



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO - UFMA
Centro de Ciências de Imperatriz - CCIM
Programa Pós-Graduação em Ciência dos Materiais - PPGCM



CHIRLENE NASCIMENTO BOTELHO

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DE PLATAFORMAS FOTOELETROQUÍMICAS À BASE DE
TITANATO DE ESTRÔNCIO PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENOS SARS-COV-2**

Imperatriz -MA

2025



CHIRLENE NASCIMENTO BOTELHO

**AVALIAÇÃO DE PLATAFORMAS FOTOELETROQUÍMICAS À BASE DE
TITANATO DE ESTRÔNCIO PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENOS SARS-COV-2**

Trabalho de tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Ciência dos Materiais.

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Silva Luz



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO - UFMA
Centro de Ciências de Imperatriz - CCIM
Programa Pós-Graduação em Ciência dos Materiais - PPGCM



Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Botelho, Chirlene Nascimento.

AVALIAÇÃO DE PLATAFORMAS FOTOELETROQUÍMICAS À BASE DE
TITANATO DE ESTRÔNCIO PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENOS SARS-COV-
2 / Chirlene Nascimento Botelho. - 2025.

130 p.

Orientador(a): Rita de Cássia Silva Luz.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciência
dos Materiais/ccim, Universidade Federal do Maranhão, São
Luís, 2025.

1. Sr₂TiO₃; G-c3n4-s. 2. Pd₂O₃(OH), Bivo₄. 3.
Fotoeletroquímica. 4. Imunossensores. 5. Sars-cov-2. I.
Luz, Rita de Cássia Silva. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO - UFMA
Centro de Ciências de Imperatriz - CCIM
Programa Pós-Graduação em Ciência dos Materiais - PPGCM



Membros da comissão julgadora da defesa da tese de doutorado da aluna **Chirlene Nascimento Botelho** apresentada e aprovada ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Materiais (PPGCM), em 24/01/2025.

COMISSÃO JULGADORA:

- Prof^a. Dr^a. RITA DE CÁSSIA SILVA LUZ (PPGCM/UFMA) - Presidente e Orientadora.

- Prof. Dr^a. JOSY ANTEVELI OSAJIMA FURTINI (UFPI)-Avaliadora externo

- Prof. Dr. RODRIGO ALEJANDRO ABARZA MUÑOZ (UFU)-Avaliador externo.

- Prof. Dr^a. LUZELI MOREIRA DA SILVA (PPGCM/UFMA) -Avaliadora interno.

- Prof. Dr. ADENILSON OLIVEIRA DOS SANTOS (PPGCM/UFMA) - Avaliador interno.

OBS.: Ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se na coordenação do programa da unidade.

Em especial...

Aos meus pais (Raimundo Célio Botelho e Maria de Nazaré Nascimento), por estarem sempre presente em todos os momentos de minha vida, sempre acreditando em meus objetivos e sonhos.

“Meus PAIS, minha bússola para vida!”

A Elilson Santos, que acompanhou toda essa trajetória acadêmica, sempre me ajudando, dando forças e apoiando em minhas decisões.

A dedicação desta conquista, é feita a vocês com profundo amor, respeito e admiração.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Profa. Dra. Rita de Cássia pelo acolhimento em seu laboratório de pesquisa, pela confiança depositada, pelo incentivo na pesquisa. Agradeço de coração pela sua dedicação, críticas construtivas, ensinamentos e amizade, todo o aprendizado contribuiu de forma significativa no meu crescimento pessoal e profissional, me ajudando a evoluir como pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Flávio Damos por se mostrar sempre disponível, principalmente nos momentos de dúvidas, agradeço todos os ensinamentos e os momentos de conversas no laboratório.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Sensores, Dispositivos e Métodos Analíticos (LabS) pela constante parceria, pelo ambiente acolhedor, por me receberem com carinho e, sobretudo, pelas discussões científicas que significativamente contribuíram para o meu desenvolvimento, em especial a Ricky Penha, Jeovana Pacheco, Danilo Braga, Sakae Yotsumoto, Antonielson Rodrigues, Greicy Kelly, Guilherme Azevedo, Barbara Demetrio e José Ribamar.

A minha família (Raimundo Célio Botelho, Maria de Nazaré Nascimento, Charles Botelho, Elilson Santos), agradeço por todo incentivo, palavras de conforto, atenção, amor e carinho.

À Universidade Federal do Maranhão e ao Programa de Pós Graduação em Ciências dos Materiais-PPGCM pela oportunidade de conseguir me capacitar.

À Central Analítica de Química, Central Analítica de Materiais, ao Laboratório de Espectroscopia Vibracional e Impedância, por todas as análises realizadas.

Ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pelas análises no microscópio eletrônico de varredura.

A FAPEMA pela bolsa concedida na qual foi fundamental para realização dessa pesquisa. A CAPES e CNPq pelo investimento nos projetos de pesquisa.

A todos os amigos e familiares que contribuíram de alguma forma na realização dessa pesquisa.

Meus agradecimentos de coração...

RESUMO

A pandemia COVID-19, iniciada em 2019, continua sendo um desafio global persistente para os sistemas de saúde pública. A detecção precoce e altamente sensível da infecção desempenha um papel crucial na prevenção da disseminação do vírus por meio de indivíduos pré-sintomáticos ou assintomáticos, especialmente em comunidades e ambientes domiciliares. Neste contexto, este trabalho descreve o desenvolvimento de plataformas fotoeletroquímicas (FEQs) imunossensoras a base de SrTiO_3 , visando a detecção de SARS-CoV-2, as quais são baseadas na modificação de uma lâmina de vidro revestida com um filme de dióxido de estanho dopado com flúor ($\text{SnO}_2\text{-F}$) - FTO. A primeira plataforma foi formada por nanopartículas de titanato de estrôncio (SrTiO_3 ou ST), nitreto de carbono grafítico dopado com enxofre ($\text{g-C}_3\text{N}_4\text{-S}$ ou CNS) e nanopartículas de paládio aprisionadas a hidróxido de alumínio (PdAlO(OH) ou PdNPs). Já a segunda plataforma foi baseada em um material compósito formado por SrTiO_3 e Vanadato de Bismuto (BiVO_4). As plataformas FEQs foram denotadas como PdNPs/CNS/ST/FTO e $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ e em ambos os sistemas fotoeletroquímicos utilizou-se o ácido ascórbico (AA) como molécula doadora de elétrons. As caracterizações químicas, morfológicas e eletroquímicas foram realizadas pelas seguintes técnicas: Difração de Raios X, Microscopia Eletrônica de Varredura, Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X, Microscopia eletrônica de transmissão, Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia Raman, Espectroscopia de Impedância Eletroquímica e Amperometria. As respostas FEQs das plataformas foram otimizadas avaliando-se os efeitos da molécula doadora, a natureza do tampão, pH, concentração de anticorpos, potencial aplicado ao eletrodo de trabalho e tempo de interação entre o antígeno e o anticorpo. Dessa forma, foi possível monitorar a diminuição da fotocorrente das plataformas FEQs contendo os antígenos espícula ou nucleocapsídeo de SARS-CoV-2. Para a plataforma PdNPs/CNS/ST/FTO observou-se o aumento da concentração dos antígenos espícula de SARS-CoV-2 de 1 fg mL^{-1} a 1000 pg mL^{-1} . Em relação a plataforma $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ obteve-se uma faixa de resposta linear de $0,1 \text{ pg mL}^{-1}$ a 1000 ng mL^{-1} para proteína espícula e $0,01 \text{ pg mL}^{-1}$ a 1000 ng mL^{-1} para proteína nucleocapsídeo. Os imunossensores propostos foram aplicados com sucesso em amostras de saliva artificial apresentando valores de recuperação de 96,20% a 109,65% e 97 % a 107,20 %, respectivamente, além de boa seletividade, precisão e exatidão, mostrando que as plataformas propostas podem ser consideradas alternativas promissoras para detecção de SARS-CoV-2.

Palavras Chaves: SrTiO_3 ; $\text{g-C}_3\text{N}_4\text{-S}$, PdAlO(OH) , BiVO_4 , fotoeletroquímica, imunossensores, SARS-CoV-2.

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic, which began in 2019, continues to pose a persistent global challenge to public health systems. Early and highly sensitive detection of the infection plays a crucial role in preventing the spread of the virus through pre-symptomatic or asymptomatic individuals, especially in communities and home settings. This work describes the development of photoelectrochemical (PEC) immunosensor platforms based on SrTiO₃ for the detection of SARS-CoV-2. These platforms are designed by modifying a glass slide coated with a fluorine-doped tin dioxide (SnO₂-F) film – FTO. The first platform consisted of strontium titanate nanoparticles (SrTiO₃ or ST), sulfur-doped graphitic carbon nitride (g-C₃N₄-S or CNS), and palladium nanoparticles encapsulated in aluminum hydroxide (PdAlO(OH) or PdNPs). The second platform was based on a composite material composed of SrTiO₃ and bismuth vanadate (BiVO₄). The PEC platforms were designated as PdNPs/CNS/ST/FTO and BiVO₄/SrTiO₃/FTO, and in both photoelectrochemical systems, ascorbic acid (AA) was used as the electron donor molecule. The chemical, morphological, and electrochemical characterizations were performed using the following techniques: X-ray Diffraction, Scanning Electron Microscopy, Energy Dispersive X-ray Spectroscopy, Transmission Electron Microscopy, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Raman Spectroscopy, Electrochemical Impedance Spectroscopy, and Amperometry. The FEQ responses of the platforms were optimized by evaluating the effects of the donor molecule, buffer nature, pH, antibody concentration, applied potential to the working electrode and interaction time between the antigen and the antibody. Thus, it was possible to monitor the decrease in photocurrent of the FEQ platforms containing the spike or nucleocapsid antigens of SARS-CoV-2. For the PdNPs/CNS/ST/FTO platform, an increase in the concentration of the SARS-CoV-2 Spike antigens from 1 fg mL⁻¹ to 1000 pg mL⁻¹ was observed. For the BiVO₄/SrTiO₃/FTO platform exhibited a linear response range from 0.1 pg mL⁻¹ to 1000 ng mL⁻¹ for the Spike protein and from 0.01 pg mL⁻¹ to 1000 ng mL⁻¹ for the Nucleocapsid protein. The proposed immunosensors were successfully applied to artificial saliva samples, showing recovery values ranging from 96.20% to 109.65% and 97% to 107.20%, respectively, as well as good selectivity, precision, and accuracy. These results indicate that the proposed platforms can be considered promising alternatives for the detection of SARS-CoV-2.

Keywords: SrTiO₃; g-C₃N₄-S, PdAlO(OH), BiVO₄, photoelectrochemical; immunosensors; SARS-CoV-2.

Produções Científicas

- DOS SANTOS, J. R. N.; **BOTELHO, C. N.**; CALDAS, G. K. C.; DE MENEZES, A.S.; KUBOTA, L. T.; SOUSA, J. K. C.; DAMOS, F. S.; LUZ, R. C. S. Photoelectrochemical determination of phloroglucinol based on a combination of a ceramic perovskite and bismuth vanadate. *Microchimica acta*, v. 191, p. 609, 2024.
- **BOTELHO, C.N.**; DE MENEZES, A. S.; SILVA, S.M.; KUBOTA, L.T.; DAMOS, F.S.; LUZ, R. C.S. Photoelectrochemical biosensing platform for the SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins, *Electroanalysis*, v. 35, p. e202200572, 2023.
- **BOTELHO, C.N.**; FALCÃO, S.S; SOARES, R.P; PEREIRA, S.R; DE MENEZES, A.S.; KUBOTA, L.T.; DAMOS, F.S.; LUZ, R.C.S. Evaluation of a photoelectrochemical platform based on strontium titanate, sulfur doped carbon nitride and palladium nanoparticles for detection of SARS-CoV-2 spike glycoprotein S1. *Biosensors Bioelectronics X*, v.11, p.100167, 2022.
- **BOTELHO, C.N.**; PAVÃO, D. P.; DAMOS, F. S.; LUZ, R. C. S. Photoelectrochemical Sensor for Isoniazid: Application in Drugs Used in the Treatment of Tuberculosis. *Electroanalysis*, v. 33, p. 1936-1944, 2021.
- PAVÃO, D. P.; **BOTELHO, C. N.**; FERNANDES, R. N.; SANTOS, C. C.; DAMOS, F. S.; LUZ, R. C. S. A simple, cost-effective, and environmentally friendly method for determination of ciprofloxacin in drugs and urine samples based on electrogenerated chemiluminescence. *Electroanalysis*, v. 32, p. 1498-1506, 2020.
- SOUSA, C. S.; LIMA, K. C. M. S.; **BOTELHO, C. N.**; PEREIRA, N. M.; FERNANDES, R. N.; SILVA, G. G.; DAMOS, F. S.; LUZ, R. C. S.. Photoelectrochemical sensor for determination of naringin at low oxidation potential using a modified FTO electrode with cadmium sulfide and titanium dioxide sensitized with chloroporphyrin IX iron (III). *Journal of Solid-State Electrochemistry*, v. 24, p. 1715–1726, 2020.
- FREIRES, A. S.; **BOTELHO, C. N.**; SILVA, S. M.; GOULART, M. O. F.; DAMOS, F. S.; LUZ, R. C. S. Photoelectrochemical biosensor for 1,4-dihydroxybenzene based on copper sulfide and horseradish peroxidase enzyme: Application in skin cream samples. *Microchemical Journal*, v. 159, p. 105487, 2020.
- **BOTELHO, C. N.**; PEREIRA, N. M.; SILVA, G. G.; MENEZES, A. S.; BEZERRA, C. W. B.; DAMOS, F. S.; LUZ, R. C. S. Photoelectrochemical-assisted determination of caffeic acid exploiting a composite based on carbon nanotubes, cadmium telluride quantum dots, and titanium dioxide. *Analytical Methods*, v. 11, p. 4775-4784, 2019.

