

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
GRUPO DE NANOMEDICINA E NANOTOXICOLOGIA - GNANO

NAYLA NAOMI KUSIMOTO TAKEUTI

Imunossensor capacitivo para o diagnóstico da COVID-19 através da
detecção da proteína Spike

São Carlos
2021

NAYLA NAOMI KUSIMOTO TAKEUTI

Imunossensor capacitivo para o diagnóstico da COVID-19 através da
detecção da proteína Spike

Trabalho de conclusão de curso
apresentada ao Programa de Graduação
em Física do Instituto de Física de São
Carlos da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Bacharela em
Física Biomolecular

Orientadora: Dra. Isabella Sampaio do
Nascimento

São Carlos
2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Takeuti, Nayla Naomi Kusimoto

Imunossensor capacitivo para o diagnóstico da COVID-19 através da detecção da proteína Spike / Nayla Naomi Kusimoto Takeuti; orientadora Isabella Sampaio do Nascimento -- São Carlos, 2021.

33 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2021.

1. Biossensor. 2. COVID-19. 3. Proteína Spike. 4. Espectroscopia de impedância elétrica. I. Nascimento, Isabella Sampaio do , orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Mônica e Ramilson, por todo o suporte dado para minha educação e por sempre fazerem os meus sonhos, os deles. Sem vocês eu não chegaria até aqui.

À minha irmã Stela e a minha madrinha Silvia, pelo apoio incondicional e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus avós, Elisa e Toshio Takeuti, Margarida e Mario Kusimoto. Vocês são a minha maior inspiração e eu tenho muita sorte em tê-los em minha vida.

À minha orientadora e amiga, Dra. Isabella Sampaio, pela paciência, conselhos e críticas construtivas que me fizeram evoluir a cada dia como jovem pesquisadora.

Ao meu grupo de amigos, carinhosamente apelidado, Jubilados (Bidu, Chiquito, Ju, Lilo, Prazer e Tandy), com os quais compartilhei memórias inesquecíveis nesses últimos anos.

Ao meu amigo Gabriel Trindade pelas horas - mesmo online - de estudos e conversas, que foram fundamentais para a minha formação e para a escrita desse texto.

Aos meus amigos do ensino médio, em especial Rafael e Giovanna, que mesmo distantes sempre estiveram presentes na minha vida.

Agradeço também aos professores que contribuíram para a minha formação acadêmica e profissional. Em especial, ao professor Dr. Valtencir Zucolotto e a todos do grupo GNano.

“We keep moving forward, opening new doors, and doing new things, because we're curious and curiosity keeps leading us down new paths.” – Walt Disney

RESUMO

A pandemia da COVID-19 já provocou mais de 3,9 milhões de mortes no mundo, sendo mais de 500 mil delas no Brasil. Os sintomas iniciais da infecção são muito semelhantes aos de outras doenças virais presentes no nosso país, como a gripe e a Dengue. Dessa maneira, o diagnóstico diferencial é fundamental para o tratamento adequado, o isolamento rápido da pessoa infectada e atualização dos dados epidemiológicos. O método de detecção atual mais confiável é o teste molecular (RT-PCR) que requer profissionais especializados e tem um custo elevado, sendo assim inviável para o monitoramento amplo da população. Este projeto visou o desenvolvimento de um biossensor elétrico para a detecção da proteína Spike presente no SARS-CoV-2, usando como controle negativo a proteína NS1 do vírus da Dengue. Os eletrodos foram modificados com duas monocamadas automontadas (SAMs) diferentes, que foram caracterizadas por microscopia de força atômica (AFM) e por espectroscopia Raman, com o intuito de avaliar a melhor estratégia de imobilização dos anticorpos. Na etapa de detecção, os eletrodos foram incubados com as amostras e submetidos a medidas de capacitância elétrica, que foram analisadas através do fator sinal/ruído e pelo método estatístico de componentes principais (PCA). A partir dos nossos resultados, encontramos que a imobilização covalente dos anticorpos (SAM 2) foi mais eficiente. No Raman foi possível observar picos característicos do grupo amida, que demonstram a ligação covalente formada entre a cisteína e o anticorpo. Além disso, no AFM foi observado o aumento da rugosidade da superfície de ouro de $1,6 \pm 0,2$ nm para $4,0 \pm 0,7$ nm após a modificação com os anticorpos a 40 µg/mL. O fator sinal/ruído para essa configuração, foi calculado a partir da razão entre o módulo da variação da capacitância para a amostra positiva (spike) e o módulo da variação da capacitância para a amostra negativa (NS1 Dengue), que indicaram uma boa seletividade do biossensor e reprodutibilidade entre as duplicatas. Os próximos passos envolvem testes com maior número de réplicas e a construção da curva de calibração para diferentes concentrações da Spike. Esse biossensor elétrico possibilita um diagnóstico preciso, rápido e de baixo-custo da COVID-19 já nos primeiros dias de infecção e poderá ser aplicado na testagem em massa da população mesmo em áreas mais pobres do país, onde não há infraestrutura laboratorial, uma vez que as medidas elétricas podem ser realizadas em um dispositivo miniaturizado e portátil.

Palavras-chaves: Biossensor. COVID-19. Proteína Spike. Espectroscopia de impedância elétrica.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	Os Coronavírus.....	9
1.2	A COVID-19 e o cenário no Brasil	10
1.3	Métodos de diagnóstico	11
1.4	Biossensores	11
1.4.1	Biossensores capacitivos.....	12
2	MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1	Fabricação dos eletrodos interdigitados (IDEs).....	15
2.2	Limpeza dos eletrodos	15
2.3	Construção das monocamadas automontadas (SAMs).....	15
2.4	Etapa de detecção	16
2.5	Medidas elétricas	17
2.6	Análise de Componentes Principais (PCA).....	17
3	RESULTADOS	19
3.1	Caracterização das modificações nas monocamadas automontadas porAFM e espectroscopia Raman.....	19
3.1.1	Imobilização eletrostática (SAM 1)	19
3.1.2	Imobilização covalente (SAM 2)	20
3.2	Detecção elétrica.....	22
3.2.2	Imobilização covalente orientada (SAM 2)	25
4	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os Coronavírus

A família dos coronavírus (Covs) foi descoberta em 1968 e recebeu esse nome devido ao seu formato semelhante a uma coroa. Eles são uma grande família de vírus envelopados com RNAs positivos que são classificados em 4 gêneros (alpha, beta, gamma e delta), sendo os α - e β -coronavírus clinicamente mais relevantes por infectar os sistemas respiratório, gastrointestinal, hepático e o sistema nervoso central de humanos ocasionando sintomas mais simples, como os da gripe comum, até mais severos que podem levar ao óbito do paciente. (1-2)

O genoma dos Covs codifica quatro grandes grupos de proteínas estruturais (Figura 1): nucleocapsídicas (N), matriciais (M), envelopes (E) e Spikes (S). O primeiro grupo, das proteínas N, está envolvido na organização do genoma viral e na eficiência de transcrição do vírus. As proteínas de membrana ou matriciais (M) podem associar-se a outras proteínas estruturais virais facilitando a montagem molecular e a patogênese. As menores proteínas estruturais são as do tipo E (8-12 kDa) que desempenham um importante papel na patogênese, montagem e liberação do vírus. Por fim, existem as glicoproteínas spikes (S) (150-200 KDa) que são compostas de duas subunidades (S1 e S2), fundamentais para a infecção de alguns coronavírus, como o SARS-CoV-2, nas células humanas. A subunidade S2 faz a mediação da integração entre a membrana viral e a célula hospedeira, eventualmente o domínio de ligação ao receptor (RBD) da subunidade S1 da Spike se acopla a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) presente na superfície das células. (3)

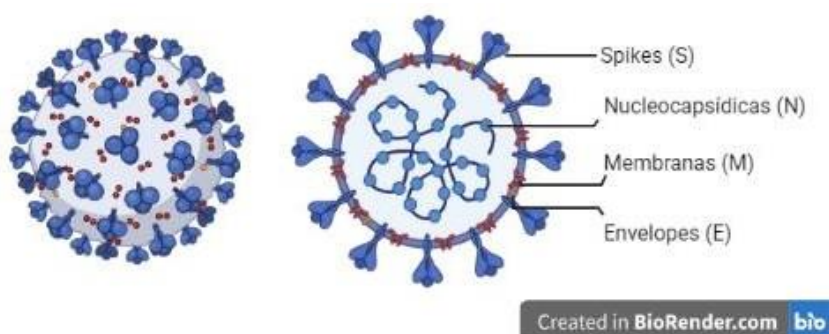


Figura 1 - Estrutura dos coronavírus e os quatro grupos de proteínas estruturais: Spikes (S), Nucleocapsídicas(N), Membranas (M) e Envelopes (E). Criado no Biorender.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nas últimas duas décadas, houveram três grandes surtos de doenças causadas por β -coronavírus: SARS-CoV (2002), MERS-CoV (2012) e o SARS-CoV-2 (2019). Dentre eles, o SARS-CoV-2 é o mais transmissível e já atingiu quase 200 países, enquanto os outros dois vírus alcançaram menos de 30 países. Estudos demonstram que a alta transmissibilidade do SARS-CoV-2 está relacionada ao número de mutações positivas na proteína S que fazem com que ela seja 20 vezes mais efetiva em reconhecer os receptores humanos que as mesmas proteínas referentes ao SARS-CoV-1 e MERS-CoV. (4)

