com o desenvolvimento de diversos sensores voltados ao diagnóstico da doença. Os alvos escolhidos se assemelham aos dos métodos diagnósticos já apresentados, como o RNA viral [116], anticorpos IgG e IgM [117], a proteína do nucleocapsídeo [118], [119] e a proteína *spike* [117], [120], além de outros biomarcadores como a proteína C reativa [121]. Porém, pelo conhecimento atual do nosso grupo, ainda não há relato de nenhum biossensor eletroquímico comercialmente disponível para o diagnóstico de COVID-19.

4.7. MATERIAIS UTILIZADOS NO BIOSSENSORIAMENTO E NIÓBIO

Diversos materiais são utilizados como coletores de corrente em biossensores eletroquímicos, como nanotubos de carbono [122], grafeno [123], ouro, prata [124] e até mesmo molibdênio [125]. A escolha deste substrato está diretamente ligada às especificações do biossensor, interferindo na sensibilidade, estabilidade, custo e necessidades técnicas de leitura do sinal [126].

Materiais a base de óxidos de nióbio vêm chamando atenção, principalmente devido às suas propriedades semicondutoras [12], [127], [128]. É importante destacar que o Brasil detém pelo menos 90% das reservas mundiais desse metal [13], facilitando o acesso e possibilitando a impulsão da indústria brasileira que faz uso deste material e, assim, diminuindo a necessidade de importação de tecnologia e insumos o que, especialmente na área médica, tem se tornado um limitador para o país.

No cenário científico brasileiro, o nióbio tem grande importância e gera interesse por suas propriedades físicas, catalíticas e semicondutoras, tanto do metal, quanto de seus óxidos. Tem sido muito estudado para aplicações nas áreas de construção civil [129], de produção de energia [130], e de armazenamento de energia [14].

A utilização de nanomateriais, materiais que possuem ao menos uma de suas dimensões menor que 100 nm [131], é uma estratégia que vem ganhando força na

área de biossensores, pois esta estruturação do material, além de aproveitar as vantagens da miniaturização, aumenta a área superficial, o que pode, em alguns casos, conferir maior condutividade elétrica e amplificação do sinal gerado durante a análise, além de ser compatível com biomoléculas [54]. Este aumento de área superficial possibilita uma maior quantidade de bioreceptores disponíveis para a detecção do analito, por consequência, fazendo com que o biossensor seja mais sensível ao analito [132], [133].

4.7.1. Óxidos de nióbio aplicados ao biossensoriamento eletroquímico

Materiais à base de nióbio têm sido sugeridos para diversas aplicações na área de biossensores nas mais diversas configurações. Esses dispositivos podem ser classificados quanto ao princípio de funcionamento, sendo os principais tipos: ópticos[134], acústicos [135], piezoelétricos [136] e eletroquímicos [137]. Além disso, o nióbio quanto utilizado para detecção de biomoléculas, pode ser utilizado nas mais diversas composições como, por exemplo, óxido de nióbio [138], carbetto de nióbio [139], estrutura metalorgânica [140], compósito com outros materiais [80], entre outros. Mais detalhes sobre a utilização de óxidos de nióbio na construção de biossensores eletroquímicos serão descritos no manuscrito de revisão apresentado no CAPÍTULO 1.

I. CAPÍTULO 1

Electrochemical Biosensors Based on Niobium-containing Oxides: A Review

Manuscrito de revisão elaborado de
acordo com as normas e em processo
de submissão à revista *Talanta* na forma
de *Review*

ISSN: 1873-3573

O texto do capítulo 1, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 59 – 94, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta de uma revisão da literatura acerca da aplicação de óxidos de nióbio aplicados à confecção de biossensores eletroquímicos.

II. CAPÍTULO 2

Este capítulo reúne os principais ensaios laboratoriais realizados neste trabalho e que serviram de base para o processo de desenvolvimento do biossensor. Foi organizado na forma de materiais e métodos, resultados e discussão específica dos mesmos.

O texto do capítulo 2, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 97 – 160, foi suprimido por tratar-se dos resultados experimentais obtidos durante a realização desse projeto, que serão publicados em periódico relevante da área. A parte experimental desse projeto consistiu no desenvolvimento de protocolos de construção e biofuncionalização de eletrodos baseados em nanofios de niobato de sódio para aplicação como genossensor eletroquímico. Também foram exploradas diferentes abordagens de otimização do protocolo de hibridização.

II.1. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES GERAIS

Foi avaliado o comportamento do sistema Nb-NW em diferentes eletrólitos, no qual foi possível observar que a utilização de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ (1:1) em PBS resultou em menores resistências do sistema, além de ser mais sensível quando comparado aos outros eletrólitos testados ao gerar fenômenos mais bem definidos até mesmo para modificações superficiais geradas a partir de concentrações menores de *ssDNA-probe*.

A película de nanofios de niobato de sódio mostrou contribuir para o aumento da resistência total dos três sistemas testados; Nb-NW, FTO-NW e Gf-NW; resultado já esperado por se tratar da aplicação de um óxido semiconductor às superfícies condutoras.

A partir dos resultados da caracterização eletroquímica por VC da imobilização por método eletrostático, foi possível observar que modificações de superfície de fato ocorreram, sugerindo a imobilização de *ssDNA-probe*. Além disso, estas modificações não causam alterações ou danos morfológicos na estrutura das cordas micrométricas ou nanofios observados por microscopia ótica e eletrônica.

Entretanto, ao realizar-se a análise de microscopia por fluorescência, foi possível observar que a imobilização de *ssDNA-probe* não foi estável às lavagens em água, que possui pH levemente ácido, mostrando a necessidade de outras estratégias para uma imobilização estável, especialmente em sistemas nos quais a camada de nanofios de niobato de sódio é suportada em outros substratos.

Ao partirmos para análises referentes à imobilização covalente de NH_2 -*ssDNA-probe*, com base nos resultados de microscopia de fluorescência foi possível concluir que a imobilização após funcionalização com quitosana e glutaraldeído foi obtida com êxito. Além disso, foi possível avaliar a estabilidade às lavagens, procedimento importante pois as análises eletroquímicas são realizadas mergulhando-se as amostras em solução; sendo assim, a imobilização realizada neste capítulo é adequada para a utilização proposta do biossensor.

Apesar de muito utilizada, a VC não se mostrou uma técnica capaz de distinguir todas as modificações induzidas no sistema, sendo que apenas a EIE conseguiu captar todas as funcionalizações realizadas, bem como a imobilização do bioreceptor em todos os sistemas analisados.

A partir dos ensaios de EIE, foi possível concluir que a funcionalização com quitosana diminui a resistência à transferência de cargas em todos os sistemas, além de gerar um segundo fenômeno nas configurações FTO-NW e Gf-NW. Já a funcionalização com o glutaraldeído tende a aumentar essa resistência retornando a patamares próximos ao eletrodo de base (Nb-NW, FTO-NW ou Gf-NW) sem modificar o segundo arco gerado anteriormente. Por fim, a imobilização do bioreceptor gera aumento na resistência do sistema, proporcional à quantidade imobilizada.

Também foi analisado um método adequado para acondicionamento das amostras quando não forem utilizadas logo após a imobilização. Foi possível verificar a degradação da amostra em apenas uma noite quando mantida seca. Já em solução PBS, ela se manteve estável por mais de 80 horas em temperatura ambiente (20-25 °C), sendo este o método escolhido para o acondicionamento quando necessário

Tendo em vista os resultados de microscopia ótica de fluorescência, foi possível concluir que após a imobilização, ainda restam sítios ativos de glutaraldeído disponíveis para a reação com DNA, gerando imobilizações inespecíficas durante o protocolo de hibridização. Por este motivo, se faz necessário o bloqueio da superfície após a imobilização, para neutralizar o glutaraldeído, deixando exposto somente o NH_2 -ssDNA-*probe* para interação com o ssDNA-*target*.

A escolha de um protocolo de bloqueio é uma etapa de suma importância, para que a resposta eletroquímica dos ensaios seja fidedigna ao fenômeno que se deseja analisar. Sendo assim, com base nos testes realizados e até o momento, um maior tempo de reação com menor concentração (*overnight* com solução de BSA 1%) foi o protocolo que trouxe melhores resultados, reagindo com sítios remanescente de glutaraldeído, porém, sem interferir na visualização da hibridização.

Após o bloqueio a superfície, o biossensor torna-se sensível às variações térmicas e, desta forma, se faz necessário o desenvolvimento de um protocolo que não utilize variação de temperatura, ou que se faça a estabilização térmica pós-hibridização.

