



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

JULIA AUGUSTO VIEIRA

Desenvolvimento de um nanobiosensor de nanopartículas de ouro (AuNPs) funcionalizadas com anticorpos de glicoproteína anti-SARS-CoV-2 e testagem em pacientes voluntários.

Brasília – DF

2023



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

JULIA AUGUSTO VIEIRA

Desenvolvimento de um nanobiosensor de nanopartículas de ouro (AuNPs) funcionalizadas com anticorpos de glicoproteína anti-SARS-CoV-2 e testagem em pacientes voluntários.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Linha de Pesquisa: Aplicações de materiais nanoestruturados

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo

Brasília – DF
2023

Ficha catalográfica

JULIA AUGUSTO VIEIRA

Desenvolvimento de um nanobiosensor de nanopartículas de ouro (AuNPs) funcionalizadas com anticorpos de glicoproteína anti-SARS-CoV-2 e testagem em pacientes voluntários.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Membros Componentes da Banca Examinadora:

Orientador: **Prof. Ricardo Bentes de Azevedo, Dr.**
Universidade de Brasília, UnB.

Membro Titular: **Profa. Patrícia Bento da Silva, Dra.**
PerkinElmer.

Membro Titular: **Profa. Glêndara Aparecida de Souza
Martins, Dra.**
Universidade Federal do Tocantins, UFT.

Local: Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
UnB – Campus Darcy Ribeiro

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Bernar e Marilene, pela preocupação, apoio, carinho, mas principalmente pela determinação e esforço em proporcionar a melhor educação para mim.

À minha irmã, Renata, minha melhor amiga, conselheira e que com sua vasta experiência sempre me orientou, não permitindo com que eu desistisse dos meus objetivos, mas sempre me resguardando em momentos difíceis.

As minhas amadas tias, Mercedes e Magda (*in memorian*), por sempre me incentivarem a estudar e me apoiarem em minhas decisões.

Ao meu orientador, professor e pesquisador, Ricardo Bentes de Azevedo, que sempre esteve ao meu lado me direcionando e valorizando meu trabalho.

À minha professora, pesquisadora e amiga Patrícia Bento da Silva, que foi o meu pilar, fornecendo toda a ajuda possível para que eu realizasse o meu Mestrado.

A todos os pesquisadores do Laboratório de Nanobiotecnologia, por dedicarem seu tempo não só aos seus projetos, mas aos meus também.

À equipe de funcionários, alunos e professores do Instituto de Biologia, por contribuírem, cada um ao seu modo, para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

À Universidade de Brasília pela ajuda na realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa e auxílio financeiro nos projetos.

*“Há, verdadeiramente, duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância”
(Hipócrates).*

RESUMO

A pandemia de COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, compreende uma doença infecciosa. Os coronavírus (CoVs), que fazem parte de uma família viral, são reconhecidos por provocar uma variedade de doenças respiratórias em humanos, que vão desde o resfriado comum até condições mais raras e graves, como a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) e a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS). Essas informações são registradas pelo painel da Organização Mundial da Saúde. No que diz respeito à transmissão, as gotículas respiratórias são o principal meio de contaminação, permitindo que o SARS-CoV-2 seja transmitido de uma pessoa infectada para uma pessoa saudável através do contato físico com o paciente doente ou ao entrar em contato com seus pertences. Os coronavírus (CoVs) têm a capacidade de permanecer em superfícies por vários dias, o que pode explicar o caso do SARS-CoV-2 e representar um risco prolongado de infecção. A nanotecnologia tem encontrado ampla aplicação em diversos campos de estudo, incluindo medicina, bio-rotulagem e agricultura. Nos dias atuais, essa tecnologia tem sido empregada em diferentes domínios da ciência médica, como a entrega direcionada de medicamentos, o diagnóstico de câncer e o desenvolvimento de agentes contra infecções virais, bacterianas e fúngicas. As nanopartículas de ouro (AuNPs) apresentam características que incluem a capacidade de fornecer uma superfície estável para a imobilização de biomoléculas, o que é altamente útil na preparação de biossensores. Elas são consideradas as nanopartículas metálicas mais estáveis devido às suas propriedades ópticas, eletrônicas e catalíticas, além de possuírem alta biocompatibilidade e uma taxa aprimorada de transferência de elétrons. Por esses motivos, as AuNPs têm encontrado amplas aplicações em diversos tipos de biossensores. No presente estudo, foi conduzido o desenvolvimento de um nanobiossensor utilizando AuNPs que foram funcionalizadas com anticorpos específicos para a glicoproteína do SARS-CoV-2. O principal objetivo desse nanobiossensor era possibilitar a detecção altamente específica do vírus SARS-CoV-2. Os resultados de caracterização das AuNP50 e AuNP100 nuas e funcionalizadas mostraram que as nanopartículas ficaram estáveis (diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão). As nanopartículas funcionalizadas mostraram um bom desempenho quanto à ligação nos vírus SARS-CoV-2. Por fim, quando as AuNP100 funcionalizadas foram colocadas em contato com as amostras de pacientes positivados, houve alteração no tamanho das nanopartículas verificadas pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS).

Palavras-chave: SARS-CoV-2, nanopartícula de ouro, espalhamento dinâmico de luz.

ABSTRACT

The current COVID-19 pandemic, caused by the SARS-CoV-2 virus, comprises an infectious disease. Coronaviruses (CoVs), which are part of a viral family, are recognized for causing a variety of respiratory diseases in humans, ranging from the common cold to rarer and more severe conditions such as Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and Middle East Respiratory Syndrome (MERS). This information is recorded by the World Health Organization panel. As far as transmission is concerned, respiratory droplets are the primary means of contamination, allowing SARS-CoV-2 to be transmitted from an infected person to a healthy person through physical contact with the sick patient or by coming into contact with their belongings. Coronaviruses (CoVs) have the ability to remain on surfaces for several days, which may explain the case of SARS-CoV-2 and represent a prolonged risk of infection. Nanotechnology has found extensive application in various fields of study, including medicine, biolabeling, and agriculture. Nowadays, this technology has been employed in different domains of medical science, such as targeted drug delivery, cancer diagnosis, and the development of agents against viral, bacterial, and fungal infections. Gold nanoparticles (AuNPs) exhibit characteristics that include the ability to provide a stable surface for the immobilization of biomolecules, which is highly useful in the preparation of biosensors. They are considered the most stable metallic nanoparticles due to their optical, electronic, and catalytic properties, as well as having high biocompatibility and an improved rate of electron transfer. For these reasons, AuNPs have found wide applications in various types of biosensors. In the present study, the development of a nanobiosensor was conducted using AuNPs that were functionalized with antibodies specific for the SARS-CoV-2 glycoprotein. The main goal of this nanobiosensor was to enable highly specific detection of the SARS-CoV-2 virus. The characterization results of the naked and functionalized AuNP50 and AuNP100 showed that the nanoparticles were stable (hydrodynamic diameter and polydispersity index). The functionalized nanoparticles showed good performance regarding binding on SARS-CoV-2 viruses. Finally, when the functionalized AuNP100 were put in contact with the samples from positive patients, there was a change in the size of the nanoparticles verified by dynamic light scattering (DLS) technique.

Keywords: SARS-CoV-2, gold nanoparticle, dynamic light scattering.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática do vírus.....	15
Figura 2.	Representação esquemática da estrutura do SARS-CoV-2.....	16
Figura 3.	Representação esquemática da entrada do CoVs na célula hospedeira.....	17
Figura 4.	Esquema do protocolo de incubação do bioconjugado pAbS1N36@AuNPs100 com amostras biológicas coletadas de pacientes.....	32
Figura 5.	Tamanho e a morfologia das nanopartículas e a distribuição de tamanho correspondente: (A) AuNPs50 e (B) pAbS1N18@AuNPs50.....	33
Figura 6.	Interação do SARS-CoV-2 e do bioconjugado pAbS1N36@AuNPs50. (A) pAbS1N36@AuNPs50; (B) vírus SARS-CoV-2 inativado; as setas rosas mostram a proteína spike do vírus. (C) reação entre pAbS1N36@AuNPs50 e vírus SARS-CoV-2 inativado a 2.11×10^5 TCID ₅₀ /mL e (D) imagem ampliada de uma região na imagem C, o que demonstra a interação entre pAbS1N36@AuNPs50 (asterisco amarelo) e o vírus SARS-CoV-2 (asterisco verde).....	34
Figura 7.	Espectros UV-Vis (400-900 nm) AuNPs50, pAbS1N18@AuNPs50, pAbS1N27@AuNPs50, e pAbS1N36@AuNPs50.....	35
Figura 8.	Espectros UV-Vis (400-900 nm) AuNPs100, pAbS1N18@AuNPs100, pAbS1N27@AuNPs100, e pAbS1N36@AuNPs100.....	35
Figura 9.	<i>Z-average</i> pela intensidade das amostras de AuNPs50 e pAbS1N18@AuNPs50 no D1 e média de cinco corridas do PDI das amostras de AuNPs50 e pAbS1N18@AuNPs50 no D1.....	36
Figura 10.	<i>Z-average</i> pela intensidade das amostras de AuNPs50 e pAbS1N18@AuNPs100 no D1 e média de cinco corridas do PDI das amostras de AuNPs50 e pAbS1N18@AuNPs100 no D1.....	37
Figura 11.	Estabilidade <i>Z-average</i> pela intensidade das amostras de AuNPs50 (A) e pAbS1N18@AuNPs50 (B).....	38
Figura 12.	Estabilidade <i>Z-average</i> pela intensidade das amostras de AuNPs100 (A) e pAbS1N18@AuNPs100 (B).....	38
Figura 13.	Distribuição de tamanho por Número pAbS1N36@AuNPs100.....	40
Figura 14.	Distribuição de tamanho por Volume pAbS1N36@AuNPs100.....	40
Figura 15.	Distribuição do diâmetro por intensidade para diferentes cepas A/Brisbane-H1N1, A/Sul da Austrália-H2N3, B/Washington, B/Phuket, e vírus SARS-CoV-2.....	41
Figura 16.	Medidas de DLS por intensidade versus tamanho para pAbS1N36@AuNPs100 antes e depois da incubação com o vírus SARS-CoV-2 inativado a $2,11 \times 10^5$ TCID ₅₀ /mL.....	42

Figura 17.	Medidas de DLS por intensidade versus tamanho para pAbS1N36@AuNPs100 antes e depois da incubação com amostras de pacientes considerados negativos: (A) amostras nasofaringe e (B) amostras de saliva dos pacientes. Os resultados são dados como a média de um experimento com cinco medidas de DLS de cada uma.....	42
Figura 18.	<i>Z-Average</i> e PDI do bioconjugado pAbS1N36@AuNPs100 (Bio 8_Sac) antes e após incubação com amostras de saliva de pacientes. Os resultados estão apresentados como a média de um experimento, e cinco medições de DLS.....	43
Figura 19.	Diferença de diâmetro hidrodinâmico (DH) de todas as amostras de pacientes incubadas com o bioconjugado pAbS1N36@AuNPs100 menos o bioconjugado isolado. Os resultados estão apresentados como a média de um experimento, e cinco medições de DLS.....	44
Figura 20.	<i>Z-Average</i> e PDI do bioconjugado pAbS1N36@AuNPs100 (Bio 4_Sac) antes e após incubação com amostras de nasofaringe de pacientes. Os resultados estão apresentados como a média de um experimento, e cinco medições de DLS.....	45
Figura 21.	Diferença de DH de todas as amostras de pacientes incubadas com o bioconjugado pAbS1N36@AuNPs100 menos o bioconjugado isolado. Os resultados estão apresentados como a média de um experimento, e cinco medições de DLS.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Conjunto de materiais.....	28
------------------	----------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2
AuNPs	Nanopartículas de ouro
AST	Aspartato transaminase
BSA	Albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
CoVs	Coronavírus
DH	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	Espalhamento dinâmico da luz
ddPCR	PCR Digital em Gotas
DTSSP	3,3'-ditiobis (propionato de sulfosuccinimidil)
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GAGs	Glicosaminoglicanos
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
HCoV	Coronavírus humano
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
LAMP	Amplificação isotérmica mediada por loop
LDH	Lactato desidrogenase
mAb	Anticorpo monoclonal anti-hemaglutinina
MERS	Síndrome Respiratória do Oriente Médio
NAAT	Teste de amplificação de ácido nucleico
NfL	Polipeptídeo leve de neurofilamento
NPs	Nanopartículas
NPs	Peptídeos natriuréticos
NSE	Enolase específica de neurônio
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCT	procalcitonina
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
rRT-PCR	RT-PCR em tempo real
RT-LAMP	LAMP de transcrição reversa
RT-qPCR	PCR de transcrição reversa quantitativa

SARS	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SERS	Espectroscopia Raman amplificada por superfície
SHERLOCK	Desbloqueio específico de repórter enzimático de alta sensibilidade
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TMPRSS2	Serino protease transmembrana tipo II
TREM	Receptor de ativação expresso em células mieloides
UV-Vis	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Estrutura viral.....	15
1.2. SARS-CoV-2.....	16
1.3. Transmissão da COVID-19.....	18
1.4. Diagnóstico da COVID-19.....	18
1.4.1. Apresentação clínica.....	19
1.4.2. Exames laboratoriais de triagem.....	19
1.4.3. Biomarcadores laboratoriais.....	20
1.4.4. Exames radiográficos.....	20
1.4.5. Detecção de ácido nucleico.....	21
1.4.6. Exames imunológicos.....	22
1.4.7. Técnica CRISPR.....	23
1.4.8. Técnica baseada em sequenciamento de próxima geração (NGS).....	23
1.5. Nanopartícula para o diagnóstico da COVID-19.....	24
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo Geral.....	27
3.2. Objetivos Específicos.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. Materiais.....	28
4.2. Reação de acoplamento.....	28
4.3. Métodos de caracterização das AuNPs	30
4.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	30
4.3.2. Espectroscopia no Uv-Vis.....	30
4.3.3. Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS).....	30
4.4. Incubação dos biconjugados com os vírus da Influenza e SARS-CoV-2.....	30
4.4.1. Incubação dos biconjugados com amostras biológicas.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
5.1. Caracterização das AuNPs50, AuNPs100 e seus bioconjugados.....	33
5.1.1. MET.....	33
5.1.2. UV-Vis Espectrofotômetro.....	34

5.1.3. DLS.....	36
5.2. Incubação dos bioconjugados com os vírus da Influenza e SARS-CoV-2.....	41
5.3. Incubação dos bioconjugados com amostras biológicas.....	42
6. CONCLUSÃO.....	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1. Introdução

1.1. Estrutura viral

A origem dos vírus ainda é considerada complexa e há estudos que afirmam que os vírus são polifiléticos, ou seja, que diferentes linhagens virais se originaram independentemente (FORTERRE, 2006; KRUPOVIC, 2013; GIBBS et al., 2020). A taxonomia viral é essencial na descrição dos vírus e desempenha a função de um catálogo unificado das diversas espécies virais. Os vírus são classificados em uma hierarquia de níveis taxonômicos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (SIMMONDS; AIEWSAKUN, 2018).