1.2 A COVID-19 e o cenário no Brasil

Em dezembro de 2019, na cidade chinesa Wuhan, foi identificado o contágio por um novo coronavírus, posteriormente conhecido como SARS-CoV-2, causando sintomas respiratórios que inicialmente foram identificados como casos de pneumonia que evoluíram para a chamada “síndrome respiratória aguda severa” (SARS). Devido ao rápido aumento das taxas de contaminação e a distribuição geográfica da doença, em 30 de janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou estado de emergência de saúde pública de importância internacional e, em 11 de março do mesmo ano, a COVID-19 foi anunciada como uma pandemia. (5) A pandemia da COVID-19 já tem mais de 181 milhões de casos confirmados e mais de 3,9 milhões de óbitos pelo mundo inteiro de acordo com os dados epidemiológicos da OMS do dia 28 de junho de 2021. No Brasil, o primeiro contágio ocorreu em 26 de fevereiro de 2021 e, atualmente, há aproximadamente 18 milhões de pessoas infectadas e mais de 500 mil mortes, de acordo com os dados do Ministério da Saúde em 28 de junho de 2021. (6)

A COVID-19 é transmitida principalmente a partir de gotículas respiratórias, em casos leves ou iniciais ela pode apresentar sintomas não específicos como tosse, febre, diarreia, dor de garganta e coriza. O quadro clínico mais grave da doença é caracterizado por dificuldade de respiração, lesão miocárdica, letargia e convulsões, sendo necessário a incubação do paciente com suporte de oxigênio. Não existe tratamento específico para a doença ainda, pessoas com quadro clínico leve a moderado são tratadas com medicamentos que atuam apenas na amenização dos sintomas.

Desde o início da pandemia, pesquisadores do mundo inteiro têm se mobilizado para o desenvolvimento de vacinas para o novo coronavírus, visto que a imunização populacional contra doenças virais garante o controle das taxas de transmissão da doença. De acordo com a OMS, estão em desenvolvimento aproximadamente 200 vacinas, 60 estão na fase de testes

clínicos e algumas já foram aprovadas e estão sendo aplicadas. (7)

1.3 Métodos de diagnóstico

O diagnóstico de doenças virais com alta taxa de transmissão, como a COVID-19, é crucial para a identificação de pessoas infectadas e o isolamento rápido delas, prevenindo que ocorra a transmissão para outras pessoas. Além disso, a determinação do número de pessoas infectadas auxilia na atualização dos dados epidemiológicos e no planejamento de medidas preventivas mais efetivas.

Atualmente, o diagnóstico da COVID-19 no Brasil é feito por um dos três métodos: i) detecção do antígeno do vírus em secreção nasal ou saliva através da técnica RT-PCR; ii) testemolecular rápido para detecção do antígeno em secreção nasal ou saliva; iii) detecção de anticorpos contra proteínas de SARS-CoV-2 através de ensaios imunológicos. O limite de detecção no teste de ELISA (do inglês, “*enzyme-linked immunosorbent assay*”) para anticorpos é de 4 ng/mL e para o antígeno, a proteína Spike, é de 19 ng/mL. Métodos moleculares mais modernos também têm sido explorados, como a amplificação isotérmica mediada por loop (RT-LAMP) e o CRISPR (do inglês “*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*”). (8) Contudo, esses testes apresentam algumas limitações que incluem a necessidade de uma instrumentação de alto custo, mão de obra especializada para a operação e interpretação de resultados, além da demora na obtenção dos resultados que inviabilizam a utilização desses métodos para o monitoramento em massa. Além disso, há possibilidade de reações cruzadas com outros vírus em testes sorológicos. (9) Para superar essas limitações, dispositivos baratos e precisos como biossensores podem ser uma alternativa promissora. (10)

1.4 Biossensores

Os biossensores são dispositivos analíticos, formados por uma camada de biorreconhecimento e uma parte transdutora que permitem a identificação e quantificação de uma amostra de interesse, chamada de analito (Figura 2). A camada de biorreconhecimento é formada por biomoléculas como DNA, enzimas e anticorpos que se ligam seletivamente ao analito. As alterações físico-químicas provenientes da interação específica entre biomolécula-analito são convertidas em parâmetros físicos (ex: impedância elétrica e eletroquímica, mudanças ópticas e piezoelétricas) pelo transdutor.

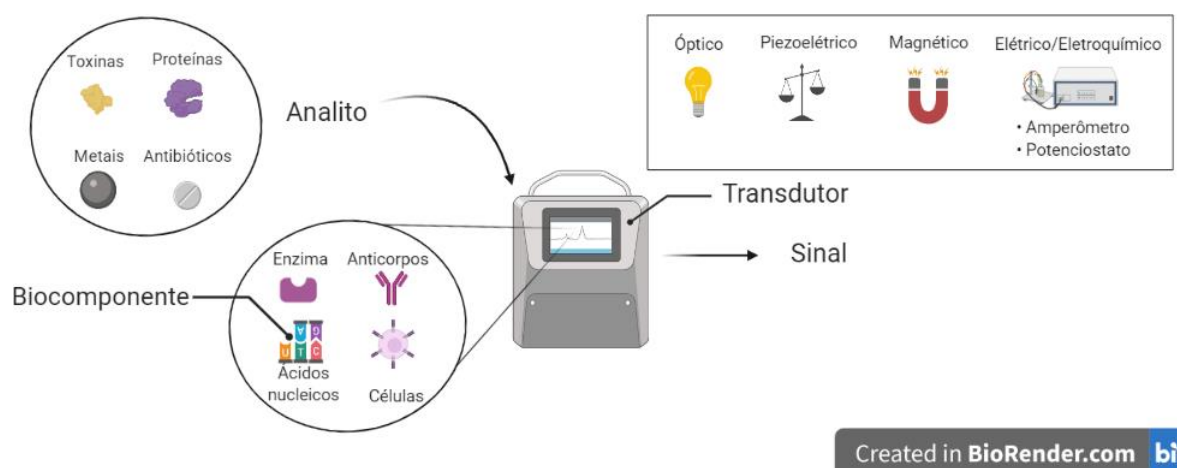


Figura 2 - Esquema de funcionamento de um biossensor. Criado no Biorender.

Fonte: Elaborada pela autora.

Um dos primeiros biossensores reportados na literatura para o diagnóstico da COVID-19 foi uma plataforma de FET (transistor de efeito de campo), que detecta a proteína spike com um limite de detecção de 1 fg/mL em PBS e 100 fg/mL em amostras clínicas. Contudo, essa plataforma exigiu o uso de uma instrumentação de alto custo para análise de dados e uma concentração consideravelmente alta (250 µg/mL) de anticorpos para a funcionalização, que encarece o produto final e pode torná-lo inacessível para testagem em massa. (11) Wen et al desenvolveram um dispositivo do tipo *lateral flow* que faz uma rápida detecção de anticorpos IgG do SARS-CoV-2 com uma sensibilidade de 69.1%. (12) No entanto, recomenda-se que esse dispositivo seja utilizado apenas após 10 dias do início dos sintomas, uma vez que esse é o tempo necessário para que o sistema imunológico do paciente produza uma quantidade detectável de anticorpos, inviabilizando o diagnóstico precoce. Biossensores ópticos (13) e eletroquímicos (14) para a detecção de antígenos, anticorpos e ácidos nucleicos também foram reportados. (15-22) Apesar desses biossensores serem capazes de detectar o vírus, eles ainda enfrentam limitações para o diagnóstico *point-of-care*. Nesse sentido, os biossensores capacitivos são vantajosos porque suas medidas podem ser feitas em aparelhos miniaturizados de fácil operação e baixo custo, possibilitando uma análise rápida e precisa.