Ainda, fica evidente que a hibridização com altas concentrações de ssDNA-*target* (100 μM) gera duas constantes de tempo observadas por EIE e que, sendo assim, as médias e baixas frequências são as de maior relevância para análise. Os protocolos de hibridização ainda precisam de otimizações, entretanto já foi possível observar que a hibridização simplificada não possui especificidade; tempos muito

curtos (30 minutos) não são suficientes para a formação adequada dos híbridos e que 60 minutos gera respostas eletroquímicas semelhantes a 45 minutos, sendo este o tempo mais adequado para a incubação; 100nM de *NH₂-ssDNA-probe* é a concentração que se mostrou mais promissora para continuar a otimização do sensor desenvolvido; e que a presença de soluções de hibridização como SSC e SSPE com SDS, favorecem a reação de hibridização específica, dificultando a formação de híbridos não-complementares, sendo que a solução tampão de hibridização mais promissora é 1x SSC.

Ademais, é possível observar que há diferença na resposta eletroquímica obtida após o protocolo de hibridização quando utilizado DNA sintético ou extraído de sangue humano, porém mais estudos ainda necessitam ser realizados para a completa elucidação dos fenômenos que ocasionam a diferença na resposta eletroquímica.

Por fim, cabe destacar que foi possível a obtenção de um eletrodo para utilização em biossensor eletroquímico baseado em nanofios de niobato de sódio, bem como o desenvolvimento de metodologia de funcionalização da superfície incluindo a imobilização de bioreceptores. Ainda que necessite de otimizações para a melhoria da especificidade, a plataforma desenvolvida é capaz de responder ao processo de hibridização gerando uma resposta eletroquímica característica. O desenvolvimento de um biossensor não é uma tarefa trivial, diversas variáveis influenciam no processo, especialmente para propostas como a desenvolvida por esta Tese, na qual o material nanoestruturado teve a sua primeira descrição para a aplicação pretendida desenvolvida pelo nosso grupo de trabalho, resultando na submissão de um pedido de depósito de patente.

II.2. PERSPECTIVAS

É importante destacar que a linha de pesquisa em biossensores foi nucleada apenas a partir do início da execução da presente tese, sendo possível iniciar uma rede de cooperação envolvendo uma equipe multidisciplinar de diferentes ICT's e hospitais, destacando-se a colaboração de pesquisadores de diferentes unidades e departamentos da UFRGS: Profa. Celia de Fraga Malfatti do Departamento de metalurgia, Professora Leliz Ticona Arenas do Instituto de Química, Professora Simone Cristina Baggio Gnoatto e o Professor Diogo André Pilger, ambos da Faculdade de Farmácia da UFRGS, Grupo Hospitalar Conceição por meio do médico Fernando Anschau e Hospital de Clínicas de Porto Alegre por meio da farmacêutica Fernanda de Paris.

O desenvolvimento do biossensor proposto ainda não está finalizado, sendo necessário ainda a melhora dos parâmetros de hibridização e aprimoramento da sua especificidade. Testes variando tempo de incubação, tampão de hibridização e concentração de $\text{NH}_2\text{-ssDNA-probe}$ já foram realizados e outras variáveis ainda estão em vista de serem objeto de estudo, como a otimização da lavagem pós-hibridização, teste de diferentes tampões de hibridização, ensaios variando a temperatura de incubação e lavagens e protocolos de resfriamentos estão entre as próximas etapas a serem investigadas.

A continuidade do desenvolvimento da área de biossensores com estes grupos de pesquisa seguirá e proporcionará a realização de projeto de pós-doutorado da autora com previsão de sua aplicação clínica.

REFERÊNCIAS

- [1] R. Lu *et al.*, “Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding,” *The Lancet*, vol. 395, no. 10224, pp. 565–574, Feb. 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
- [2] World Health Organization, “WHO Director-General’s opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020.” 2020. [Online]. Available: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19—11-march-2020>
- [3] M. K. Sott, M. S. Bender, and K. da Silva Baum, “Covid-19 Outbreak in Brazil: Health, Social, Political, and Economic Implications,” *International Journal of Health Services*, vol. 52, no. 4, pp. 442–454, Oct. 2022, doi: 10.1177/00207314221122658.
- [4] R. W. Peeling, D. L. Heymann, Y. Y. Teo, and P. J. Garcia, “Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control,” *The Lancet*, vol. 399, no. 10326. Elsevier B.V., pp. 757–768, Feb. 19, 2022. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02346-1.
- [5] World Health Organization, “WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard.” Accessed: Jan. 12, 2024. [Online]. Available: <https://covid19.who.int>
- [6] M. Mohamadian, H. Chiti, A. Shoghli, S. Biglari, N. Parsamanesh, and A. Esmaeilzadeh, “COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis,” *Journal of Gene Medicine*, vol. 23, no. 2. Blackwell Publishing Inc., Feb. 01, 2021. doi: 10.1002/jgm.3303.
- [7] R. K. Ochani *et al.*, “COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management,” 2021.
- [8] E. Waltz, “How Do Coronavirus Tests Work?” 2020. [Online]. Available: <https://spectrum.ieee.org/the-human-os/biomedical/diagnostics/how-do-coronavirus-tests-work>
- [9] P. Zhai, Y. Ding, X. Wu, J. Long, Y. Zhong, and Y. Li, “The epidemiology, diagnosis and treatment of COVID-19,” *Int J Antimicrob Agents*, p. 105955, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105955.
- [10] R. Sha and S. Badhulika, “Recent advancements in fabrication of nanomaterial based biosensors for diagnosis of ovarian cancer: a comprehensive review,” *Microchimica Acta*, vol. 187, no. 3, p. 181, Mar. 2020, doi: 10.1007/s00604-020-4152-8.
- [11] P. Zhang and M. S. Draz, “Functional Nanomaterial for Theranostic Medicine,” *Curr Top Med Chem*, vol. 19, no. 27, pp. 2447–2448, Dec. 2019, doi: 10.2174/156802661927191206151729.
- [12] A. Gonçalves dos Santos Júnior, L. Marasca Antonini, E. J. Pacheco Sampaio, A. M. Helgueira de Andrade, C. Aguzzoli, and C. de Fraga Malfatti, “Sodium

- niobates and protonic niobates nanowires obtained from hydrothermal synthesis: Electrochemical behavior in aqueous electrolyte,” *Ceram Int*, vol. 48, no. 2, pp. 1522–1531, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.ceramint.2021.09.230.
- [13] European Commission, “Study on the review of the list of critical raw materials,” European Commission Brussels, 2017.
- [14] Rede Comunicação de Resultado da Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração, “CBMM e Echion anunciam parceria para construção de nova planta de óxidos de Nióbio para baterias em Araxá-MG.” Accessed: Dec. 30, 2022. [Online]. Available: <https://assets.cbmm.com/-/media/CBMM/MEDIA-CENTER/Noticias-Internas/Acordo-Echion/Parceria-entre-CBMM-e-Echion.pdf>
- [15] Center for Infectious Disease Research and Policy, “News Scan for Dec 31, 2019.” 2019. [Online]. Available: <http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2019/12/news-scan-dec-31-2019>
- [16] S. Umakanthan *et al.*, “Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19),” *Postgraduate Medical Journal*, vol. 96, no. 1142. BMJ Publishing Group, pp. 753–758, Dec. 01, 2020. doi: 10.1136/postgradmedj-2020-138234.
- [17] S. Raskin, “Genetics of COVID-19,” *Jornal de Pediatria*, vol. 97, no. 4. Elsevier Editora Ltda, pp. 378–386, Jul. 01, 2021. doi: 10.1016/j.jped.2020.09.002.
- [18] S. Su *et al.*, “Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses,” *Trends Microbiol*, vol. 24, no. 6, pp. 490–502, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.tim.2016.03.003.
- [19] Ministério da Saúde, “Coronavírus - Diagnóstico.” Accessed: Dec. 23, 2022. [Online]. Available: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/diagnostico>
- [20] M. D. Mair *et al.*, “A systematic review and meta-analysis comparing the diagnostic accuracy of initial RT-PCR and CT scan in suspected COVID-19 patients,” *Br J Radiol*, vol. 94, no. 1119, p. 20201039, Mar. 2021, doi: 10.1259/bjr.20201039.
- [21] H. Wang, R. Wei, G. Rao, J. Zhu, and B. Song, “Characteristic CT findings distinguishing 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) from influenza pneumonia,” *Eur Radiol*, vol. 30, no. 9, pp. 4910–4917, Sep. 2020, doi: 10.1007/s00330-020-06880-z.
- [22] O. Filchakova, D. Dossym, A. Ilyas, T. Kuanysheva, A. Abdizhamil, and R. Bukasov, “Review of COVID-19 testing and diagnostic methods,” *Talanta*, vol. 244. Elsevier B.V., Jul. 01, 2022. doi: 10.1016/j.talanta.2022.123409.
- [23] S. Jadhav, G. Deng, M. Zawin, and A. E. Kaufman, “COVID-view: Diagnosis of COVID-19 using Chest CT,” *IEEE Trans Vis Comput Graph*, vol. 28, no. 1, pp. 227–237, Jan. 2022, doi: 10.1109/TVCG.2021.3114851.