Os vírus são agentes infecciosos ultramicroscópicos (20-300 nm de diâmetro) que têm a capacidade de se replicar somente em células hospedeiras vivas (ROBB, 2020). Na célula hospedeira, o genoma viral direciona a produção de partículas virais infecciosas da progênie, também conhecidas como vírions. Os vírions são o veículo de transmissão do genoma viral para o próximo hospedeiro, para iniciar uma nova rodada de infecção (MARTÍN, 2019).

Como observado na Figura 1, os vírus são compostos por material genético - ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA) - em seu núcleo, por um revestimento de proteínas (capsídeo) e alguns vírus mais complexos possuem um envelope lipídico, cuja origem remonta do momento no qual o vírus deixa a célula hospedeira e leva consigo uma parte da membrana citoplasmática (ROBB, 2020).

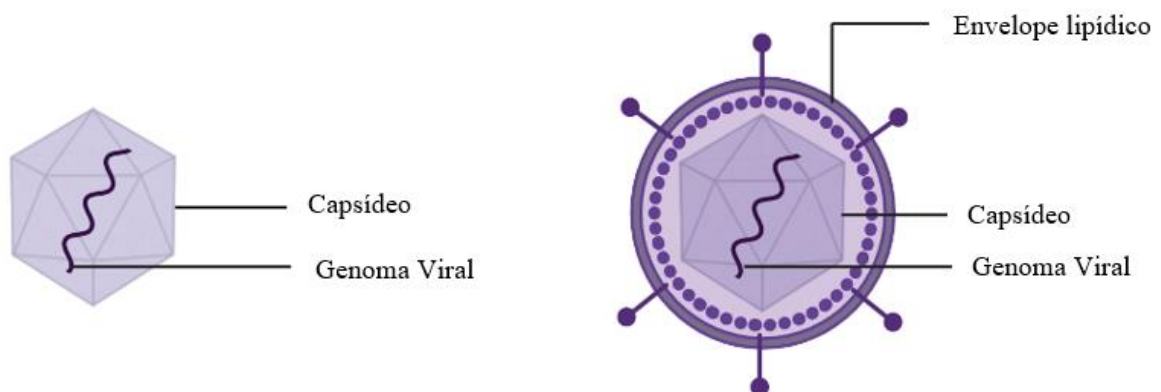


Figura 1. Representação esquemática dos vírus. Fonte: autoria própria (2022).

1.2. SARS-CoV-2

A pandemia da doença do coronavírus (COVID-19) compreende uma doença infecciosa causada pelo vírus SARS-CoV-2. De acordo com o painel da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2020) os coronavírus (CoVs) fazem parte de uma família de vírus, os quais causam doenças respiratórias em humanos desde o resfriado comum até doenças mais raras e graves, como a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) e a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS).

Os CoVs pertencem a ordem *Nidovirales*, são membros da subfamília *Coronavirinae* na família *Coronaviridae* (LEPELLETIER.D, GRANDBASTIEN B, MICHAEL J. SMART, 2020). São vírus envelopados, o genoma é composto por RNA fita simples de sentido positivo e possuem de 26 a 32 kilobases (kb) de comprimento, além de possuir o maior genoma dentre os vírus. Ainda na classificação genética e antigênica, os CoVs foram organizados em três grupos: α -CoVs, β -CoVs e γ -CoVs (FIELDING, 2019).

No genoma dos CoVs existem 14 fases de leitura aberta codificando proteínas não estruturais para processos de replicação e montagem de vírus, proteínas estruturais, incluindo envelope (E), membrana/matriz (M), nucleocapsídeo (N), spike (S) e proteínas acessórias (ABDULJALIL; ABDULJALIL, 2020), que podem ser visualizadas na Figura 2.

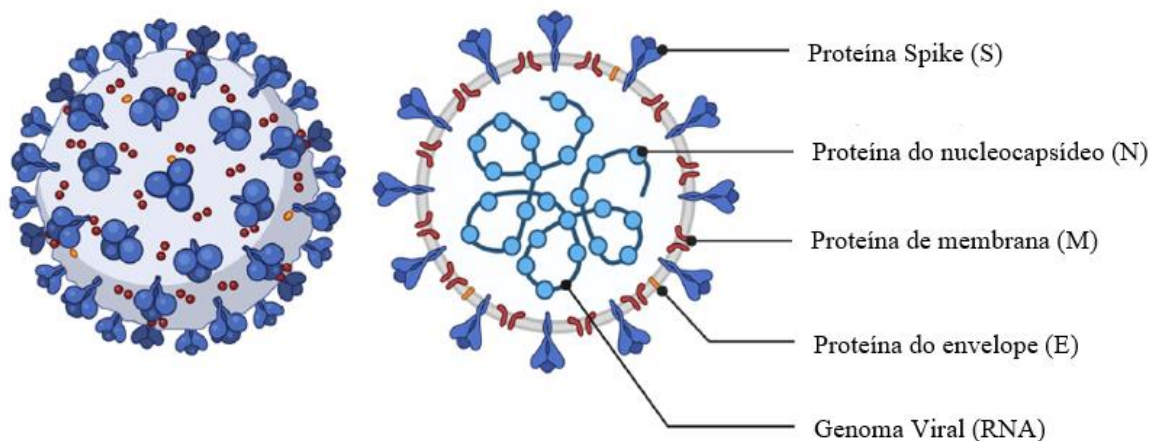


Figura 2. Representação esquemática da estrutura do SARS-CoV-2. Fonte: adaptado de Majumder & Minko (2021).

A proteína E é o menor componente da estrutura do SARS-CoV-2, cuja função é facilitar a produção, maturação e liberação de vírions (ABU et al., 2020).

A proteína M é uma das proteínas mais abundantes e bem conservadas na estrutura do vírion. (MOHAMADIAN et al., 2021). Esta proteína desempenha um papel muito importante na montagem viral e já mostrou induzir a apoptose (YOSHIMOTO, 2020).

A proteína N se liga ao genoma viral e está envolvida na replicação do RNA, formação de vírions e evasão imune. A proteína do nucleocapsídeo também interage com as proteínas não estruturais e a proteína M (MU et al., 2020).

A proteína S, é uma proteína transmembrana que facilita a ligação do envelope viral aos receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) expressos nas superfícies das células hospedeiras (como em pneumócitos do tipo II) (RABI et al., 2020). A proteína spike é composta de subunidades de ligação ao receptor (S1) e fusão da membrana celular (S2) (KHAILANY; SAFDAR; OZASLAN, 2020).

A entrada do coronavírus se dá pela ligação dessa proteína S ao receptor ACE2 e logo em seguida ocorre a fusão da membrana viral com a célula hospedeira (ALEXANDRA C. WALLS; M. ALEJANDRA TORTORICI; ANDREW T. MCGUIRE, 2020). Conforme exposto na Figura 3, após a fusão das membranas, a proteína S se liga ao receptor ACE2, o qual está presente nas células hospedeiras, formando um complexo que sofre uma proteólise pela enzima serino protease transmembrana tipo II (TMPRSS2), levando à clivagem do ACE2 e à ativação da proteína S. (RABI et al., 2020). Dessa forma, com o ACE2 clivado e a proteína S ativada, o coronavírus possui a entrada facilitada na célula hospedeira.

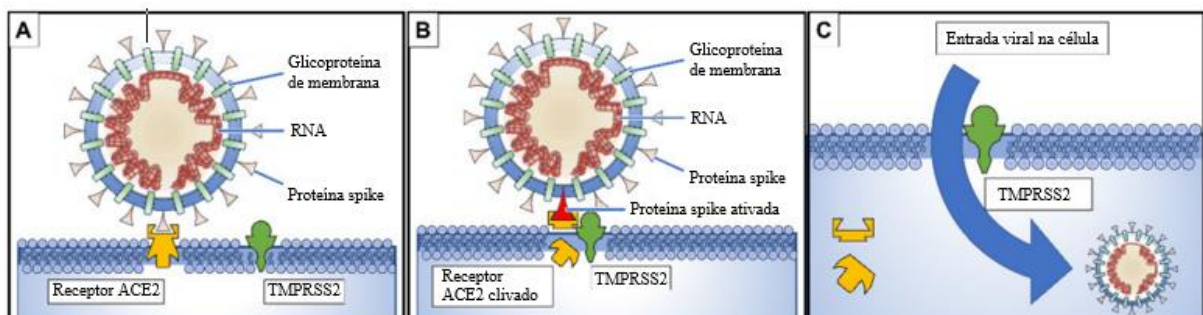


Figura 3. Representação esquemática da entrada do CoVs na célula hospedeira. Fonte: Adaptado de Rabi et al. (2020).

Para que ocorra a replicação do CoVs, é necessária a presença de uma célula hospedeira e inclui os seguintes passos: adsorção, penetração, desnudamento, transcrição e tradução (síntese), maturação e liberação. A proteína S na superfície do CoVs se liga ao receptor ACE2

na célula hospedeira facilitando seu acesso. Em seguida o vírus libera seu genoma viral e com o auxílio dos ribossomos da célula hospedeira, novas poliproteínas virais são produzidas. As proteinases virais 3CLpro e PLpro clivam as poliproteínas virais em proteínas efetoras. Já a RNA polimerase dependente de RNA, sintetiza uma fita negativa de comprimento total, a qual é utilizada para produzir mais RNA viral. O genoma viral é produzido por meio da replicação genômica e as quatro proteínas virais estruturais (proteína E, M, N e S) são transcritas e traduzidas. As proteínas E, M e S são incorporadas na membrana do retículo endoplasmático, enquanto a proteína N se liga ao RNA genômico. O nucleocapsídeo é encapsulado no retículo endoplasmático e a progênie viral é transportada até a membrana celular da célula hospedeira e é liberado por meio da exocitose (MAJUMDER; MINKO, 2021).

1.3. Transmissão da COVID-19

Com relação à transmissão, as gotículas respiratórias configuram o principal meio de contaminação e o SARS-CoV-2 pode ser transmitido de uma pessoa infectada à uma pessoa saudável se esta tiver contato físico com o paciente doente ou entrar em contato com algum dos seus pertences (YESUDHAS; SRIVASTAVA; GROMIHA, 2021). Os CoVs podem se manter em superfícies por vários dias, fato que pode explicar o caso do SARS-CoV-2, podendo significar um risco prolongado da infecção (HU et al., 2021).

A transmissão, contudo, pode ser evitada mantendo uma distância de 2 metros entre as pessoas, utilizando máscaras ao sair de casa e o isolamento de pessoas com diagnóstico positivo para COVID-19 (YESUDHAS; SRIVASTAVA; GROMIHA, 2021).

1.4. Diagnóstico da COVID-19

O diagnóstico cedo e o isolamento dos possíveis contaminados desempenham papel importante no controle da pandemia. O critério para diagnóstico dessa doença foi dividido em apresentação clínica, exames laboratoriais de triagem, biomarcadores laboratoriais, exames radiográficos, detecção de ácido nucleico, exames imunológicos e novas técnicas mais robustas (MOHAMADIAN et al., 2021).

1.4.1. Apresentação clínica

De acordo com Adnan et al. (2020), os sintomas da COVID-19 são observados 5 dias após o tempo de incubação e os pacientes infectados apresentam sintomas até 11,5 dias (LAUER et al., 2020). Alguns sintomas gastrointestinais como diarreia, vômito e anorexia, foram observados nos pacientes (XIANG et al., 2020). O COVID-19 também foi associado à embolia pulmonar aguda (MARIANO; RAMOS; REIS, 2020). Em relação aos sintomas neurológicos, podemos citar não só fadiga e tontura, como também acidentes vasculares cerebrais isquêmicos e hemorrágicos e danos musculares (BRANCH, 2020).

1.4.2. Exames laboratoriais de triagem

A maioria das descobertas nos exames de sangue são inespecíficos, porém não são descartados, uma vez que podem contribuir para entender as causas da COVID-19 (MOHAMADIAN et al., 2021).

De acordo com um artigo de revisão sistemática e metanálise de Pormohammad et al., (2020), foi avaliado o resultado de exames laboratoriais de 2361 pacientes com SARS-CoV-2 e os resultados demonstraram 26% de leucopenia, 13,3% de leucocitose e 62,5% de linfopenia. No mesmo tudo, de 2200 pacientes, 81% apresentaram um aumento da proteína C reativa enquanto 91% apresentaram número de plaquetas elevado.

Ao entrar na célula hospedeira por meio da ligação entre a proteína S e o ACE2, os glicosaminoglicanos (GAGs) possui a função de um correceptor para a entrada do vírus. Essa entrada induz a expressão de células Th1, as quais fazem parte da resposta imune inata e ativam mediadores pró-inflamatórios, como interleucina-6 (IL-6), fator estimulante das colônias de macrófagos granulócitos e monócitos CD14⁺ CD16⁺ (PUM et al., 2021). Isso acelera a superexpressão de IL-6 e resulta em concentrações elevadas do fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1). Além disso, outras citocinas também são expressas e ocorre a infiltração de macrófagos e neutrófilos (HU, 2021). Essa liberação maciça de citocinas e a resposta imune atuando de forma exacerbada pode gerar uma tempestade de citocinas, que pode ser responsável por causar algumas doenças críticas, falhas inflamatórias, lesões de múltiplos órgãos e também responsável pela mortalidade da COVID-19 (PUM et al., 2021).

1.4.3. Biomarcadores Laboratoriais

Os biomarcadores laboratoriais de danos a órgãos desempenham um papel fundamental no diagnóstico, previsão e prognóstico de pacientes de alto risco. A análise de biomarcadores que refletem o envolvimento de múltiplos órgãos e/ou efeitos farmacológicos tem sido extensivamente realizada em pacientes gravemente enfermos. Alguns desses biomarcadores são empregados para monitorar disfunções em órgãos distintos ao mesmo tempo, devido à redundância ou falta de especificidade (BATTAGLINI et al., 2022).

Alguns biomarcadores utilizados na COVID-19 são: enolase específica de neurônio (NSE), lactato desidrogenase (LDH), aspartato transaminase (AST), receptor de ativação expresso em células mieloides (TREM-1 e TREM-2) para função pulmonar; peptídeos natriuréticos (NPs) e troponina para o funcionamento cardiovascular; a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), polipeptídeo leve de neurofilamento (NfL), enolase específica de neurônio (NSE) e marcadores inflamatórios para manifestações neurológicas e urina 11-dehidro-tromboxano B2, 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, procalcitonina (PCT), saturação arterial de oxigênio, nitrogênio ureico no sangue para a função do fígado e rim (BATTAGLINI et al., 2022).