1.4.1 Biossensores capacitivos

Os biossensores capacitivos têm sido amplamente utilizados em diversas áreas, devido a sua facilidade de miniaturização e a simplicidade em sua operação. (23) Na

literatura, eles têm sido aplicados para detecção de proteínas (24-27), ácidos nucleicos (28-29) e células (30-31), com um bom limite de detecção. Para a construção desses sensores são utilizados eletrodos interdigitados (IDEs) que possuem placas metálicas (ex: ouro, cobre e etc) igualmente espaçadas, denominadas *fingers*, que atuam como capacitores planares. Dentre eles, os IDEs de ouro são os mais explorados, uma vez que sua superfície possibilita a modificação com biomoléculas através de diferentes metodologias, como a montagem de camadas com filmes orgânicos estruturados, que utilizam moléculas que possuem o grupo tiol (-SH) em uma das extremidades, formando uma ligação forte com o ouro da superfície, e grupos funcionais na outra extremidade, que se ligam à biomolécula. (32) Dessa forma, a formação da dupla camada elétrica na interface dos capacitores influencia na transferência de cargas, promovendo mudanças nas propriedades dielétricas do material que podem ser analisadas através de medidas de capacitância em função da frequência aplicada. (33)

Este projeto teve como objetivo o desenvolvimento de um imunossensor capacitivo para a detecção da proteína Spike utilizando IDEs de ouro modificados com anticorpos anti-spike. A discriminação das amostras foi feita através de medidas de capacitância elétrica, analisadas pelo método estatístico de componentes principais (PCA) e pelo fator sinal/ruído. Como controle negativo foi usada a proteína NS1 do vírus da Dengue para garantir que o biossensor não realize detecção cruzada entre essas duas doenças virais. Espera-se que esse dispositivo contribua para o diagnóstico de COVID-19 de maneira rápida, simples e precisa.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Fabricação dos eletrodos interdigitados (IDEs)

Os IDEs de ouro foram confeccionados em substrato de vidro BK7 pela técnica de fotolitografia seguida de metalização de uma fina camada de ouro pela técnica de *sputtering*. Cada eletrodo possui 150 placas metálicas paralelas denominadas *fingers*, com espaçamento de 10 μm entre elas, em que cada par funciona como um capacitor planar.

2.2 Limpeza dos eletrodos

A limpeza dos eletrodos foi realizada com plasma de oxigênio, para a remoção de resíduos orgânicos, utilizando o equipamento Tergeo Plasma Cleaner nas seguintes condições: O_2 médio, 35 W de potência e taxa de fluxo de gás 5 sccm (cm^3/min).

2.3 Construção das monocamadas automontadas (SAMs)

Os IDEs foram modificados com duas diferentes estratégias para a construção das SAMs com o intuito de encontrar a melhor forma de imobilização dos anticorpos e de obter uma detecção sensível da proteína Spike (Figura 3).

Imobilização eletrostática (SAM 1): os IDEs foram incubados overnight (15 h) com 10 μL de cisteamina 10 mM em solução aquosa. Em seguida, os eletrodos foram incubados com 10 μL de anticorpos anti-Spike 250 $\mu\text{g/mL}$ para a interação eletrostática com a cisteamina. Para bloquear possíveis sítios ativos, foi utilizado 10 μL de uma solução de albumina de soro bovina (BSA) 1% em tampão PBS (10 mM, pH 7,4, NaCl 0.1 M) por 30 min.

Imobilização covalente orientada (SAM 2): Para a segunda SAM, os IDEs também foram incubados overnight (15 h) com 10 μL de cisteamina 10 mM em solução aquosa. Em seguida, foi preparada uma mistura de EDC/NHS (8 mM/5 mM) com anti-Spike (nas concentrações 4 $\mu\text{g/mL}$ ou 40 $\mu\text{g/mL}$) em tampão PBS (10 mM, pH 7,4, NaCl 0.1 M) e incubada por 2 h à 4 $^\circ\text{C}$ para ativação dos grupos carboxílicos presentes nos anticorpos (desprotonação do H^+). A imobilização foi realizada adicionando 10 μL da mistura contendo os anticorpos ativados aos IDEs modificados. Nesse caso, os grupos carboxílicos dos anticorpos se ligam covalentemente ao grupo amina da cisteamina presente na superfície dos eletrodos. Para bloquear possíveis sítios ativos, foi utilizada 10 μL de uma solução de

BSA 1% por 30 min.

Todas as etapas de incubação foram realizadas a 4 °C e a lavagem entre as etapas foi feita imergindo os IDEs em PBS e em água Milli-Q. Por fim, os eletrodos foram secos cuidadosamente com jato de nitrogênio (N₂).

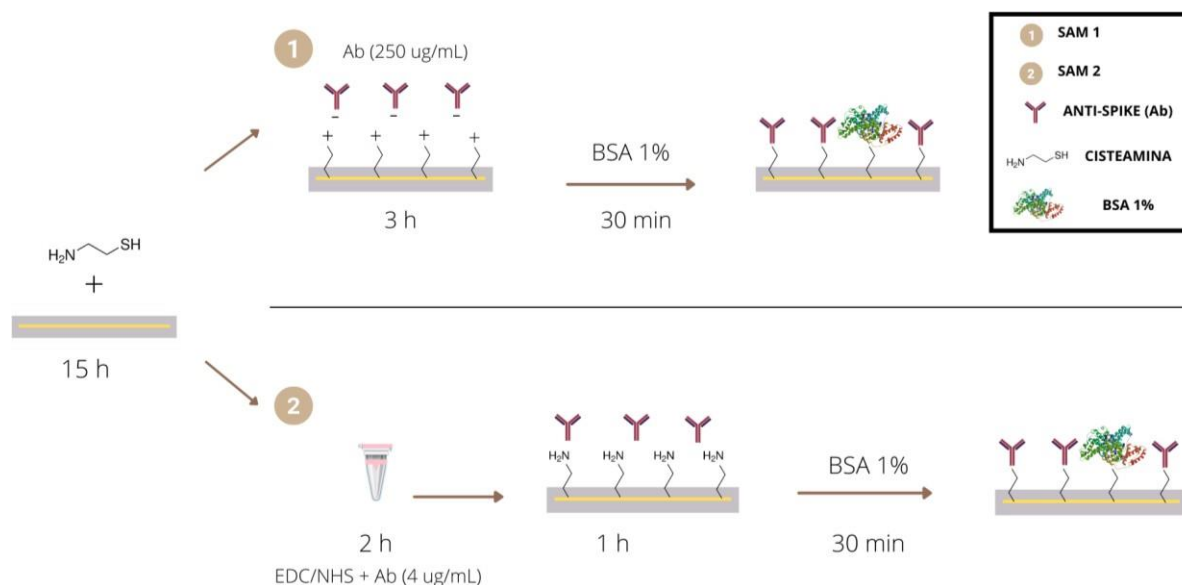


Figura 3 - Ilustração da construção das duas monocamadas automontadas (SAM 1 e SAM 2). Criado em Canva.

Fonte: Elaborada pela autora.

Caracterização das SAMs

Para avaliar se as moléculas utilizadas nas etapas de funcionalização dos eletrodos de fato foram imobilizadas na sua superfície, as SAMs foram caracterizadas quanto a sua rugosidade através de medidas de microscopia de força atômica (AFM), com imagens coletadas com resolução de 512 pixels e dimensões 2 µm x 2 µm, e por espectroscopia Raman para verificar a presença dos grupos funcionais característicos. Os espectros Raman foram coletados na faixa 500-3800 cm⁻¹, utilizando laser de 532 nm com intensidade de 5%, 20 acumulações e tempo de 30 s para cada medida.

2.4 Etapa de detecção

Na etapa de detecção, os eletrodos funcionalizados com os anticorpos anti-spike foram incubados por 30 min com 10 µL de proteína Spike 2,5 µg/mL em tampão PBS 10 mM (amostra positiva). Em seguida, os IDEs foram lavados e secos. Após essa etapa, os eletrodos foram submetidos a medidas elétricas. A fim de avaliar a seletividade do biossensor, todos os experimentos foram realizados também com controle negativo,

utilizando a proteína NS1 do vírus da Dengue nas mesmas concentrações e condições da proteína positiva.

2.5 Medidas elétricas

Medidas de capacitância elétrica foram realizadas utilizando o equipamento Solartron, variando a frequência de 20 Hz a 1 MHz. Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente, com um tempo de espera de 10 min para que a dupla camada elétrica possa se estabilizar, 5 ciclos de medidas e utilizando 10 μ L de tampão PBS 10 mM.