Lista de Figuras

Figura 1: Ilustração da estrutura do vírus SARS-CoV-2.....	25
Figura 2: Tipos de testes atuais para detecção de Covid-19	28
Figura 3: Estrutura para perovskita ABX_3	31
Figura 4: (a) Representação esquemática dos sítios cubo-octaedrais do $SrTiO_3$; (b) Estrutura cúbica do $SrTiO_3$	32
Figura 5: Esquema do mecanismo para FEQ para (A) fotocorrente anódica e (B) fotocorrente catódica.....	34
Figura 6: Representação de reconhecimento de um imunossensor padrão.....	35
Figura 7: Representação esquemática da produção do $g-C_3N_4-S$ ou CNS.	44
Figura 8: Representação esquemática da produção do $BiVO_4$	45
Figura 9: Representação esquemática da construção da plataforma PdNPs/CNS/ST/FTO....	46
Figura 10: Esquema de modificação do FTO com $BiVO_4/SrTiO_3/FTO$	47
Figura 11: Representação esquemática da construção dos imunossensores FEQ's.	48
Figura 12: Microscópio Eletrônica de Transmissão o Centro de Microscopia da UFMG	51
Figura 13: Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) - CEMAT (UFMA).	51
Figura 14: Ilustração da lei de difração de raios X proposta por Bragg.	53
Figura 15: Ilustração do processo de análise do difratômetro de raios X.	53
Figura 16: Difratoograma de raio X (DRX)- CEMAT- UFMA	54
Figura 17: Espectro eletromagnético, com destaque a região do visível ao Infravermelho. ..	55
Figura 18: Os modos vibracionais simétricos e assimétricos de moléculas poliatômicas	56
Figura 19: Espectrofotômetro Infravermelho- Central Analítica-UFMA.....	56
Figura 20: Esquema do espalhamento de luz por uma amostra na qual foi incidida radiação monocromática.....	57
Figura 21: Espectrômetro Raman Horiba-Jobin-Yvon (modelo T64000) - LEVI-UFMA.	58
Figura 22: Arranjo experimental das medidas de EIE. (CE - Contra Eletrodo; ER- Eletrodo de Referência; ET - Eletrodo de Trabalho).	60
Figura 23: Potenciostato/Galvanostato utilizado no sistema FEQ.	61
Figura 24: Representação esquemática do sistema eletroquímico e FEQ.	61
Figura 25: Imagens MEV para (a) titanato de estrôncio, $SrTiO_3$, (b) nitreto de carbono grafitico dopado com enxofre, $g-C_3N_4-S$, (c) nanopartículas de paládio aprisionadas em matriz de hidróxido de alumínio, Pd/AlO(OH) e (d) o material compósito PdNPs/CNS/ST, (e) imagem MET da amostra PdNPs/CNS/ST e (f) espectro EDS da amostra PdNPs/CNS/ST.....	69

Figura 26: Padrões de DRX para o ST (SrTiO ₃); CNS (g-C ₃ N ₄ -S); PdNPs (PdAlO(OH)) e PdNPs/CNS/ST.....	70
Figura 27: Espectros de FTIR para o PdNPs (PdAlO(OH)); CNS (g-C ₃ N ₄ -S); ST (SrTiO ₃) e PdNPs/CNS/ST.....	72
Figura 28: Espectros Raman obtidos para o CNS (g-C ₃ N ₄ -S) (a); PdNPs (PdAlO(OH)) (b), ST (SrTiO ₃) (c) e PdNPs/CNS/ST (d).....	73
Figura 29: (a) Gráfico de Nyquist para o imunossensor FEQ PdNPs/CNS/ST/FTO em 0,1 mol L ⁻¹ de solução de KCl contendo 5 mmol L ⁻¹ de K ₃ [Fe (CN) ₆], obtido em potencial fechado na ausência (espectro preto) e presença (espectro vermelho) de luz LED visível. (b) Gráficos de Nyquist para a plataforma anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO na ausência (espectro 1) e incidência de luz LED visível (espectro 2). Gráficos de Nyquist para o anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO na ausência (espectro 3) e incidência de luz LED visível (espectro 4) após incubação em solução de antígeno SARS-CoV. Experimentos também realizado em solução de 0,1 mmol L ⁻¹ de KCl contendo 5 mmol L ⁻¹ de K ₃ [Fe (CN) ₆].	74
Figura 30: Resposta FEQ para os materiais: PdNPs/ST/FTO (amperograma vermelho), CNS/ST/FTO (amperograma rosa), PdNPs/CNS/FTO (amperograma azul) e PdNPs/CNS/ST/FTO (amperograma roxo) na presença de 0,2 mol L ⁻¹ de AA em 0,1 mol L ⁻¹ de TF, pH 7,0, E _{apl.} = 0,0 V vs Ag/AgCl (KCl _{sat}).....	75
Figura 31: (a) Amperogramas para diferentes concentrações de AA em 0,1 mol L ⁻¹ de TF, pH 7,0, E _{apl.} = 0,0 V vs Ag/AgCl (KCl _{sat}). (a1) Gráfico de fotocorrente em função da concentração de AA obtido a partir da Figura 31(a).	77
Figura 32: (a) Amperogramas de diferentes valores de pH em 0,1 mol L ⁻¹ de TF contendo 0,3 mol L ⁻¹ de AA. E _{apl.} = 0,0 V vs Ag/AgCl (KCl _{sat}). (a1) Gráfico de fotocorrente em função do pH obtido a partir da Figura 32a.....	78
Figura 33: Amperogramas referentes ao tipo de solução tampão (0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0) contendo 0,3 mol L ⁻¹ de AA. E _{apl.} = 0,0V vs Ag/AgCl (KCl _{sat}).....	79
Figura 34: Amperogramas referentes à diferentes valores de potenciais aplicados ao eletrodo de trabalho. Experimentos conduzidos em 0,1 mol L ⁻¹ de solução tampão HEPES, pH 7,0... 80	
Figura 35: (a) Resposta amperométrica da plataforma FEQ PdNPs/CNS/ST/FTO para diferentes concentrações de anticorpos SARS-CoV-2 (0 – 10 µg mL ⁻¹). Experimentos realizados em 0,1 mol L ⁻¹ do tampão HEPES, pH 7,0, E _{apl.} = 0,0 V vs Ag/AgCl (KCl _{sat}); T _{incubação} =30 minutos; (a1) Gráfico obtido a partir da Fig. 35a.....	81
Figura 36: (a) Amperogramas obtidos para diferentes tempos de incubação (5 - 40 minutos) do antígeno SARS-CoV-2 na plataforma FEQ. (a1) Gráfico obtido a partir da Figura 36 (a).....	82

Figura 37: (a) Resposta de fotocorrente para imunossensor anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO antes, com [SARS-CoV-2] = 0 pg mL ⁻¹ (amperograma preto) e após incubação de diferentes concentrações de SARS-CoV-2; 1 fg mL ⁻¹ ; 10 fg mL ⁻¹ ; 100 fg mL ⁻¹ ; 1 pg mL ⁻¹ ; 10 pg mL ⁻¹ ; 100 pg mL ⁻¹ ; 1000 pg mL ⁻¹ (demais amperogramas). (b) Curva analítica para detecção de antígenos SARS-CoV-2 com anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO. Medidas realizadas em 0,1 mol L ⁻¹ do tampão HEPES, pH 7,0, contendo 0,3 mol L ⁻¹ de AA, E _{apl.} = 0,0 V vs Ag/AgCl (KCl _{sat}). T _{incubação} = 30 minutos.....	83
Figura 38: Representação esquemática do mecanismo proposto para a detecção fotoeletroquímica do imunossensor anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO.	85
Figura 39: Avaliação da repetibilidade das medições em 1000s, na presença de 0,3 mol L ⁻¹ AA (amperograma preto), plataforma modificada de anticorpo SARS-CoV-2 (amperograma vermelho) e plataforma modificada de anticorpo-antígeno SARS-CoV-2 (Amperograma azul). [Anti-SARS-CoV-2] = 5 µg mL ⁻¹ e [proteína SARS-CoV-2] = 100 pg mL ⁻¹	86
Figura 40: Resposta amperométrica para a plataforma FEQ anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO preparada em dias diferentes. Medidas realizadas em 0,1 mol L ⁻¹ do tampão HEPES, pH 7,0, contendo 0,3 mol L ⁻¹ AA, E _{apl.} = 0,0 V vs Ag/AgCl (KCl _{sat}). [Anti-SARS-CoV-2] = 5 µg mL ⁻¹	87
Figura 41: (a) Respostas amperométricas para o imunossensor anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO na presença de possíveis espécies interferentes: Glicose (1), citocromo C (2), ureia (3), propil dimetil amina (4), BSA (5), PSA (6), dopamina (7) e troponina (8). (a1) Gráfico do percentual do efeito desses compostos na determinação de SARS-CoV-2. Medidas realizadas em 0,1 mol L ⁻¹ de tampão HEPES (pH 7,0), contendo 0,3 mol L ⁻¹ AA, E _{apl.} = 0,0 V vs Ag/AgCl (KCl _{sat}).....	88
Figura 42: Imagens MEV para (a) SrTiO ₃ ; (b) BiVO ₄ e (c) BiVO ₄ /SrTiO ₃ e os respectivos espectros de EDS obtidos para (d) SrTiO ₃ , (e) BiVO ₄ e (f) BiVO ₄ /SrTiO ₃	91
Figura 43: Padrões de difração de raios X do (a) SrTiO ₃ , (b) BiVO ₄ e (c) BiVO ₄ /SrTiO ₃	92
Figura 44: Espectros de FTIR para os materiais BiVO ₄ , SrTiO ₃ e BiVO ₄ /SrTiO ₃ , respectivamente.	93
Figura 45: Medidas amperométricas obtidas para as plataformas FEQs SrTiO ₃ /FTO (amperograma preto); BiVO ₄ /FTO (amperograma vermelho); BiVO ₄ /SrTiO ₃ /FTO (amperograma azul). As medidas foram realizadas em solução tampão TF 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,4 e E _{apl.} 0,0 V vs Ag/AgCl (KCl _{sat}), contendo 0,3 mol L ⁻¹ de AA.....	94

Figura 46: Curva de nyquist para a plataforma $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ na ausência (espectro preto) e presença de luz LED (espectro azul). Gráfico obtido em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $E_{\text{apl.}} = 0,3 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$ 95

Figura 47: Curva de nyquist para os imunossensores (S-Anti-SARS-CoV/BiVO₄/SrTiO₃/FTO e N-Anti-SARS-CoV/BiVO₄/SrTiO₃/FTO na ausência (espectro verde e preto) e presença de luz LED (espectro azul e vermelho). Gráficos obtido em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl contendo $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $E_{\text{apl.}} = 0,3 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$ 96

Figura 48: (a) Medidas amperométricas para a plataforma $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ modificada com anticorpos espícula (S-Anti-SARS-CoV-2), em diferentes soluções tampão a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4 contendo $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de AA e $E_{\text{apl.}} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$. (a1) Fotocorrente em função de diferentes soluções tampão e avaliação do percentual de inibição da fotocorrente pelo anticorpo espícula para cada solução tampão. (b) Medições amperométricas para plataforma $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ modificada com anticorpo nucleocapsídeo (N-Anti-SARS-CoV-2), em diferentes soluções tampão em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4, contendo $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de AA e $E_{\text{apl.}} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$. (b1) Fotocorrente em função de diferentes soluções tampão e avaliação do percentual de inibição da fotocorrente do anticorpo nucleocapsídeo para cada solução tampão 97

Figura 49: (a) Amperograma para plataforma $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ modificado com diferentes concentrações de anticorpos S ($0-10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Gráfico inserido: fotocorrente vs. concentração de anticorpo S. (b) Amperograma obtido para diferentes tempos de incubação para a detecção da proteína alvo S-SARS-CoV-2 (10 pg mL^{-1}) de 0 a 35 min (c) Amperograma para a plataforma $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ modificada com diferentes concentrações de N anticorpos ($0-10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Gráfico inserido: fotocorrente vs concentração de anticorpo N. (d) Amperograma obtido para diferentes tempos de incubação para a detecção da proteína alvo N-SARS-CoV-2 (10 pg mL^{-1}) de 0 a 35 min. Todas as medidas foram realizadas em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4, $E_{\text{apl.}} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}$. Todos os experimentos continham $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de AA. 100

Figura 50: (a) Amperogramas obtidos para o imunossensor S-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO antes da incubação e após a incubação em diferentes concentrações de proteína S ($0-1000 \text{ ng mL}^{-1}$). (a1) Curva de calibração para diferentes concentrações de proteína S. As medidas foram realizadas em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4, $E_{\text{apl.}} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$. (b) Amperogramas obtidos para o imunossensor N-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO antes da incubação e após a incubação em diferentes concentrações de proteína N ($0-1000 \text{ ng mL}^{-1}$). (b1) Curva de calibração para diferentes concentrações de

proteína N. Todos os experimentos continham 0,3 mol L ⁻¹ de AA. Tempo de incubação = 20 minut	101
Figura 51: Mecanismo proposto para detecção de FEQ usando o imunossensor BiVO ₄ /SrTiO ₃ /FTO modificado com o anticorpo espícula ou nucleocapsídeo para detecção de SARS-CoV-2. (BC= Banda de Condução; BV=Banda de Valência).....	104
Figura 52: Reprodutibilidade da resposta do imunossensor das medições em dias diferentes para (a) S-Anti-SARS-CoV-2/BiVO ₄ /SrTiO ₃ /FTO e (b) N-Anti-SARS-CoV-2/BiVO ₄ /SrTiO ₃ /FTO (c) e (d) Repetibilidade das medições em 1000s, para cada plataforma modificada (anticorpo S ou N) antes (linhas pretas) e após a detecção da proteína alvo (linhas vermelhas). [Anti-SARS-CoV-2] = 3 µg mL ⁻¹ ; [proteína SARS-CoV-2] = 10 pg mL ⁻¹	105
Figura 53: Gráfico de Percentual de inibição do imunossensor (a) S-Anti-SARS-CoV-2/BiVO ₄ /SrTiO ₃ /FTO e (b) N-Anti-SARS-CoV-2/BiVO ₄ /SrTiO ₃ /FTO em: (1) dopamina; (2) BSA; (3) glicose, (4) PSA; (5) ácido úrico; (6) troponina. Todas as medidas realizadas em solução 0,1 mol L ⁻¹ de BR (pH 7,4) contendo 0,3 mol L ⁻¹ de AA, sob E _{apl.} = 0,0 V vs Ag/AgCl (KCl _{sat}). e Tempo de incubação= 20 minutos.	107

Lista de Tabelas

Tabela 1: Procedimento experimental de preparo das soluções tampões.....	43
Tabela 2: Comparação de parâmetros analíticos para diferentes sensores eletroquímicos para empregados para determinação de SARS-CoV-2.....	84
Tabela 3: Resultados da detecção de SARS-CoV-2 em amostras de saliva artificial usando o imunossensor FEQ anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO.	89
Tabela 4: Valores dos parâmetros e componentes utilizados nos gráficos de nyquist para as plataformas BiVO ₄ /SrTiO ₃ /FTO, N-Anti-SARS-CoV/BiVO ₄ /SrTiO ₃ /FTO e S-Anti-SARS-CoV/BiVO ₄ /SrTiO ₃ /FTO.....	96
Tabela 6: Resultados obtidos para detecção de SARS-CoV-2 em amostras de saliva artificial.	108

Sumário

1. Introdução.....	20
2. Revisão Bibliográfica.....	24
2.1. Doenças Virais e os agravos a saúde humana	24
2.1.1 COVID-19	25
2.1.2 Técnicas de Detecção da COVID-19	26
2.1.3 Métodos eletroquímicos: Imunossensores aplicados na detecção de Doenças Virais	28
2.2. Cerâmicas Perovskitas e suas propriedades	30
2.2.1 Titanato de Estrôncio (SrTiO_3)	31
2.3. Sistemas Fotoeletroquímicos- FEQ's.....	33
2.3.1. Imunossensores	34
2.3.2. Imunossensores FEQ.....	36
2.3.3. Materiais fotoeletricamente ativos	36
2.3.4. g- $\text{C}_3\text{N}_4\text{-S}$ (CNS).....	38
2.3.5. Pd/ $\text{AlO}(\text{OH})$ -(PdNPs).....	38
2.3.6. BiVO_4	39
3. Metodologia.....	42
3.1. Reagentes e Soluções.....	42
3.1.1. Preparo das Soluções Tampões	42
3.2. Síntese dos materiais utilizados na construção da plataforma fotoeletroquímica - FEQ	43
3.2.1. Síntese do nitreto de carbono grafítico dopado com enxofre (g- $\text{C}_3\text{N}_4\text{-S}$ ou CNS). 43	
3.2.2. Síntese do vanadato de bismuto- (BiVO_4).....	44
3.3. Construção das plataformas fotoeletroquímicas-FEQ's e Preparo dos imunossensores para SARS-CoV-2	45
3.3.1. Plataforma FEQ PdNPs/CNS/ST/FTO.....	45
3.3.2. Plataforma FEQ $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$	46
3.3.3. Preparo dos Imunossensores FEQs PdNPs/CNS/ST/FTO e $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$..	47