1.4.4. Exames radiográficos

Pacientes diagnosticados com COVID-19 apresentam diversas características ou padrões de imagens de raio-X dependendo da duração e gravidade da doença (FANG; PANG, 2020). No entanto, a tomografia computadorizada é um exame fundamental no acompanhamento da evolução da doença (VYAKARANAM et al., 2019).

Pequenas sombras fragmentadas, presença de linha curvilínea subpleural, mudanças pleurais e sinais auriculares invertidos são comumente observados em pacientes diagnosticados com COVID-19 (AI; LV, 2020).

No trabalho de Xie et al. (2020) foi possível constatar que 3% dos pacientes obtiveram resultado negativo primário no RT-PCR, porém na tomografia computadorizada do tórax o resultado foi positivo, concluindo que os dois exames são importantes para o diagnóstico da COVID-19. Dessa forma, a tomografia computadorizada do tórax é um exame de alta sensibilidade e importante para a detecção inicial e acompanhamento da progressão da COVID-19 nos pacientes (MOHAMADIAN et al., 2021).

1.4.5. Detecção de ácido nucleico

O teste de amplificação de ácido nucleico (NAAT) é a tecnologia utilizada para realizar o diagnóstico de COVID-19 (LAI; LAM, 2020). Os ensaios NAAT têm como alvo os genes das proteínas N, S e E do SARS-CoV-2 e regiões no primeiro quadro de leitura aberto (orf1a e orf1b) e o gene da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (HONG et al., 2020). Um tipo de ferramenta que amplifica o genoma do vírus é o RT-PCR em tempo real (rRT-PCR) (MOHAMADIAN et al., 2021). Esta técnica consiste na extração de RNA da nasofaringe e orofaringe, em seguida ocorre a transcrição reversa para converter o RNA em DNA complementar (cDNA) que será amplificado (OLIVEIRA et al., 2020). Os testes contêm sondas fluorescentes os quais reconhecerão e hibridizarão com segmentos dos produtos de amplificação, aumentando a especificidade dos ensaios (CORMAN et al., 2019; COMPARING et al., 2020).

Após a coleta da secreção com o auxílio de swab, as amostras são imersas em meio de transporte/tampão de lise ou uma solução salina estéril (SRIDHAR et al., 2020) e devem ser armazenadas a 2-8 °C por até 72h após a amostragem, a fim de garantir que a performance do RT-PCR atinja sua excelência e também para evitar que ocorra a degradação do RNA (OLIVEIRA et al., 2020).

Durante a pandemia, ocorreu uma adversidade em relação à demora na liberação dos resultados dos pacientes. No protocolo do diagnóstico, a etapa de extração de RNA é longa, o que pode gerar contaminação cruzada entre as amostras e risco biológico aos funcionários que manipulam as amostras (OLIVEIRA et al., 2020). Um estudo realizado por Grant et al. (2020) mostrou o desenvolvimento de um RT-PCR que não passou pela fase de extração de RNA e no fim do experimento essa nova técnica foi comparada à uma plataforma automatizada de alto rendimento (Panther fusion Hologic) a qual atingiu 98% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Outro trabalho realizado por Rifo (2020) investigou se dois kits comerciais de PCR de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR) eram compatíveis com a detecção direta de SARS-CoV-2 de amostras de swab da nasofaringe. Foi demonstrado que um dos kits utilizado obteve uma eficiência comparável ao novo protocolo livre de extração de RNA. Sendo assim, foi evidenciado que a etapa de extração de RNA não é necessária, desde que o swab nasal do paciente esteja imerso em meio de transporte viral.

Normalmente o RT-qPCR é considerado o teste padrão-ouro para o diagnóstico final da COVID-19. A sensibilidade desse teste pode ser alterada devido a quantidade de carga viral,

técnica de extração do RNA utilizada, procedência da amostra e o estágio da doença que se encontra o paciente durante a amostragem. A ocorrência dos resultados falso-positivos é consequência da contaminação cruzada das amostras e erros humanos de manuseio (MOHAMADIAN et al., 2021). Já os resultados falso-negativos possuem origem em irregularidades durante qualquer etapa da coleta, armazenamento e processamento de amostras (OLIVEIRA et al., 2020).

Testes de ácido nucleico usando amplificação isotérmica estão atualmente em desenvolvimento para detecção de SARS-CoV-2. Esses testes de amplificação isotérmica ocorrem sem variação de temperatura normalmente exigidas para a PCR (CRAW; BALACHANDRAN, 2012) o que torna a técnica muito mais rápida comparada ao RT-PCR. As técnicas inclusas nessa amplificação isotérmica são: amplificação da polimerase recombinase, amplificação dependente de helicase e amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) (UDUGAMA et al., 2020).

As técnicas de amplificação isotérmica são realizadas a uma única temperatura e não precisam de equipamento de laboratório especializado para fornecer sensibilidades analíticas semelhantes à PCR (CRAW; BALACHANDRAN, 2012). O LAMP de transcrição reversa (RT-LAMP) foi desenvolvido e testado em alguns trabalhos para a SARS-CoV-2 (LAMB et al., 2020; YANG et al., 2020). O RT-LAMP utiliza DNA polimerase e de 4 a 6 diferentes primers que se ligam a seis regiões diferentes do genoma de interesse e é mais específica, pois utiliza um maior número de primers para realizar a reação (NOTOMI et al., 2000).

1.4.6. Exames imunológicos

Técnicas imunológicas e testes de detecção de antígeno podem ser utilizados não só para um diagnóstico rápido e econômico, como também para oferecer uma alternativa aos métodos moleculares (MOHAMADIAN et al., 2021).

Os testes de detecção de antígeno reconhecem a presença de proteínas virais do SARS-CoV-2 em amostras respiratórias e a maioria dos testes disponíveis exigem amostras retiradas da cavidade nasal ou nasofaringe (LAI; LAM, 2020). As técnicas imunológicas como o ensaio de imunofluorescência, teste de anticorpo de fluorescência direta, ensaio de detecção de proteína de nucleocapsídeo, chip de proteínas, pontos quânticos semicondutores e o ensaio de microneutralização estabelecem uma ligação entre um antígeno viral e um anticorpo (CHAN et al., 2013) (ROH; JO, 2011; VALIZADEH; ABDOLMOHAMMADI-VAHID; DANSHINA,

2020). Essas técnicas imunológicas são fáceis de manusear, porém possuem baixa sensibilidade e especificidade (MOHAMADIAN et al., 2021).

Os testes sorológicos podem medir concomitantemente anticorpos IgM e IgG, podem ser específicos para um tipo de anticorpo ou podem ser testes para medir anticorpos absolutos que medem anticorpo IgA (MOHAMADIAN et al., 2021). Em um estudo realizado por Li et al. (2020), foi desenvolvido um teste rápido para detecção de IgM e IgG simultaneamente no sangue humano em 15 minutos. O produto foi testado em oito hospitais e agências chinesas para validar sua eficácia. Os resultados demonstraram que este teste rápido de anticorpos tem alta sensibilidade e especificidade, além de ser de fácil manuseio e não é necessário nenhum equipamento adicional.

1.4.7. Técnica CRISPR

A técnica CRISPR-Cas13a/C2c2 utilizada para a detecção de ácido nucleico é uma plataforma de detecção molecular extremamente rápida, sensível e específica (GOOTENBERG et al., 2017).

Um protocolo para detecção de COVID-19 foi desenvolvido utilizando a técnica SHERLOCK, (Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing) baseado no diagnóstico CRISPR, que utiliza Cas13a ribonuclease para detecção de RNA, onde fragmentos de RNA do vírus SARS-CoV-2 ajudam a detectar sequências alvo de aproximadamente 100 cópias. O experimento é realizado por amplificação isotérmica do ácido nucleico extraído de amostras de pacientes e, em seguida, amplificação da sequência de RNA viral via Cas13 e é lido por uma vareta de papel em menos de 1 hora (ZHANG et al., 2020)

1.4.8. Técnica baseada em sequenciamento de próxima geração (NGS)

Os vírus de RNA compõem a maior variedade de vírus e são os agentes etiológicos de inúmeras doenças infecciosas em seres humanos e animais. A tecnologia NGS de alto rendimento tem um papel essencial no diagnóstico primário (INOUE-NAGATA, 2013).

Uma das vantagens da utilização do NGS é que os genomas virais podem ser reconstruídos para genomas de vírus não conhecidos ou mal caracterizados a partir de preparações virais enriquecidas em cultura ou diretamente de amostras clínicas (CHIARA et al., 2020). Um estudo expôs um novo coronavírus de pato utilizando o método de sequenciamento de RNA, que era diferente do vírus da bronquite infecciosa de frango (CHEN et al., 2013). Na pandemia do SARS-CoV-2, as tecnologias NGS de segunda e terceira gerações

têm obtido êxito na aplicação (CAMPOS et al., 2020; PADEN et al., 2020; PILLAY et al., 2020).

1.5. Nanopartícula para o diagnóstico da COVID-19

A nanotecnologia tem sido largamente utilizada em várias áreas de estudo como na medicina (YADOLLAHPOUR, 2021), bio-rotulagem (GAIKWAD et al., 2019) e agricultura (PRASAD; BHATTACHARYYA; NGUYEN, 2017). Na atualidade a nanotecnologia tem sido utilizada em diferentes áreas da ciência médica como entrega direcionada de medicamentos (PRASAD; BHATTACHARYYA; NGUYEN, 2017), diagnóstico de câncer (MISRA; ACHARYA; SAHOO, 2010) e para desenvolvimento de agentes contra infecções virais, bacterianas e fúngicas (NIKAEEN; ABBASZADEH; YOUSEFINEJAD, 2020). Um estudo realizado em 2017 desenvolveu um dispositivo analítico colorimétrico multiplex baseado em papel usando nanopartículas de prata como reagente colorimétrico para a detecção de DNA da MERS-CoV, com capacidade de detectar o DNA de uma forma simples, rápida, sensível e seletiva (TEENGAM et al., 2017).

Um imunossensor eletroquímico foi desenvolvido utilizando uma matriz de eletrodos de carbono modificados por nanopartículas de ouro que permitiram a detecção de proteínas de coronavírus humano (HCoV) e MERS-CoV em amostras nasais (LAYQAH; EISSA, 2019).

Recentemente, foi desenvolvido um ensaio colorimétrico baseado em nanopartículas (AuNPs) de 10 nm, revestidos com oligonucleotídeos antisense específicos para o gene N do SARS-CoV-2, para uma detecção rápida e seletiva (MOITRA et al., 2020). O propósito dos autores foi anexar uma molécula específica às nanopartículas de ouro que detectam uma determinada proteína da sequência genética do vírus SARS-CoV-2. O biossensor se liga à sequência gênica do vírus, e as nanopartículas de ouro são responsáveis pela transição do reagente líquido de roxo para azul. Quando há a presença direta do vírus SARS-CoV-2 na amostra, ocorre a alteração visual (THARAYIL et al., 2021).

Ainda utilizando AuNPs, pesquisadores desenvolveram um kit diagnóstico de detecção rápida de anticorpos IgG e IgM contra SARS-CoV-2. Esse kit diagnóstico é altamente específico e estável, baixo custo, fácil de operar e os resultados podem ser liberados em até 10 minutos, minimizando o tempo de diagnóstico. Além disso, é um método viável de diagnóstico quando há muitas amostras para serem testadas (HUANG et al., 2020).

Ensaio colorimétricos como o realizado por Liu et. al, 2015 também são utilizados para o diagnóstico de doenças. Foi desenvolvido um imunossensor colorimétrico com o objetivo de

identificar o vírus da gripe A (IAV), através da utilização de nanopartículas de ouro (AuNPs) modificadas com anticorpo monoclonal anti-hemaglutinina (mAb). Esse imunossensor permite uma detecção do IAV de forma rápida, simples e seletiva. Durante o ensaio, os anticorpos específicos para influenza são conjugados às AuNPs, resultando na formação das sondas mAb-AuNP, contudo esse ensaio pode ser aplicado a qualquer outro vírus desde que sejam utilizados anticorpos específicos para o patógeno.

A espectroscopia UV-Vis é uma técnica analítica que avalia a absorção ou transmissão de luz em comprimentos de onda específicos, tanto na região UV quanto na visível, comparando-se uma amostra com uma amostra de referência ou em branco. Essa propriedade é afetada pela composição da amostra, possibilitando a obtenção de informações sobre sua composição e concentração. O trabalho de Dias, 2022 desenvolveu um biossensor com nanobastões de ouro para detecção de SARS-CoV-2 comprovando a formação desses nanobastões e a ligação com os anticorpos anti-SARS-CoV-2.

O Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS) é utilizado para medir o diâmetro médio das partículas e a distribuição das partículas nanométricas dispersas em líquido. Essa técnica pode ser utilizada como uma ferramenta para os estudos de bioconjugação de nanopartículas de ouro e estudos de ligação biomolecular (JANS et. al, 2009).

O DLS apresenta diversas vantagens em relação a outros métodos. Por exemplo, é possível realizar experimentos com uma ampla variedade de tampões de amostra, faixa de temperatura e concentrações. Além disso, o DLS é uma técnica não invasiva que requer quantidades relativamente baixas de amostra, fornecendo estimativas confiáveis da qualidade da preparação de forma rápida. (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016).

As AuNPs possuem características como: capacidade de fornecer uma superfície estável para a imobilização de biomoléculas, o que é extremamente útil na preparação de biossensores. São as nanopartículas metálicas mais estáveis, devido à sua atividade ótica, eletrônica, catalítica, possuem propriedades de alta biocompatibilidade e taxa de transferência de elétrons aprimorada. Por esses motivos, as AuNPs têm mostrado amplas aplicações em vários biossensores (SOARES et. al , 2021; YA & PINGARRÓN, 2005).

Sendo assim, propôs-se o desenvolvimento de um nanobiossensor de AuNPs funcionalizadas com anticorpos de glicoproteína anti-SARS-CoV-2 para a detecção da SARS-CoV-2 utilizando a técnica DLS, devido à sua natureza não invasiva e à capacidade de fornecer uma verificação rápida, precisa e reprodutível da qualidade da preparação biomolecular, mesmo com quantidades mínimas de amostra.

2. Justificativa

O diagnóstico da COVID-19 se faz necessário para o controle da infecção por SARS-CoV-2 e na contenção da pandemia (LAI; LAM, 2020). A RT-PCR é o teste mais utilizado identificar SARS-CoV-2, mesmo os laboratórios de diagnósticos enfrentando dificuldades como falta de reagente e crescente cobrança por mais testes, acarretando em atrasos nos resultados (SAFIABADI TALI et al., 2021).