2.6 Análise de Componentes Principais (PCA)

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o método de análise de componentes principais (PCA) do software OriginPro 2021©. Para montar o PCA foi escolhida uma frequência fixa em que houvesse uma maior variação de capacitância na etapa de detecção da proteína positiva. Posteriormente, foi realizada a combinação das duas unidades sensoriais (FOAC: filme orgânico com o anticorpo e FO: filme orgânico sem o anticorpo) para a discriminação das amostras. No resultado final do PCA espera-se observar uma separação entre os dois grupos distintos (amostras positiva e negativa) influenciada pela unidade sensorial FOAC, confirmando que o imunossensor desenvolvido detectou a Spike através da interação específica antígeno-anticorpo.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização das modificações nas monocamadas automontadas por AFM e espectroscopia Raman

3.1.1 Imobilização eletrostática (SAM 1)

A superfície de ouro foi caracterizada quanto a sua rugosidade pela técnica de AFM, para cada etapa das modificações realizadas (Figura 4). A rugosidade média obtida foi $0,9 \pm 0,1$ nm para o eletrodo limpo (Figura 4a) e de $1,6 \pm 0,2$ nm após a incubação com cisteamina (Figura 4b), indicando que essas moléculas se ligaram à superfície do eletrodo (Figura 4b). Por outro lado, nas etapas de incubação com o anticorpo (Figura 4c) e com o BSA 1% (Figura 4d) a rugosidade média foi de $1,7 \pm 0,2$ nm e $1,4 \pm 0,2$ nm, respectivamente. A pequena variação na rugosidade após a etapa da cisteamina, indica que houve uma baixa ou nenhuma imobilização dos anticorpos e das moléculas de BSA por interação eletrostática. (35)

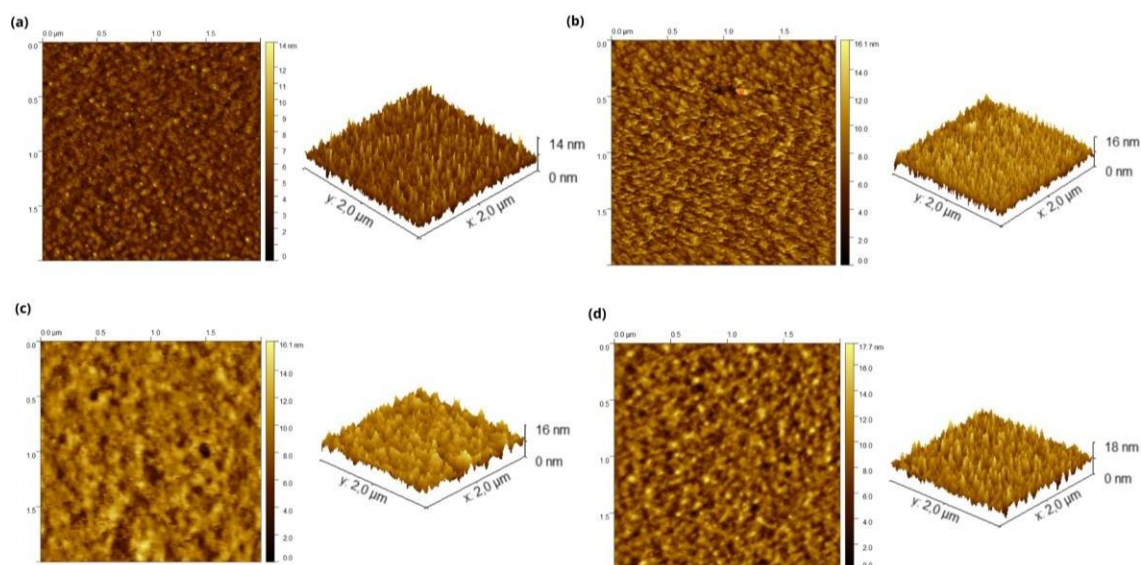


Figura 4 - Imagens de AFM da superfície do IDE: (a) Limpo, (b) Modificado com cisteamina 10 mM. (c) cisteamina 10 mM + anticorpo 250 µg/mL. (d) Cisteamina 10 mM + anticorpo 250 µg/mL + BSA 1%. A resolução utilizada foi de 512 pixels em 2 µm x 2 µm.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para cada etapa de modificação, os eletrodos foram caracterizados por espectroscopia Raman para identificar os grupos funcionais das moléculas imobilizadas

(Figura 5). A banda em 110 cm^{-1} presente em todos os espectros é proveniente de vibrações reticuladas do vidro. As bandas em 800 cm^{-1} e em 2837 cm^{-1} que também aparecem em todos os espectros, correspondem às vibrações de C-O-C e C-H, respectivamente. Após a etapa de modificação com cisteamina são observados dois novos picos em 1480 cm^{-1} e 1520 cm^{-1} , característicos dos grupos CH_2 e NH_2 , respectivamente, presentes nela. (34) Apesar de um pequeno aumento na intensidade das bandas, não houve diferença nos grupos funcionais encontrados após a etapa do anticorpo. Esses resultados indicam que os anticorpos não foram imobilizados na superfície do eletrodo, corroborando as análises de AFM. No pH 7,4 da solução tampão utilizada durante a imobilização, a cisteamina fica carregada positivamente e os anticorpos negativamente, favorecendo a interação eletrostática entre eles. No entanto, por ser uma interação fraca com baixa estabilidade, ela pode ter sido desfeita nas etapas de lavagens, de modo que os anticorpos e o BSA não tenham permanecido na superfície dos IDEs.

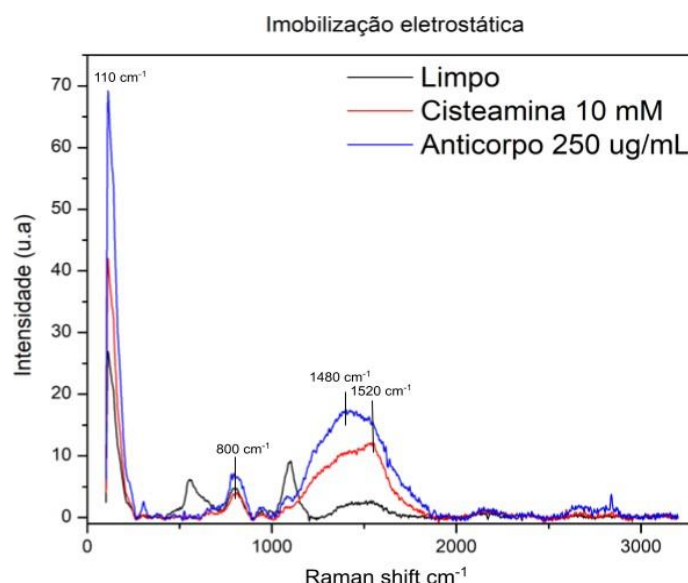


Figura 5 - Espectro Raman para as modificações (limpo, cisteamina 10 mM, anticorpo 250 $\mu\text{g/mL}$) na superfície dos IDEs para a estratégia de imobilização eletrostática. Os espectros foram coletados com laser de 532 nm intensidade 5%, 10 acumulações e tempo de aquisição de 30 s para cada medida.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.2 Imobilização covalente (SAM 2)

A SAM 2 também foi caracterizada quanto a sua rugosidade pelo AFM, para o filme orgânico modificado com duas concentrações diferentes de anticorpos (4 $\mu\text{g/mL}$ e 40 $\mu\text{g/mL}$), pré-ativados com EDC/NHS (Figura 6). Os anticorpos com os grupos carboxílicos

ativados (COO^-) conseguem ser imobilizados na superfície do ouro através de uma ligação covalente com a amina (NH_2) da cisteamina, formando a ligação amida ($-\text{CONH}_2$). A modificação com a concentração mais baixa de anticorpos, $4 \mu\text{g/mL}$, apresentou uma rugosidade média de $1,6 \pm 0,2 \text{ nm}$, enquanto para $40 \mu\text{g/mL}$ a mesma foi de $4,0 \pm 0,7 \text{ nm}$. Ao comparar esses resultados com o valor encontrado para a superfície de ouro modificada apenas com cisteamina ($1,6 \pm 0,2 \text{ nm}$, Figura 4b) é visto que a imobilização com $40 \mu\text{g/mL}$ de anticorpos produziu um aumento significativo no valor de rugosidade e da altura da superfície de 16 nm para 48 nm (Figura 6b). Na figura 6c, são apresentados os espectros Raman para o eletrodo limpo, modificado com cisteamina e após a imobilização covalente dos anticorpos ativados com EDC/NHS para duas concentrações: $4 \mu\text{g/mL}$ e $40 \mu\text{g/mL}$. As bandas que aparecem nos espectros do eletrodo limpo e do eletrodo modificado com cisteamina são os mesmos já discutidos na seção 3.1.1. No entanto, nos espectros coletados após a imobilização dos anticorpos são observadas bandas em 1406 cm^{-1} e 1560 cm^{-1} características da vibração $\text{C}=\text{N}$ proveniente da ligação amida, demonstrando que a ligação covalente entre o grupo amina da cisteamina e o grupo carboxílico do anticorpo ocorreu. Além disso, comparando os espectros obtidos para as duas concentrações de anticorpos, podemos observar que intensidade dessas bandas é maior para o eletrodo modificado com a maior concentração de anticorpos.