- [24] P. K. Drain, "Rapid Diagnostic Testing for SARS-CoV-2," *New England Journal of Medicine*, vol. 386, no. 3, pp. 264–272, Jan. 2022, doi: 10.1056/nejmcp2117115.
- [25] Y. Zhang *et al.*, "Recent Progress on Rapid Lateral Flow Assay-Based Early Diagnosis of COVID-19," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 10. Frontiers Media S.A., May 03, 2022. doi: 10.3389/fbioe.2022.866368.
- [26] M. Yüce, E. Filiztekin, and K. G. Özkaya, "COVID-19 diagnosis —A review of current methods," *Biosens Bioelectron*, vol. 172, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.bios.2020.112752.
- [27] G. Turcato *et al.*, "Rapid antigen test to identify COVID-19 infected patients with and without symptoms admitted to the Emergency Department," *American Journal of Emergency Medicine*, vol. 51, pp. 92–97, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.ajem.2021.10.022.
- [28] C. C. Cheng, C. C. Liu, T. F. Chiu, and S. Shiou-Sheng Chen, "Evaluation of a Rapid Antigen Test for the Diagnosis of SARS-CoV-2 during the COVID-19 Pandemic," *Inquiry (United States)*, vol. 59, May 2022, doi: 10.1177/00469580221105354.
- [29] E. Albert *et al.*, "Field evaluation of a rapid antigen test (Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device) for COVID-19 diagnosis in primary healthcare centres," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 27, no. 3, pp. 472.e7-472.e10, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.cmi.2020.11.004.
- [30] Agência Nacional de Vigilância Sanitária, "Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device (Nasal)." Accessed: Jan. 21, 2023. [Online]. Available: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/25351525272202011/?numeroRegistro=10071770918>
- [31] N. Adnan *et al.*, "Detection of SARS-CoV-2 by antigen ELISA test is highly swayed by viral load and sample storage condition," *Expert Rev Anti Infect Ther*, vol. 20, no. 3, pp. 473–481, Mar. 2022, doi: 10.1080/14787210.2021.1976144.
- [32] A. Osterman *et al.*, "Comparison of four commercial, automated antigen tests to detect SARS-CoV-2 variants of concern," *Med Microbiol Immunol*, vol. 210, no. 5–6, pp. 263–275, Dec. 2021, doi: 10.1007/s00430-021-00719-0.
- [33] M. J. Ahava, S. Kurkela, S. Kuivanen, M. Lappalainen, H. Jarva, and A. J. Jääskeläinen, "Detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid antigen from serum can aid in timing of COVID-19 infection," *J Virol Methods*, vol. 302, p. 114469, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.jviromet.2022.114469.
- [34] G. Alhamid, H. Tombuloglu, A. A. Rabaan, and E. Al-Suhaimi, "SARS-CoV-2 detection methods: A comprehensive review," *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 29, no. 11. Elsevier B.V., Nov. 01, 2022. doi: 10.1016/j.sjbs.2022.103465.

- [35] Y. Tanimoto, A. Mori, S. Miyamoto, E. Ito, K. Arikawa, and T. Iwamoto, "Comparison of RT-PCR, RT-LAMP, and Antigen Quantification Assays for the Detection of SARS-CoV-2," *Jpn J Infect Dis*, vol. 75, no. 3, p. JJID.2021.476, May 2022, doi: 10.7883/yoken.JJID.2021.476.
- [36] P. Huang *et al.*, "Use of Chest CT in Combination with Negative RT-PCR Assay for the 2019 Novel Coronavirus but High Clinical Suspicion," *Radiology*, vol. 295, no. 1, pp. 22–23, Apr. 2020, doi: 10.1148/radiol.2020200330.
- [37] K. Ejima *et al.*, "Estimation of the incubation period of COVID-19 using viral load data," *Epidemics*, vol. 35, p. 100454, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.epidem.2021.100454.
- [38] R. Wölfel *et al.*, "Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019," *Nature*, Apr. 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2196-x.
- [39] BIONEER CORPORATION, "AccuPower® COVID-19 Real-Time RT-PCR Kit." 2020. [Online]. Available: <https://eng.bioneer.com/20-ncv-1111.html>
- [40] Thermo Fisher Scientific, "Genetic Analysis Research Solutions for SARS-CoV-2 (the COVID-19 Virus)." 2020. [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/clinical/clinical-genomics/pathogen-detection-solutions/coronavirus-2019-ncov/genetic-analysis.html>
- [41] M. Pradhan *et al.*, "COVID-19: clinical presentation and detection methods," *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, vol. 43, no. 1. Taylor and Francis Ltd., 2022. doi: 10.1080/15321819.2021.1951291.
- [42] M. Pohanka, "Progress in Biosensors for the Point-of-Care Diagnosis of COVID-19," *Sensors*, vol. 22, no. 19. MDPI, Oct. 01, 2022. doi: 10.3390/s22197423.
- [43] U.S. Food and D. Administration, "Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Informs Public About Possible Accuracy Concerns with Abbott ID NOW Point-of-Care Test." 2020. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-informs-public-about-possible-accuracy-concerns-abbott-id-now-point>
- [44] M. Rostami and H. Mansouritorghabeh, "D-dimer level in COVID-19 infection: a systematic review," *Expert Rev Hematol*, vol. 13, no. 11, pp. 1265–1275, Nov. 2020, doi: 10.1080/17474086.2020.1831383.
- [45] Inc. Getein Biotech, "One Step Test for Novel Coronavirus (2019-nCoV) IgM/IgG antibody." 2020. [Online]. Available: <https://www.assaygenie.com/content/One>
- [46] L. Zou *et al.*, "SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients," *New England Journal of Medicine*, vol. 382, no. 12, pp. 1177–1179, Mar. 2020, doi: 10.1056/NEJMc2001737.
- [47] D. V. Pachito, Â. M. Bagattini, and R. Riera, "TESTES DIAGNÓSTICOS PARA INFECÇÃO POR COVID-19. Síntese de evidências." 2020.

- [48] S. Samadzadeh, B. Nakstad, Z. Jamalpoor, and A. Tahamtan, "COVID-19 diagnosis: lessons to learn and hints for preparedness," *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 22, no. 9. Taylor and Francis Ltd., pp. 851–853, 2022. doi: 10.1080/14737159.2022.2132852.
- [49] Y. Zhou, L. Zhang, Y. H. Xie, and J. Wu, "Advancements in detection of SARS-CoV-2 infection for confronting COVID-19 pandemics," *Laboratory Investigation*, vol. 102, no. 1. Springer Nature, pp. 4–13, Jan. 01, 2022. doi: 10.1038/s41374-021-00663-w.
- [50] S. Chupradit *et al.*, "Various types of electrochemical biosensors for leukemia detection and therapeutic approaches," *Anal Biochem*, vol. 654, p. 114736, Oct. 2022, doi: 10.1016/j.ab.2022.114736.
- [51] B. G. Andryukov, I. N. Lyapun, E. V. Matosova, and L. M. Somova, "Biosensor Technologies in Medicine: from Detection of Biochemical Markers to Research into Molecular Targets (Review)," *Sovremennye tehnologii v medicine*, vol. 12, no. 6, p. 70, Dec. 2020, doi: 10.17691/stm2020.12.6.09.
- [52] N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, and P. Estrela, "Introduction to biosensors," *Essays Biochem*, vol. 60, no. 1, pp. 1–8, Jun. 2016, doi: 10.1042/EBC20150001.
- [53] B. Bohunicky and S. Mousa, "Biosensors: the new wave in cancer diagnosis," *Nanotechnol Sci Appl*, p. 1, Dec. 2010, doi: 10.2147/NSA.S13465.
- [54] B. D. Malhotra and Md. A. Ali, "Nanomaterials in Biosensors," in *Nanomaterials for Biosensors*, Elsevier, 2018, pp. 1–74. doi: 10.1016/b978-0-323-44923-6.00001-7.
- [55] R. Sunasee and R. Narain, *Chemistry of Bioconjugates - Synthesis, Characterization, and Biomedical Application*. John Wiley & Sons, 2014.
- [56] S. Khan, B. Burciu, C. D. M. Filipe, Y. Li, K. Dellinger, and T. F. Didar, "DNAzyme-Based Biosensors: Immobilization Strategies, Applications, and Future Prospective," *ACS Nano*, vol. 15, no. 9. American Chemical Society, pp. 13943–13969, Sep. 28, 2021. doi: 10.1021/acsnano.1c04327.
- [57] J. I. A. Rashid and N. A. Yusof, "The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review," *Sensing and Bio-Sensing Research*, vol. 16. Elsevier B.V., pp. 19–31, Nov. 01, 2017. doi: 10.1016/j.sbsr.2017.09.001.
- [58] K. Thapa, W. Liu, and R. Wang, "Nucleic acid-based electrochemical biosensor: Recent advances in probe immobilization and signal amplification strategies," *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 14, no. 1. John Wiley and Sons Inc, Jan. 01, 2022. doi: 10.1002/wnan.1765.
- [59] F. Rodrigues Ribeiro Teles, D. Miguel França dos Prazeres, and J. Luiz de Lima-Filho, "Electrochemical Detection of a Dengue-related Oligonucleotide Sequence Using Ferrocenium as a Hybridization Indicator," *Sensors*, vol. 7, pp. 2510–2518, 2007, [Online]. Available: www.mdpi.org/sensors