Devido ao alto custo desse teste e a possibilidade de contaminação cruzada, objetivou-se a utilização do DLS para análise de um nanobiosensor contendo AuNPs funcionalizadas com anticorpos de glicoproteína anti-SARS-CoV-2 foi desenvolvido para a detecção da SARS-CoV-2, como uma opção mais rápida e barata para o diagnóstico da COVID-19.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver um nanobiossensor de nanopartículas de ouro (AuNPs) funcionalizado com anticorpos de glicoproteína anti-SARS-CoV-2 para a detecção da SARS-CoV-2 utilizando a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS).

3.2. Objetivos específicos

- Funcionalizar as nanopartículas de ouro de 50 nm (AuNPs50) e 100 nm (AuNPs100) com anticorpos de glicoproteína anti-SARS-CoV-2 (AbS1N@AuNPs50 e AbS1N@AuNPs100);
- Caracterizar as AuNPs50 e AuNPs100, assim como seus bioconjugados (AbS1N@AuNPs50 e AbS1N@AuNPs100) quanto ao tamanho e morfologia por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS);
- Realizar o teste de especificidade dos bioconjugados com o vírus da Influenza, SARS-CoV-2 e com amostras de pacientes.

4. Materiais e Métodos

4.1. Materiais

Tabela 1 – Conjunto de materiais.

Materiais	Fornecedor
AuNPs (50 nm e 100 nm)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Albumina de soro bovino (BSA)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
3,3'-ditiobis (propionato de sulfosuccinimidil) (DTSSP)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA)
Solução salina tamponada com fosfato (PBS)	Laborclin (Pinhais, PR, Brasil)
Tetraborato de sódio	Dinâmica (Indaiatuba, SP, Brasil)
Ácido bórico	Vetec TM (Duque de Caxias, RJ, Brasil)
Vírus SARS-CoV-2	Instituto Butantan (São Paulo, Brasil)
Anticorpos policlonais	Laboratório de Virologia e Microscopia (Universidade de Brasília)
Amostras biológicas	UBS 05 (Arapoanga de Planaltina)

Para a realização de testes com amostras biológicas com pacientes voluntários, foi solicitado o comitê de ética CEP Faculdade Ciências da Saúde da UnB - CAAE 38940920.7.0000.0030.

4.2. Reação de acoplamento

Para realizar a reação de acoplamento, foram utilizados dois tamanhos diferentes de AuNPs (50 nm e 100 nm). Inicialmente, o acoplamento foi realizado com as AuNPs de 50 nm, resultando em um deslocamento de alguns nanômetros em relação ao branco solução que a proteína S está armazenada, porém livre de proteína S). Em seguida, procedeu-se ao acoplamento com as AuNPs de 100 nm para verificar se haveria um aumento maior no delta de deslocamento.

Foram realizadas alíquotas de 1,2 mL - volume necessário que possui relação com o número de partículas de ouro para ocorrer a reação - da solução de AuNPs de 50 nm ($2,6 \times 10^{10}$ partículas/mL) em eppendorfs. Em seguida, o pH das alíquotas foi medido e ajustado para 8,9 com o auxílio do tampão borato (50mM, pH 8,9). Cada alíquota foi transferida para um balão de fundo redondo e incubados com 10 μ L de DTSSP (10 mM) por 45 minutos em e sob proteção de luz. A solução foi transferida para um Tubo Lobind® Eppendorf (Eppendorf, Hamburgo,

Alemanha) e o tubo foi centrifugado (7000 g, 5 minutos, 5 °C). Após a centrifugação, o sobrenadante contendo o excesso de DTSSP foi removido e as AuNPs foram ressuspensas em 1100 µL de 2 mM de tampão borato pH a 8,9. A centrifugação e ressuspensão foram realizadas mais duas vezes. Logo depois, os anticorpos de glicoproteína anti-SARS-CoV-2 (21.6 µg, 32.4 µg, e 43.2 µg) foram adicionados à suspensão de DTSSP@AuNPs50 e incubados à temperatura ambiente por 1 hora e 30 minutos no agitador Kline, NT-150. Após a incubação, a suspensão foi centrifugada (7000 g, 5 minutos, 5 °C). O sobrenadante contendo o excesso de anticorpo foi removido e ressuspense em 1100 µL de tampão borato 2 mM, pH 8,9, contendo 0,25% de BSA. Por fim, o processo de centrifugar e ressuspender foi realizado mais duas vezes, a fim de remover aqueles anticorpos que não se ligaram. As amostras contendo 21,6 µg, 32,4 µg e 43,2 µg de anticorpos são referidas aos bioconjugados pAbS1N18@AuNPs50, pAbS1N27@AuNPs50 e pAbS1N36@AuNPs50, respectivamente.

Para o acoplamento da solução de AuNPs de 100 nm foram utilizadas alíquotas de 1,2 mL ($4,56 \times 10^9$ partículas/mL). A solução teve o valor de pH ajustado para 8,9 com tampão borato (50 mM, pH 8,9). Cada alíquota foi transferida para um balão de fundo redondo e incubados com 45 µL de DTSSP (10 mM) por 45 minutos em agitação e sob proteção de luz. A solução foi transferida para um Tubo Lobind® Eppendorf (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e o tubo foi centrifugado (7000 g, 5 minutos, 5 °C). Após a centrifugação, o sobrenadante contendo o excesso de DTSSP foi removido e as AuNPs foram ressuspensas em 1100 µL de 2 mM de tampão borato pH a 8,9. A centrifugação e ressuspensão foram realizadas mais duas vezes. Em seguida, diferentes quantidades de anticorpos de glicoproteína anti-SARS-CoV-2 (21.6 µg, 32.4 µg e 43.2 µg) foram adicionadas à suspensão de DTSSP@AuNPs100. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora e 30 minutos em um agitador Kline, modelo NT-150. Após a incubação, a suspensão foi centrifugada a 7000 g por 5 minutos a 5 °C. O sobrenadante, que continha o excesso de anticorpo, foi removido e ressuspense em 1100 µL de tampão borato 2 mM, pH 8.9, contendo 0.25% de BSA. Por último, foram realizados mais dois ciclos de centrifugação e ressuspensão com o objetivo de remover os anticorpos que não se ligaram. As amostras referem-se aos bioconjugados pAbS1N18@AuNPs100, pAbS1N27@AuNPs100 e pAbS1N36@AuNPs100, com quantidades de anticorpos de 21,6 µg, 32,4 µg e 43,2 µg, respectivamente.

4.3. Métodos de caracterização das AuNPs

4.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a realização da MET, foi utilizado um microscópio JEOL JEM 1011, operando a uma tensão de aceleração de 100 kV. Colocou-se 5 µL de AuNPs50 e pAbS1N18@AuNPs50 em uma grade de cobre de 400 mesh revestida com filme formvar. A amostra secou ao ar e foi utilizado vapor de tetróxido de ósmio para aumentar o contraste. As grades foram utilizadas para outras análises e por isso foram preservadas em temperatura ambiente.

A afinidade de ligação dos vírus SARS-CoV-2 e pAb1SN36@AuNPs50 foi comprovada por essa técnica.

4.3.2. Espectroscopia no Uv-Vis

Os espectros das nanopartículas (NPs) em suspensão foram registrados em um espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Japão) utilizando células de quartzo com 10,00 mm de caminho óptico sem diluição para amostras de AuNPs50, AuNPs100, pAbS1N18@AuNPs50, pAbS1N18@AuNPs100, pAbS1N27@AuNPs50, pAbS1N27@AuNPs100, pAbS1N36@AuNPs50 e pAbS1N36@AuNPs100.

4.3.3. Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)

Para medir o tamanho das AuNPs nuas e dos bioconjugados, foi utilizado o aparelho Zetasizer Nano ZS90: ZEN3690 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK) equipado com um laser de 4,0 mW 632,8nm (vermelho) em um ângulo de detecção de dispersão de 90°, à 25°C. Uma cubeta de 50 µL (ZEN0118) foi utilizada para medir o tamanho das partículas. Foram realizadas cinco corridas por medição de tamanho para obter uma média e um desvio padrão. Os dados foram coletados e analisados no software Zetasizer 8.01.4906.

4.4. Incubação dos biconjugados com os vírus da Influenza e SARS-CoV-2

Foram realizados testes nas amostras de vírus da Influenza usando estoques de vírus diluídos preparados com PBS e 20% de sacarose como diluente, nas seguintes concentrações: $1 \times 10^{10.3}$ TCID₅₀/mL para A/Brisbane, $1 \times 10^{10.6}$ TCID₅₀/mL para B/Washington, 1×10^9 TCID₅₀/mL para B/Phuket e $1 \times 10^{10.7}$ TCID₅₀/mL para A/Sul da Austrália.

Para o vírus SARS-CoV-2, foram preparadas 12 diluições ($2,11 \times 10^5$ TCID₅₀/mL) utilizando PBS como diluente. Inicialmente, 90 µL da respectiva diluição de vírus e 10 µL de pAbS1N18@AuNPs50 ou pAbS1N36@AuNPs50 foram adicionados em um criotubo, e a amostra foi incubada em temperatura ambiente por 30 min em um agitador orbital Kline (400 rpm; Nova Técnica, Piracicaba, SP, Brasil). Por fim, 50 µL de pAbS1N@AuNPs com a mistura de vírus foi transferido para uma cubeta de pequeno volume (modelo ZEN0118, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido) para medições no DLS.

4.4.1. Incubação dos biconjugados com amostras biológicas

A coleta foi realizada na UPAS 9 de Planaltina- DF (Gerência de atenção primária Nº 9 de Planaltina – DF, de acordo com a aprovação do comitê de ética CEP Faculdade Ciências da Saúde da UnB - CAAE 38940920.7.0000.0030). A amostra de saliva e de nasofaringe de cada voluntário foi coletada por meio do swab e foi colocado em um falcon com 2,5 mL contendo PBS pH 7.4 juntamente com 20% de sacarose para as análises posteriores. Retirou-se 90 µL da amostra de nasofaringe da solução e incubou-se com 10 µL do bioconjugado pAbS1N36@AuNPs100 concentrado. Em seguida, as amostras foram colocadas no agitador orbital Kline (400 rpm; Nova Técnica, Piracicaba, SP, Brasil) por 30 minutos e transferidas para a cubeta de pequeno volume (modelo ZEN0118, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK) para leitura no DLS utilizando o modelo Zetasizer Nano ZS90: ZEN3690 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido).

O DLS estava equipado com um laser vermelho de 4,0 mW (632,8 nm) e operou em um ângulo de detecção de dispersão de 90°. Para medir o tamanho das partículas, foi utilizada uma cubeta descartável (ZEN0118). Cada medição de tamanho consistiu em cinco repetições para obter uma média e um desvio padrão. Todos os dados obtidos por DLS foram coletados e analisados usando o software Zetasizer 8.01.4906. Os diâmetros hidrodinâmicos determinados pelo DLS foram obtidos por análise de acúmulo e são referidos como diâmetros efetivos (Figura 4).

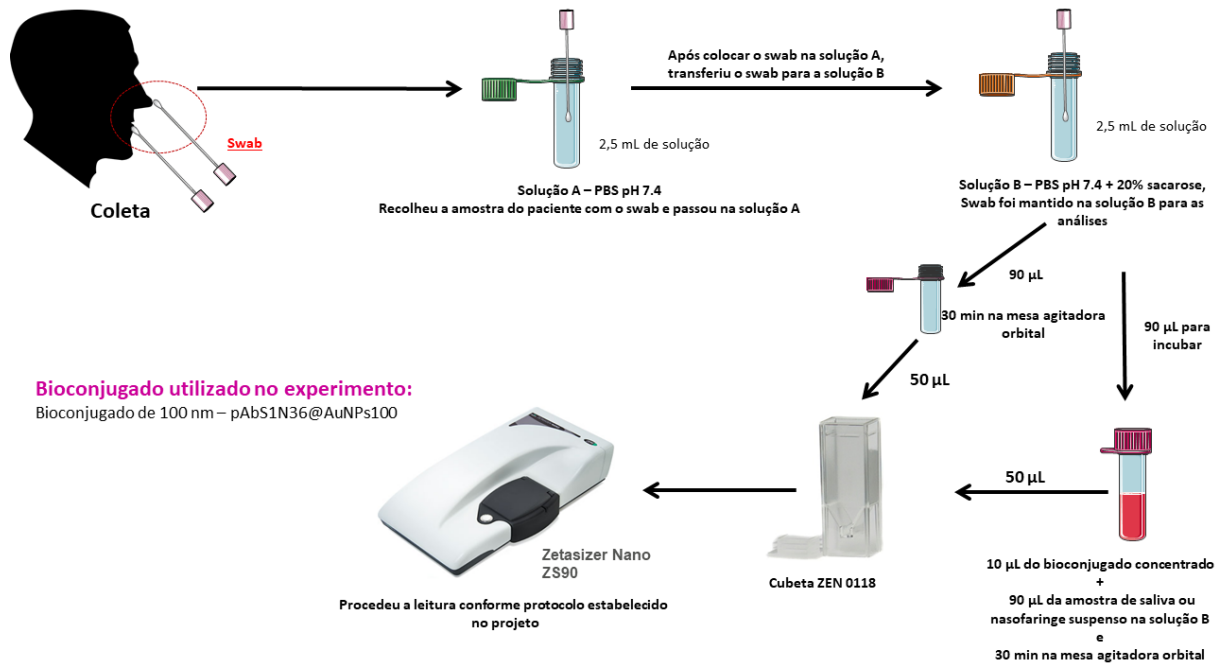


Figura 4. Esquema do protocolo de incubação do bioconjugado pAbS1N36@AuNPs100 com amostras biológicas coletadas de pacientes.

5. Resultados e Discussões

5.1. Caracterização das AuNPs50, AuNPs100 e seus bioconjugados

5.1.1. MET

O emprego dessa técnica possibilita a análise morfológica das nanopartículas, dispersão e seu diâmetro. Essa técnica foi aplicada somente nas AuNPs50 e nos seus bioconjugados para a comprovação do seu tamanho e ligação com o vírus SARS-CoV-2.

Nas micrografias MET (Figura 5) para as amostras de AuNPs50 (A) e pAbS1N18@AuNPs50 (B), é possível observar estruturas esféricas e hexagonais com tamanhos médios de 55 nm a 60 nm, respectivamente. Essas mesmas morfologias também foram encontradas no trabalho de Driskell et al. (2011).