As análises de AFM e Raman após a incubação dos eletrodos com o BSA não apresentaram diferença em relação à etapa anterior. O papel do BSA na construção do filme orgânico é bloquear os sítios ativos em que não houve ligação com os anticorpos. Contudo, diferentemente de como foi feito com os anticorpos, o BSA não teve seus grupos carboxílicos pré-ativados com EDC/NHS para que pudessem se ligar covalentemente com a cisteamina. Então, o bloqueio de sítios ativos poderia ocorrer via interação eletrostática que, como discutido anteriormente, é uma ligação fraca que poderia ser desfeita durante a lavagem. Isso justificaria o fato de não terem sido observadas mudanças na rugosidade ou nos espectros Raman após a incubação com essa biomolécula. De maneira geral, os resultados de AFM e Raman foram coerentes entre si e indicam que a imobilização covalente dos anticorpos aconteceu, sendo mais eficiente para a concentração de $40 \mu\text{g/mL}$.

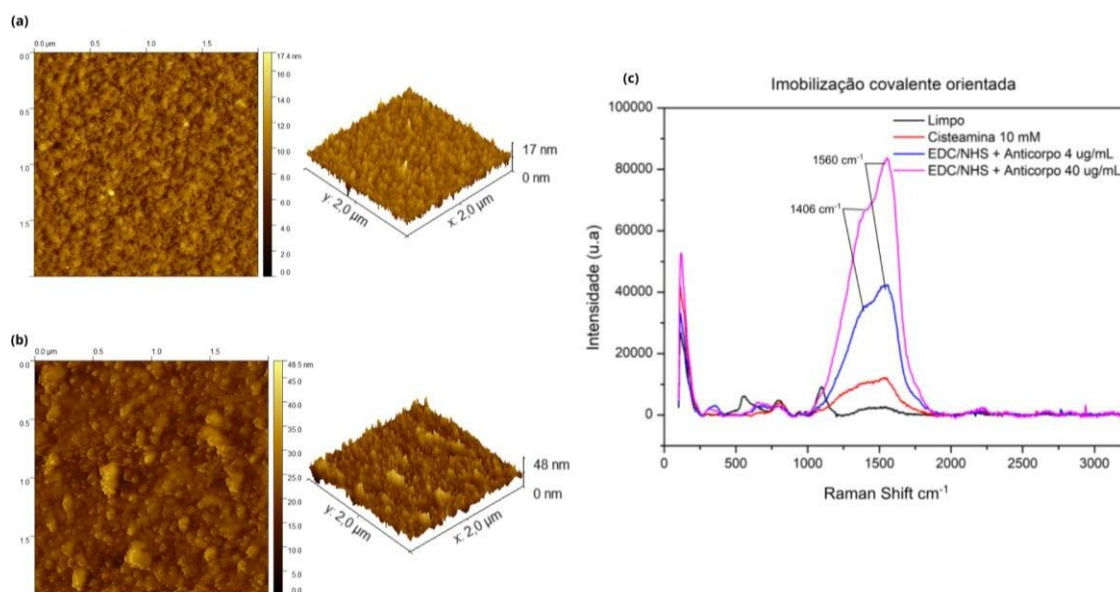


Figura 6 - (a) Imagem de AFM em 2D e 3D da superfície dos IDEs modificados com cisteamina + EDC/NHS/Ab4 µg/mL (b) Imagem de AFM em 2D e 3D da superfície dos IDEs modificados com cisteamina + EDC/NHS/Ab40 µg/mL. A resolução utilizada para as imagens de AFM foi de 512 pixels em 2 µm x 2 µm. (c) Espectros Raman, coletados entre 100-3500 cm⁻¹, para as modificações na superfície dos IDEs referentes a imobilização covalente orientada. Os espectros foram coletados com laser de 532 nm intensidade 5%, 10 acumulações e tempo de aquisição de 30 s para cada medida.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.2 Detecção elétrica

3.2.1 Imobilização eletrostática (SAM 1)

Na figura 7 é apresentado o comportamento do biossensor modificado com a SAM 1 após 30 min de incubação com uma amostra negativa (NS1 DenV 2,5 µg/mL) e positiva (Spike 2,5 µg/mL) para dois tipos de preparações do eletrodo (unidades sensoriais): I) Filme orgânico+ anticorpo (FOAC); II) Filme orgânico sem anticorpo (FO). Inicialmente, a análise é feita em uma faixa maior de frequência para buscar um intervalo em que a variação da capacitância seja proveniente de interações específicas. Através dos gráficos das duas unidades (Figura 7a e 7b) o melhor intervalo para a discriminação das amostras foi entre 10⁴-10⁵ Hz, visto que há pouca variação da capacitância na unidade sensorial FO após a adição das amostras negativa e positiva, indicando que a variação observada em FOAC seria proveniente da interação antígeno-anticorpo. Além disso, em altas frequências há uma maior repetibilidade entre medidas consecutivas e o ângulo de fase é próximo de 90°, indicando uma predominância do comportamento capacitivo que é influenciado por eventos na dupla camada elétrica, como o biorreconhecimento. (37) Sendo assim, para as análises subsequentes

foi escolhida a frequência intermediária de 25 kHz. A variação de capacitância, na frequência escolhida, para a unidade sensorial FOAC (Figura 7a) foi de $|\Delta C_{\text{spike,FOAC}}| = (2,4 \pm 0,9)$ nF para a amostra positiva e

$|\Delta C_{\text{NS1,FOAC}}| = (3 \pm 1)$ nF para a amostra negativa. Enquanto para a unidade FO (Figura 7b) os resultados foram de $|\Delta C_{\text{spike,FO}}| = (0,10 \pm 0,04)$ nF e $|\Delta C_{\text{NS1,FO}}| = (0,99 \pm 0,05)$.

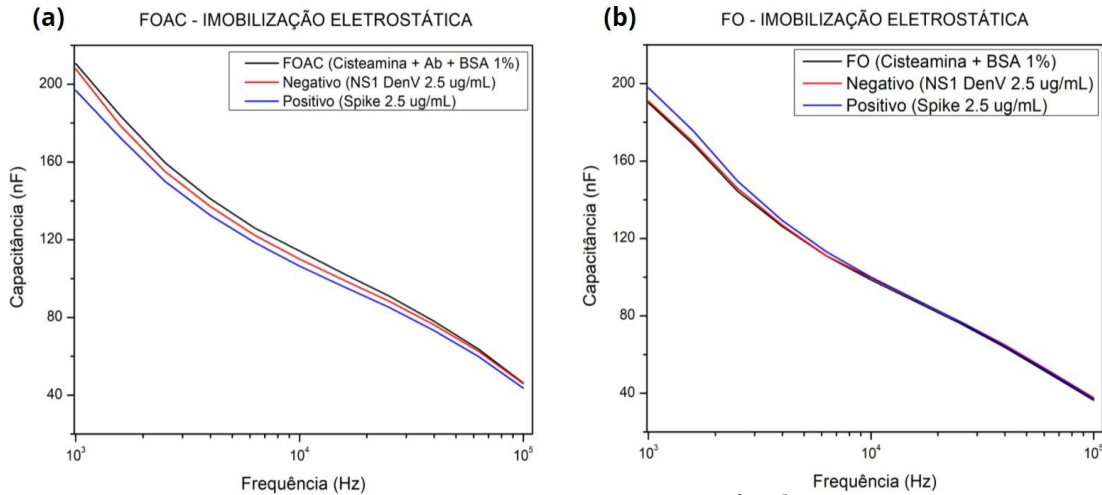


Figura 7 - Variação da capacitância em função da frequência (10^3 - 10^5 Hz) para as unidades sensoriais FOAC (a) e FO (b) após a adição da proteína negativa (NS1 DenV 2,5 $\mu\text{g/mL}$) e da proteína positiva (Spike 2,5 $\mu\text{g/mL}$).

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir da variação da capacitância das amostras positivas e negativas, calculou-se o fator sinal/ruído pela fórmula (1):

$$S = \frac{\Delta C_{\text{spike}}}{\Delta C_{\text{ns/DenV}}} \quad (1)$$

O fator sinal/ruído é um parâmetro que indica a razão entre a variação de capacitância da sua amostra positiva pela variação da capacitância de um controle negativo. Sendo assim, quanto maior o seu valor, melhor é a seletividade do biossensor. A tabela 1 mostra os valores do fator sinal/ruído para as duplicatas de cada unidade sensorial (FOAC e FO). Os resultados mostram um baixo fator sinal/ruído associado as unidades sensoriais e também uma baixa reprodutibilidade entre eletrodos da mesma unidade. Isso pode indicar que as variações de capacitâncias, não vieram de interações específicas da proteína com anticorpo, e sim de interferências associadas a interações eletrostáticas acontecendo no filme orgânico.

Tabela 1 – Análise do fator sinal/ruído para as duplicatas das unidades sensoriais FOAC e FO, para a imobilização eletrostática na frequência de 25 kHz.