- [60] G. A. Nascimento *et al.*, “Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode,” *Biosens Bioelectron*, vol. 38, no. 1, pp. 61–66, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.bios.2012.04.052.
- [61] B. Saoudi *et al.*, “Study of DNA adsorption on polypyrrole: interest of dielectric monitoring,” *Sens Actuators B Chem*, vol. 62, no. 1, pp. 35–42, Jan. 2000, doi: 10.1016/S0925-4005(99)00356-1.
- [62] Q. Zheng *et al.*, “An electrochemical DNA sensor based on polyaniline/graphene: high sensitivity to DNA sequences in a wide range,” *Analyst*, vol. 140, no. 19, pp. 6660–6670, 2015, doi: 10.1039/C5AN01088H.
- [63] S. M. Sheta *et al.*, “A novel HCV electrochemical biosensor based on a polyaniline@Ni-MOF nanocomposite,” *Dalton Transactions*, vol. 49, no. 26, pp. 8918–8926, Jul. 2020, doi: 10.1039/d0dt01408g.
- [64] N. Oliveira *et al.*, “A Sensitive and Selective Label-Free Electrochemical DNA Biosensor for the Detection of Specific Dengue Virus Serotype 3 Sequences,” *Sensors*, vol. 15, no. 7, pp. 15562–15577, Jul. 2015, doi: 10.3390/s150715562.
- [65] V. Gerbreder *et al.*, “ZnO nanostructure-based electrochemical biosensor for *Trichinella* DNA detection,” *Sens Biosensing Res*, vol. 23, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.sbsr.2019.100276.
- [66] J. Choi, J. H. Lim, S. Rho, D. Jahng, J. Lee, and K. J. Kim, “Nanoporous niobium oxide for label-free detection of DNA hybridization events,” *Talanta*, vol. 74, no. 4, pp. 1056–1059, Jan. 2008, doi: 10.1016/j.talanta.2007.07.007.
- [67] M. Pividori, “Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods,” *Biosens Bioelectron*, vol. 15, no. 5–6, pp. 291–303, Aug. 2000, doi: 10.1016/S0956-5663(00)00071-3.
- [68] F. v. Oberhaus, D. Frense, and D. Beckmann, “Immobilization Techniques for Aptamers on Gold Electrodes for the Electrochemical Detection of Proteins: A Review,” *Biosensors (Basel)*, vol. 10, no. 5, p. 45, Apr. 2020, doi: 10.3390/bios10050045.
- [69] M. K. Patel, P. R. Solanki, S. Khandelwal, V. v. Agrawal, S. G. Ansari, and B. D. Malhotra, “Self-assembled monolayer based electrochemical nucleic acid sensor for *Vibrio cholerae* detection,” in *Journal of Physics: Conference Series*, Institute of Physics Publishing, 2012. doi: 10.1088/1742-6596/358/1/012009.
- [70] Y. Sun, X. He, J. Ji, M. Jia, Z. Wang, and X. Sun, “A highly selective and sensitive electrochemical CS-MWCNTs/Au-NPs composite DNA biosensor for *Staphylococcus aureus* gene sequence detection,” *Talanta*, vol. 141, pp. 300–306, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.talanta.2015.03.052.

- [71] X. Ma, X. Li, G. Luo, and J. Jiao, "DNA-functionalized gold nanoparticles: Modification, characterization, and biomedical applications," *Front Chem*, vol. 10, Dec. 2022, doi: 10.3389/fchem.2022.1095488.
- [72] M. Dash, F. Chiellini, R. M. Ottenbrite, and E. Chiellini, "Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications," *Progress in Polymer Science (Oxford)*, vol. 36, no. 8. Elsevier Ltd, pp. 981–1014, 2011. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001.
- [73] E.-S. Paik, Y.-R. Kim, and H.-G. Hong, "Amperometric Glucose Biosensor Utilizing Zinc Oxide-chitosan-glucose Oxidase Hybrid Composite Films on Electrodeposited Pt-Fe(III)," *Analytical Sciences*, vol. 34, no. 11, pp. 1271–1276, Nov. 2018, doi: 10.2116/analsci.18P054.
- [74] S. Taufik, A. Yusof, T. W. Tee, and I. Ramli, "Bismuth Oxide Nanoparticles/Chitosan/Modified Electrode as Biosensor for DNA Hybridization," 2011. [Online]. Available: www.electrochemsci.org
- [75] F. R. R. Teles and L. P. Fonseca, "Trends in DNA biosensors," *Talanta*, vol. 77, no. 2. Elsevier, pp. 606–623, Dec. 15, 2008. doi: 10.1016/j.talanta.2008.07.024.
- [76] S. Yu. Zaitsev, A. A. Savina, and I. S. Zaitsev, "Biochemical aspects of lipase immobilization at polysaccharides for biotechnology," *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 272, p. 102016, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.cis.2019.102016.
- [77] G. Ozyilmaz and E. Yağız, "Isoamylacetate production by entrapped and covalently bound *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipases," *Food Chem*, vol. 135, no. 4, pp. 2326–2332, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.062.
- [78] M. D. de Mello, D. Cordeiro, L. T. Costa, and C. Follmer, "Catalytic properties of lipases immobilized onto ultrasound-treated chitosan supports," *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 18, no. 6, pp. 1090–1100, Nov. 2013, doi: 10.1007/s12257-013-0285-5.
- [79] I. Migneault, C. Dartiguenave, M. J. Bertrand, and K. C. Waldron, "Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking," *Biotechniques*, vol. 37, no. 5, pp. 790–802, Nov. 2004, doi: 10.2144/04375RV01.
- [80] S. Helali *et al.*, "Functionalization of niobium electrodes for the construction of impedimetric biosensors," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 28, no. 5–6, pp. 826–830, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.msec.2007.10.078.
- [81] C.-H. Kao *et al.*, "Multi-analyte biosensors on a CF₄ plasma treated Nb₂O₅-based membrane with an extended gate field effect transistor structure," *Sens Actuators B Chem*, vol. 194, pp. 419–426, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.snb.2013.12.056.