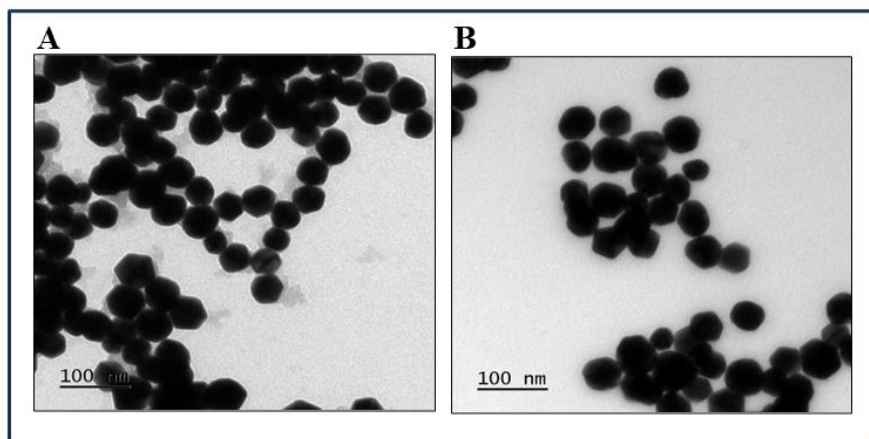


Figura 5. Tamanho e a morfologia das nanopartículas e a distribuição de tamanho correspondente: (A) AuNPs50 e (B) pAbS1N18@AuNPs50.

Foi confirmada a ligação do SARS-CoV-2 ao bioconjugado pAbS1N36@AuNPs50 por meio da MET. Na Figura 6B, é possível visualizar as partículas virais do SARS-CoV-2 com glicoproteínas spike presentes em sua superfície (marcadas na imagem). A Figura 6C mostra a ligação entre pAbS1N36@AuNPs50 e o SARS-CoV-2, enquanto a ampliação da Figura 6D confirma a interação entre a proteína spike da superfície viral e o bioconjugado.

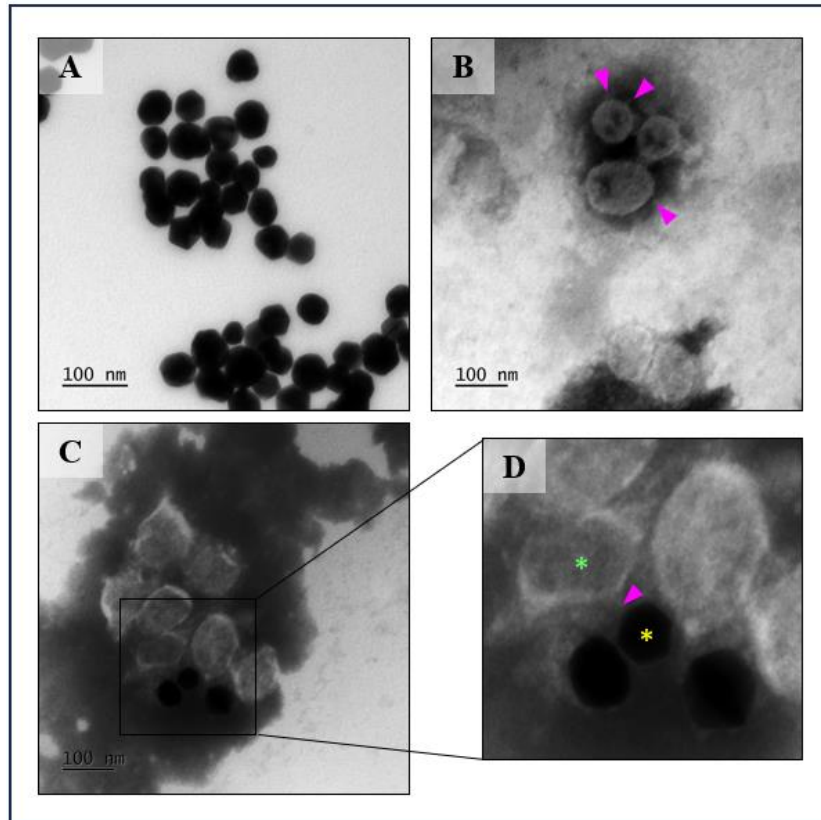


Figura 6. Interação do SARS-CoV-2 e do bioconjugado pAbS1N36@AuNPs50. (A) pAbS1N36@AuNPs50; (B) vírus SARS-CoV-2 inativado; as setas rosas mostram a proteína spike do vírus. (C) reação entre pAbS1N36@AuNPs50 e vírus SARS-CoV-2 inativado a 2.11×10^5 TCID₅₀/mL e (D) imagem ampliada de uma região na imagem C, o que demonstra a interação entre pAbS1N36@AuNPs50 (asterisco amarelo) e o vírus SARS-CoV-2 (asterisco verde).

5.1.2. UV-Vis Espectrofotômetro

Os resultados do UV-Vis para as AuNPs de 50 nm e seus bioconjugados podem ser visualizadas na Figura 7 e as AuNPs 100 nm e seus bioconjugados na Figura 8. Para as nanopartículas de 50 nm os espectros mostram uma mudança no redshift de 534 nm para 537 nm, em função da mudança no índice de refração das nanopartículas. Analisando as nanopartículas de 100 nm, após a conjugação do pAbS1N às AuNPs100, foi observado um deslocamento no redshift na faixa de 568 nm a 572 nm, o qual é atribuído à modificação do índice de refração das nanopartículas.

O redshift não é influenciado pelo número específico de nanopartículas, mas a intensidade de sua banda está diretamente relacionada à quantidade de anticorpos utilizados durante o processo de bioconjugação (DRISKELL et. al, 2011). O trabalho de Liu et al. (2015) utilizou nanopartículas de ouro funcionalizadas com anticorpo para a detecção de vírus

Influenza A e também obteve uma mudança no redshift, resultado que corrobora com o presente trabalho.

Se partículas ou agregados maiores forem formados, uma segunda banda de absorção é detectada na faixa de 650-750 nm, resultando em uma dispersão de cor azul-escura. No entanto, esse efeito não foi observado nos bioconjugados das AuNPs50.

Dessa forma, UV-vis confirma a conjugação de anticorpos policlonais nas nanopartículas de ouro.

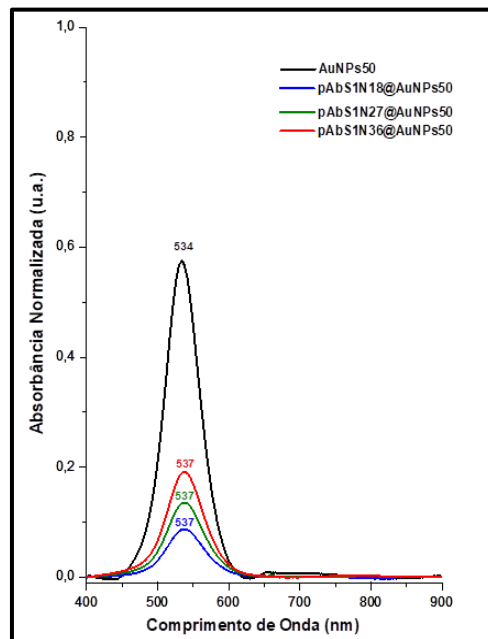


Figura 7. Espectros UV-Vis (400-900 nm) AuNPs50, pAbS1N18@AuNPs50, pAbS1N27@AuNPs50, e pAbS1N36@AuNPs50

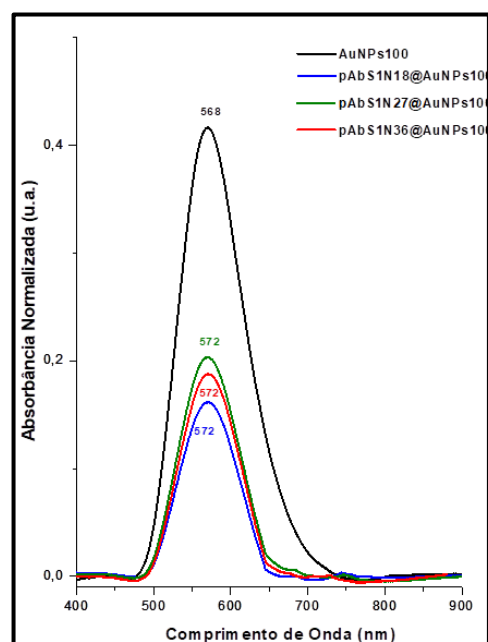


Figura 8. Espectros UV-Vis (400-900 nm) AuNPs100, pAbS1N18@AuNPs100, pAbS1N27@AuNPs100, e pAbS1N36@AuNPs100.

5.1.3. DLS

A funcionalização das AuNPs50 e AuNPs100 pode ser observada nas figuras abaixo (Figura 9 e Figura 10).

Analisando as figuras abaixo, é possível observar tanto para as pAbS1N18@AuNPs50 quanto para as pAbS1N18@AuNPs100 que houve um deslocamento para a direita, indicando um aumento no tamanho dos bioconjugados em comparação com suas respectivas AuNPs. Esse resultado evidencia que houve o acoplamento dos anticorpos nas AuNPs50 e nas AuNPs100. Ocorreu também um aumento na intensidade depois do acoplamento dos anticorpos para as AuNPs50 e para as AuNPs100.

Em relação ao resultado do PDI, houve uma diminuição no valor do PDI após o acoplamento do anticorpo nos dois tamanhos de AuNPs. Considerando uma escala de 0 a 1, um índice de polidispersão inferior a 0,1 é considerado indicativo de uma população de partículas altamente homogênea. Por outro lado, um valor elevado de índice de polidispersão sugere uma ampla distribuição de tamanhos de partículas ou até mesmo a presença de diferentes populações com tamanhos variados (GAUMET et al., 2008). Todas as medições de PDI das pAbS1N18@AuNPs100 estáveis ficaram abaixo de 0,1, indicando que a amostra estava monodispersa (Figura 10).

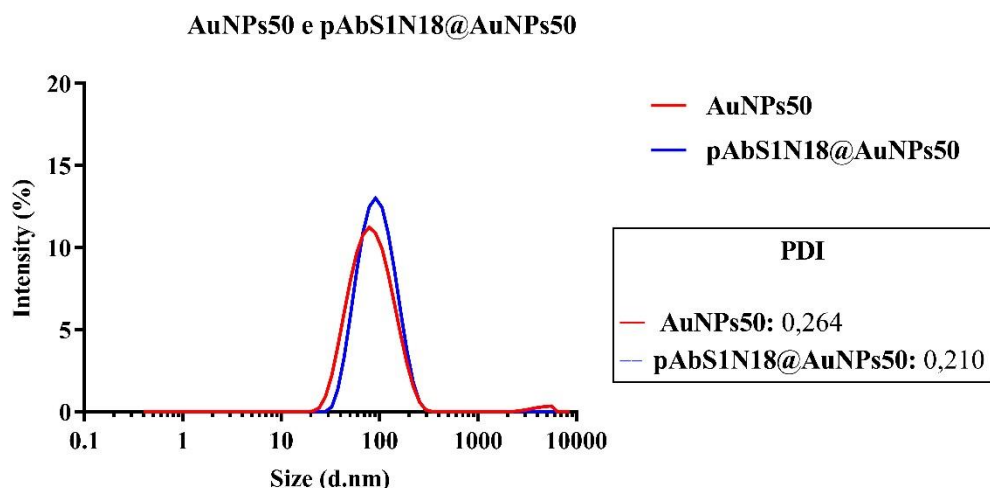


Figura 9. *Z-average* pela intensidade das amostras de AuNPs50 e pAbS1N18@AuNPs50 no D1 e média de cinco corridas do PDI das amostras de AuNPs50 e pAbS1N18@AuNPs50 no D1.

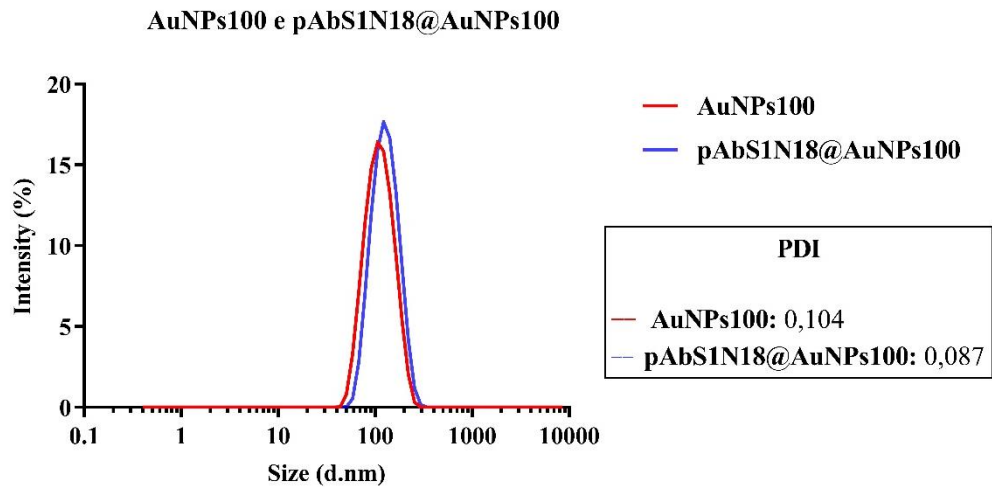


Figura 10. Z-average pela intensidade das amostras de AuNPs100 e pAbS1N18@AuNPs100 no D1 e média de cinco corridas do PDI das amostras de das amostras de AuNPs100 e pAbS1N18@AuNPs100 no D1.

A estabilidade das amostras de 50 nm e 100 nm foi avaliada através dos resultados do DLS (Figuras 11 e Figura 12). Durante o período de avaliação de estabilidade, as partículas contendo o anticorpo pAbS1N apresentaram constantemente valores mais elevados de tamanho médio. Esses valores estão relacionados ao perfil de intensidade, ou seja, quanto maior a intensidade e o deslocamento para a direita, maiores são os valores do tamanho médio da nanopartícula (Figura 11).

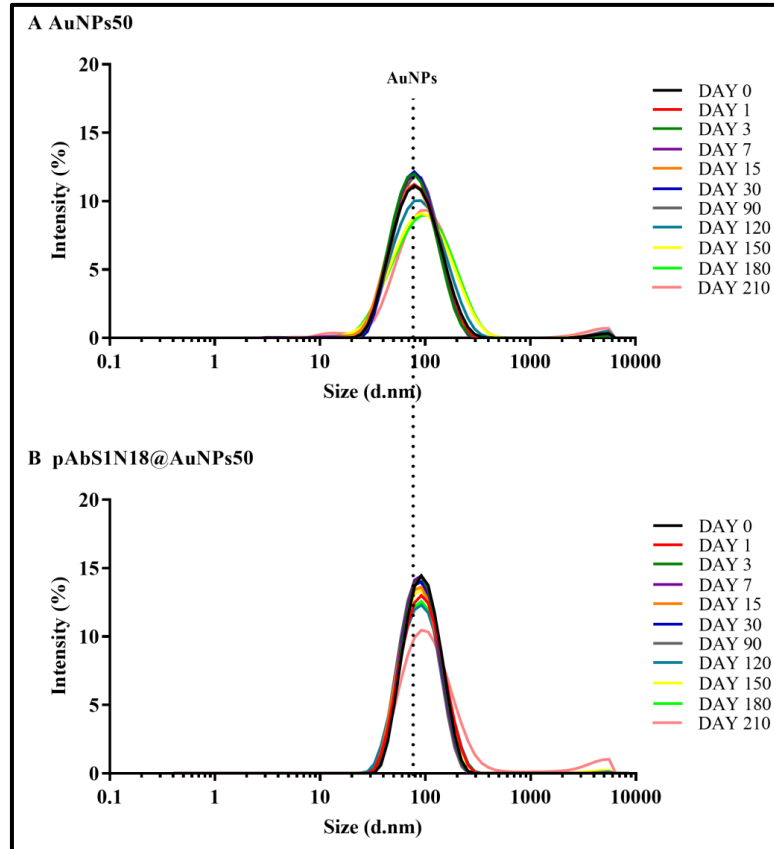


Figura 11. Estabilidade *Z-average* pela intensidade das amostras de AuNPs50 (A) e pAbS1N18@AuNPs50 (B).