3.4. Caracterização morfológica e espectroscópica dos materiais que compõem as plataformas FEQ's.....	49
3.4.1. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV).....	49
3.4.2. Microscopia eletrônica de transmissão-MET	50
3.4.3. Difração de Raio X (DRX).....	52
3.4.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	54
3.4.5. Espectroscopia Raman.....	57
3.5. Caracterização Eletroquímica e Fotoeletroquímica- FEQs.....	59
3.6. Otimização dos parâmetros experimentais e operacionais dos sistemas fotoeletroquímicos propostos.....	62
3.6.1. Concentração da Molécula doadora.....	62
3.6.2 pH (Potencial Hidrogeniônico) do meio sobre a resposta das plataformas FEQs ...	62
3.6.3 Solução Tampão.....	62
3.6.4 Potencial aplicado ($E_{apl.}$)	63
3.6.5. Efeitos da Concentração dos anticorpos SARS-CoV-2 sobre as plataformas FEQs	63
3.6.6. Tempo de interação entre os antígenos e anticorpos de SARS-CoV-2.....	63
3.7. Caracterização analítica dos imunossensores Anti-PdNPs/CNS/ST/FTO e Anti-BiVO ₄ /SrTiO ₃ /FTO	64
3.8. Avaliação da precisão do imunossensor.....	65
3.9. Aplicação dos imunossensores em amostras de saliva artificial e exatidão do método	65
3.10. Seletividade.....	66
4. Resultados e Discussão (Primeira plataforma).....	68
4.1. Caracterização dos materiais que compõem a plataforma FEQ.....	68
4.2. Caracterização do imunossensor por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)	73
4.3. Estudo do comportamento amperométrico dos materiais que compõem a plataforma fotoeletroquímica – FEQ	75
4.4. Otimização dos parâmetros experimentais e operacionais	76

4.4.1. Concentração do ácido ascórbico como molécula doadora (AA).....	76
4.4.2. Efeito do pH.....	77
4.4.3. Influência da Solução Tampão.....	78
4.4.4. Estudo do Potencial Aplicado ($E_{apl.}$).....	79
4.5 Efeitos da concentração do anti-SARS-CoV-2 e tempo de incubação/interação sobre a resposta na plataforma FEQ.....	80
4.6. Caracterização analítica do imunossensor FEQ anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO para detecção de SARS-CoV-2.....	82
4.7. Avaliação da precisão do imunossensor.....	85
4.8. Seletividade do Imunossensor.....	87
4.9. Aplicação do imunossensor FEQ anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO em amostras de saliva artificial.....	89
5. Resultados e Discussão (Segunda plataforma).....	90
5.1. Caracterização dos materiais SrTiO ₃ , BiVO ₄ e BiVO ₄ /SrTiO ₃ por microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de raios X por energia dispersiva, difração de raio X e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	90
5.2. Caracterização eletroquímica e Medições FEQs.....	93
5.3. Otimização dos parâmetros experimentais.....	97
5.4. Desempenho analítico do imunossensor FEQ (S ou N) -Anti-SARS-CoV-2/BiVO ₄ /SrTiO ₃ /FTO.....	101
5.5. Precisão do imunossensor.....	104
5.6. Estudo de possíveis interferentes e aplicação em amostras de saliva artificial.....	106
6. Considerações Finais.....	110
6.1. Perspectivas.....	112
REFERÊNCIAS.....	113

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

O SARS-CoV-2, vírus que causa uma síndrome respiratória aguda grave, foi detectado pela primeira vez em dezembro de 2019, causando uma pandemia global e gerando um grave impacto na vida das pessoas, além de crises econômicas e na saúde pública (Zheng et al., 2022; Liang Qizhi et al., 2023). A COVID-19 tornou-se um enorme problema de saúde pública a qual já infectou mais de 760 milhões e matou mais de 6,9 milhões de pessoas em todo o mundo (World Health Organization, 2023).

Mesmo com o desenvolvimento das vacinas e as taxas de vacinações atuais elevadas, ainda há uma grande preocupação com a variante SARS-CoV-2, devido ao grande número de alterações na glicoproteína, que podem levar ao escape de anticorpos desenvolvidos (Iketani et al., 2022; Meng et al., 2022). Considerando que o SARS-CoV-2 é uma doença altamente contagiosa, o custo elevado de medicamentos e vacinas não é suficiente para evitar e controlar a disseminação do vírus, sendo assim uma triagem para identificar a presença do inibidor, é fundamental (Luttens et al., 2022). Além disso, há uma dificuldade no controle e proteção contra o SARS-CoV-2, devido ao número elevado de indivíduos infectados assintomáticos (Wei et al., 2023).

A quinta onda da COVID-19 causada pelo surgimento da variante ômicron, que se caracteriza por deleções e mais de 30 mutações, trouxe maior transmissibilidade, maior afinidade de ligação viral e escape imunológico. Portanto, ainda existem incertezas quanto ao comportamento desta variante, inclusive em relação à imunidade mediada pela vacina (Karim e Karim, 2021).

Geralmente os sintomas dessa doença podem surgir entre 2 e 14 dias após o contágio e, dentre os sintomas mais comuns, destacam-se a febre, tosse e fadiga. Como sintomas mais críticos tem-se a pneumonia, dispneia, insuficiência respiratória, choque séptico e/ou falência dos órgãos (Wu et al., 2020, Wei et al., 2023). Neste sentido, o desenvolvimento de métodos alternativos de detecção que sejam rápidos, e eficientes, são essenciais para auxiliar na busca pelo controle dessa doença, uma vez que o diagnóstico precoce e rápido de pacientes infectados pode retardar a propagação desta doença infecciosa (Yakoh et al., 2021; Morales-Narvaez e Dincer, 2020).

Atualmente, na literatura são apresentados métodos de detecção de SARS-CoV-2, baseados em moléculas (Kudo et al., 2020; Suo et al., 2020), métodos sorológicos (Vernet et al., 2021; Trabucchi et al., 2022) e os biossensores (Carter et al., 2020; Antiochia, 2022; Liang et al., 2023). A técnica mais utilizada para diagnóstico de COVID-19 atualmente é a reação em

cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR), uma técnica laboratorial que apresenta alta sensibilidade e precisão de resultados (Broughton et al., 2020; Corman et al., 2020; Shen et al., 2020). No entanto, o RT-PCR requer um processo relativamente complicado de pré-tratamento da amostra e a obtenção dos resultados demora cerca de 3-4 horas por amostra analisada (Petralia e Conoci, 2017; Cheong et al., 2020; He et al., 2020; Liu et al., 2022). Além disso, o teste RT-PCR é caro e requer instalações laboratoriais especializadas com instrumentação cara e pessoal bem treinado. No geral, o RT-PCR não é ideal para testes em massa da COVID-19, especialmente em países subdesenvolvidos e comunidades remotas.

Visando, o desenvolvimento de testes rápidos e confiáveis, os biossensores/imunossensores eletroquímicos têm atraído uma atenção considerável, devido a suas diversas características como fácil manuseio, curto tempo de análise, baixo custo, análise em tempo real e sensibilidade.

Conseqüentemente, os imunossensores fotoeletroquímicos (FEQ) herdam essas características e tem a possibilidade de detectar biomoléculas por meio da fotocorrente gerada (Devadoss et al., 2015). Os sistemas fotoeletroquímicos referem-se à conversão de fótons em eletricidade, através da separação e transferência de carga (Zhang et al., 2012) e baseia-se em uma fonte de luz utilizada para excitar uma espécie fotoativa, gerando um sinal de fotocorrente, que é registrado pela estação de trabalho (Chen et al., 2022). Os materiais fotoativos são essenciais para a construção de uma plataforma FEQ pois apresentam diversas aplicações, sendo investigado em várias áreas como fotocatalise, eletrônica, células fotovoltaicas e optoeletrônicas (Guan et al., 2017).

Dentre os materiais fotoativos é possível destacar as cerâmicas semicondutoras, devido seu grande potencial extremamente amplo de aplicação, além de apresentarem propriedades ferroelétricas e piezoelétricas (Furuta e Miura, 2010), consideradas úteis em muitas aplicações tecnológicas (Youssef et al., 2021). O titanato de estrôncio, SrTiO_3 , é uma perovskita que apresenta propriedades fotoquímicas interessantes, além de ser atóxica e apresentar relativamente baixo custo (Kafeshani et al., 2022). O SrTiO_3 está se tornando um material promissor em aplicações de FEQ, porém, o mesmo apresenta algumas desvantagens, como uma alta taxa de recombinação, devido ao seu alto valor de *band gap* ($\cong 3,2$ eV), diminuindo, portanto, a absorção de luz (Abdi et al., 2020). Nessa perspectiva, para solucionar essa limitação várias estratégias foram propostas na literatura para melhorar o desempenho fotocatalítico desses materiais, como a dopagem com outros elementos ou combinação com outros materiais semicondutores.

Pelo exposto acima, o presente trabalho visa como a principal objetivo a construção e desenvolvimento de plataformas imunossensoras FEQs à base de SrTiO₃ para a detecção de fragmentos do vírus SARS-CoV. Neste contexto, a primeira plataforma proposta explorou o uso de SrTiO₃ combinado com o nitreto de carbono grafítico, g-C₃N₄, dopado com enxofre (CNS) e nanopartículas de paládio suportadas em hidróxido de alumínio (Pd/AlO(OH)) como plataforma fotoeletroquímica para detecção da glicoproteína espícula do SARS-CoV-2. A segunda, mostra a eficiência e desempenho fotocatalítico, através do SrTiO₃ modificado com vanadato de bismuto, BiVO₄, cuja combinação desses materiais permitiu uma maior absorção eficiente de luz visível, possibilitando a detecção da glicoproteína espícula e nucleocapsídeo de SARS-CoV-2. Por último, é importante destacar que a identificação e determinação das proteínas exigiu a utilização de uma pequena quantidade de amostra, apenas 10 µL, em tempo de incubação de 30 e 20 minutos respectivamente. Outro ponto bastante relevante deste trabalho foi a utilização do sistema fotoeletroquímico de baixo custo onde empregou-se uma caixa artesanal com encaixe para a lâmpada LED visível de baixa potência (36 W) adquirida em comércio local.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Doenças Virais e os agravos a saúde humana

Entre as principais enfermidades que impactam significativamente as condições de vida de uma população, aquelas causadas por vírus se destacam por sua notória dificuldade de controle e elevado poder destrutivo. O Brasil por sua vez, passa por contínuas transformações, principalmente em relação ao crescimento populacional e urbanização. Grande parte da população passou a viver em cidades e/ou centros urbanos (Waldman et al., 2016) nos quais ocorrem problemas, como a disseminação de doenças, que costuma ocorrer de forma muito mais rápida.

No Brasil, um dos grandes problemas da saúde pública são as doenças transmissíveis endêmicas-epidêmicas devido as condições demográficas, socioculturais, econômicas e políticas do país. Basicamente o desenvolvimento das doenças virais se inicia quando alguns casos dessa doença passam a evoluir gerando um surto que é definido como a elevação do número de casos da doença em determinado período. Após essa fase transforma-se em uma epidemia, que ocorre quando há um aumento no número de casos de uma doença em várias regiões, mas sem uma escala global e por fim, se não controlada adequadamente, uma epidemia pode se tornar uma pandemia, que é caracterizada pela disseminação geográfica da doença em escala global, afetando múltiplos países e continentes (Moreira et al., 2022).

Nesta perspectiva, pesquisas que auxiliem na determinação das causas, meios de contágios e tratamentos têm sido desenvolvidas constantemente para melhor lidar com as doenças virais. Vale ressaltar que as vacinas têm sido a principal forma de prevenção, após passar pela fase de teste, e uma vez aprovadas por órgãos competentes, têm alto valor de segurança e de importância (Martins et al., 2019; Moreira et al., 2022). Entretanto é importante ressaltar que o diagnóstico e controle dessas doenças são considerados fundamentais. O diagnóstico da doença é a base para a escolha do tratamento correto, é um processo pelo qual o profissional da saúde define se o paciente tem determinada doença com base em dados como os sintomas, reações adversas e resultados de exames (Han et al., 2023).

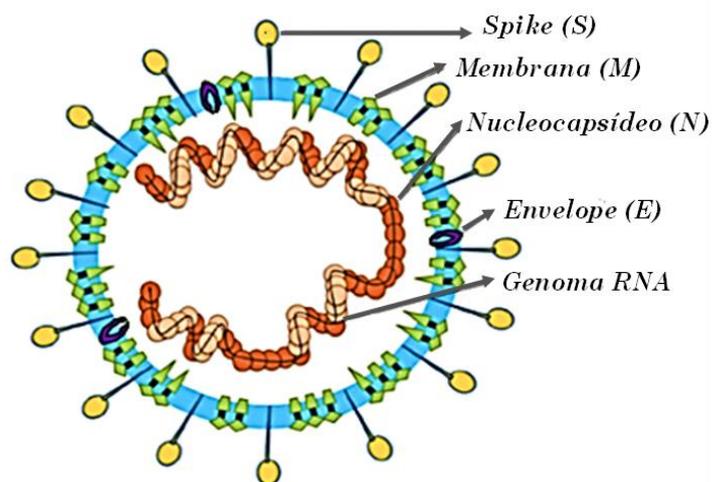
Portanto, estes fatores têm contribuído para o interesse de pesquisadores no mundo inteiro a desenvolverem novos métodos que possam auxiliar no reconhecimento dessas doenças, como é o caso de doenças virais como a COVID-19 (Huang et al., 2020; Zhou et al., 2020).

2.1.1 COVID-19

A Covid-19 é uma doença causada pelo vírus SARS-CoV-2, o qual surgiu em dezembro de 2019, em Wuhan na China e cruzou rapidamente as fronteiras se espalhando pelo mundo devido a uma população global interdependente e altamente móvel (Nunoo-Mensah et al., 2020). No Brasil, o registro do primeiro caso ocorreu em 26 de fevereiro de 2020 no estado de São Paulo e em 11 de março de 2020, a Organização Mundial de saúde (OMS), declarou emergência global (Pandemia), gerando um grande impacto em todo o mundo (Insaidoo et al., 2023).

O SARS-CoV-2 é um vírus do ácido ribonucleico (RNA) cujo genoma contém menos de 30.000 nucleotídeos, cada um deles formado por uma molécula de açúcar (ribose), um ácido fosfórico e uma base nitrogenada. Aproximadamente 29 diferentes proteínas virais podem ser identificadas. As mais relevantes são a glicoproteína espícula, também conhecida como proteína S e a proteína N, referente ao nucleocapsídeo viral. A glicoproteína espícula permite a entrada do vírus na célula hospedeira pela ligação ao receptor celular e à fusão da membrana, paralelamente, a proteína do nucleocapsídeo, por sua vez, regula o processo de replicação viral (Uzunian, A. 2020). A representação esquemática referente a estrutura do vírus SARS-CoV-2 é apresentada na Figura 1.

Figura 1: Ilustração da estrutura do vírus SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptada de Li et al., 2020.

Neste sentido, a entrada do vírus na célula do hospedeiro ocorre através da interação entre a proteína espícula e o receptor de superfície celular, conhecido como enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), a qual está presente nas células do trato respiratório dos seres

humanos. Após esse processo ocorre a replicação viral que gera a destruição da célula hospedeira (Brito et al., 2020).