- [82] S. Niyomdechcha *et al.*, “Phage-based capacitive biosensor for Salmonella detection,” *Talanta*, vol. 188, pp. 658–664, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.talanta.2018.06.033.
- [83] M. D. L. Oliveira, C. A. S. Andrade, M. T. S. Correia, L. C. B. B. Coelho, P. R. Singh, and X. Zeng, “Impedimetric biosensor based on self-assembled hybrid cystein-gold nanoparticles and CramoLL lectin for bacterial lipopolysaccharide recognition,” *J Colloid Interface Sci*, vol. 362, no. 1, pp. 194–201, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.jcis.2011.06.042.
- [84] G.-C. Chen, C.-H. Liu, and W.-C. Wu, “Electrochemical immunosensor for serum parathyroid hormone using voltammetric techniques and a portable simulator,” *Anal Chim Acta*, vol. 1143, pp. 84–92, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.aca.2020.11.045.
- [85] Z. Sarfraz, A. Sarfraz, H. M. Iftikar, and R. Akhund, “Is COVID-19 pushing us to the Fifth Industrial Revolution (Society 5.0)?,” *Pak J Med Sci*, vol. 37, no. 2, Feb. 2021, doi: 10.12669/pjms.37.2.3387.
- [86] M. Roser, E. Ortiz-Ospina, and H. Ritchie, “Life Expectancy - Our World in Data.” Accessed: Jan. 29, 2023. [Online]. Available: <https://ourworldindata.org/life-expectancy#:~:text=The%20term%20“life%20expectancy”%20refers,will%20be%20when%20they%20die.>
- [87] J. Byrne and R. Dahm R., “Friedrich Miescher and the 150th anniversary of the discovery of DNA,” *Biomics*, vol. 11, no. 3, pp. 249–258, 2019, doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-23.
- [88] J. D. WATSON and F. H. C. CRICK, “Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid,” *Nature*, vol. 171, no. 4356, pp. 737–738, Apr. 1953, doi: 10.1038/171737a0.
- [89] “A descoberta do DNA e o projeto genoma,” *Rev Assoc Med Bras*, vol. 51, no. 1, Feb. 2005, doi: 10.1590/S0104-42302005000100001.
- [90] O. Ableitner, *Introduction to Molecular Biology*. Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden, 2022. doi: 10.1007/978-3-658-33920-3.
- [91] B. Lubas and T. Wilczok, “Effect of ionic strength on DNA hydration during thermal helix-coil transition,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, vol. 224, no. 1, pp. 1–9, Nov. 1970, doi: 10.1016/0005-2787(70)90614-3.
- [92] Y. You, “Understanding melting temperature (Tm) - Integrated DNA Technologies, Inc.” Accessed: Jan. 29, 2023. [Online]. Available: [https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/understanding-melting-temperature-\(t-sub-m-sub-\)](https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/understanding-melting-temperature-(t-sub-m-sub-))
- [93] W. Rychlik, W. J. Spencer, and R. E. Rhoads, “Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro* ;,” *Nucleic Acids Res*, vol. 18, no. 21, pp. 6409–6412, 1990, doi: 10.1093/nar/18.21.6409.

- [94] T. A. Leski *et al.*, "Use of real-time multiplex PCR, malaria rapid diagnostic test and microscopy to investigate the prevalence of Plasmodium species among febrile hospital patients in Sierra Leone," *Malar J*, vol. 19, no. 1, p. 84, Dec. 2020, doi: 10.1186/s12936-020-03163-2.
- [95] Centers for Disease Control and Prevention, "Research Use Only 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR Primer and Probe Information." 2020. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>
- [96] P. Mahmoodi *et al.*, "Early-stage cervical cancer diagnosis based on an ultra-sensitive electrochemical DNA nanobiosensor for HPV-18 detection in real samples," *J Nanobiotechnology*, vol. 18, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.1186/s12951-020-0577-9.
- [97] Z. Guler Gokce, P. Akalın, F. N. Kok, and A. S. Sarac, "Impedimetric DNA biosensor based on polyurethane/poly(m-anthranilic acid) nanofibers," *Sens Actuators B Chem*, vol. 254, pp. 719–726, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.snb.2017.07.136.
- [98] Y. H. Lee and R. Mutharasan, "Biosensors," in *Sensor Technology Handbook*, Elsevier, 2005, pp. 161–180. doi: 10.1016/B978-075067729-5/50046-X.
- [99] A. Kawamura and T. Miyata, "Biosensors," in *Biomaterials Nanoarchitectonics*, Elsevier, 2016, pp. 157–176. doi: 10.1016/B978-0-323-37127-8.00010-8.
- [100] T. A. R. Cordeiro, M. A. C. de Resende, S. C. dos S. Moraes, D. L. Franco, A. C. Pereira, and L. F. Ferreira, "Electrochemical biosensors for neglected tropical diseases: A review," *Talanta*, vol. 234, p. 122617, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.talanta.2021.122617.
- [101] W. J. Guan and X. G. Gong, "Development of the portable blood glucose meter," *Chinese journal of medical instrumentation*, vol. 24, no. 6, pp. 321–323, Nov. 2000, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12583250>
- [102] E. Cesewski and B. N. Johnson, "Electrochemical biosensors for pathogen detection," *Biosens Bioelectron*, vol. 159, p. 112214, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.bios.2020.112214.
- [103] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods - Fundamentals and Applications*, 2^a Edição. Wiley, 2001.
- [104] N. Elgrishi, K. J. Rountree, B. D. McCarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart, and J. L. Dempsey, "A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry," *J Chem Educ*, vol. 95, no. 2, pp. 197–206, Feb. 2018, doi: 10.1021/acs.jchemed.7b00361.
- [105] C. M. A. Brett and A. M. O. Brett, *Electrochemistry - Principles, Methods, and Applications*. Oxford University Press, 1993.
- [106] C. Singhal, C. S. Pundir, and J. Narang, "A genosensor for detection of consensus DNA sequence of Dengue virus using ZnO/Pt-Pd nanocomposites,"

- Biosens Bioelectron*, vol. 97, pp. 75–82, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.bios.2017.05.047.
- [107] C. Singhal, M. Khanuja, N. Chaudhary, C. S. Pundir, and J. Narang, “Detection of chikungunya virus DNA using two-dimensional MoS₂ nanosheets based disposable biosensor,” *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-25824-8.
- [108] K. Y. P. S. Avelino, L. S. Oliveira, H. P. de Oliveira, N. Lucena-Silva, C. A. S. Andrade, and M. D. L. Oliveira, “Impedimetric sensing platform for human papillomavirus and p53 tumor suppressor gene in cervical samples,” *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, vol. 7, no. 1, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.jsamd.2021.100411.
- [109] K. Y. P. S. Avelino, L. S. Oliveira, N. Lucena-Silva, C. A. S. Andrade, and M. D. L. Oliveira, “Flexible sensor based on conducting polymer and gold nanoparticles for electrochemical screening of HPV families in cervical specimens,” *Talanta*, vol. 226, May 2021, doi: 10.1016/j.talanta.2021.122118.
- [110] A. Santos, “Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors,” *J Anal Bioanal Tech*, vol. S7, no. 012, 2014, doi: 10.4172/2155-9872.s7-016.
- [111] J. R. Macdonald, *Encyclopedia of Physical Science and Technology - Impedance Spectroscopy*, 3^a Edição. Academic Press Inc, 2001.
- [112] H. S. Magar, R. Y. A. Hassan, and A. Mulchandani, “Electrochemical impedance spectroscopy (Eis): Principles, construction, and biosensing applications,” *Sensors*, vol. 21, no. 19. MDPI, Oct. 01, 2021. doi: 10.3390/s21196578.
- [113] W. Zhang *et al.*, “Electrochemical biosensors for measurement of colorectal cancer biomarkers,” *Anal Bioanal Chem*, vol. 413, no. 9, pp. 2407–2428, Apr. 2021, doi: 10.1007/s00216-021-03197-8.
- [114] M. L. Mujica *et al.*, “Impedimetric and amperometric genosensors for the highly sensitive quantification of SARS-CoV-2 nucleic acid using an avidin-functionalized multi-walled carbon nanotubes biocapture platform,” *Biosens Bioelectron X*, vol. 12, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.biosx.2022.100222.
- [115] R. Nazari-Vanani, H. Heli, and N. Sattarahmady, “An impedimetric genosensor for *Leishmania infantum* based on electrodeposited cadmium sulfide nanosheets,” *Talanta*, vol. 217, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.talanta.2020.121080.
- [116] A. Lomae *et al.*, “Label free electrochemical DNA biosensor for COVID-19 diagnosis,” *Talanta*, vol. 253, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.talanta.2022.123992.
- [117] A. Yakoh, U. Pimpitak, S. Rengpipat, N. Hirankarn, O. Chailapakul, and S. Chaiyo, “Paper-based electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: Detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen,” *Biosens Bioelectron*, vol. 176, p. 112912, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.bios.2020.112912.