	E1	E2
FOAC	$0,40 \pm 0,06$	$1,2 \pm 0,2$
FO	$1,0 \pm 0,6$	$0,10 \pm 0,05$

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise estatística de componentes principais (PCA) foi realizada com as duas unidades sensoriais, com o intuito de observar a capacidade de discriminação do biossensor e verificar se as variações na capacitância são provenientes da interação antígeno-anticorpo. O gráfico de *score* (Figura 8a) indica que o biossensor foi capaz de diferenciar as duas amostras com 95,5 % considerando apenas a primeira componente principal (eixo x), e com 100% de acerto quando somada com a segunda componente (PC1 + PC2), indicada pelo eixo y. O gráfico de *loading* (Figura 8b) mostra através de vetores a contribuição de cada unidade sensorial para a discriminação da amostra. Quanto maior é o vetor na direção x, maior é sua contribuição para a discriminação das amostras através da PC1. Da mesma maneira, quanto maior for o vetor na direção y, maior é a sua contribuição para a discriminação das amostras através da PC2. Nesse caso, a unidade sensorial que mais contribuiu para o PC1 foi a FOAC, apontando que a variação na capacitância provém da interação antígeno-anticorpo. Apesar da interpretação dada pelo gráfico de *loading*, não é possível afirmar que o biossensor foi realmente seletivo, uma vez que foi observada uma variação de capacitância maior para a amostra negativa do que para a amostra positiva nas duas unidades sensoriais. Além disso, o fator sinal/ruído demonstrou uma baixa reprodutibilidade entre as réplicas. O biossensor construído via interação eletrostática apresentou um baixo desempenho analítico que, baseado nos resultados das caracterizações da monocamada, por AFM e Raman, e pelo fator sinal/ruído parece estar associado às ligações não específicas na superfície do biossensor.

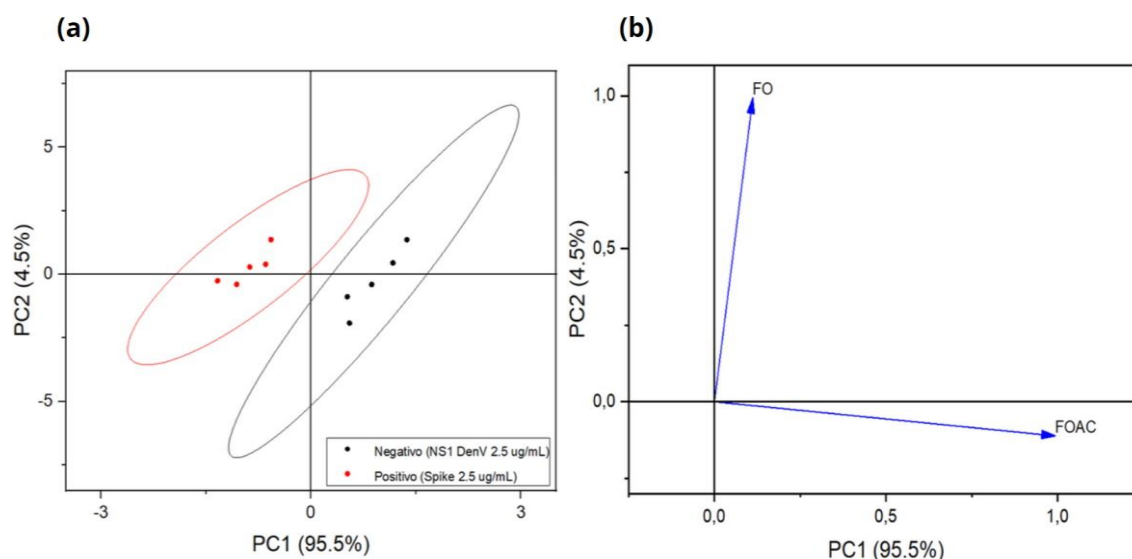


Figura 8 – Análise de PCA para a SAM 1: (a) Gráfico de *score* representando a discriminação entre a amostra negativa (NS1 DenV 2,5 µg/mL) e positiva (Spike 2,5 µg/mL) e (b) Gráfico de *loading* representando a influenciadas unidades sensoriais FOAC e FO nas componentes principais para a discriminação dos grupos. Ambos os resultados de PCA foram feitos para a frequência de 25 kHz.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.2.2 Imobilização covalente orientada (SAM 2)

As medidas elétricas também foram realizadas para a imobilização covalente (SAM 2), nesse caso a frequência escolhida para a análise dos resultados foi a de 100 kHz, pelos mesmos motivos apresentados anteriormente. A variação de capacitância para o biossensor construído com SAM 2 contendo 40 µg/mL de anticorpos é apresentada na figura 9. Na unidade sensorial FOAC (Figura 9a) a variação foi de $|\Delta C_{\text{spike,FOAC}}| = (1,08 \pm 0,06)$ nF para a amostra positiva e $|\Delta C_{\text{NS1,FOAC}}| = (0,13 \pm 0,04)$ nF para a amostra negativa. Enquanto para a unidade FO (Figura 9b) os resultados foram de $|\Delta C_{\text{spike,FO}}| = (2,5 \pm 0,7)$ nF e $|\Delta C_{\text{NS1,FO}}| = (1,1 \pm 0,2)$.

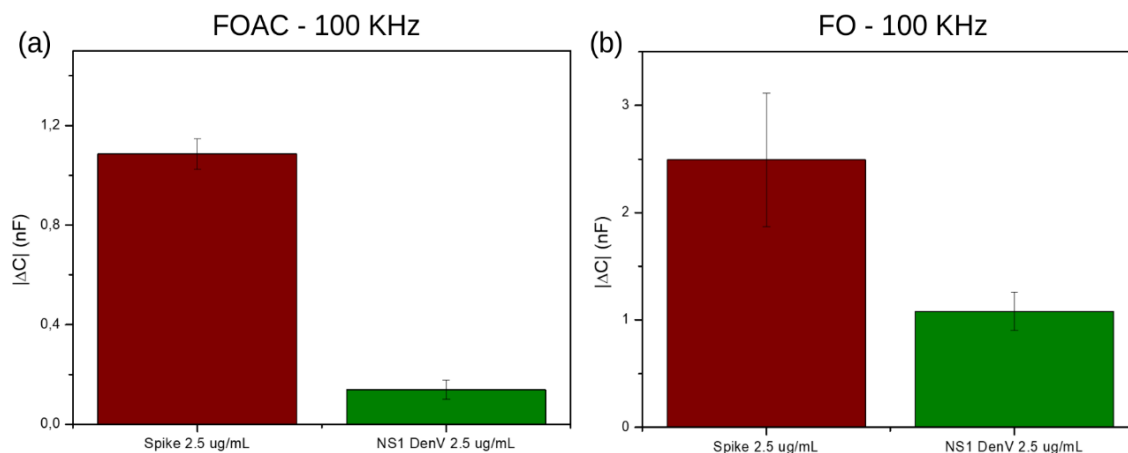


Figura 9 – Gráfico de barras mostrando o módulo da variação da capacitância em 100 kHz para a SAM 2 construída com 40 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpos: após a incubação do biossensor com a amostra positiva (Spike) e com amostra negativa (NS1 DenV) para as unidades sensoriais FOAC (a) e FO (b).

Fonte: Elaborada pela autora.

A mesma análise foi feita para o biossensor construído com SAM 2 contendo 4 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpos (figura 10). Na unidade sensorial FOAC (Figura 10a) a variação foi de $|\Delta C_{\text{spike,FOAC}}| = (1,2 \pm 0,3)$ nF para a amostra positiva e $|\Delta C_{\text{NS1,FOAC}}| = (2,5 \pm 0,4)$ nF para amostra negativa. Enquanto para a unidade FO (Figura 10b) os resultados foram de $|\Delta C_{\text{spike,FO}}| = (0,23 \pm 0,03)$ nF e $|\Delta C_{\text{NS1,FO}}| = (1,5 \pm 0,9)$ para a amostra positiva e negativa, respectivamente.

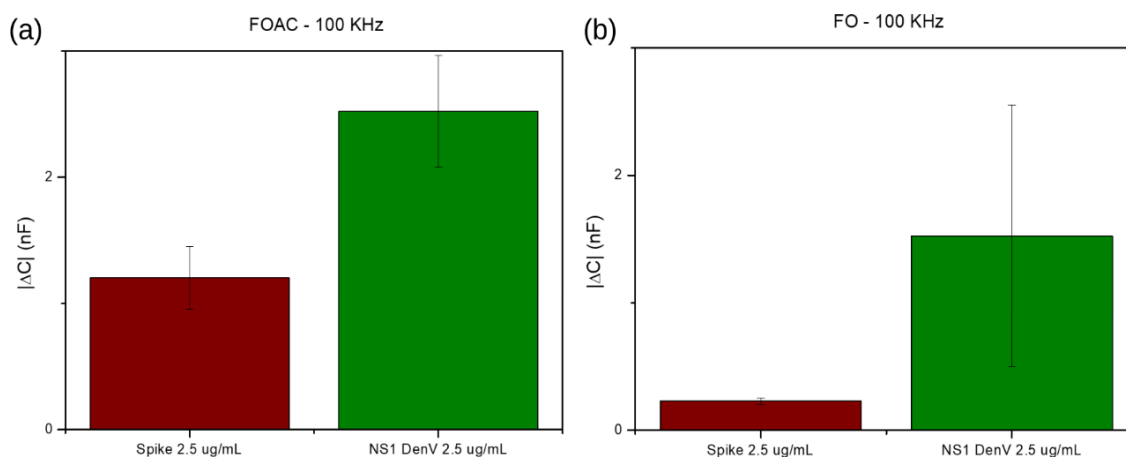


Figura 10 – Gráfico de barras mostrando o módulo da variação da capacitância em 100 kHz para a SAM 2 construída com 4 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpos: após a incubação do biossensor com a amostra positiva (Spike) e com a amostra negativa (NS1 DenV) para as unidades sensoriais FOAC (a) e FO (b).