A transmissão do SARS-CoV-2 costuma ocorrer pelo ar ou contato físico com indivíduos contaminados através de gotículas de saliva, espirros, tosse, objetos ou superfícies contaminadas. Geralmente o período de incubação dessa doença é de 5 a 12 dias e a transmissibilidade ocorre em média 7 dias após o início dos sintomas ou até mesmo sem o aparecimento dos sintomas, em situações que o indivíduo é assintomático (não manifesta os sintomas).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os sintomas iniciais da doença são semelhantes a um quadro gripal, variando de indivíduo para indivíduo. Dentre os principais sintomas destacam-se o mal-estar, febre, fadiga, tosse, dispneia leve, anorexia, dor de garganta, dor no corpo, dor de cabeça ou congestão nasal, sendo que em algumas situações também podem ocorrer diarreia, náusea e vômito (Iser et al., 2020).

Nas situações mais graves da doença, o paciente com o vírus SARS-CoV-2 pode apresentar insuficiência respiratória, além de disfunção de múltiplos órgãos e pneumonia grave, entretanto, quando há necessidade de suporte respiratório e internações em unidades de terapia intensiva indicando um estágio mais crítico da COVID-19 (Li et al., 2020).

Sabe-se que todo vírus pode sofrer mutação com o tempo e, quanto mais oportunidade possui de ser disseminado maior é a possibilidade de se replicar. Atualmente já existem milhares de mutações genéticas do vírus SARS-CoV-2, nesta perspectiva, medidas rápidas e conscientes para preservar a população são necessárias para diagnosticar e controlar essa doença. Tais medidas, embasadas em uma sólida base científica, podem garantir o fortalecimento de ações estratégicas para o enfrentamento da COVID-19 (Brito et al., 2020). Assim, o profundo impacto global na saúde e na economia causada pela pandemia de SARS-CoV-2, despertou grande atenção para a necessidade de diagnósticos precoces de baixo custo para doenças virais e a preparação para futuros surtos.

2.1.2 Técnicas de Detecção da COVID-19

A organização Mundial de saúde decretou que o diagnóstico padrão ouro para identificação do vírus SARS-CoV-2 é realizado pela Técnica do RT-PCR, na qual vem sendo realizado por laboratórios de análises clínicas por todo o mundo. A RT-PCR é uma técnica de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa com amplificação em tempo real. As amostras utilizadas nessa análise são coletadas pela secreção respiratória do trato inferior (Nogueira e Silva, 2020).

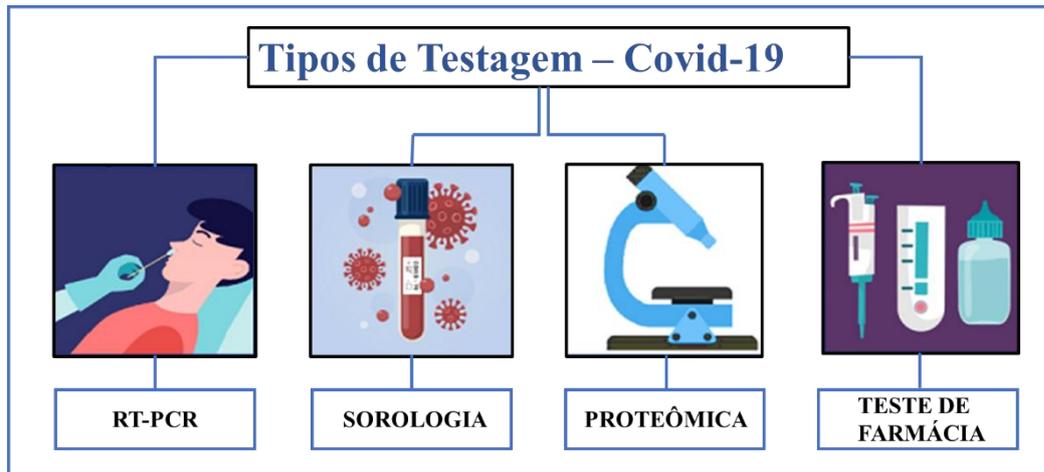
A RT-PCR é uma técnica que apresenta uma sensibilidade (aproximadamente 86%) e alta especificidade (acima de 95%), sendo considerado o método mais eficaz de detecção, no entanto, o resultado negativo em RT-PCR não descarta a possibilidade de infecção pelo vírus. Neste sentido, é recomendado e necessário que o resultado seja combinado com observações clínicas, bem como assegurar que os resultados da amostra foram analisados de forma correta (Pavão et al., 2020). É importante ressaltar que o teste de RT-PCR requer equipamentos especiais e existem dificuldades como coleta e transporte de amostras cujos resultados variam de algumas horas a alguns dias. Assim, a baixa sensibilidade do teste RT-PCR faz com que o diagnóstico e o tratamento de muitos pacientes com COVID-19 atrasem e continuam infectando a comunidade devido à alta transmissão do vírus (Ozkarafakili et al., 2022).

Outra forma de detecção para diagnóstico da Covid-19 são os exames sorológicos, que se baseiam na ligação de antígenos e anticorpos IgA, IgM e/ou IgG e são executados por metodologias de ensaio imunoenzimático (ELISA), quimioluminescência (CLIA), eletroquimioluminescência (ECLIA), teste por proteômica (espectrometria de massa) e imunocromatografia (testes rápidos). Estes testes foram desenvolvidos como métodos complementares de diagnóstico, pois podem fornecer informações sobre infecções recentes ou anteriores.

Alguns estudos relataram que os testes sorológicos apresentam alta sensibilidade, variando de 96% a 98%, porém os mesmos demonstraram apresentar melhor precisão quando combinados com o PCR (Peeling et al., 2020; Deeks et al., 2020; Chen et al., 2021). Além disso a alta sensibilidade desses testes é limitada em certos estágios da doença, principalmente nos estágios iniciais, pois os anticorpos IgM na qual são produzidos no início do desenvolvimento da doença, podem levar alguns dias para serem detectáveis, resultando muitas vezes em falsos negativos (Bastos et al., 2020).

A Figura 2 apresenta os tipos de testes que são disponibilizados a população atualmente. Embora esses testes tenham sido uma ferramenta muito importante no controle da pandemia, apresentam algumas desvantagens como dependência de amostras de alta qualidade, custo elevado, equipamentos de alta qualidade, tempo elevado de análises, sensibilidade e especificidade variável (Watson et al., 2020; Lima et al., 2020).

Figura 2: Tipos de testes atuais para detecção de Covid-19



Fonte: Autor

Atualmente, os testes de RT-PCR, considerados “padrão ouro”, são amplamente aceitos, pois oferecem muitas vantagens tornando-se técnicas de diagnóstico que salvam vida, mas é importante salientar que, devido aos seus altos custos, processo demorado, várias etapas de análise e necessidade de profissionais altamente qualificados, podendo não ser uma técnica adequada para monitoramento de amostras em larga escala.

Neste contexto, visando aumentar a sensibilidade, especificidade e rapidez dos testes para detecção de SARS-CoV-2, vários métodos analíticos têm sido desenvolvidos e aprimorados, além de ser uma área de pesquisa ativa no controle, combate e diagnósticos de doenças virais. Dentre esses métodos, é possível citar os métodos eletroquímicos os quais empregam os imunossensores que têm sido amplamente utilizados devido seu potencial para serem em aplicados em diferentes tipos de amostras.

2.1.3 Métodos eletroquímicos: Imunossensores aplicados na detecção de Doenças Virais

Os métodos eletroquímicos utilizam fenômenos elétricos e reações químicas, e são considerados poderosas ferramenta para resolução de problemas, especialmente por causa de algumas características vantajosas como a elevada sensibilidade das determinações, custo moderado e portabilidade (Lowinsohn e Bertotti, 2006). Neste sentido, muitos pesquisadores tem desenvolvido imunossensores eletroquímicos para detecção de vírus. Alguns desses trabalhos serão descritos a seguir:

Han et al., 2016 relataram em seu trabalho um imunossensor multidetectável baseado em nanobastões de ZnO o qual foi desenvolvido para detectar simultaneamente e

quantitativamente três subconjuntos do vírus influenza A: H1N1, H5N1 e H7N9. As análises de regressão linear das correntes amperométricas demonstraram medidas com boa linearidade, variando de 1 pg mL^{-1} a 10 ng mL^{-1} e um limite de detecção de 1 pg mL^{-1} . Logo o imunossensor proposto pôde ser considerado uma alternativa viável para detectar vários biomarcadores, incluindo o vírus influenza A, com alta seletividade e baixo limite de detecção.

Kaushik et al., 2018 desenvolveram um imunossensor eletroquímico para detecção de proteínas do vírus Zika, usando um arranjo de microeletrodos de ouro interdigitados funcionalizados (IDE-Au). Um chip de imunossensibilidade IDE-Au miniaturizado foi preparado por meio da imobilização do anticorpo da proteína do vírus da Zika. A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi realizada para medir a resposta elétrica do sensor desenvolvido em função das concentrações da proteína da Zika. Os resultados dos estudos EIS confirmaram a detecção da proteína e exibiu uma faixa de detecção de 10 pM a 1 nM e um limite de detecção de 10 pM , juntamente com uma alta sensibilidade de $12 \text{ k}\Omega \text{ M}^{-1}$. Essa abordagem pode ser considerada uma proposta promissora para detecção do vírus da Zika.

Mojsoska et al., 2021 desenvolveu um novo biossensor eletroquímico para detecção do antígeno SARS-CoV-2 Espícula. O sensor consistiu em um eletrodo de trabalho de grafeno funcionalizado com anticorpos anti-espícula. Testes, utilizando a voltametria cíclica e a espectroscopia de impedância eletroquímica, determinaram que o biossensor pode detectar especificamente a proteína espícula com a concentração de até 260 nM ($20 \text{ }\mu\text{g/mL}$), usando um tempo de incubação de 45 minutos.

Um sensor eletroquímico baseado em nanotubos de óxido de titânio, TiO_2 , funcionalizados com cobalto foi proposto por Vadlamani et al., 2020, para detecção eletroquímica da proteína SARS-CoV-2, através da detecção do domínio de ligação ao receptor (RBD) da glicoproteína espícula (S). Este estudo envolveu anodização eletroquímica de etapa única para sintetizar os nanotubos de TiO_2 , posteriormente, esses materiais foram funcionalizados com cobalto (Co-TNT) usando um processo de troca iônica úmida. O sensor desenvolvido foi capaz de detectar a proteína S-RBD do SARS-CoV-2 em uma faixa de concentração muito baixa de 14 a 1400 nM , apresentando uma resposta linear para a determinação das proteínas virais na faixa de concentração investigada. O limite de detecção por este método foi de aproximadamente $0,7 \text{ nM}$ e mais vantajosamente, o sensor pode detectar a proteína S-RBD do vírus em um tempo muito curto de resposta (30 s), utilizando a amperometria.

Com base nos resumos apresentados percebe-se que os sistemas eletroquímicos têm contribuído enormemente para o desenvolvimento de novos métodos de análises, por isso, a busca por métodos inovadores e atrativos tem sido foco de muitos pesquisadores.

É evidente que nem os testes “padrão-ouro” e nem os métodos eletroquímicos empregando imunossensores para detecção viral são sistemas perfeitos para a identificação de COVID-19 e/ou outras doenças, mas esses métodos podem ser considerados complementares entre si, e havendo uma maior atenção, pode atender a humanidade numa difícil situação que o mundo venha a enfrentar (Kumar et al., 2022).

São inúmeros os materiais que podem ser utilizados no desenvolvimento de sensores/imunossensores eletroquímicos dos quais destacam-se os nanomateriais cerâmicos semicondutores. Estes materiais são interessantes por apresentarem características como ferroeletricidade, piezeletricidade, propriedades eletro-ópticas, magneto-ópticas, boa resistência química, resistência a elevadas temperaturas etc. (Magalhães et al., 2017). Nos tópicos seguintes serão abordados temas sobre os materiais cerâmicos a base de perovskitas e sua ampla gama de possibilidades aplicações.

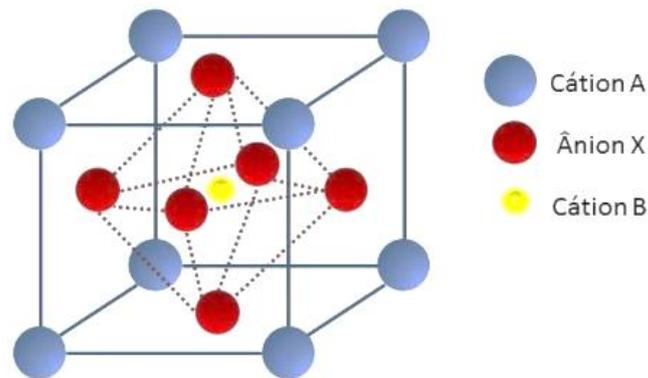
2.2. Cerâmicas Perovskitas e suas propriedades

Os materiais cerâmicos assumem um papel fundamental em diversas indústrias e aplicações tecnológicas devido às suas propriedades singulares e vantagens distintas em comparação com outros materiais. Desde os anos de 1940 houve uma extensa dedicação ao estudo das propriedades estruturais, químicas e físicas dos materiais de perovskita visando obter materiais para aplicações modernas (Bin Adnan et al., 2018).

Em 1839, o mineral perovskita foi descoberto nos montes Urais, localizados na Rússia. As amostras do mineral foram entregues a Gustav Rosen o qual dedicou-se intensamente à determinação das propriedades da perovskita e, em reconhecimento a esse trabalho, nomeou o mineral em homenagem a Lev Perovski, um proeminente político e mineralogista russo (Katz, 2020; Nkwachukwu and Arotiba, 2021).

Normalmente, as perovskitas são óxidos metálicos binários com uma fórmula estrutural geralmente representada como ABX_3 , em que A e B são cátions e X é o ânion que estabelece ligações iônicas com A e B. Essa estrutura apresenta uma característica notável: A é posicionado nas arestas do octaedro, enquanto B ocupa o centro do mesmo (Zhu et al., 2014). A Figura 3 apresenta o modelo ideal para essa estrutura.

Figura 3: Estrutura para perovskita ABX_3



Fonte: Santos et al., 2015.

O termo "perovskita" foi originalmente utilizado para descrever um mineral composto por óxido de cálcio e titânio, especificamente denominado de titanato de cálcio ($CaTiO_3$) (Moreira, 2010). Atualmente, esse termo é amplamente empregado para designar uma diversidade de compostos ABX_3 com uma estrutura cristalina iônica semelhante. Dependendo dos raios iônicos, a estrutura cúbica ideal pode sofrer deformações, resultando em estruturas com menor simetria. A estrutura de perovskita é capaz de acomodar diferentes cátions dopantes, abrindo oportunidades para a alteração das propriedades do material (Katz, 2020).