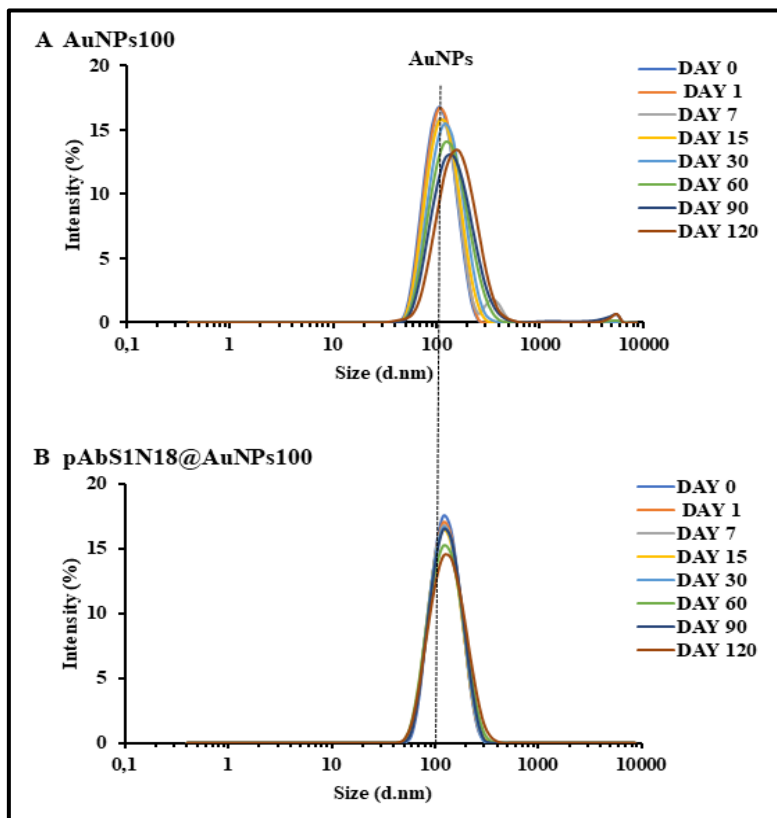


Figura 12. Estabilidade *Z-average* pela intensidade das amostras de AuNPs100 (A) e pAbS1N18@AuNPs100 (B).

As amostras contendo AuNPs100 foram avaliadas pela intensidade por até 120 dias e os dados referem-se a uma comparação de todos os dias de avaliação para AuNPs100 e pAbS1N18@AuNPs100 (Figura 12).

Ao analisar os resultados obtidos, tanto as AuNPs100 quanto as pAbS1N18@AuNPs100 mostraram um único pico de intensidade durante o período avaliado, porém, não se observa um deslocamento do pico para maior valor de DLS para o bioconjugado pAbS1N18@AuNPs100, enquanto se observa para a AuNPs100. Isso significa que os biconjugados permaneceram com o mesmo tamanho com praticamente a mesma intensidade durante o teste de estabilidade. A estabilidade dessas AuNPs pode ser atribuída à presença da BSA e do anticorpo em sua superfície, o que resulta na redução da auto-agregação das partículas não só em meios aquosos como também em soluções tampão.

O tamanho médio das nanopartículas AuNPs100 e pAbS1N18@AuNPs100 ficaram abaixo de 1000 nm. Esse valor situa-se dentro da faixa de tamanho esperada para um sistema nanoestruturado, ou seja, inferior a 1000 nm (BUZEA et al., 2007).

Os princípios do DLS baseiam-se na medição da intensidade da luz dispersa. Portanto, o valor representativo de tamanho hidrodinâmico deve sempre ser deduzido das medições de intensidade, enquanto os parâmetros de volume e número devem ser usados apenas como informações de apoio (BHATTACHARJEE, 2016). Assim, tanto a distribuição ponderada pelo volume quanto a distribuição ponderada pelo número devem ser analisadas juntamente com o parâmetro pela intensidade (YEAP et al., 2018).

Isso posto, ao analisar as variáveis Número e Volume, Figuras 13 e 14, respectivamente, é possível concluir que as pAbS1N36@AuNPs100 mantiveram-se estáveis até o dia 120 e que as nanopartículas apresentavam uma concentração significativa em tamanhos próximos a 100 nm.

**Distribuição de tamanho por Número
pAbS1N36@AuNPs100**

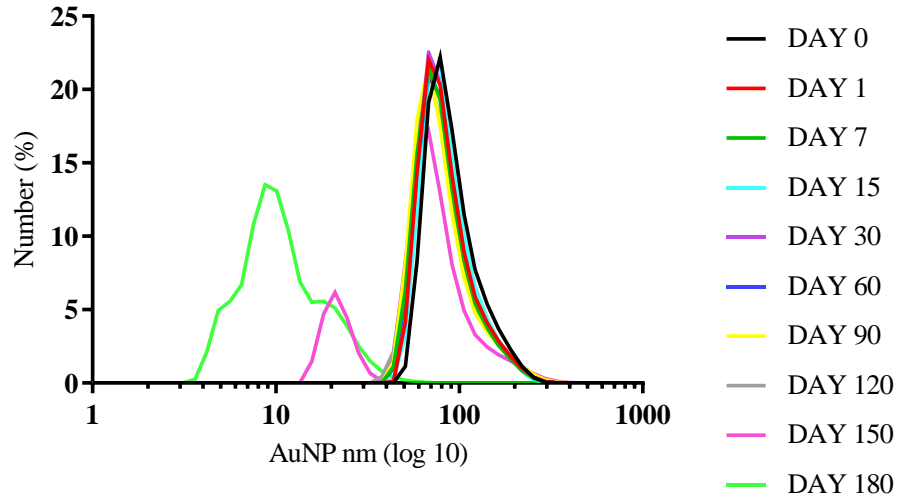


Figura 13. Distribuição de tamanho por Número pAbS1N36@AuNPs100.

**Distribuição de tamanho por Volume
pAbS1N36@AuNPs100**

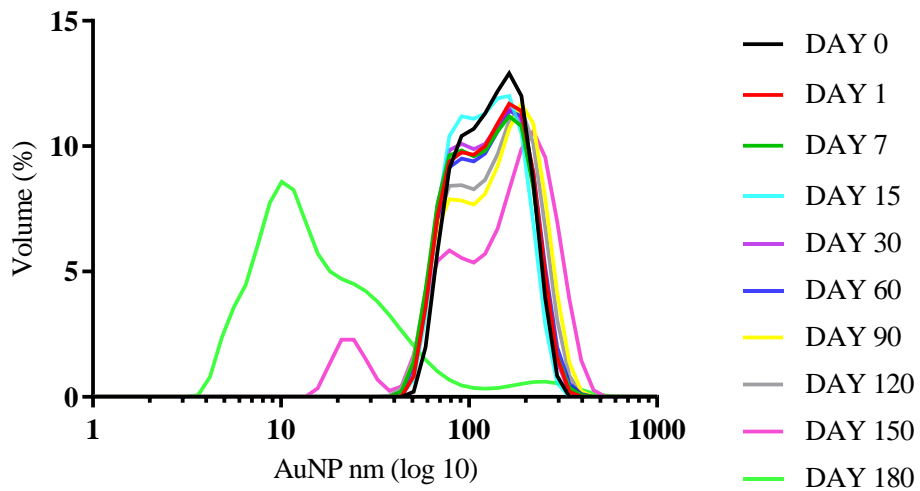


Figura 14. Distribuição de tamanho por Volume pAbS1N36@AuNPs100.

5.2. Incubação dos bioconjugados com os vírus da Influenza e SARS -CoV-2

Além de apresentar sensibilidade adequada na detecção do SARS-CoV-2, é crucial que a interação entre anticorpos e vírus seja suficientemente específica para evitar resultados falsos-positivos. A fim de confirmar a seletividade da detecção do SARS-CoV-2, foram realizados testes utilizando DLS nos bioconjugados.

A fim de realizar esses testes, amostras de vírus da Influenza (A/Brisbane, B/Washington, B/Phuket e A/Sul da Austrália) e de SARS-CoV-2 foram incubados com o bioconjugado pAbS1N18@AuNPs50. A Figura 15, ilustra a diferença de tamanho observada entre os biconjugados de Influenza e SARS-CoV-2 e mostra pequenas mudanças nas distribuições de tamanho do pico de nanopartículas, sendo a diferença máxima de apenas 10 nm para a cepa Phuket em comparação com quase centenas de nm após a incubação da SARS-CoV-2.

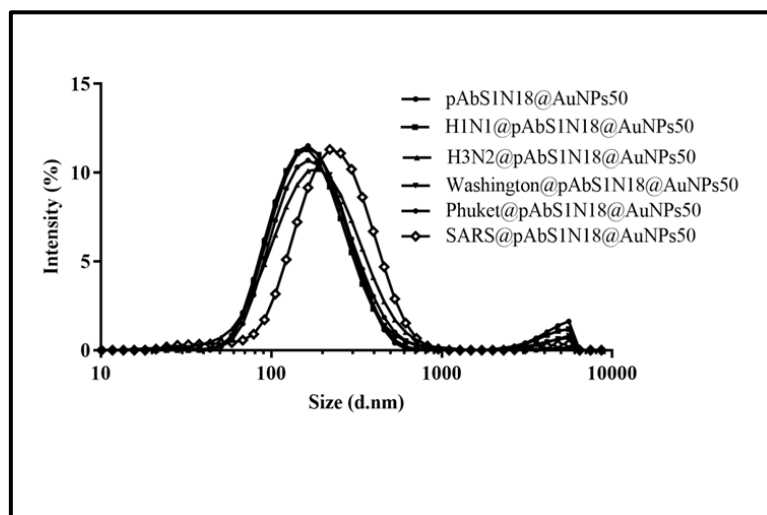


Figura 15. Distribuição do diâmetro por intensidade para diferentes cepas A/Brisbane-H1N1, A/Sul da Austrália-H2N3, B/Washington, B/Phuket, e vírus SARS-CoV-2.

Para os experimentos a seguir, foram utilizados os pAbS1N36@AuNPs100. A incubação do bioconjugado pAbS1N36@AuNPs100 com SARS-CoV-2 a uma concentração de $2,11 \times 10^5$ TCID₅₀/mL resultou em um deslocamento do pico para um valor maior no DLS, indicando um aumento no diâmetro hidrodinâmico e conseqüentemente a ligação do vírus SARS-CoV-2 no anticorpo aderido à nanopartícula (Figura 16).

Esse resultado é confirmado quando analisamos trabalho de Driskell et. al, 2011, no qual o autor mostra que nanopartículas de ouro funcionalizadas com anticorpos da Influenza sofrem alteração no seu tamanho.

Ademais, em um trabalho anterior realizado por Bento et. al, 2020, foi obtida uma imagem de MET que ilustra a interação entre as nanopartículas funcionalizadas com anticorpos específicos para o SARS-CoV-2 e o vírus causador da COVID-19 e um resultado de DLS revelando o aumento de tamanho das nanopartículas após a interação com os vírus.

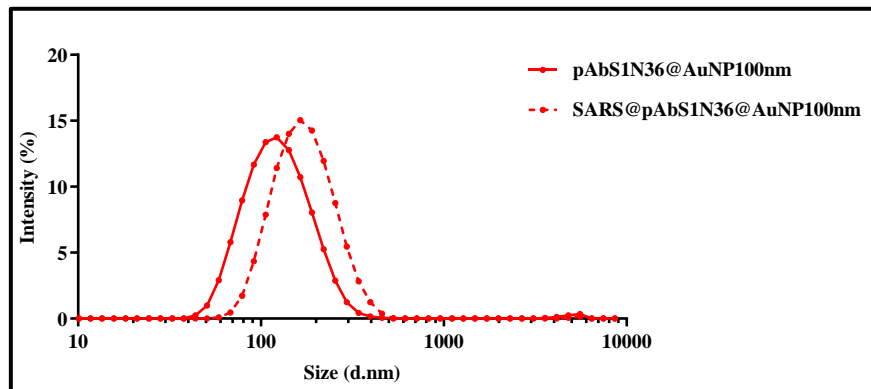


Figura 16. Medidas de DLS por intensidade versus tamanho para pAbS1N36@AuNPs100 antes e depois da incubação com o vírus SARS-CoV-2 inativado a $2,11 \times 10^5$ TCID₅₀/mL.

5.3. Incubação dos bioconjugados com amostras biológicas

A Figura 17 exibe os gráficos de distribuição de tamanho do bioconjugado pAbS1N36@AuNPs100, tanto antes quanto após a incubação com amostras de três pacientes (P1, P2 e P3) com resultados negativos confirmados de nasofaringe (Figura 17A) e saliva (Figura 17B).

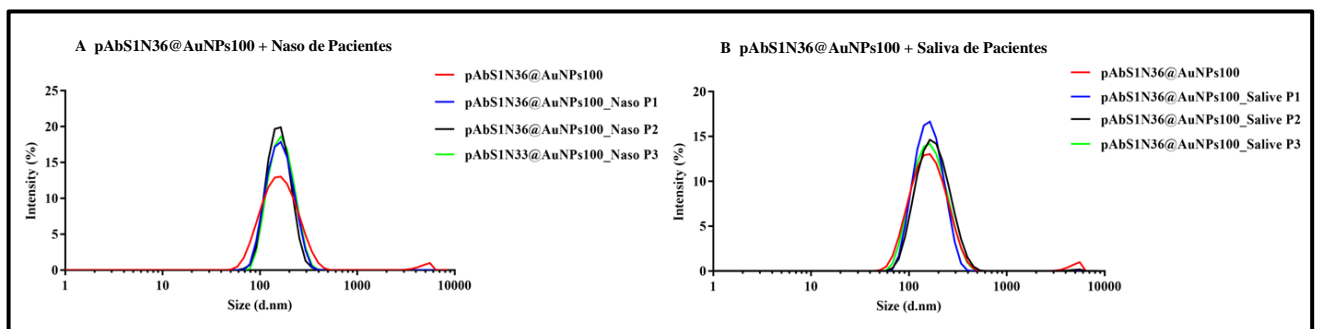


Figura 17. Medidas de DLS por intensidade versus tamanho para pAbS1N36@AuNPs100 antes e depois da incubação com amostras de pacientes considerados negativos: (A) amostras nasofaringe e (B) amostras de saliva dos pacientes. Os resultados são dados como a média de um experimento com cinco medidas de DLS cada uma.