Fonte: Elaborada pela autora.

A Tabela 2 mostra o fator sinal/ruído das duplicatas para cada uma das unidades sensoriais nas duas concentrações analisadas de anticorpos. A imobilização com 4 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpos apresentou valores baixos de sinal/ruído para ambas unidades sensoriais e suas duplicatas, representando uma baixa seletividade do biossensor. Por outro lado, na

imobilização com 40 µg/mL de anticorpos da unidade FOAC, as duas réplicas incubadas com as proteínas spike têm valores altos, mostrando que a variação da capacitância da amostra positiva foi significativamente maior do que a da amostra negativa. Para as réplicas das unidades FO, os valores do fator sinal/ruído são bem menores, mostrando que a variação da capacitância (Figura 9b) pode ser proveniente de interações não-específicas. Portanto, obiossensor demonstrou potencial para discriminação da amostra positiva quando utilizada a concentração de 40 µg/mL de anticorpos. Para essas condições foi realizada a análise estatística por PCA.

Tabela 2 – Análise do fator sinal/ruído para as duplicatas das unidades sensoriais FOAC e FO nas duas concentrações de anticorpos analisadas (4 µg/mL e 40 µg/mL).

FOAC	E1	E2	FO	E1	E2
40 µg/mL	6,3 ± 0,5	7,7 ± 0,8	40 µg/mL	-1,71 ± 0,09	-3,08 ± 0,06
4 µg/mL	0,36 ± 0,04	0,62 ± 0,07	4 µg/mL	0,40 ± 0,10	0,10 ± 0,05

Fonte: Elaborada pela autora.

O gráfico de *score* (Figura 11a) indica que o biossensor foi capaz de diferenciar as duas amostras com 99,3 % considerando apenas a primeira componente principal (eixo x) e 100% quando somado PC1 + PC2. No entanto, o gráfico de *loading* (Figura 11b) mostra que as duas unidades sensoriais têm uma grande contribuição para a discriminação da PC1 (analisando as componentes em x). Apesar da análise estatística de PCA ter indicado que as duas unidades sensoriais tiveram grande contribuição na discriminação das amostras, os resultados de sinal/ruído discutidos previamente demonstram a seletividade do biossensor associado a unidade FOAC para a detecção da proteína Spike

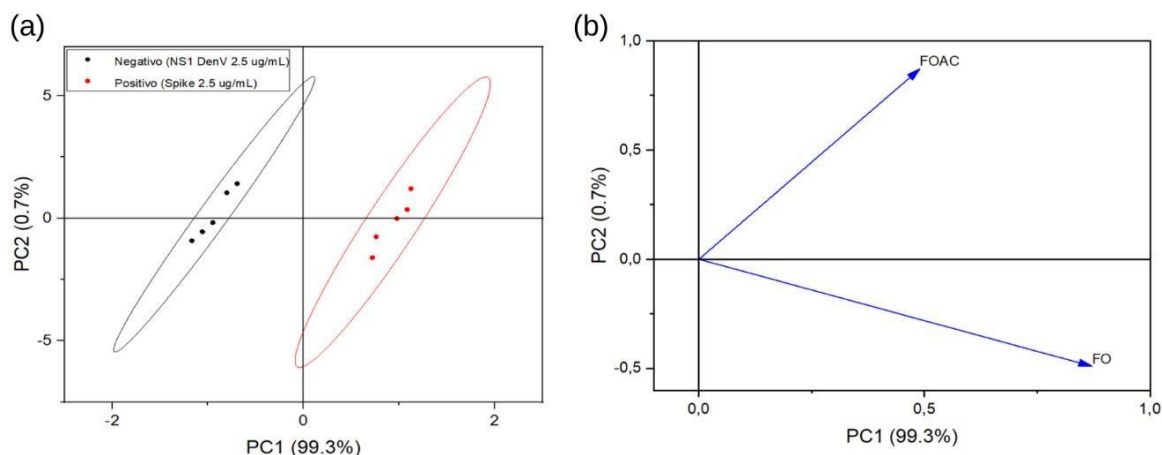


Figura 11 - Análise de PCA para a SAM 2: (a) Gráfico de *score* representando a discriminação entre a amostra negativa (NS1 DenV 2,5 $\mu\text{g/mL}$) e positiva (Spike 2,5 $\mu\text{g/mL}$) e (b) Gráfico de *loading* representando a influência das unidades sensoriais FOAC e FO nas componentes principais para a discriminação dos grupos. Ambos os resultados de PCA foram feitos para a frequência de 100 kHz.

Fonte: Elaborada pela autora.

As duplicatas dos eletrodos modificados com 40 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram uma boa reprodutibilidade, como observado na Figura 12, com desvio padrão de $\pm 0,2$ nF entre os seus valores de capacitância.

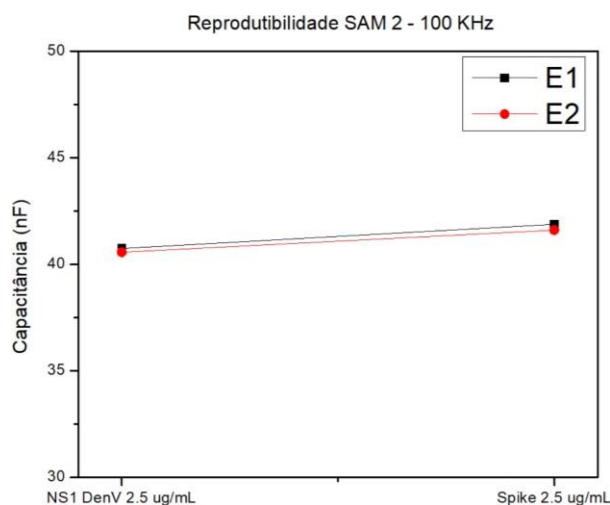


Figura 12 – Reprodutibilidade das medidas elétricas de capacitância para NS1 DenV 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e Spike 2,5 $\mu\text{g/mL}$ para as duplicatas dos eletrodos modificados com a SAM 2 contendo 40 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpos anti-spike.

Fonte: Elaborada pela autora.

As próximas etapas envolvem testes com diferentes concentrações da Spike para a construção da curva analítica e uma análise estatística com mais réplicas para aumentar a confiabilidade dos resultados. Ainda assim, os resultados da SAM 2 são promissores e mostram a capacidade do imunossensor em detectar a proteína Spike.

4 CONCLUSÃO

Os experimentos de caracterização das monocamadas automontadas mostraram a influência da concentração dos anticorpos e da estratégia escolhida para sua imobilização. A partir dos nossos resultados, encontramos que os eletrodos modificados com a SAM 2 apresentaram melhor desempenho. Nos espectros Raman foi possível observar picos em 1406cm^{-1} e 1560cm^{-1} após a incubação com os anticorpos nas duas concentrações testadas, que indicam a presença do grupo amida formado a partir da ligação covalente entre a cisteamina e os anticorpos. Já no AFM, o aumento da rugosidade do eletrodo de $1,6 \pm 0,2$ nm, após a modificação com cisteamina, para $4,0 \pm 0,7$ nm após a modificação com os anticorpos, demonstrou que a melhor concentração para a imobilização dos anticorpos foi a de $40\text{ }\mu\text{g/mL}$. Essa configuração da SAM 2 também foi a que forneceu os melhores resultados nas medidas de capacitância elétrica na frequência de 100 kHz. O fator sinal/ruído calculado para as duas réplicas foi bastante significativo (E1: $6,3 \pm 0,5$, E2: $7,7 \pm 0,8$), demonstrando a seletividade do biossensor na detecção da proteína Spike. A melhor análise e discriminação das amostras foi obtida pelo módulo da variação da capacitância associado com o fator sinal/ruído e não pelo PCA construído para as duas unidades sensoriais. Os próximos passos incluem a otimização do sensor, através de testes com variação da concentração da Spike para a construção da curva de calibração e análise estatística com maior número de réplicas. Em seguida, será avaliado o seu desempenho com amostras reais para aplicação no sistema de saúde público como uma alternativa rápida, precisa e de baixo-custo aos testes já existentes.