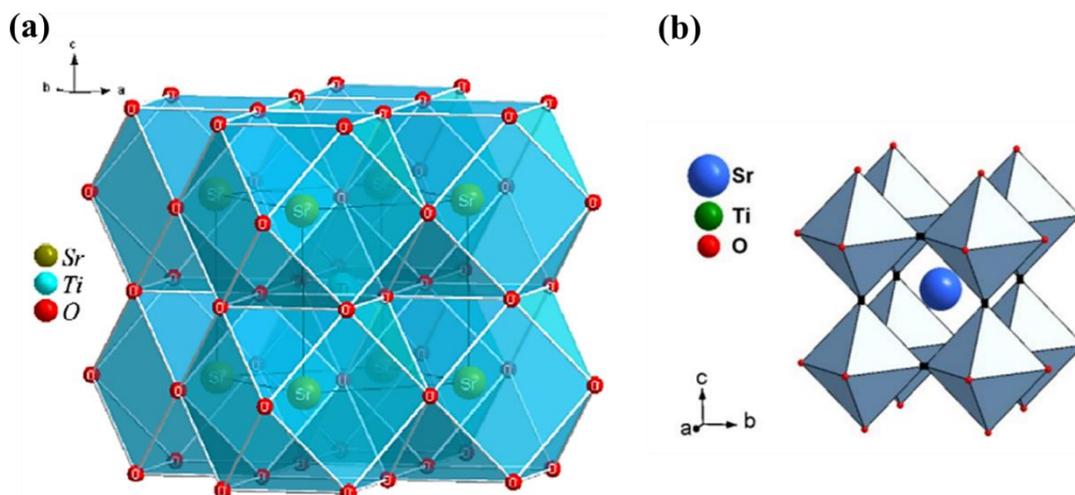
Um exemplo destes tipos de óxidos com estrutura tipo perovskita são os titanatos ($B = Ti$) e dentre eles tem-se o Titanato de Estrôncio ($SrTiO_3$) que faz parte de uma classe de materiais cerâmicos dielétricos, semicondutores, exibindo diversas propriedades, como supercondutividade, ferromagnetismo e alta condutividade térmica. Essas propriedades variam de uma substância para outra, resultando em diferentes comportamentos entre os diversos casos, logo pode apresentar várias aplicabilidades tecnológicas (Santos et al., 2015; Magalhães et al., 2017; Nkwachukwu and Arotiba, 2021).

2.2.1 Titanato de Estrôncio ($SrTiO_3$)

O Titanato de Estrôncio ($SrTiO_3$), representado na Figura 4, é amplamente reconhecido e valorizado na ciência dos materiais devido às suas propriedades únicas e versatilidade em diversas aplicações. Pertencente à família das perovskitas, o $SrTiO_3$ possui um grupo espacial $Pm\bar{3}m$ (221), com um sistema cristalino cúbico em temperatura ambiente (Moreira, 2010). É um composto de alta simetria em comparação com outros titanatos; sua estrutura cristalina é composta por um átomo de titânio (Ti) localizado no centro da célula unitária, coordenado por seis átomos de oxigênio formando um cluster octaédrico TiO_6 . Os átomos de estrôncio (Sr)

estão posicionados nos vértices de um cubo cercados por doze átomos de oxigênio dispostos no centro das faces, criando um cubo-octaedro regular (Souza et al., 2010; Moreira, 2010).

Figura 4: (a) Representação esquemática dos sítios cubo-octaedrais do SrTiO₃; (b) Estrutura cúbica do SrTiO₃.



Fonte: Adaptado Moreira, 2010 e Oliveira, 2013.

Na literatura há muitos estudos relacionados as propriedades do SrTiO₃, tais como: propriedades termoelétricas (Zavjalov et al., 2022; Azevedo et al., 2023), elétricas (Łącz et al., 2018), ópticas (Karakozov et al., 2021) e ferroelétricas (Pradhan et al., 2021). Neste sentido, o desempenho de suas aplicações, está relacionado as suas diversas propriedades, além disso é um material de baixo custo, podendo ser obtido por diferentes métodos de sínteses incluindo fase sólida, sol-gel, hidrotérmica e micro-ondas, além de possuir estabilidade térmica em altas temperaturas (Ferreira, 2018).

De acordo com os estudos feitos por Phoon *et al.*, (2019), descobriu-se que um dos principais desafios para os diversos métodos de sínteses para o SrTiO₃, é fato de afetar a morfologia, cristalinidade e tamanho das partículas do SrTiO₃, além de serem métodos que requerem temperaturas extremas. Apesar das sínteses apresentarem desafios, novas técnicas e abordagens estão sempre em desenvolvimento, para diferentes tipos de aplicações, tornando-se ainda mais evidentes as vantagens que o SrTiO₃ apresenta e ressaltando o seu potencial em diversos campos da ciência e tecnologia.

2.3. Sistemas Fotoeletroquímicos - FEQ's

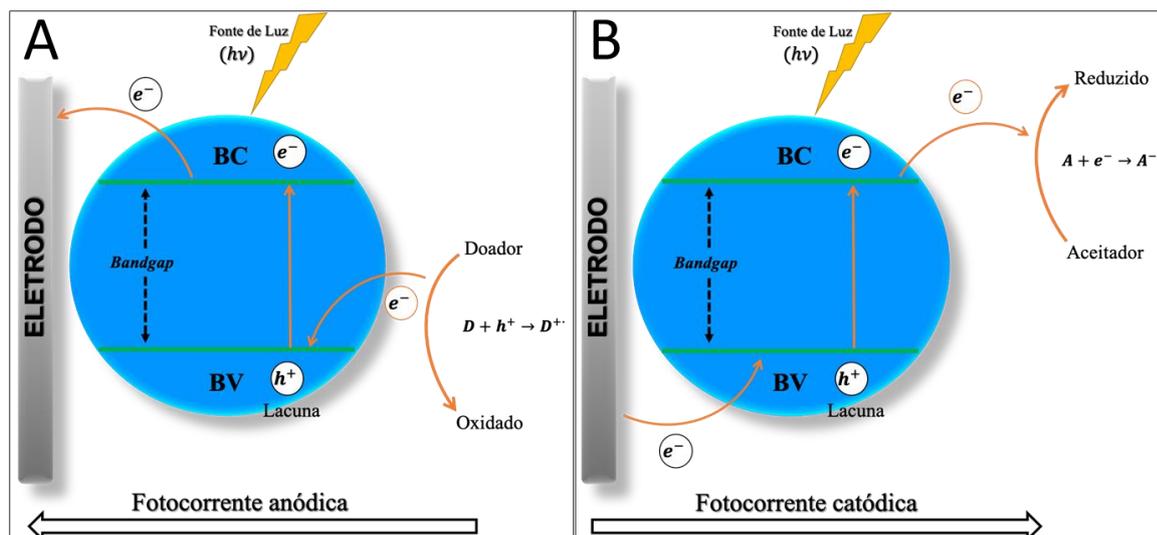
Nos últimos anos, surgiram diversas investigações a respeito da interação entre a luz, fluxo de elétrons e reações químicas. Nesse contexto, um dos avanços mais notáveis tem sido o desenvolvimento de células fotoeletroquímicas. Esses sistemas, em geral, são compostos por dois componentes fundamentais: um material sensível à luz, que pode ser constituído por um ou mais materiais semicondutores e um eletrólito geralmente é uma solução aquosa composta com sais em alta concentração para diminuir a resistência da solução.

Para determinar quantitativamente as moléculas alvo, são adotados alguns processos de reconhecimento específicos que podem induzir mudanças nos sinais elétricos dos materiais fotoelétricos ativos sob iluminação (Wang et al., 2021). É um sistema que se baseia na fonte de energia (Luz) e no sinal de detecção (fotocorrente) que possui como vantagens a possibilidade de alta sensibilidade, boa seletividade e rápida resposta (Li et al., 2014; Wang et al., 2021).

Um dos tipos comuns de células fotoeletroquímicas é composto essencialmente por um eletrodo de trabalho, que pode ser de ouro, ITO (óxido de estanho e índio) ou FTO (óxido de flúor e estanho), o qual fica em contato direto com o sistema eletrônico, estabelecendo uma conexão com um contra-eletrodo, geralmente de platina. Esses dois eletrodos permanecem interligados por meio de um eletrólito suporte, que fecha o circuito, e um eletrodo de referência, cuja função é controlar o potencial aplicado no sistema (Freires, 2019). Nessa perspectiva, nos sensores FEQ, uma sequência de processos de transferência de carga deve ocorrer entre o analito, o material fotocatalítico e o eletrodo, para que a fotocorrente de saída possa ser aproveitada de forma eficiente (Devadoss et al., 2015).

O processo de detecção FEQ ocorre quando um material sensível a luz (semicondutor) é exposto a fótons de energia igual ou superior ao seu *band gap* havendo a promoção de elétrons excitados para a banda de condução (BC) e a formação de lacunas na banda de valência (BV). É necessário que haja um desempenho eficaz para suprimir a recombinação do par e^-/h^+ (elétron/lacunas) e assim gerar fotocorrente no sistema (Freires, 2019). O processo de geração de fotocorrente consiste em uma corrente anódica, na qual ocorre a oxidação da espécie em solução e/ou em uma fotocorrente catódica, que ocorre quando a espécie em solução atua como aceitadora de elétrons. A Figura 5, mostra o processo de fotoexcitação em um semicondutor.

Figura 5: Esquema do mecanismo para FEQ para (A) fotocorrente anódica e (B) fotocorrente catódica.



Fonte: Yotsumoto Neto, 2019.

Conforme é apresentado na Figura 5, se o analito agir como uma espécie doadora de elétrons, as lacunas fotogeradas na banda de valência do material são capturadas, reduzindo a recombinação do par e^-/h^+ , logo o fluxo de corrente será elevado, o que resultará em uma fotocorrente anódica (Figura 5A). Paralelamente, se o analito agir como uma espécie aceitadora de elétrons, o mesmo captura os elétrons que são transferidos para a banda de condução e reduz a recombinação. Nessa situação o fluxo de elétrons é bloqueado, resultando numa fotocorrente catódica (Figura 5B). Essas correntes são proporcionais a concentração do analito que interage com o material semiconductor (Wang et al., 2014; Monteiro, 2017).

Nesse sentido, os sistemas FEQ surgem como uma alternativa moderna e significativa para análises biológicas, devido suas características como boa seletividade e sensibilidade. Portanto, buscando aprimorar as características dos sensores, surgiram os chamados biossensores/imunossensores FEQ, os quais serão abordados a seguir.

2.3.1. Imunossensores

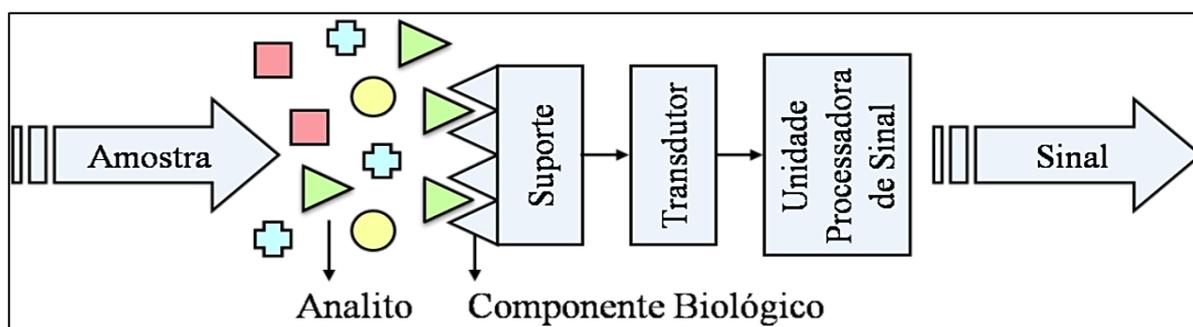
A combinação de materiais biológicos com materiais fotoelétricos promove a construção de dispositivos com diversas características, permitindo a aplicação de um gama de moléculas. Nesta perspectiva, o biossensor pertencente a classe dos sensores químicos, é um dispositivo que fornece informações analíticas através de um elemento biológico acoplado a um transdutor cujo processo de detecção se baseia na interação específica entre as moléculas

de biorreconhecimento e os analitos alvos, produzindo respostas biológicas que são convertidas em sinais elétricos (Figueiredo, 2013; Freires, 2019; Lima, 2022).

Os biossensores podem apresentar diversos tipos de agentes biológicos, tais como: enzimas (Zouleh et al., 2023), ácidos nucleicos (Quin et al., 2022), microorganismos (Bettaieb et al., 2007) e antígenos/anticorpos, os quais podem ser denominados imunossensores, que se definem com interações do tipo antígeno-anticorpo (Mostafa et al., 2023; Ke et al., 2024).

Portanto, o imunossensor é um tipo de biossensor baseado na formação de um imunocomplexo (reação imunológica), sendo que o antígeno ou anticorpo é imobilizado na superfície do transdutor (Riccardi et al., 2002). Quando imobilizarmos um anticorpo na superfície do eletrodo, ele entra em contato com seu antígeno específico se ligando e formando um imunocomplexo. Essa ligação gera um sinal que é processado pelo transdutor, que pode ser eletroquímico, ótico, piezoelétrico entre outros (Riccardi et al., 2002; Figueiredo, 2013). A Figura 6 apresenta um esquema do processo de reconhecimento do imunossensor.

Figura 6: Representação de reconhecimento de um imunossensor padrão.



Fonte: <https://qnint.s bq.org.br/novo/index.php?hash=tema.97>

Dentre as técnicas mais utilizadas em análises químicas e detecção de substâncias em diversas amostras, destacam-se as técnicas eletroquímicas devido suas diversas características como simplicidade na estrutura do sensor, baixo custo de produção, possibilidade de miniaturização do sistema sendo capaz de atingir baixos limites de detecção mesmo com pequenos volumes de amostra (Figueiredo, 2013; Zhang et al., 2023).

Nos imunossaios eletroquímicos o anticorpo ou o antígeno é imobilizado na superfície do eletrodo, em seguida o mesmo interage ou com o antígeno ou com anticorpo, dependendo de quem está sendo imobilizado gerando um sinal eletroquímico.

Na literatura são reportadas duas estratégias diferentes para o imunossensaio eletroquímico, uma se baseia na interação anticorpo-antígeno, onde o antígeno é imobilizado sobre um anticorpo (ou vice-versa) já adicionado na superfície do eletrodo e a imunorreacção é completada. A outra estratégia é a interação anticorpo-antígeno, do tipo sanduíche, onde ocorre

um acoplamento de diferentes marcadores a um anticorpo secundário (AbdoraHim et al., 2016; Rusling et al., 2010).

Dentre essas estratégias para o imunoensaio eletroquímico, a interação antígeno-anticorpo foi a utilizada nesta pesquisa uma vez que a mesma tem se destacado em várias áreas, dentre elas podemos destacar os imunossensores fotoeletroquímicos, os quais são particularmente úteis em aplicações de diagnóstico, monitoramento ambiental e pesquisa biomédica. Portanto, utilizou-se os anticorpos Espícula e Nucleocapsídeo (anticorpo monoclonal recombinante que reconhecem a glicoproteína SARS-CoV-2 Espícula e/ou Nucleocapsídeo), para detecção de SARS-CoV-2, o agente causador do COVID-19.

2.3.2. Imunossensores FEQ

Os imunossensores FEQ são considerados eficientes para detecção sensível de moléculas biológicas, íons, células e bactérias (Wang et al., 2023) sendo favorecidos pela sua alta especificidade, sensibilidade e estabilidade. Neste sentido, esta técnica mudou significativamente o método tradicional de imunoensaios e passou a integrar as vantagens dos imunoensaios tradicionais com as características dos biossensores (Bai et al., 2023).

Por meio dos imunossensores FEQ é possível reduzir o tempo de análise, simplificar o procedimento de determinação, além de melhorar a precisão e a especificidade do ensaio, o que os tornam adequados para uma ampla gama de aplicações (Jia et al., 2021; Bai et al., 2023).

A detecção de moléculas está inteiramente vinculada ao processo de conversão fotoelétrica, no qual tanto o sinal de entrada quanto o de saída são representados por duas formas distintas de energia: a luminosa e a elétrica. O sistema FEQ incorpora as vantagens das análises eletroquímicas e ópticas destacando-se pela sua operação simplificada, mas também pelo uso de equipamentos acessíveis, sinal de fundo claro e baixo limite de detecção (Zhao et al., 2021; Bai et al., 2023).