Realizando a análise dos gráficos de distribuição de tamanho por intensidade, nota-se que tanto antes quanto após a incubação do pAbS1N36@AuNPs100 com amostras de nasofaringe e saliva dos pacientes, foi observado um pico de tamanho idêntico. A única diferença reside na intensidade do pico após a incubação. Verificou-se que o tipo de amostra do paciente (nasofaringe ou saliva) não teve influência significativa nos resultados obtidos. Portanto, optou-se por utilizar exclusivamente amostras de saliva nos experimentos subsequentes, uma vez que isso acarreta menor desconforto para o paciente em comparação à coleta de amostras da nasofaringe.

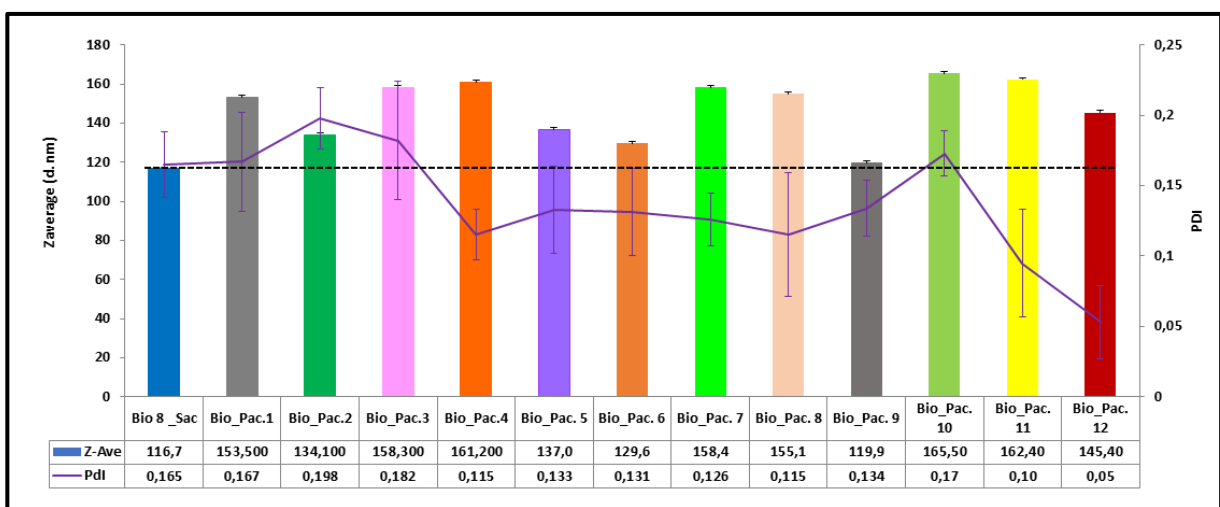


Figura 18. Z-Average e PDI do bioconjugado pAbS1N36@AuNPs100 (Bio 8_Sac) antes e após incubação com amostras de saliva de pacientes. Os resultados estão apresentados como a média de um experimento, e cinco medições de DLS.

A análise do gráfico da Figura 18 revela que, das 12 amostras de saliva de pacientes incubadas com o bioconjugado pAbS1N36@AuNPs100, 11 apresentaram um aumento significativo no diâmetro hidrodinâmico. Apenas uma amostra (Pac 9) mostrou uma variação mínima no diâmetro hidrodinâmico (DH), mantendo-se praticamente estável.

A Figura 19 exibe um gráfico representando a diferença no DH entre todas as amostras de pacientes analisadas até o momento, após a incubação com o bioconjugado pAbS1N36@AuNPs100, em comparação com o DH do bioconjugado isolado.

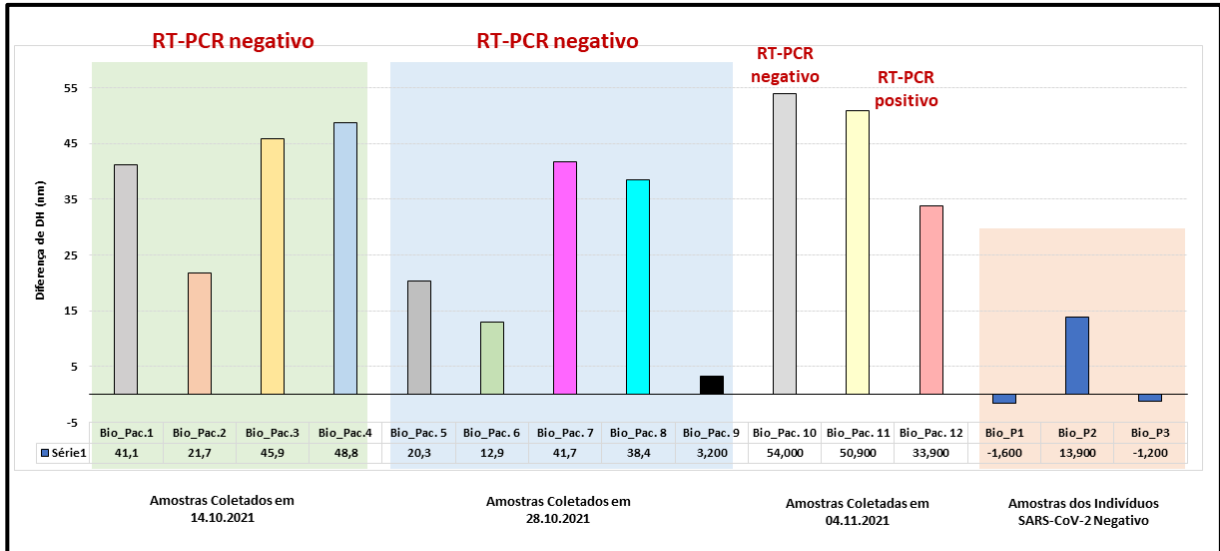


Figura 19. Diferença de diâmetro hidrodinâmico (DH) de todas as amostras de pacientes incubadas com o bioconjugado pAbS1N36@AuNPs100 menos o bioconjugado isolado. Os resultados estão apresentados como a média de um experimento, e cinco medições de DLS.

Após uma análise dos dados do gráfico acima e uma comparação com os resultados obtidos pelo RT-PCR, não foi identificada uma correlação entre pacientes positivos e os valores de diferença de DH. Essa falta de correlação pode ser atribuída ao fato de que o RT-PCR é realizado utilizando amostras de nasofaringe, enquanto nossos ensaios foram realizados com amostras de saliva, ou seja, as amostras provêm de matrizes biológicas distintas. Além disso, é possível que a falta de correlação nos testes esteja relacionada ao limite de detecção, isto é, o número de partículas virais presentes nas amostras positivas pode ser muito baixo para ser detectado pelo DLS.

Com base nos resultados obtidos, foi realizado um novo conjunto de coletas de amostras de pacientes, especificamente amostras de nasofaringe. Essas coletas foram realizadas repetidamente e em diferentes dias durante o Ensaio Clínico, na Unidade Básica de Saúde 5 (UBS5) em Planaltina, Arapoanga - DF. No entanto, para fins ilustrativos, apenas os dados referentes a um único dia de coleta serão apresentados.

A Figura 20 exibe o gráfico que representa o *Z-Average* e o PDI do bioconjugado pAbS1N36@AuNPs100 (Bio 4_Sac) antes e após a incubação com as amostras de nasofaringe dos pacientes.

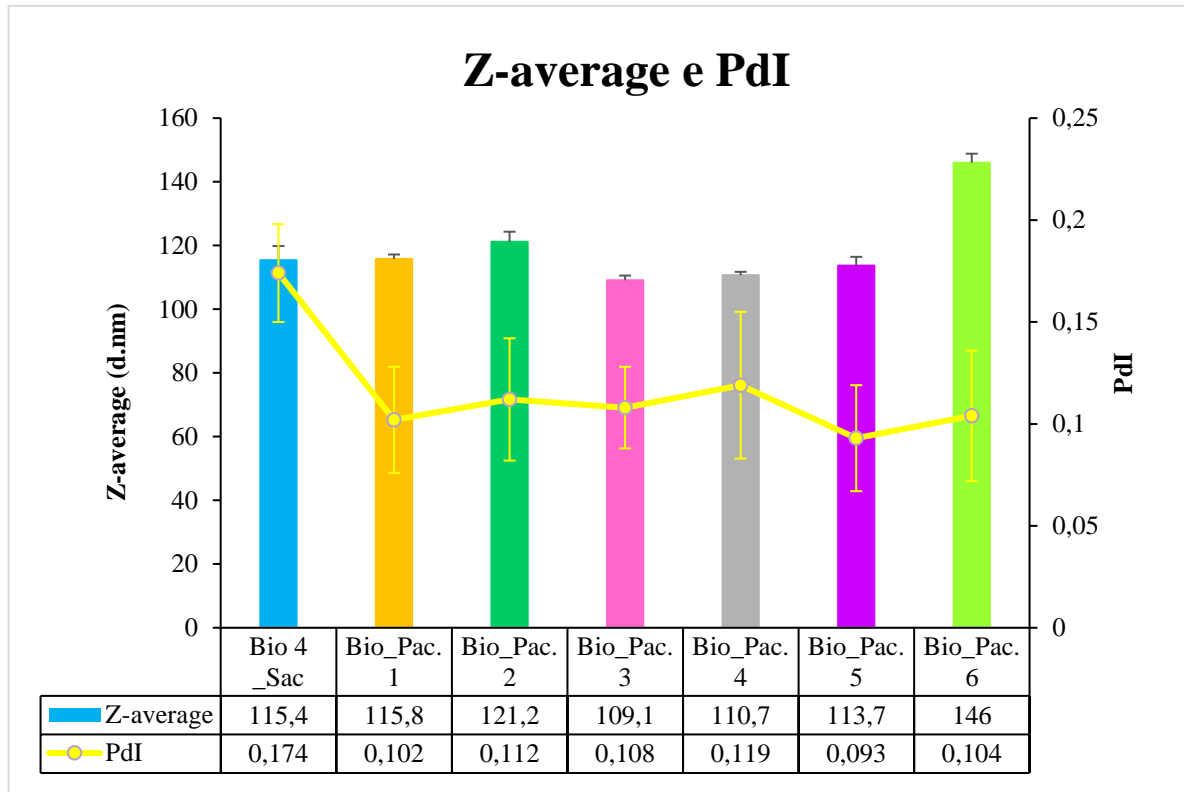


Figura 20. Z-Average e PDI do bioconjugado pAbS1N36@AuNPs100 (Bio 4_Sac) antes e após incubação com amostras de nasofaringe de pacientes. Os resultados estão apresentados como a média de um experimento, e cinco medições de DLS.

Ao analisar o gráfico acima, constata-se que, dentre as seis amostras de nasofaringe de pacientes submetidas à incubação com o bioconjugado pAbS1N36@AuNPs100, apenas a amostra do Pac 6 apresentou um aumento significativo no DH, indicando uma possível contaminação pelo SARS-CoV-2. Nas demais amostras, o valor do DH permaneceu praticamente inalterado.

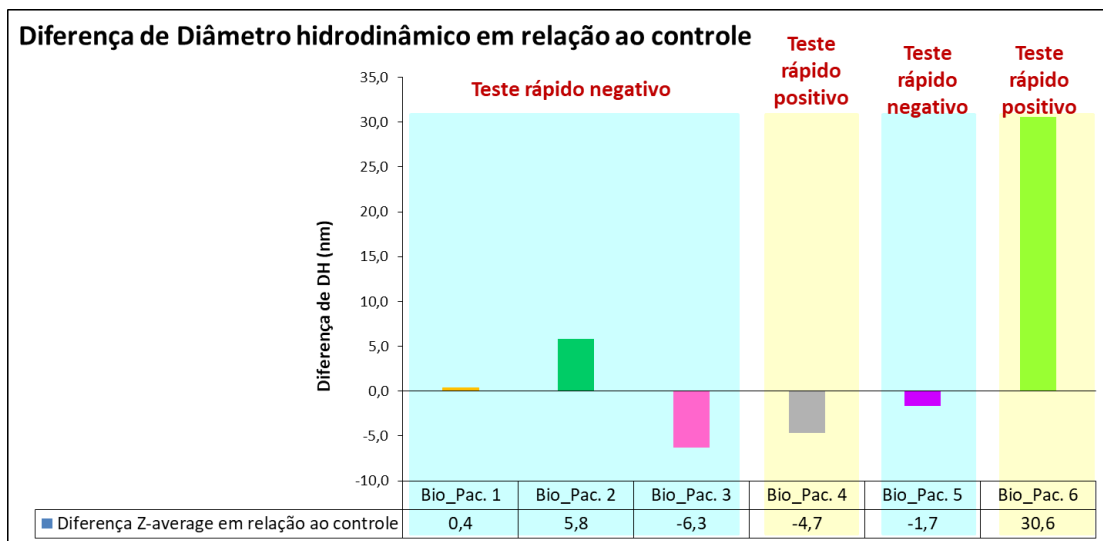


Figura 21 . Diferença de DH de todas as amostras de pacientes incubadas com o bioconjugado pAbS1N36@AuNPs100 menos o bioconjugado isolado. Os resultados estão apresentados como a média de um experimento, e cinco medições de DLS.

Ao analisarmos os dados do gráfico da Figura 21 e compará-los com os resultados obtidos no teste rápido realizado na UBS 5, podemos observar uma correlação em desenvolvimento entre pacientes positivos e a diferença nos valores do DH. No teste rápido realizado na unidade de saúde, o paciente 4 foi diagnosticado como positivo, mas com uma intensidade de cor consideravelmente baixa no kit, sugerindo uma possível fase final da infecção, uma vez que o indivíduo estava no sexto dia de sintomas, durante o período em que a variante Ômicron estava predominante, caracterizada por um curso de infecção mais curto. Em contrapartida, o paciente 6 apresentou um resultado positivo no teste rápido com uma intensidade de cor elevada, estando apenas no segundo dia de sintomas, e demonstrando um aumento de 30,6 nm no valor do DH.

Com base nos resultados apresentados e em outros obtidos até o momento, é possível inferir que as amostras de nasofaringe infectadas com o vírus SARS-CoV-2 são mais facilmente detectadas pelo DLS, visto que observamos uma correlação entre o teste realizado na unidade de saúde e o nosso teste. No caso do paciente 4, a ausência de aumento no valor do DH está possivelmente relacionada ao limite de detecção do nosso teste, ou seja, o número de partículas virais presentes na amostra é muito baixo para ser detectado pelo DLS.