- [118] J. Tian, Z. Liang, O. Hu, Q. He, D. Sun, and Z. Chen, "An electrochemical dual-aptamer biosensor based on metal-organic frameworks MIL-53 decorated with Au@Pt nanoparticles and enzymes for detection of COVID-19 nucleocapsid protein," *Electrochim Acta*, vol. 387, p. 138553, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.electacta.2021.138553.
- [119] A. Raziq, A. Kidakova, R. Boroznjak, J. Reut, A. Öpik, and V. Syritski, "Development of a portable MIP-based electrochemical sensor for detection of SARS-CoV-2 antigen," *Biosens Bioelectron*, vol. 178, p. 113029, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.bios.2021.113029.
- [120] E. Karakuş, E. Erdemir, N. Demirbilek, and L. Liv, "Colorimetric and electrochemical detection of SARS-CoV-2 spike antigen with a gold nanoparticle-based biosensor," *Anal Chim Acta*, vol. 1182, p. 338939, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.aca.2021.338939.
- [121] R. M. Torrente-Rodríguez *et al.*, "SARS-CoV-2 RapidPlex: A Graphene-Based Multiplexed Telemedicine Platform for Rapid and Low-Cost COVID-19 Diagnosis and Monitoring," *Matter*, vol. 3, no. 6, pp. 1981–1998, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.matt.2020.09.027.
- [122] H. Wang, Y. Liu, J. Wang, B. Xiong, and X. Hou, "Electrochemical impedance biosensor array based on DNAzyme-functionalized single-walled carbon nanotubes using Gaussian process regression for Cu(II) and Hg(II) determination," *Microchimica Acta*, vol. 187, no. 4, p. 207, Apr. 2020, doi: 10.1007/s00604-020-4202-2.
- [123] C. I. L. Justino, A. R. Gomes, A. C. Freitas, A. C. Duarte, and T. A. P. Rocha-Santos, "Graphene based sensors and biosensors," *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 91, pp. 53–66, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.trac.2017.04.003.
- [124] N. Ibrahim, N. D. Jamaluddin, L. L. Tan, and N. Y. Mohd Yusof, "A Review on the Development of Gold and Silver Nanoparticles-Based Biosensor as a Detection Strategy of Emerging and Pathogenic RNA Virus," *Sensors*, vol. 21, no. 15, p. 5114, Jul. 2021, doi: 10.3390/s21155114.
- [125] K. Kalantar-zadeh and J. Z. Ou, "Biosensors Based on Two-Dimensional MoS₂," *ACS Sens*, vol. 1, no. 1, pp. 5–16, Jan. 2016, doi: 10.1021/acssensors.5b00142.
- [126] E. O. Polat *et al.*, "Transducer Technologies for Biosensors and Their Wearable Applications," *Biosensors (Basel)*, vol. 12, no. 6, p. 385, Jun. 2022, doi: 10.3390/bios12060385.
- [127] X. Fang *et al.*, "New Ultraviolet Photodetector Based on Individual Nb₂O₅ Nanobelts," *Adv Funct Mater*, vol. 21, no. 20, pp. 3907–3915, Oct. 2011, doi: 10.1002/adfm.201100743.
- [128] Y. Shan *et al.*, "Niobium pentoxide: a promising surface-enhanced Raman scattering active semiconductor substrate," *NPJ Comput Mater*, vol. 3, no. 1, p. 11, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41524-017-0008-0.

- [129] C. Bruziquesi, J. Balena, M. Pereira, A. Silva, and L. Oliveira, "NIÓBIO: UM ELEMENTO QUÍMICO ESTRATÉGICO PARA O BRASIL," *Quim Nova*, 2019, doi: 10.21577/0100-4042.20170442.
- [130] J. D. B. D. Moreira, P. H. C. de Souza, I. C. D. S. Silva, R. C. S. Araújo, C. N. C. Corgozinho, and D. B. de Rezende, "Uso de compostos de nióbio como catalisadores na produção de biocombustíveis: uma revisão," *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, vol. 8, no. 1, Jan. 2022, doi: 10.18540/jcecvl8iss1pp13417-01-30e.
- [131] A. S. Maghsoudi, S. Hassani, K. Mirnia, and M. Abdollahi, "Recent advances in nanotechnology-based biosensors development for detection of arsenic, lead, mercury, and cadmium," *Int J Nanomedicine*, vol. 16, pp. 803–832, 2021, doi: 10.2147/IJN.S294417.
- [132] I. E. Tothill, "Biosensors for cancer markers diagnosis," *Semin Cell Dev Biol*, vol. 20, no. 1, pp. 55–62, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.semcdb.2009.01.015.
- [133] W. U. Wang, C. Chen, K. -h. Lin, Y. Fang, and C. M. Lieber, "Label-free detection of small-molecule-protein interactions by using nanowire nanosensors," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 102, no. 9, pp. 3208–3212, Mar. 2005, doi: 10.1073/pnas.0406368102.
- [134] M. Li, R. Singh, M. S. Soares, C. Marques, B. Zhang, and S. Kumar, "Convex fiber-tapered seven core fiber-convex fiber (CTC) structure-based biosensor for creatinine detection in aquaculture," *Opt Express*, vol. 30, no. 8, p. 13898, Apr. 2022, doi: 10.1364/OE.457958.
- [135] O. I. Guliy *et al.*, "Microbial acoustic sensor test-system based on a piezoelectric resonator with a lateral electric field for kanamycin detection in liquid," *Ultrasonics*, vol. 120, p. 106651, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.ultras.2021.106651.
- [136] J. A. Capobianco, W.-H. Shih, J.-H. Leu, G. C.-F. Lo, and W. Y. Shih, "Label free detection of white spot syndrome virus using lead magnesium niobate–lead titanate piezoelectric microcantilever sensors," *Biosens Bioelectron*, vol. 26, no. 3, pp. 964–969, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.bios.2010.08.004.
- [137] J. P. Marco, K. B. Borges, C. R. T. Tarley, E. S. Ribeiro, and A. C. Pereira, "Development and application of an electrochemical biosensor based on carbon paste and silica modified with niobium oxide, alumina and DNA (SiO₂/Al₂O₃/Nb₂O₅/DNA) for amitriptyline determination," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 704, pp. 159–168, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.jelechem.2013.06.021.
- [138] X. Xu, B. Z. Tian, J. L. Kong, S. Zhang, B. H. Liu, and D. Y. Zhao, "Ordered Mesoporous Niobium Oxide Film: A Novel Matrix for Assembling Functional Proteins for Bioelectrochemical Applications," *Advanced Materials*, vol. 15, no. 22, pp. 1932–1936, Nov. 2003, doi: 10.1002/adma.200305424.
- [139] M. Song, S. Pang, F. Guo, M. Wong, and J. Hao, "Fluoride-Free 2D Niobium Carbide MXenes as Stable and Biocompatible Nanoplatfoms for

- Electrochemical Biosensors with Ultrahigh Sensitivity,” *Advanced Science*, vol. 7, no. 24, p. 2001546, Dec. 2020, doi: 10.1002/adv.202001546.
- [140] B. Dey, Md. W. Ahmad, G. Sarkhel, G. Ho Lee, and A. Choudhury, “Fabrication of niobium metal organic frameworks anchored carbon nanofiber hybrid film for simultaneous detection of xanthine, hypoxanthine and uric acid,” *Microchemical Journal*, vol. 186, p. 108295, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.microc.2022.108295.
- [141] E. J. Pacheco Sampaio *et al.*, “Highly ordered nanotubular niobium oxide obtained by self-organizing anodization: A study of capacitive behavior,” *Ceram Int*, vol. 48, no. 17, pp. 25424–25430, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.ceramint.2022.05.219.
- [142] A. G. dos Santos Júnior and C. de F. Malfatti, “Membrana ou Filme autossuportado de óxido nanoestruturado à base de nióbio.,” BR10202301014, May 2023
- [143] S. Nimse, K. Song, M. Sonawane, D. Sayyed, and T. Kim, “Immobilization Techniques for Microarray: Challenges and Applications,” *Sensors*, vol. 14, no. 12, pp. 22208–22229, Nov. 2014, doi: 10.3390/s141222208.
- [144] F. Rizzotto *et al.*, “Recent Advances in Electrochemical Biosensors for Food Control,” *Micromachines (Basel)*, vol. 14, no. 7, p. 1412, Jul. 2023, doi: 10.3390/mi14071412.
- [145] K. Y. P. S. Avelino, L. S. Oliveira, M. R. Santos, N. Lucena-Silva, C. A. S. Andrade, and M. D. L. Oliveira, “Electrochemical DNA biosensor for chronic myelocytic leukemia based on hybrid nanostructure,” *Bioelectrochemistry*, vol. 147, p. 108176, Oct. 2022, doi: 10.1016/j.bioelechem.2022.108176.
- [146] A. Javed, S. R. Abbas, M. U. Hashmi, N. U. A. Babar, and I. Hussain, “Graphene Oxide Based Electrochemical Genosensor for Label Free Detection of Mycobacterium tuberculosis from Raw Clinical Samples,” *Int J Nanomedicine*, vol. Volume 16, pp. 7339–7352, Nov. 2021, doi: 10.2147/IJN.S326480.
- [147] F. Maleki *et al.*, “Detection of receptor tyrosine kinase-orphan receptor-2 using an electrochemical immunosensor modified with electrospun nanofibers comprising polyvinylpyrrolidone, soy, and gold nanoparticles,” *Microchimica Acta*, vol. 190, no. 10, p. 418, Oct. 2023, doi: 10.1007/s00604-023-06002-8.
- [148] Annu and A. N. Raja, “Recent development in chitosan-based electrochemical sensors and its sensing application,” *Int J Biol Macromol*, vol. 164, pp. 4231–4244, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.012.
- [149] B. Rezaei, H. R. Jamei, and A. A. Ensafi, “An ultrasensitive and selective electrochemical aptasensor based on rGO-MWCNTs/Chitosan/carbon quantum dot for the detection of lysozyme,” *Biosens Bioelectron*, vol. 115, pp. 37–44, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.bios.2018.05.012.
- [150] X. Sun, Y. Cao, Z. Gong, X. Wang, Y. Zhang, and J. Gao, “An Amperometric Immunosensor Based on Multi-Walled Carbon Nanotubes-Thionine-Chitosan