A sensibilidade e estabilidade do imunossensor FEQ está diretamente relacionado ao material fotoeletricamente ativo, nessa perspectiva a seleção do material é uma etapa de extrema importância, visto que esses materiais podem melhorar o desempenho das plataformas (Cui et al., 2022).

2.3.3. Materiais fotoeletricamente ativos

Um sistema FEQ típico consiste basicamente em cinco componentes: a fonte de luz, o fotoeletrodo, contra-eleto-rodo, eletrodo de referência e eletrólito. Entre eles é possível destacar

o fotoeletrodo (fotoanodo ou fotocatodo), que geralmente se caracteriza como um material semiconductor com capacidade de resposta a luz e um substrato condutor (Tong et al., 2024).

Os materiais fotoelétricos, quando excitados sob iluminação, fazem com que os elétrons foto gerados promovam a separação dos pares elétron-buraco gerando o sinal analítico desejado (fotocorrente) (Zhang Xinyu et al., 2023; Tong et al., 2024).

Nessa perspectiva, as propriedades dos materiais utilizados para modificação das plataformas estão fundamentalmente relacionadas à magnitude do sinal analítico. Portanto para a escolha dos materiais semicondutores leva-se em consideração tanto o processo de conversão de energia quanto a capacidade de fixação das biomoléculas (anticorpo/antígeno) (Zhao e Ding, 2019).

Dentre os materiais semicondutores mais populares incluem óxidos metálicos tradicionais, sulfetos metálicos, nitretos, sistemas de prata e óxidos contendo bismuto, bem como polímeros e perovskitas (Tong et al., 2024). As perovskitas apresentam propriedades notáveis, tais como altos coeficientes de absorção óptica, *band gaps* ajustáveis, longos comprimentos de difusão de portadores de carga e baixa condutividade térmica (Tang et al., 2023). Essas características tem gerado avanços significativos na ciência, tais como células solares, LEDs, lasers, geradores termoelétricos, fotodetectores e fibras ópticas (Tang et al., 2023). Uma das classes de perovskitas mais investigadas, é a base de titanatos (BaTiO_3 e SrTiO_3) por possuírem diferentes propriedades como supercondutividade, efeito fotovoltaico, emissão de luz azul, além de um ampla gama de aplicações (Gillani et al., 2021). Entretanto, o SrTiO_3 tem um grande valor de *band gap* (3,20 eV – 3,25 eV) o que não é adequado para absorção eficiente do espectro solar, levando a um desempenho fotoeletroquímico ruim e uma rápida recombinação dos portadores de cargas (Wahl et al., 2008, Liu et al., 2022; Gillani et al., 2021). Logo, para solucionar essas limitações várias estratégias já foram propostas na literatura para melhorar o desempenho fotocatalítico dos materiais, como a dopagem com outros elementos ou combinação com outros materiais semicondutores.

Dessa forma, alguns materiais fotoativos têm se mostrado atrativos devido seu baixo custo, alta cristalinidade, durabilidade, boa estabilidade, facilidade de síntese e atoxicidade, além de apresentar *band gaps* menores. Com base nisso, neste trabalho explorou-se a combinação e sensibilização do SrTiO_3 , com materiais semicondutores, com objetivo de obter um melhor desempenho no sinal analítico.

2.3.4. *g-C₃N₄-S (CNS)*

Um nanomaterial de carbono que têm recebido muito destaque nas pesquisas atuais, é o nitreto de carbono grafitico (*g-C₃N₄*). Sua alta atividade fotoluminescente e considerável estabilidade química e térmica tem sido amplamente explorada (Ramezani et al., 2021). Apresenta um *band gap* de aproximadamente 2,7 eV, permitindo a possibilidade de se trabalhar na região da luz visível. A sua estrutura é composta por carbono e nitrogênio na proporção de 4/3 unidos por ligações covalentes em unidades de triazina (Veisi et al., 2023; Madhoush et al., 2023).

Neste sentido, a diferença de eletronegatividade entre os átomos de carbono e nitrogênio presentes no *g-C₃N₄* provoca uma carga parcial que confere características específicas a este material, como alta estabilidade térmica, química e mecânica (Madhoush et al., 2023).

Cabe ressaltar que embora o *g-C₃N₄* apresente uma atividade fotocatalítica baixa devido à rápida taxa de recombinação de pares elétron-lacunas fotogerados e à utilização limitada da energia solar, várias estratégias vêm sendo desenvolvidas para melhorar o desempenho fotocatalítico, dentre essas estratégias é possível destacar a dopagem com outros elementos (Wang et al., 2018; Ramezani et al., 2021).

Wang et al., 2018, desenvolveram um estudo, na qual observou que a dopagem foi uma estratégia eficiente para melhorar a atividade fotocatalítica e ajustar a estrutura eletrônica do *g-C₃N₄*, as propriedades eletrônicas e ópticas indicaram que a dopagem com enxofre (S) melhorou de forma significativa o desempenho catalítico do *g-C₃N₄*. Seus resultados sugerem que o *g-C₃N₄* dopado com S, como fotocatalisador é favorável para promover a separação de cargas, inibir a recombinação e-/h+, além de prolongar a vida útil dos portadores de carga, aumentando assim a eficiência fotocatalítica em comparação com *g-C₃N₄*, sem a dopagem. Além de Wang et al outros pesquisadores também doparam o *g-C₃N₄* com o S e os resultados do ponto de vista analítico foram muito interessantes (Mohammad et al., 2020; Zhu et al., 2023).

Inspirado no mencionado acima, o *g-C₃N₄* dopado com S, pode otimizar a estrutura do *g-C₃N₄* tanto do ponto de vista da fotofísica quanto da fotoquímica, melhorando assim a absorção de luz e a eficiência de separação de cargas.

2.3.5. *Pd/AlO(OH) -(PdNPs)*

As nanopartículas (NPs) de Pd/AlO(OH) são disponíveis comercialmente e tem despertado o interesse de pesquisadores em diversas áreas que tratam

da alquilação de cetonas com álcoois, redução de olefinas e resolução cinética dinâmica de amins primárias (Kara et al., 2016).

Os nanomateriais a base de Pd passaram a ser amplamente utilizados como eletrocatalisadores devido às suas vantagens inerentes, como alta mobilidade eletrônica, sítios ativos abundantes, alta proporção de aspecto e propriedades eletrônicas únicas (Li et al., 2005; Tronto et al., 2006; Domínguez-domínguez et al., 2008; Xu et al., 2022). Além disso, esses materiais são amplamente utilizados como nanopartículas suportadas em vários materiais para se obter nanopartículas de paládio com alta estabilidade e uma elevada relação superfície-volume (Choudary et al., 2002; Yang et al., 2008; Gniewek et al., 2008).

Estes materiais à base de nanopartículas de paládio têm sido explorados em reações catalíticas e eletrocatalíticas de muitas espécies (Trzeciak e Augustyniak, 2019; Xu et al., 2022). Neste sentido, neste trabalho as nanopartículas de Pd foram empregadas com o objetivo de melhorar a oxidação eletroquímica da molécula doadora (Wu et al., 2012).

Baseado no exposto acima, a primeira plataforma fotoeletroquímica, explora o uso do SrTiO₃ combinado com g-C₃N₄ dopado com enxofre e nanopartículas de paládio suportadas em hidróxido de alumínio para detecção do SARS-CoV-2.

2.3.6. BiVO₄

O Vanadato de Bismuto (BiVO₄), atraiu um interesse significativo devido as suas propriedades excepcionais com *band gap* de 2,4eV, resistência a corrosão, baixa toxicidade e uma excelente resposta a luz visível, este material possui a capacidade de absorver 11% do espectro solar (Lotfi et al., 2023).

O BiVO₄ apresenta uma alta taxa de recombinação de elétrons-lacunas fotogeradas, resultando em aplicações restritas nas áreas de engenharia de superfície como deposição de metal, dopagem e construção de nanocompósitos. Este material fornece propriedades fotoeletroquímicas que ampliam a faixa de absorção de luz visível e acelera o transporte de portador de carga (Wang et al., 2013; Pan et al., 2023).

Na literatura são relatados vários métodos de síntese para a obtenção do BiVO₄, como rotas hidrotérmicas, métodos sol-gel, estratégias de co-precipitação e reações de estado sólido, entretanto esses métodos consistem em sínteses demoradas e a grande maioria faz uso de surfactantes e aditivos orgânicos (Lotfi et al., 2023). Neste trabalho buscou-se rota de sínteses mais relativamente simples e diretas utilizando procedimentos desenvolvidos por Mascaro et al., 2015 e Prado et al., 2018.

Devido à sua baixa atividade fotocatalítica sob luz visível resultante da rápida recombinação de elétrons e lacunas fotogerados, pesquisadores têm buscado melhorar sua atividade fotocatalítica (Malathi et al., 2018) através da combinação com outros materiais (Monteiro et al., 2023). O uso combinado de BiVO_4 e SrTiO_3 mostrou resultados promissores para aplicações fotocatalíticas (Li et al., 2017) e decomposição da água (Wang et al., 2020), com essa perspectiva, a combinação $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3$ foi usado pela primeira vez, para construir imunossensores FEQ para detecção de SARS-CoV-2.

Capítulo 3

Metodología

3. Metodologia

3.1. Reagentes e Soluções

Todos os produtos químicos foram de grau analítico sem etapas de purificação. Os reagentes utilizados foram fosfato dissódico (Na_2HPO_4), hidróxido de sódio (NaOH), ácido bórico (H_3BO_3), ácido acético (CH_3COOH), hidróxido de sódio (NaOH), ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, denominado AA), ácido fosfórico (H_3PO_4), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), etilenoglicol, ácido clorídrico (HCl) e cloreto de potássio (KCl) foram todos adquiridos pela Isofar – Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda. O titanato de estrôncio (SrTiO_3), nanopartículas de paládio aprisionadas em matriz de hidróxido de alumínio ($\text{Pd}/\text{AlO}(\text{OH})$), 2-[4-(2-hidroxi)etil] piperazina-1-il] etano sulfônico (HEPES), TRIS-(hidroximetil) amino metano, piperazina-N, N'-bis (ácido 2-etanossulfônico)- (PIPES), glutaraldeído (5%), quitosona (1%), albumina de soro bovina (BSA) (1%), vanadato de amônia (NH_4VO_3), nitrato de bismuto (BiNO_3) $_3$.5 H_2O), ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) e tiourea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$) foram adquiridos na Sigma-Aldrich Chemical. Anti- SARS-CoV de glicoproteína espícula (Ab273074), nucleocapsídeo (Ab272852) e a glicoproteína SARS-CoV-espícula (Ab272105) e nucleocapsídeo (Ab273530) foram adquiridas na Abcam. O etanol foi adquirido na Merck. As soluções foram preparadas utilizando água deionizada obtido pela GEAKA Ultrapurifier.

3.1.1. Preparo das Soluções Tampões

Foram preparadas e testadas diferentes soluções tampões (Fosfato - TF, McIlvaine - MCV, Britton-Robinson - BR, HEPES, PIPES e TRIS) em concentração molar de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 7,0$. Para todas as soluções tampões, utilizou-se um pHmetro KASVI modelo K39214B, o procedimento realizado para cada solução está descrito na tabela 1.

Tabela 1: Procedimento experimental de preparo das soluções tampões.

<i>Soluções Tampões</i>	<i>Procedimento de Preparo</i>
<i>Fosfato (TF)</i>	Para o preparo utilizou-se o fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), ajustando o pH com hidróxido de sódio (NaOH) 10%.
<i>Mcilvaine (MCV)</i>	Para este tampão, utilizou-se o fosfato dissódico (Na_2HPO_4), ajustando o pH com a solução de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 10%.
<i>Britton-Robinson (BR)</i>	O preparo deste tampão, foi realizado pela mistura de ácido bórico (H_3BO_3), ácido fosfórico (H_3PO_4) e ácido acético (CH_3COOH), ajustando o pH com hidróxido de sódio (NaOH) 10%. A solução final ficou em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.
<i>HEPES</i>	Para o preparo do tampão, utilizou-se o 2-[4-(2-hidroxietil) piperazina-1-il] etano sulfônico (HEPES), ajustando o pH com hidróxido de sódio (NaOH) 10%.
<i>TRIS</i>	Para este tampão, utilizou-se o TRIS-(hidroximetil) amino metano, ajustando o pH com ácido clorídrico (HCl) 10%.
<i>PIPES</i>	Neste tampão, utilizou-se o piperazina-N, N'-bis (ácido 2-etanossulfônico) - (PIPES), ajustando o pH com hidróxido de sódio (NaOH) 10%.

3.2. Síntese dos materiais utilizados na construção da plataforma fotoeletroquímica - FEQ

3.2.1. Síntese do nitreto de carbono grafítico dopado com enxofre ($g\text{-C}_3\text{N}_4\text{-S}$ ou CNS)

O nitreto de carbono grafítico dopado com enxofre ($g\text{-C}_3\text{N}_4\text{-S}$ ou CNS) foi sintetizado usando-se a Tiouréia, como um precursor sob condições de aquecimento de alta temperatura numa mufla, conforme descrito por Mohammad et al., 2020. Resumidamente, pesou-se uma

certa quantidade do precursor (5,0 gramas), levou-se para o forno mufla, mantendo-se a temperatura a 550 °C por 2 h, em seguida a amostra foi resfriada à temperatura ambiente. Então, um produto amarelo de g-C₃N₄-S foi obtido, sendo moído na forma de um pó fino, conforme apresentado na Figura 7.

Figura 7: Representação esquemática da produção do g-C₃N₄-S ou CNS.

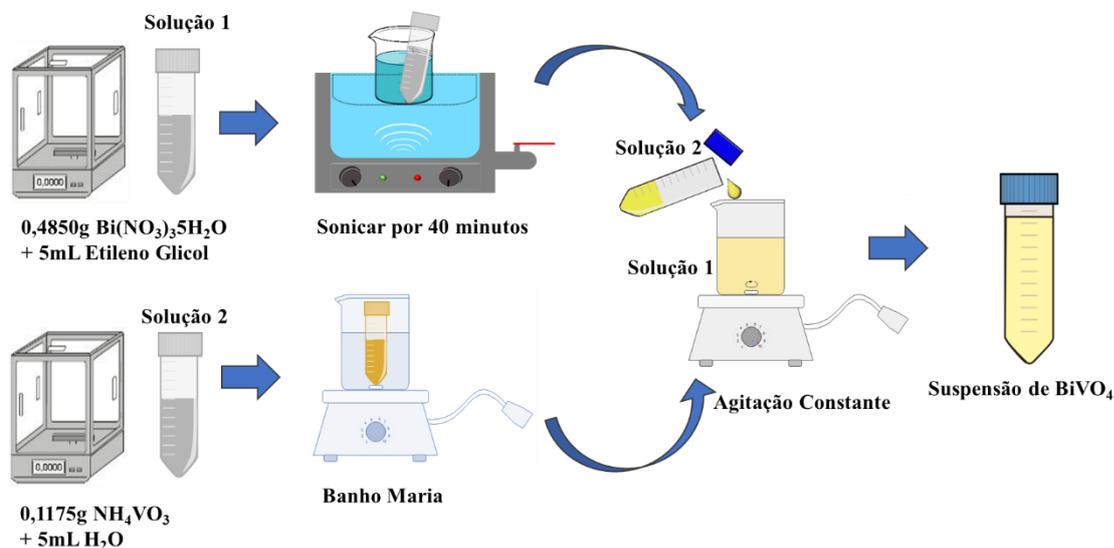


Fonte: Próprio autor

3.2.2. Síntese do vanadato de bismuto - (BiVO₄)

O procedimento de síntese do BiVO₄ foi realizado de acordo com Prado et al., 2018, realizando-se apenas algumas adaptações. Primeiramente, pesou-se uma massa 0,4850 g de (BiNO₃)₃.5H₂O, a qual foi transferida para um tubo Falcon contendo 5mL de Etilenoglicol e deixado sonicar por 40 minutos, formando então a solução 1. Posteriormente, pesou-se 0,1175 g de NH₄VO₃ e transferiu-se para um tubo Falcon contendo 5mL de água deionizada. Essa solução foi deixada em banho maria até a dissolução completa dos sólidos obtendo-se a solução 2. Logo, a solução 2 foi adicionada lentamente a solução 1 sob agitação constante durante um tempo de 30 minutos. Em seguida o material foi centrifugado e, após a centrifugação o sobrenadante foi retirado permanecendo apenas a suspensão de vanadato de bismuto (BiVO₄) de cor amarelada. Um esquema do procedimento de síntese é apresentado na Figura 8.