Em suma, os resultados mostraram que o imunossensor elétrico é promissor para o diagnóstico da COVID-19 sem detecção cruzada com a proteína NS1 da Dengue. Nosso dispositivo poderá auxiliar na redução da taxa de infecção pela COVID-19, pois possibilita um diagnóstico preciso, rápido e de baixo-custo já nos primeiros dias de infecção e poderá ser aplicado na testagem em massa da população mesmo em regiões onde não há infraestrutura laboratorial, uma vez que seu sistema de medida pode ser miniaturizado e portátil.

REFERÊNCIAS

- 1 ACTER, T. *et al.* Evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) as coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: a global health emergency. *Science of the Total Environment*, v. 730, p. 138996, 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138996.
- 2 NISHIURA, H.; LINTON, N. M.; AKHMETZHANOV, A. R. Initial cluster of novel coronavirus (2019-nCoV) infections in Wuhan, China is consistent with substantial human-to-human transmission. *Journal of Clinical Medicine*, v. 9, n. 2, p. 488, 2020.
- 3 YADAV, R. *et al.* Role of structural and non-structural proteins and therapeutic targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells*, v. 10, n. 4, p. 821, 2021.
- 4 SOUZA, P. F. N. *et al.* The human pandemic coronaviruses on the show: the spike glycoprotein as the main actor in the coronaviruses play. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 179, p. 1–19, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.203.
- 5 ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. *Histórico da pandemia de COVID-19*. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19>. Acesso em: 30 abr. 2021.
- 6 BRAZIL: WHO Coronavirus disease (COVID-19) dashboard with vaccination data. Disponível em: <https://covid19.who.int>. Acesso em: 30 abr. 2021
- 7 WORLD HEALTH ORGANIZATION. *COVID-19 vaccines*. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/covid-19-vaccines>. Acesso em: 30 abr. 2021.
- 8 MOBED, A.; SHAFIGH, E. S. Biosensors promising bio-device for pandemic screening “COVID-19”. *Microchemical Journal*, v. 164, p. 106094, 2021. DOI: 10.1016/j.microc.2021.106094.
- 9 KUDR, J. *et al.* COVID-19: a challenge for electrochemical biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 136, p. 116192, 2021. DOI: 10.1016/j.trac.2021.116192.
- 10 ABID, S. A. *et al.* Biosensors as a future diagnostic approach for COVID-19. *Life Sciences*, v. 273, p. 119117, 2021. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119117.
- 11 SEO, G. *et al.* Rapid detection of COVID-19 causative virus (SARS-CoV-2) in human nasopharyngeal swab specimens using field-effect transistor-based biosensor. *ACS Nano*, v. 14, n. 4, p. 5135–5142, 2020.
- 12 WEN, T. *et al.* Development of a lateral flow immunoassay strip for rapid detection of IgG antibody against SARS-CoV-2 virus. *Analyst*, v. 145, n. 15, p. 5345–5352, 2020.
- 13 MOITRA, P. *et al.* Selective naked-eye detection of SARS-CoV-2 mediated by N Gene targeted antisense oligonucleotide capped plasmonic nanoparticles. *ACS Nano*, v. 14, n. 6, p. 7617–7627, 2020.

- 14 RASHED, M. Z. *et al.* Rapid detection of SARS-CoV-2 antibodies using electrochemical impedance-based detector. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 171, p. 112709, 2021. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112709.
- 15 QIU, G. *et al.* Dual-functional plasmonic photothermal biosensors for highly accurate severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 detection. *ACS Nano*, v. 14, p. 5268–5277, 2020. DOI: 10.1021/acsnano.0c02439.
- 16 ADROVER-JAUME, C. *et al.* Paper biosensors for detecting elevated IL-6 levels in blood and respiratory samples from COVID-19 patients. *Sensors & Actuators B: chemical*, v. 330, p. 129333, 2021. DOI: 10.1016/j.snb.2020.129333.
- 17 YAKOH, A. *et al.* Paper-based electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 176, p. 112912, 2021.
- 18 ZHU, X. *et al.* Multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nanoparticle-based lateral flow biosensor for the diagnosis of COVID-19. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 166, p. 112437, 2020. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112437.
- 19 ZHAO, H. *et al.* Ultrasensitive supersandwich-type electrochemical sensor for SARS-CoV-2 from the infected COVID-19 patients using a smartphone. *Sensors and Actuators B: chemical*, v. 327, p. 128899, 2021. DOI: 10.1016/j.snb.2020.128899.
- 20 FUNARI, R.; CHU, K.-Y.; SHEN, A. Q. Detection of antibodies against SARS-CoV-2 spike protein by gold nanospikes in an opto-microfluidic chip. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 169, p. 112578, 2020. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112578.
- 21 QUIJANO-RUBIO, A. *et al.* De novo design of modular and tunable protein biosensors. *Nature*, v. 591, n. 7850, p. 482–487, 2021.
- 22 MAVRIKOU, S.; MOSCHOPOULOU, G.; TSEKOURAS, V.; KINTZIOS, S. Development of a portable, ultra-rapid and ultra-sensitive cell-based biosensor for the direct detection of the SARS-CoV-2 S1 spike protein antigen. *Sensors*, v. 20, n. 11, p. 3121, 2020.
- 23 ERTÜRK, G.; MATTIASSON, B. Capacitive biosensors and molecularly imprinted electrodes. *Sensors*, v. 17, n. 2, p. 390, 2017.
- 24 LABIB, M.; HEDSTRÖM, M.; AMIN, M.; MATTIASSON, B. A capacitive immunosensor for detection of cholera toxin. *Analytica Chimica Acta*, v. 634, n. 2, p. 255–261, 2009.
- 25 LOYPRASERT, S. *et al.* Sub-attomolar detection of cholera toxin using a label-free capacitive immunosensor. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 25, n. 8, p. 1977–1983, 2010.
- 26 TEEPARUKSAPUN, K. *et al.* Ultrasensitive detection of HIV-1 p24 antigen using nanofunctionalized surfaces in a capacitive immunosensor. *Analytical Chemistry*, v. 82, n. 20, p. 8406–8411, 2010.

- 27 LABIB, M.; HEDSTRÖM, M.; AMIN, M.; MATTIASSON, B. A novel competitive capacitive glucose biosensor based on concanavalin A-labeled nanogold colloids assembled on a polytyramine-modified gold electrode. *Analytica Chimica Acta*, v. 659, n. 1-2, p. 194–200, 2010.
- 28 WANG, L. *et al.* A sensitive DNA capacitive biosensor using interdigitated electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 87, p. 646–653, 2017. DOI: 10.1016/j.bios.2016.09.006.
- 29 PARK, J.-W. *et al.* Rapid and sensitive detection of Nampt (PBEF/visfatin) in human serum using an ssDNA aptamer-based capacitive biosensor. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 38, n. 1, p. 233–238, 2012.
- 30 JANTRA, J. *et al.* Real-time label-free affinity biosensors for enumeration of total bacteria based on immobilized concanavalin A. *Journal of Environmental Science and Health A*, v. 46, n. 13, p. 1450–1460, 2011.
- 31 QURESHI, A. *et al.* Whole-cell based label-free capacitive biosensor for rapid nanosize-dependent toxicity detection. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 67, p. 100–106, 2015. DOI: 10.1016/j.bios.2014.07.038.
- 32 TRILLING, A. K.; BEEKWILDER, J.; ZUILHOF, H. Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. *Analyst*, v. 138, n. 6, p. 1619–1627, 2013.
- 33 QUOC, T. V. *et al.* High-frequency interdigitated array electrode-based capacitive biosensor for protein detection. *BioChip Journal*, v. 13, n. 4, p. 403-415, 2019.
- 34 RAMAN DATA AND ANALYSIS. *Raman spectroscopy for analysis and monitoring*. Disponível em: https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Technology/Measurement_Techniques/Molecular_Spectroscopy/Raman_Spectroscopy/Raman_Academy/Raman_Tutorial/Raman_bands.pdf. Acesso em: 20 de jun. 2021.
- 35 TRILLING, A. K.; BEEKWILDER, J.; ZUILHOF, H. Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. *Analyst*, v. 138, n. 6, p. 1619-1627, 2013.
- 36 KANN, B.; OFFERHAUS, H. L.; WINDBERGS, M.; OTTO, C. Raman microscopy for cellular investigations — from single cell imaging to drug carrier uptake visualization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 89, p. 71–90, 2015. DOI:10.1016/j.addr.2015.02.006.
- 37 BERGGREN, C.; BJARNASON, B.; JOHANSSON, G. Capacitive biosensors. *Electroanalysis: an international journal devoted to fundamental and practical aspects of electroanalysis*, v. 13, n. 3, p. 173-180, 2001.