- Nanocomposite Film for Chlorpyrifos Detection,” *Sensors*, vol. 12, no. 12, pp. 17247–17261, Dec. 2012, doi: 10.3390/s121217247.
- [151] K. Malecka *et al.*, “Voltammetric Detection of a Specific DNA Sequence of Avian Influenza Virus H5N1 Using HS-ssDNA Probe Deposited onto Gold Electrode,” *Electroanalysis*, vol. 24, no. 2, pp. 439–446, Feb. 2012, doi: 10.1002/elan.201100566.
- [152] H. Abdulkarim and M. Siaj, “Label-free multiplex electrochemical immunosensor for early diagnosis of lysosomal storage disorders,” *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, p. 9334, Jun. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-13259-1.
- [153] S. B. Adeloju and A. T. Lawal, “Fabrication of a bilayer potentiometric phosphate biosensor by cross-link immobilization with bovine serum albumin and glutaraldehyde,” *Anal Chim Acta*, vol. 691, no. 1–2, pp. 89–94, Apr. 2011, doi: 10.1016/j.aca.2011.02.020.
- [154] C. Deng *et al.*, “Impedimetric Aptasensor with Femtomolar Sensitivity Based on the Enlargement of Surface-Charged Gold Nanoparticles,” *Anal Chem*, vol. 81, no. 2, pp. 739–745, Jan. 2009, doi: 10.1021/ac800958a.
- [155] L. J. Lapidus, “Protein unfolding mechanisms and their effects on folding experiments,” *F1000Res*, vol. 6, p. 1723, Sep. 2017, doi: 10.12688/f1000research.12070.1.
- [156] M.-B. Gholivand and A. Akbari, “A sensitive electrochemical genosensor for highly specific detection of thalassemia gene,” *Biosens Bioelectron*, vol. 129, pp. 182–188, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.bios.2019.01.017.
- [157] P. Gallay, M. López Mujica, S. Bollo, and G. Rivas, “Genosensing Applications of Glassy Carbon Electrodes Modified with Multi-Walled Carbon Nanotubes Non-Covalently Functionalized with Polyarginine,” *Micromachines (Basel)*, vol. 13, no. 11, p. 1978, Nov. 2022, doi: 10.3390/mi13111978.
- [158] B. Golichenari *et al.*, “Electrochemical-based biosensors for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and tuberculosis biomarkers,” *Crit Rev Biotechnol*, vol. 39, no. 8, pp. 1056–1077, Nov. 2019, doi: 10.1080/07388551.2019.1668348.
- [159] K. Y. P. S. Avelino, L. S. Oliveira, N. Lucena-Silva, C. P. de Melo, C. A. S. Andrade, and M. D. L. Oliveira, “Metal-polymer hybrid nanomaterial for impedimetric detection of human papillomavirus in cervical specimens,” *J Pharm Biomed Anal*, vol. 185, p. 113249, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.jpba.2020.113249.
- [160] C.-C. Wu, H.-Y. Yen, L.-T. Lai, G.-C. Perng, C.-R. Lee, and S.-J. Wu, “A Label-Free Impedimetric Genosensor for the Nucleic Acid Amplification-Free Detection of Extracted RNA of Dengue Virus,” *Sensors*, vol. 20, no. 13, p. 3728, Jul. 2020, doi: 10.3390/s20133728.

- [161] J. M. R. Flauzino *et al.*, "Label-free and reagentless electrochemical genosensor based on graphene acid for meat adulteration detection," *Biosens Bioelectron*, vol. 195, p. 113628, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.bios.2021.113628.
- [162] S. M. A. Daraghma, S. Talebi, and V. Periasamy, "Understanding the electronic properties of single- and double-stranded DNA," *The European Physical Journal E*, vol. 43, no. 6, p. 40, Jun. 2020, doi: 10.1140/epje/i2020-11965-8.
- [163] "Northern and Southern Blot Protocols & Introduction," Merck. Accessed: Jan. 14, 2024. [Online]. Available: https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/protocol/protein-biology/gel-electrophoresis/southern-and-northern-blotting?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=19329107722&utm_content=141938264102&gclid=CjwKCAiAzJOtBhALEiwAtwj8tngCMvhcdztbTw5L4yQ8kqo-mvQVAsfQHYHVFgqV813bYZBrtJ2KOBoC4NQQAvD_BwE
- [164] B. Xu, D. Zheng, W. Qiu, F. Gao, S. Jiang, and Q. Wang, "An ultrasensitive DNA biosensor based on covalent immobilization of probe DNA on fern leaf-like α -Fe₂O₃ and chitosan Hybrid film using terephthalaldehyde as arm-linker," *Biosens Bioelectron*, vol. 72, pp. 175–181, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.bios.2015.05.015.

ANEXO I

Submissão de pedido de patente



870230107676
06/12/2023 15:44

29409162308042571

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2023 025640 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 92969856000198

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AV. PAULO GAMA Nº 110, 6º ANDAR, CENTRO, PORTO ALEGRE, RS, BRASIL

Cidade: Porto Alegre

Estado: RS

CEP: 90040-060

País: Brasil

Telefone: (51)3308.3800

Fax: (51)3308.4237

Email: propriedadeintelectual@ufrgs.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em
06/12/2023 às 15:44, Petição 870230107676

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO VERSÁTIL FEITO COM ELETRODO COMPOSTO POR FILME DE NANOFIOS DE ÓXIDO À BASE DE NIÓBIO BIOFUNCIONALIZADO COM BIORECEPTORES

Resumo: A presente invenção refere-se a um biossensor eletroquímico versátil constituído de eletrodo feito com filme de nanofios de óxido à base de nióbio biofuncionalizado com bioreceptores. A invenção inclui a elaboração do eletrodo; a imobilização da biomolécula de reconhecimento (bioreceptor); a funcionalização do óxido nanoestruturado quando necessário; o eletrodo biofuncionalizado e os métodos de detecção. O eletrodo contendo o filme de óxido nanoestruturado à base de nióbio se caracteriza pela versatilidade pois pode ser suportado em diversos coletores de corrente. A biomolécula de reconhecimento pode ser ácidos nucleicos, como DNA, RNA ou Aptâmeros, ou proteínas como anticorpos, antígenos ou enzimas, entre outros. A imobilização da biomolécula de reconhecimento pode ser eletrostática ou covalente. O Biossensor eletroquímico proposto permite a flexibilização dos possíveis agentes a serem detectados (vírus, bactérias, substratos enzimáticos, entre outros) por meio da modificação da biomolécula de reconhecimento imobilizada e/ou do coletor de corrente utilizado (versatilidade quanto ao meio analisado (pH básico, neutro ou ácido). A detecção é feita por meio da captação de um sinal eletroquímico proveniente da interação entre a biomolécula de reconhecimento e do elemento de interesse, podendo ter como alvo: biomoléculas, elementos químicos, íons, moléculas, compostos químicos, entre outros.

Figura a publicar: 14

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 06/12/2023 às 15:44, Petição 870230107676

ANEXO II

Self-supporting (free-standing) sodium niobate nanowires film

Manuscrito elaborado de acordo com
as normas e em processo de
submissão à revista *Ceramic
International* na forma de *Short
Communication*
ISSN: 0272-8842

O texto do Anexo II, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 187 – 195, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta do desenvolvimento e caracterização da obtenção de camada de nanofios de niobato de sódio.

ANEXO III

Efeito do eletrólito na detecção de ssDNA imobilizado em eletrodo funcionalizado de FTO para aplicação com biossensor eletroquímico

Manuscrito de revisão em processo de
construção na forma de *Research
Article*

O manuscrito foi redigido em língua portuguesa e será traduzido para o idioma inglês após a revisão da banca.

O texto do Anexo III, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 199 – 213, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta do estudo do impacto de diferentes eletrólitos na resposta eletroquímica de genossensores.

Parecer consubstanciado aprovado – Comitê de Ética em Pesquisa HCPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Validação de biossensores de nióbio para identificação de infecção por SARS-CoV-2.