Figura 8: Representação esquemática da produção do BiVO_4 .



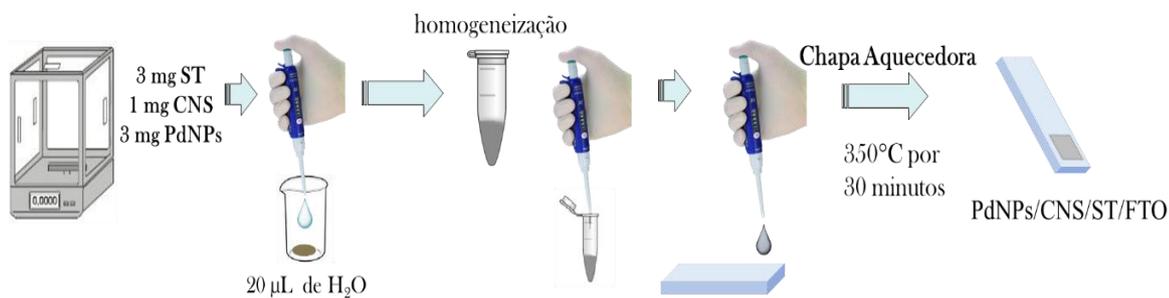
Fonte: Próprio autor

3.3. Construção das plataformas fotoeletroquímicas-FEQ's e Preparo dos imunossensores para SARS-CoV-2

3.3.1. Plataforma FEQ PdNPs/CNS/ST/FTO

Para a construção da plataforma FEQ, representado na Figura 9, primeiramente o eletrodo de FTO foi limpo com etanol e água, posteriormente, pesou-se 3 mg de SrTiO_3 (denominado ST), 1 mg de CNS e 3 mg de Pd/ $\text{AlO}(\text{OH})$ (representados como PdNPs) e em seguida esses materiais foram dispersos em 20 μL de água deionizada para posterior mistura e homogeneização. Em seguida, uma alíquota de 20 μL dessa suspensão foi retirada e colocada diretamente na superfície do eletrodo FTO, que foi seco a temperatura ambiente e levado à chapa de aquecimento a uma temperatura de 350°C por 30 minutos, formando assim um filme composto pelo material composto PdNPs/CNS/ST na superfície da plaquinha de FTO.

Figura 9: Representação esquemática da construção da plataforma PdNPs/CNS/ST/FTO

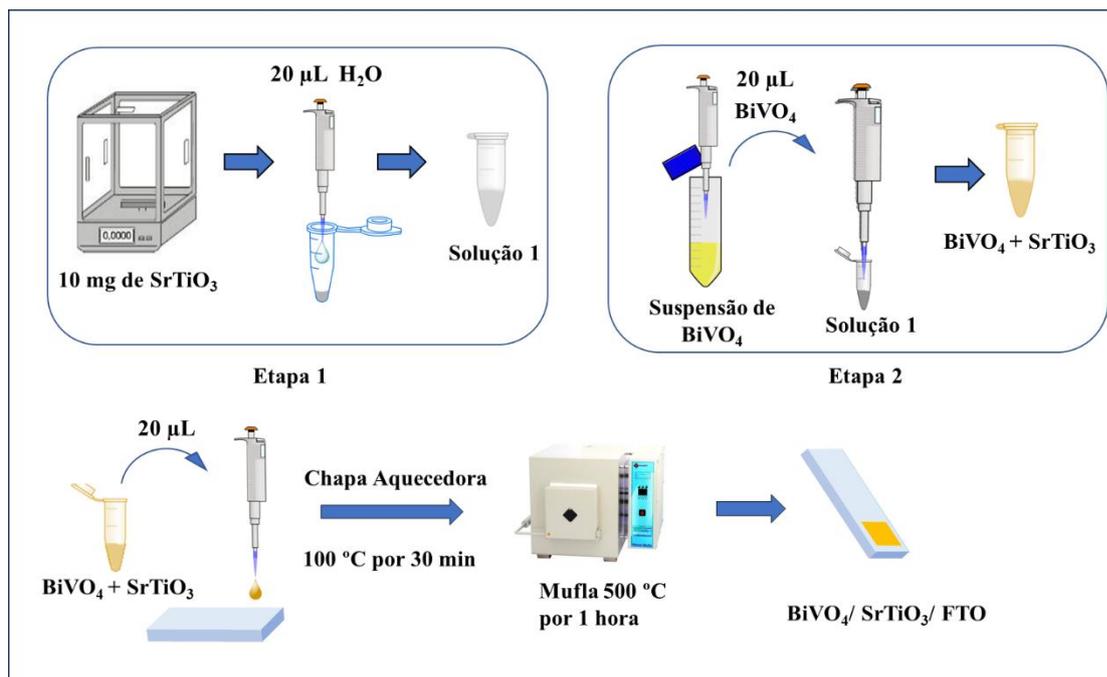


Fonte: Próprio autor

3.3.2. Plataforma FEQ BiVO₄/SrTiO₃/FTO

Inicialmente, o substrato de FTO foi imerso em etanol e sonicado durante 10 minutos e em seguida limpo com água deionizada. Esse procedimento foi realizado com o propósito de retirar impurezas ou espécies adsorvidas na superfície do eletrodo. Para o preparo da plataforma BiVO₄/SrTiO₃/FTO, primeiramente pesou-se 10 mg de SrTiO₃ e dispersando-a em 20 µL de água deionizada. Em seguida adicionou-se 20 µL da suspensão de BiVO₄ à suspensão anterior e, dessa mistura, retirou-se 20 µL para adicioná-la na superfície do eletrodo de FTO, que por sua vez foi deixado secar a temperatura ambiente e levado para a chapa aquecedora a 100 °C por 30 minutos. Por fim, o eletrodo de FTO modificado com BiVO₄/SrTiO₃ foi levado para a mufla a 500°C por 1 hora, formando assim o sensor fotoeletroquímico BiVO₄/SrTiO₃/FTO. A Figura 10, mostra a representação esquemática do procedimento realizado.

Figura 10: Esquema de modificação do FTO com $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$



Fonte: Próprio autor

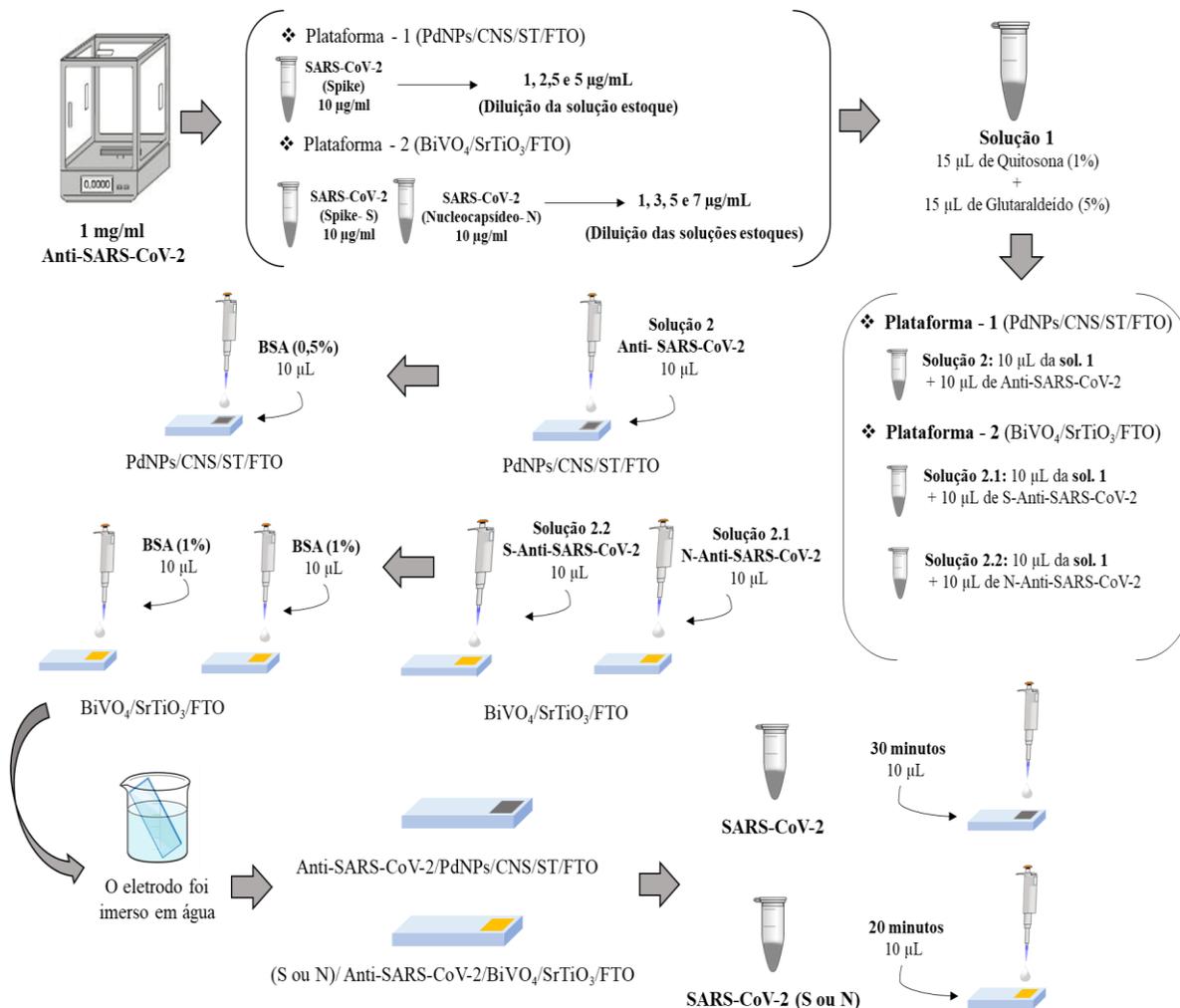
3.3.3. Preparo dos Imunossensores FEQs $\text{PdNPs}/\text{CNS}/\text{ST}/\text{FTO}$ e $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$

Para a imobilização das plataformas FEQs modificadas com $\text{PdNPs}/\text{CNS}/\text{ST}$ ou $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3$, primeiramente, preparou-se uma solução estoque de anticorpos de SARS-CoV-2 de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, dissolvendo-a em tampão fosfato pH 7,4. Em seguida as diluições das soluções estoques foram realizadas para as seguintes concentrações: 1, 2,5 e $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a plataforma $\text{PdNPs}/\text{CNS}/\text{ST}/\text{FTO}$ ou 1, 3, 5 e $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a plataforma $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$.

Para modificação das plataformas com anticorpos SARS-CoV-2 (espícula (S) ou nucleocapsídeo (N)), representado na Figura 11, inicialmente a solução 1 foi preparada pela mistura de 15 μL de quitosana (1%), com 15 μL de glutaraldeído (5%). Em seguida, 10 μL dessa solução 1 foram retirados e misturados a 10 μL da solução de anticorpos de SARS-CoV-2 – ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ou $3 \mu\text{g mL}^{-1}$), para assim formar a solução 2. Nesse sentido, 10 μL da solução 2 foram retirados e adicionados na superfície da plataforma $\text{PdNPs}/\text{CNS}/\text{ST}/\text{FTO}$ ou $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$, a plataforma modificada com anticorpos de SARS-CoV-2 foi deixada para secar durante 30 e/ou 20 minutos, respectivamente. Após esta etapa, 10 μL de BSA (0.5% ou 1%) foram adicionados à plataforma, deixado em repouso por um tempo de 10 minutos, posteriormente a plataforma foi imersa em água, para remover espécies adsorvidas, obtendo o imunossensor Anti-SARS-CoV-2/ $\text{PdNPs}/\text{CNS}/\text{ST}/\text{FTO}$ ou Anti-SARS-COV-

2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO. A interação imune de reconhecimento antígeno-anticorpo foi realizada através da imobilização de 10 µL de antígenos SARS-CoV-2, sob a superfície transdutora por 30 ou 20 minutos.

Figura 11: Representação esquemática da construção dos imunossensores FEQ's.



Fonte: Próprio autor

3.4. Caracterização morfológica e espectroscópica dos materiais que compõem as plataformas FEQ's

Para caracterizar os materiais deste estudo foram empregadas diversas técnicas, pois sabe-se que essas análises são fundamentais para compreender as estruturas, propriedades e composição dos materiais. A seguir, descreveremos as técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho.

3.4.1. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

A história da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) teve início com o trabalho de M. Knoll em 1935, quando ele delineou os princípios conceituais dessa técnica inovadora (Knoll, 1935). No ano de 1938, Von Ardenne deu um passo crucial ao construir o primeiro microscópio eletrônico de varredura, ao qual ele incorporou bobinas de varredura ao microscópio eletrônico de transmissão (Von Ardenne, 1938). A visão de Von Ardenne abriu caminho para uma nova dimensão de observação microscópica dando origem ao desenvolvimento contínuo da MEV ao longo das décadas seguintes.

A MEV é um equipamento que oferece informações quanto a morfologia e identificação dos elementos químicos presentes nas amostras (Dedavid et al., 2007). É um dos instrumentos mais versáteis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos e apresenta uma alta resolução durante a observação de amostras. Nos equipamentos comerciais é possível obter resoluções da ordem de 2 a 5 nanômetros, em casos de instrumentos de pesquisa mais avançados é possível alcançar uma resolução ainda mais precisa, chegando a valores melhores que 1 nanômetro (Nagatani et al., 1987).

Essa abordagem envolve a interação entre um feixe de elétrons acelerados e a superfície de uma amostra sólida. Essa interação desencadeia a emissão de elétrons a partir dos materiais presentes, os quais são posteriormente detectados e convertidos em sinais e imagens (Fugimoto, 2016). A MEV convencional é constituída por uma coluna óptico-eletrônica que visa à produção de um pequeno feixe de elétrons de alta intensidade, adaptada a uma câmara com porta-amostra aterrado, além do sistema eletrônico, detectores e sistema de vácuo (Dedavid et al., 2007).

A combinação da MEV com o detector de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) possibilita uma gama de análises químicas. Isso inclui a identificação de elementos presentes na amostra, a criação de mapas químicos que quantificam a composição em áreas específicas e a obtenção de perfis químicos que revelam variações na composição ao longo de uma determinada região. O EDS é fundamental nesse processo, uma vez que interage com a amostra

por meio do feixe primário, resultando na detecção dos raios X emitidos. Esses raios X, capturados pelo detector fornecem informações cruciais sobre a composição química dos materiais (Duarte et al., 2003; Cruz, 2019).