6. Conclusão

Os bioconjugados pAbS1N18@AuNPs50 e pAbS1N18@AuNPs100 demonstraram uma notável capacidade de manter sua estabilidade quando comparados às AuNPs50 e AuNPs100 não modificadas. Essa estabilidade pode ser atribuída diretamente à presença da BSA e do anticorpo na superfície das AuNPs, desempenhando um papel crucial na redução da auto-agregação dessas partículas em meios aquosos ou soluções tampão. A incorporação da BSA e do anticorpo confere às AuNPs uma maior resistência à agregação, garantindo assim a preservação de sua estrutura e funcionalidade ao longo do tempo.

Em relação aos experimentos com amostras biológicas, houve a ligação específica do vírus SARS-CoV-2 com os biconjugados de acordo com as técnicas de MET e DLS e com as amostras de pacientes voluntários. Após uma análise minuciosa dos resultados obtidos até o momento com as amostras de nasofaringe, constatou-se uma correlação significativa de 84% entre o teste rápido realizado na UBS5 e o teste realizado por meio da técnica DLS.

Por fim, vale ressaltar que o desenvolvimento desse nanossistema metálico foi bem sucedido e não só poderá ser manuseado para o diagnóstico de COVID-19 como também para outras doenças, desde que sejam realizadas as adaptações necessárias.

7. Referências Bibliográficas

- ABDULJALIL, J. M.; ABDULJALIL, B. M. Epidemiology, genome, and clinical features of the pandemic SARS-CoV-2: a recent view. **New Microbes and New Infections**, v. 35, p. 100672, 2020.
- ABU, A. et al. Insights into SARS-CoV-2 genome , structure , evolution , pathogenesis and therapies : Structural genomics approach. **BBA - Molecular Basis of Disease**, n. January, 2020.
- ADNAN, M. et al. COVID-19 infection : Origin , transmission , and characteristics of human coronaviruses. **Journal of Advanced Research**, v. 24, p. 91–98, 2020.
- AI, T.; LV, W. Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China : A Report of 1014 Cases. **Radiology**, v. 2019, 2020.
- ALEXANDRA C. WALLS, Y.-J. P.; M. ALEJANDRA TORTORICI, A. W.; ANDREW T. MCGUIRE, D. V. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, n. January, 2020.
- BATTAGLINI, D. et al. Laboratory Biomarkers for Diagnosis and Prognosis in COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. April, p. 1–11, 2022.
- BENTO, P. et al. Detection of SARS-CoV-2 virus via dynamic light scattering using antibody-gold nanoparticle bioconjugates against viral spike protein. **Talanta**, v. 243, p. 123355, 2022.
- BHATTACHARJEE, S. **DLS and zeta potential - What they are and what they are not?** **Journal of Controlled Release**, 2016.
- BUZEA, Cristina; PACHECO, Ivan I.; ROBBIE, Kevin. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, n. 4, p. MR17-MR71, 2007.
- BRANCH, W. Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. **JAMA Neurology**, 2020.
- CAMPOS, G. S. et al. Ion torrent-based nasopharyngeal swab metatranscriptomics in COVID-19. **Journal of Virological Methods**, n. January, 2020.
- CHAN, K. et al. Cross-reactive antibodies in convalescent SARS patients sera against the emerging novel human coronavirus EMC (2012) by both immunofluorescent and neutralizing antibody tests. **Journal of Infection**, v. 67, n. 2, p. 130–140, 2013.
- CHEN, G. et al. Identification and Survey of a Novel Avian Coronavirus in Ducks. **PLoS One**, v. 8, n. 8, 2013.
- CHIARA, M. et al. Next generation sequencing of SARS-CoV-2 genomes : challenges , applications and opportunities. **Briefings in Bioinformatics**, v. 00, n. September, p. 1–15, 2020.

COMPARING, D. C.- et al. Diagnostic Tools for Coronavirus Disease (COVID-19): Comparing CT and RT-PCR Viral Nucleic Acid Testing. **American Journal of Roentgenology**, n. October, p. 1–5, 2020.

CORMAN, V. M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Eurosurveillance**, n. December, p. 1–8, 2019.

CRAW, P.; BALACHANDRAN, W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics : a critical review. **Lab on a Chip**, p. 2469–2486, 2012.

DRISKELL, J. D. et al. One-step assay for detecting influenza virus using dynamic light scattering and gold nanoparticles. **Analyst**, v. 136, n. 15, p. 3083–3090, 2011.

DIAS, B. P. **Diagnóstico de SARS-CoV-2: uma revisão sistemática e o desenvolvimento de um biossensor com nanobastões de ouro**. Ouro Preto, 2022. 92f. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Ouro Preto.

FANG, Y.; PANG, P. Sensitivity of Chest CT for COVID-19: Comparison to RT-PCR. **Radiology**, p. 1–3, 2020.

FIELDING, D. S. AND B. C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. **Virology Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–22, 2019.

FORTERRE, P. The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions. **Virus Research**, v. 117, p. 5–16, 2006.

GAIKWAD, A. et al. Fluorescent Carbon-Dots Thin Film for Fungal Detection and Bio-labeling Applications. **ACS Appl. Bio Mater**, 2019.

GAUMET, Marie et al. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.

GIBBS, A. J. et al. The potyviruses: An evolutionary synthesis is emerging. **Viruses**, v. 12, n. 2, p. 1–29, 2020.

GOOTENBERG, J. S. et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a / C2c2. **Science**, v. 356, n. 6336, p. 438–442, 2017.

GRANT, P. R. et al. Extraction-free COVID-19 (SARS-CoV-2) diagnosis by RT- PCR to increase capacity for national testing programmes during a pandemic. **bioRxiv**, v. 19, p. 2–7, 2020.

HONG, K. H. et al. Guidelines for Laboratory Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Korea. **Annals of Laboratory Medicine**, p. 351–360, 2020.

HU, B. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141–154, 2021.

HU, B. The cytokine storm and COVID - 19. **Journal of Medical Virology**, n. March 2020, p. 250–256, 2021.

HUANG, C. et al. Rapid Detection of IgM Antibodies against the SARS-CoV - 2 Virus via Colloidal Gold Nanoparticle-Based Lateral-Flow Assay. **ACS Omega**, 2020.

INOUE-NAGATA, A. K. Complete genome sequence of arracacha mottle virus. **Archives of Virology**, p. 291–295, 2013.

JANS, H. et al. Dynamic light scattering as a powerful tool for gold nanoparticle bioconjugation and biomolecular binding studies. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 22, p. 9425–9432, 2009.

KHAILANY, R. A.; SAFDAR, M.; OZASLAN, M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. **Gene Reports**, v. 19, n. January, p. 1–6, 2020.

KRUPOVIC, M. Networks of evolutionary interactions underlying the polyphyletic origin of ssDNA viruses. **Current Opinion in Virology**, v. 3, n. 5, p. 578–586, 2013.

LAI, C. K. C.; LAM, W. Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. January 2020.

LAMB, L. E. et al. Rapid Detection of Novel Coronavirus (COVID-19) by Reverse Transcription- Loop-Mediated Isothermal Amplification. **medRxiv**, 2020.

LAUER, S. A. et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. **Annals of Internal Medicine**, v. 2019, 2020.

LAYQAH, L. A.; EISSA, S. An electrochemical immunosensor for the corona virus associated with the Middle East respiratory syndrome using an array of gold nanoparticle-modified carbon electrodes. **Microchimica Acta**, 2019.

LEPELLETIER.D, GRANDBASTIEN B, MICHAEL J. SMART, R. B. N. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. **Ann Oncol**, n. January, p. 19–21, 2020.

LI, Z. et al. Development and clinical application of a rapid IgM - IgG combined antibody test for SARS - CoV - 2 infection diagnosis. **Journal of Medical Virology**, n. February, p. 1518–1524, 2020.

LIU, Y. et al. Colorimetric detection of influenza A virus using antibody-functionalized gold nanoparticles. **Analyst**, v. 140, n. 12, p. 3989–3995, 2015.

MAJUMDER, J.; MINKO, T. Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19. **AAPS Journal**, v. 23, n. 1, 2021.

MARIANO, R. Z.; RAMOS, M. D. C.; REIS, F. Images in Infectious Diseases COVID-19 and pulmonary embolism: Do not forget the association! **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, v. 53:e202002, p. 10–11, 2020.

MARTÍN, C. S. Virus Maturation. **Physical Virology**, p. 129–158, 2019.

- MISRA, R.; ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 19–20, p. 842–850, 2010.
- MOHAMADIAN, M. et al. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. **Journal of Gene Medicine**, v. 23, n. 2, p. 1–11, 2021.
- MOITRA, P. et al. Selective Naked-Eye Detection of SARS-CoV - 2 Mediated by N Gene Targeted Antisense Oligonucleotide Capped Plasmonic Nanoparticles. **ACS Nano**, 2020.
- MU, J. et al. SARS-CoV-2-encoded nucleocapsid protein acts as a viral suppressor of RNA interference in cells. **Science China Life Sciences**, v. 63, n. 9, p. 1413–1416, 2020.
- NIKAEEN, G.; ABBASZADEH, S.; YOUSEFINEJAD, S. Application of nanomaterials in treatment , anti-infection and detection of coronaviruses. **Nanomedicine**, v. 15, p. 1501–1512, 2020.
- NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, 2000.
- OLIVEIRA, B. M. et al. SARS-CoV-2 and the COVID-19 disease: a mini review on diagnostic methods. **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine**, n. May, p. 1–8, 2020.
- PADEN, C. R. et al. Rapid, Sensitive, Full-Genome Sequencing of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. **Emerg Infect Dis**, v. 26, n. 10, p. 2401–2405, 2020.
- PILLAY, S. et al. Whole Genome Sequencing of SARS-CoV-2 : Adapting Illumina Protocols for Quick and Accurate Outbreak Investigation during a Pandemic. **Genes**, 2020.
- PORMOHAMMAD, A. et al. Clinical Characteristics, laboratory findings, radiographic signs and outcomes of 52,251 patients with confirmed covid-19 infection: a systematic review and meta-analysis. **Microbial Pathogenesis Journal**, n. January, 2020.
- PRASAD, R.; BHATTACHARYYA, A.; NGUYEN, Q. D. Nanotechnology in Sustainable Agriculture: Recent Developments , Challenges , and Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. June, p. 1–13, 2017.
- PUM, A. et al. Cytokines and Chemokines in SARS-CoV-2 Infections — Therapeutic Strategies Targeting Cytokine Storm. **Biomolecules**, p. 1–21, 2021.
- RABI, F. A. et al. SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019 : What We Know So Far. **Pathogens**, p. 1–14, 2020.
- RIFO, R. S. SARS-CoV-2 detection from nasopharyngeal swab samples without RNA extraction. **bioRxiv**, 2020.
- ROBB, N. C. Virus morphology: Insights from super-resolution fluorescence microscopy. **BBA - Molecular Basis of Disease**, n. January, 2020.

ROH, C.; JO, S. K. Quantitative and sensitive detection of SARS coronavirus nucleocapsid protein using quantum dots-conjugated RNA aptamer on chip. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, n. June, p. 1475–1479, 2011.

SAFIABADI TALI, S. H. et al. Tools and techniques for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 detection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 3, p. 1–63, 2021.

SIMMONDS, P.; AIEWSAKUN, P. Virus classification – where do you draw the line? **Archives of Virology**, v. 163, n. 8, p. 2037–2046, 2018.

SOARES, J. P. et al. Detection of a SARS-CoV-2 sequence with genosensors using data analysis based on information visualization and machine learning techniques. **Materials Chemistry Frontiers**, v. 5, n. 15, p. 5658-5670, 2021.

SRIDHAR, S. et al. A blueprint for the implementation of a validated approach for the detection of SARS- Cov2 in clinical samples in academic facilities. **bioRxiv**, p. 1–34, 2020.

STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 4, p. 409–427, 2016.

TEENGAM, P. et al. Multiplex Paper-Based Colorimetric DNA Sensor Using Pyrrolidinyl Peptide Nucleic Acid-Induced AgNPs Aggregation for Detecting MERS-CoV, MTB, and HPV Oligonucleotides. **Anal. Chem**, 2017.

THARAYIL, A. et al. New insights into application of nanoparticles in the diagnosis and screening of novel coronavirus (SARS-CoV-2). **Emergent Materials**, p. 101–117, 2021.

UDUGAMA, B. et al. Diagnosing COVID-19 : The Disease and Tools for Detection. **ACS Nano**, 2020.

VALIZADEH, H.; ABDOLMOHAMMADI-VAHID, S.; DANSHINA, S. Nano-curcumin therapy , a promising method in modulating inflammatory cytokines in COVID-19 patients. **International Immunopharmacology**, n. January, 2020.

VYAKARANAM, A. R. et al. 11 C-hydroxy-ephedrine-PET/CT in the Diagnosis of Pheochromocytoma and Paraganglioma. **Cancers**, 2019.

XIANG, J. Z. et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS- CoV-2 in Wuhan , China. **Allergy**, n. February, p. 1730–1741, 2020.

XIE, X. et al. Chest CT for Typical 2019-nCoV Pneumonia: Relationship to Negative RT-PCR Testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. April, p. 1–5, 2020.

YA, P.; PINGARRÓN, J. M. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Anal Bioanal Chem**, p. 884–886, 2005.

YADOLLAHPOUR, A. Nanotechnology and Biomarkers in Precision Medicine : Advances and Perspectives. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 14, p. 1199–1201, 2021.

YANG, W. et al. Rapid Detection of SARS-CoV-2 Using Reverse transcription RT-LAMP method. **medRxiv**, 2020.

YEAP, S. P. et al. Role of Particle–Particle Interaction Towards Effective Interpretation of Z - Average and Particle Size Distributions from Dynamic Light Scattering (DLS) Analysis . **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 18, n. 10, p. 6957–6964, 2018.

YESUDHAS, D.; SRIVASTAVA, A.; GROMIHA, M. M. COVID-19 outbreak history, mechanism, transmission, structural studies and therapeutics. **Infection**, v. 49, n. 2, p. 199–213, 2021.

YOSHIMOTO, F. K. The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus - 2 (SARS CoV - 2 or n - COV19), the Cause of COVID - 19. **The Protein Journal**, v. 39, n. 3, p. 198–216, 2020.

ZHANG, F. et al. A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics. **Archives of Virology**, p. 1–8, 2020.

ZHANG, Y. et al. Rapid Molecular Detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) Virus RNA. **medRxiv**, v. 2, 2020.

World Health Organization. **Origin of SARS-CoV-2**. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_1. Acesso em: 14 de março de 2022.