Pesquisador: Fernanda de Paris

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 66395622.5.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: FIPE/HCPA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.875.043

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo do projeto e das Informações Básicas da Pesquisa "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS__DO_PROJETO_2031871", de 19/01/2023.

Em março de 2020 a OMS decretou estado de pandemia pela doença causada pelo novo coronavírus, SARS-CoV-2, denominada de COVID-19. Até início de agosto de 2021 já foram registradas mais de 200 milhões de pessoas com diagnóstico confirmado e taxas de mortalidade que atingem aproximadamente 2,1%. Infelizmente, esses números não representam o real cenário da doença, pois existe uma grande subnotificação, basicamente proporcionada pela falta de testagem de pacientes suspeitos, especialmente em países dependentes da importação de kits e insumos laboratoriais. Além disso, os testes usualmente utilizados necessitam de estrutura e recursos humanos especializados (RT- qPCR) ou apresentam baixa sensibilidade e não detectam a infecção no período de janela imunológica (testes rápidos para IgG e IgM). Considerando o cenário exposto, este projeto visa ao desenvolvimento de um biossensor eletroquímico a base de nióbio nanoestruturado com sondas de ácidos nucleicos imobilizadas para a identificação de SARS-CoV-2 em amostras respiratórias. Propomos aqui a obtenção das nanoestruturas, a imobilização, e a caracterização físico-química, morfológica e eletroquímica do dispositivo, bem como a avaliação de eficácia e seletividade em comparação aos testes atualmente empregados. Fundamentalmente,

Endereço: Av. Protásio Alves, 211 Portão 4 Bloco C 5º andar
Bairro: Rio Branco **CEP:** 90.410-000
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-6246 **Fax:** (51)3359-6246 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br



Continuação do Parecer: 5.875.043

pretende-se o desenvolvimento de uma tecnologia de elevado desempenho analítico a partir de insumos disponíveis no mercado nacional, uma ferramenta laboratorial de execução rápida e sem necessidade de estrutura complexa e a baixo custo. Ainda, uma vez validada, a metodologia poderá ser adaptada para identificação de outros agentes infecciosos além do SARS-CoV-2 como a configuração de painéis de agentes infecciosos múltiplos.

Objetivo da Pesquisa:

Este projeto tem o objetivo de validar um biossensor eletroquímico à base de óxidos de nióbio nanoestruturado para aplicação no diagnóstico de SARS-CoV-2.

Objetivos específicos:

- a) Imobilização do elemento de reconhecimento de detecção viral (fitas simples de DNA complementar ao RNA viral de SARS-CoV-2) ao eletrodo teste;
- b) Imobilização do elemento de reconhecimento de controle interno da amostra (fitas simples de DNA complementar ao RNA mensageiro de RNase P humana) ao eletrodo controle;
- c) Caracterização físico-química, morfológica e eletroquímica das superfícies funcionalizadas;
- d) Validação do método em comparação com a metodologia de referência de RT-qPCR:
 - Determinação da precisão e exatidão analítica;
 - Determinação da linearidade e sensibilidade analítica;
 - Determinação da especificidade analítica;
 - Determinação dos valores preditivos negativo e positivo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os maiores riscos estão relacionados à quebra de confidencialidade, porém todos os cuidados de anonimização das amostras e utilização de biobanco serão tomados. Além disso, será mantido completo sigilo sobre a identificação dos pacientes envolvidos no estudo.

Benefícios:

Embora a pesquisa não proporcione benefícios imediatos ao participante, os resultados e a participação no estudo poderão contribuir para que o desenvolvimento de um novo método para investigação laboratorial do SARS-CoV-2.

Endereço: Av. Protásio Alves, 211 Portão 4 Bloco C 5º andar
Bairro: Rio Branco **CEP:** 90.410-000
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-6246 **Fax:** (51)3359-6246 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br



Continuação do Parecer: 5.875.043

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Material genético: As amostras de RNA oriundas de amostras clínicas coletadas e armazenadas serão utilizadas na etapa de validação do biossensor em comparação com o método padrão ouro (RT-qPCR). As amostras utilizadas serão obtidas junto ao Biobanco/HCPA. Nenhum exame adicional será solicitado aos pacientes. Por se tratar de estudo com amostras de biobanco e resultados de RT-qPCR fornecido anonimamente, entendemos que não há necessidade de consentimento por parte dos pacientes. Os pesquisadores se comprometem a garantir o anonimato dos pacientes e a preservar o sigilo ao acessar dados sensíveis. Para esta etapa serão utilizadas 100 amostras com resultado de qPCR positivo e 100 amostras com resultado de qPCR negativo. A partir destas amostras, serão determinadas novamente a sensibilidade e especificidade, bem como valor preditivo negativo e positivo.

Amostras clínicas: Pretende-se, ainda, validar o método de detecção do vírus diretamente na amostra clínica (aspirado de nasofaringe e swab de nasofaringe) sem a necessidade da etapa de extração de ácido nucleico com intuito de simplificar a preparação da amostra, e, conseqüentemente, a análise. Será avaliada a possibilidade de emprego de tratamentos que lisam o capsídeo viral, como o uso de saponinas, e expõem material genético sem a necessidade de extração e purificação prévia de RNA. Nesta hipótese, iremos comparar os métodos de preparo de amostra e sua interferência no resultado obtido. Para esta etapa, serão utilizadas 50 amostras de secreção de nasofaringe ou o RNA viral já extraído de amostras do Biobanco/HCPA e que tenham resultado conhecido de RT-qPCR. Cada amostra será tratada das duas formas propostas, tanto com extração e purificação do material genético, quanto a forma simplificada. Os dois pré-tratamentos serão comparados a fim de validar o método simplificado.

Aspectos éticos: O trabalho será desenvolvido de acordo com os princípios de ética em pesquisa conforme Resolução 466/2012. Os pesquisadores se comprometem em cumprir o estabelecido no Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Projeto propõe dispensa de TCLE com a seguinte justificativa:

As amostras utilizadas serão obtidas junto ao Biobanco/HCPA. Nenhum exame adicional será solicitado aos pacientes. Por se tratar de estudo com amostras de biobanco e resultados de RT-qPCR fornecido anonimamente, entendemos que não há necessidade de consentimento por parte

Endereço: Av. Protásio Alves, 211 Portão 4 Bloco C 5º andar
Bairro: Rio Branco **CEP:** 90.410-000
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-6246 **Fax:** (51)3359-6246 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA



Continuação do Parecer: 5.875.043

dos pacientes. Os pesquisadores se comprometem a garantir o anonimato dos pacientes e a preservar o sigilo ao acessar dados sensíveis.

Recomendações:

A justificativa de dispensa de TCLE deve ser atualizada no projeto e não apenas na Plataforma Brasil. Favor atualizar para futuras submissões.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer N.º 5.848.086 foram respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 19/01/2023. Não apresenta novas pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

- Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS N.º 466/2012 e na Norma Operacional CNS/Conep N.º 001/2013, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

- O projeto está aprovado para inclusão ou revisão de registros de 250 participantes neste centro.

- Deverão ser apresentados relatórios semestrais e um relatório final.

- Os projetos executados no HCPA somente poderão ser iniciados quando seu status no sistema AGHUse Pesquisa for alterado para "Aprovado", configurando a aprovação final da Diretoria de Pesquisa.

- Textos e anúncios para divulgação do estudo e recrutamento de participantes deverão ser submetidos para apreciação do CEP, por meio de Notificação, previamente ao seu uso. A redação deverá atender às recomendações institucionais, que podem ser consultadas na Página da Pesquisa do HCPA.

- Eventos adversos deverão ser comunicados de acordo com as orientações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep (Carta Circular N.º 13/2020-CONEP/SECNS/MS). Os desvios de protocolo também deverão ser comunicados em relatórios consolidados, por meio de Notificação.

Endereço: Av. Protásio Alves, 211 Portão 4 Bloco C 5º andar
Bairro: Rio Branco **CEP:** 90.410-000
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-6246 **Fax:** (51)3359-6246 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

Página 04 de 05



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA



Continuação do Parecer: 5.875.043

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2031871.pdf	19/01/2023 19:55:37		Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	19/01/2023 19:55:10	JESSICA GOTARDI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_v2.pdf	19/01/2023 19:54:47	JESSICA GOTARDI	Aceito
Folha de Rosto	FR.pdf	28/12/2022 10:26:25	JESSICA GOTARDI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 03 de Fevereiro de 2023

Assinado por:
Daisy Crispim Moreira
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Protásio Alves, 211 Portão 4 Bloco C 5º andar
Bairro: Rio Branco **CEP:** 90.410-000
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-6246 **Fax:** (51)3359-6246 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

Página 05 de 05