3.4.2. Microscopia eletrônica de transmissão-MET

Em 1931, o físico alemão Ernst Ruska e sua equipe apresentaram o primeiro microscópio eletrônico de transmissão. A invenção desse aparelho foi tão significativa que, 55 anos depois, em 1986, Ernst Ruska foi agraciado com o Prêmio Nobel de Física em reconhecimento à sua contribuição revolucionária para a ciência (Robinson, 1986).

Atualmente, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) oferece uma riqueza de informações sobre a estrutura e dinâmica de fenômenos que englobam escalas que variam em micrômetros, sendo essas informações de imensa relevância tanto do ponto de vista fundamental quanto prático para a sociedade (Spurgeon et al., 2021). É uma técnica que permite acompanhar diferentes processos físicos e químicos pela observação direta dos fenômenos em resolução atômica (Cordeiro et al., 2015).

Uma das principais vantagens da microscopia eletrônica de transmissão, reside na sua capacidade de atingir uma resolução notável possibilitada pela utilização de feixes de elétrons altamente acelerados cujos comprimentos de onda efetivos são cerca de 10^5 vezes mais curtos do que os da luz visível. Em princípio, os microscópios eletrônicos têm o potencial de alcançar resolução molecular, considerando apenas a limitação relacionada ao comprimento de onda (difração). No entanto, na prática, diversas outras limitações entram em jogo, incluindo características inerentes à própria amostra (Burghardt e Droleskey, 2006).

O princípio desta técnica baseia-se na utilização de feixe de elétrons sob alta tensão emitidos através da amostra. Os átomos que constituem o feixe de elétrons produzem diferentes tipos de radiação, logo os elétrons transmitidos são analisados pelo detector produzindo o sinal de imagem (Ramos, 2013). Portanto, esta técnica é utilizada com objetivo de analisar a morfologia, microestrutura dos materiais e entender suas propriedades auxiliando no desenvolvimento de novos materiais com características específicas.

As imagens MEV e MET para a plataforma PdNPS/CNS/ST/FTO foram obtidas usando-se um Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-20 - FEI SuperTwin 200 kV em parceria com o Centro de Microscopia da UFMG e UNICAMP (Figura 12).

Figura 12: Microscópio Eletrônica de Transmissão do Centro de Microscopia da UFMG



Fonte: <https://www.ufmg.br/boletim/bol1825/9.shtml>

As imagens MEV para a plataforma $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ foram obtidas usando-se um Microscópio Zeiss, modelo EVO HD e as análises EDS foram realizadas com um detector Bruker's XFLASH EDS (Figura 13). Essas análises foram realizadas na Central Analítica de Materiais (CEMAT), localizada na UFMA, campus Dom Delgado.

Figura 13: Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) - CEMAT (UFMA).



Fonte: Próprio autor

3.4.3. Difração de Raio X (DRX)

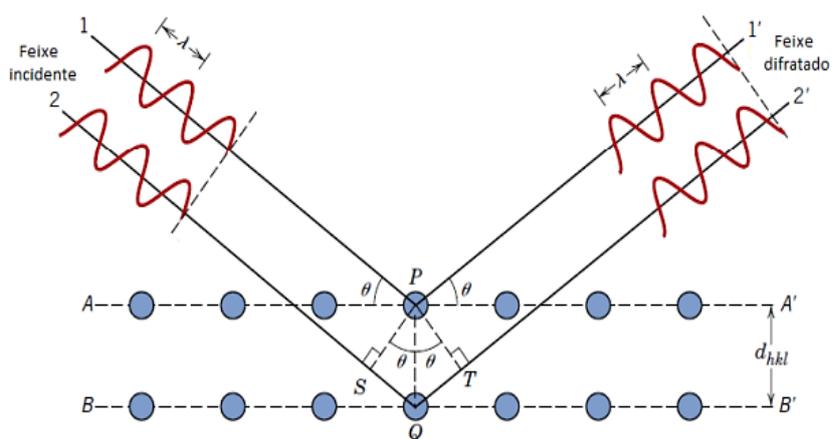
Uma outra técnica considerada valiosa em várias áreas é a Difração de raios X (DRX), pois permite determinar a estrutura cristalina de um material, além de identificar compostos e estudar suas propriedades. É uma técnica considerada não destrutiva, além de poder ser combinada com ajustes teóricos como o método de Rietveld oferecendo várias informações cristalográficas tais como a identificação das fases presentes em uma amostra, identificação de orientações preferenciais, medição do tamanho médio de cristalitos e avaliação de microdeformações, entre outros parâmetros (Faita, 2010).

A pesquisa conduzida por Von Laue em 1912 sobre difração de raios X revolucionou nossa compreensão das estruturas cristalinas e da medição do espaçamento interatômico em uma ampla variedade de materiais. Esse avanço foi possível graças à exploração da interferência construtiva entre raios X monocromáticos quando incididos em uma mostra cristalina. Após esses estudos, William Bragg e Lawrence Bragg descobriram que, quando os átomos estão regularmente espaçados em um reticulado cristalino e a radiação incidente possui comprimento de onda compatível com esse espaçamento, ocorre interferência construtiva em determinados ângulos de incidência e interferência destrutiva em outros (Padilha, 1997). O princípio dessa técnica é fundamentado na interação entre os elétrons presentes nos átomos de um material e o feixe de raios X incidente (Gobbo, 2009). Para ilustrar esse princípio, considera-se a existência de dois planos paralelos, designados como A-A' e B-B', conforme mostrado na Figura 14. Esses planos compartilham índices de Miller idênticos, especificados como (h, k, l), e estão separados por um intervalo de espaçamento interplanar denotado como (d_{hkl}) (Lopes, 2018), exposto pela seguinte equação (1):

$$d_{hkl} = \frac{n*\lambda}{2*sen(\theta)} \quad (1)$$

onde, a ordem de difração (n) é equivalente ao ângulo de incidência e reflexão (θ) e o comprimento de onda (λ).

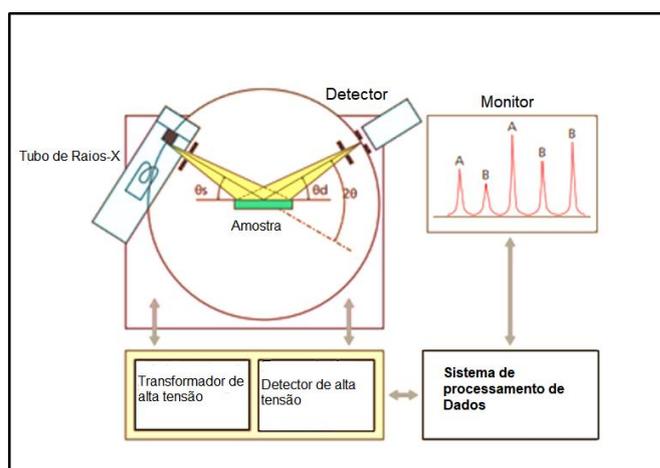
Figura 14: Ilustração da lei de difração de raios X proposta por Bragg.



Fonte: Adaptado Callister, 2002 e Lopes, 2018.

As análises de DRX podem ser realizadas com amostras na forma de pó ou filme e os resultados são apresentados na forma de um gráfico de intensidade da radiação difratada em relação ao ângulo 2θ . Este gráfico é denominado padrão de difração ou difratograma o qual mostra a radiação difratada através de picos cuja largura a meia altura está relacionada ao ângulo 2θ associado a um plano cristalino específico. Esse fenômeno está em conformidade com Lei de Bragg, que descreve a relação entre os ângulos de difração e a distâncias entre os planos cristalinos em um material (Magalhães, 2014). A Figura 15 ilustra o procedimento de análise onde o difratômetro pode empregar o arranjo geométrico θ - 2θ também conhecido como geometria de Bragg-Brentano, conforme mostrado na ilustração.

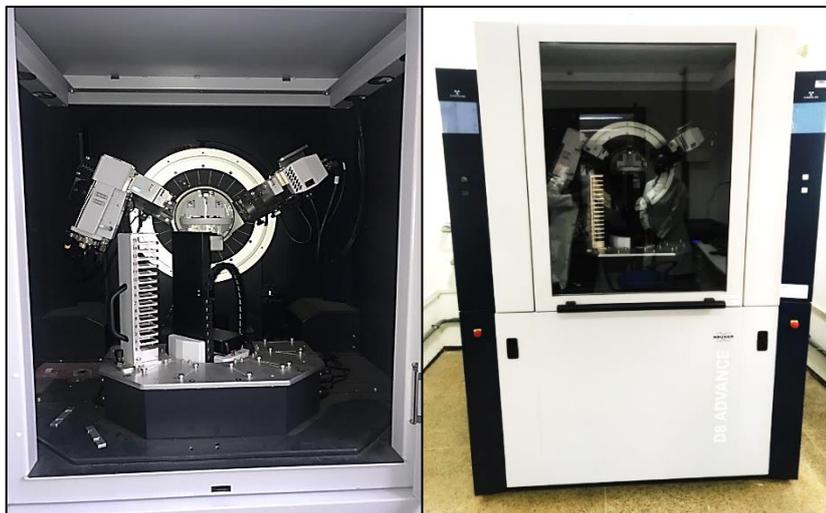
Figura 15: Ilustração do processo de análise do difratômetro de raios X.



Fonte: Adaptado Shimadzu, 2016.

Para as medições de difração de raios X (DRX) utilizou-se um difratômetro Bruker D8 Advance, com Tubo de radiação $\text{CuK}\alpha$ operando a 40 kV/40 mA, apresentado na Figura 16. As medições foram realizadas na faixa de 10° - 90° , com tamanho de passo de $0,02^\circ$ e tempo de contagem de 0,5 segundos. As medidas foram realizadas na CEMAT.

Figura 16: Difratograma de raio X (DRX)- CEMAT- UFMA



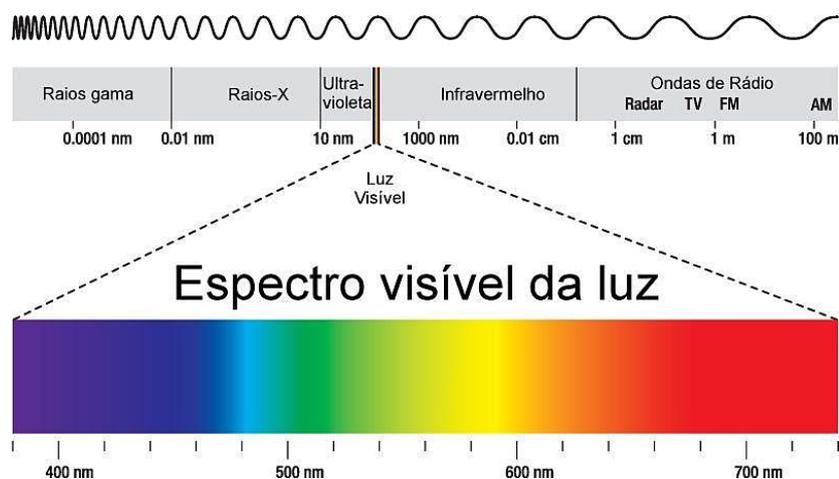
Fonte: Próprio autor.

3.4.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica considerada rápida e não destrutiva a qual baseia-se em interações entre as moléculas ou átomos e radiação eletromagnética resultando em vibrações que estão diretamente relacionadas à amplitude das ligações covalentes presentes na estrutura molecular (Cougo, 2017). A interação entre a radiação infravermelha e as moléculas ocorre devido a capacidade de absorção da molécula, correspondendo a diferentes vibrações, logo o número de modos vibracionais de uma molécula é determinado de acordo com seus graus de liberdade de vibração. Portanto, esta técnica é fundamentada na absorção molecular na qual a energia absorvida por uma molécula específica provoca transições tanto vibracionais quanto rotacionais (Silva, 2017).

A região espectral pode ser dividida em várias regiões de acordo com características da radiação, abrangendo um intervalo muito amplo de comprimentos de ondas e de frequência (Moreira et al., 2016), como representado na Figura 17. Essa ampla faixa é utilizada para definir as categorias dos métodos espectroscópicos.

Figura 17: Espectro eletromagnético, com destaque a região do visível ao Infravermelho.

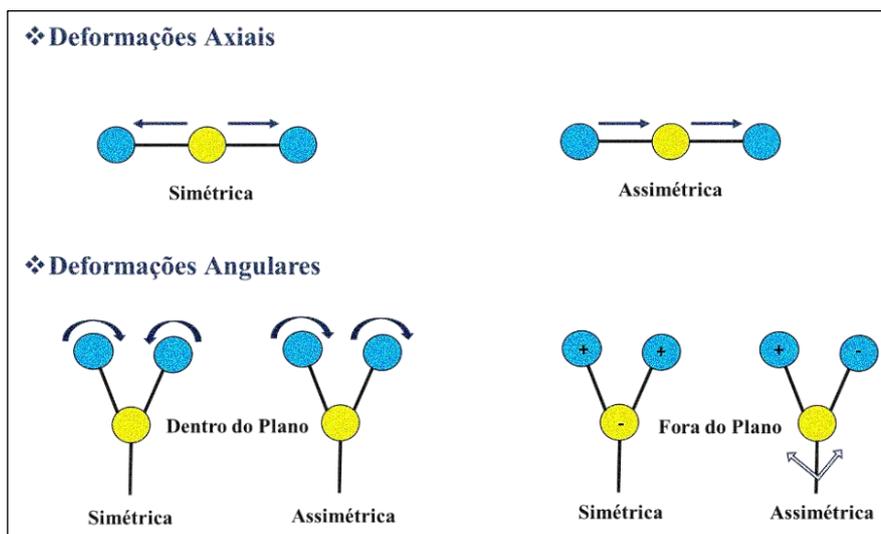


Fonte: Adaptado Harris, 2008.

A faixa de radiação infravermelha no espectro eletromagnético está localizada entre a região visível e as micro-ondas conforme ilustrado na figura acima. A faixa de maior interesse abrange a região de 4000 a 400 cm^{-1} (Cantor e Schimmel, 1980). Existem diferentes modos de vibração em uma molécula, cada um correspondendo a uma frequência específica de vibração. Essas vibrações moleculares podem ser divididas em dois tipos: estiramento (deformação axial) ou de deformação angular (fora ou dentro do plano cartesiano). Elas também podem ser simétricas ou assimétricas se envolvem mudanças coordenadas entre vários átomos ao mesmo tempo ou se as mudanças acontecem de forma descoordenada entre átomos adjacentes. Portanto, radiação infravermelha absorvida é convertida em um modo vibracional peculiar de cada molécula (Gonçalves, 2012). Os tipos de vibrações podem ser observados na Figura 18.

A espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier é uma técnica rápida e precisa que não necessita do uso de solventes para o preparo das amostras, além de depender de pouca quantidade de amostras para realizar as análises tornando-se essencial na investigação e caracterização de novos materiais (Bezerra, 2019).

Figura 18: Os modos vibracionais simétricos e assimétricos de moléculas poliatômicas



Fonte: Adaptado Gonçalves, 2012.

Neste trabalho, também buscou-se realizar análises de FTIR as quais fornecem informações sobre a presença de grupos funcionais, bem como a sua composição química, sendo possível avaliar se ocorrerem interações entre os materiais que compõem as plataformas FEQs. Para esta técnica, utilizou-se o disco prensado, no qual usou-se o brometo de potássio seco e pulverizado (cerca de 100 mg) misturando-o a uma pequena quantidade do adsorvente (0,5 mg). Essa mistura foi prensada em moldes específicos com uma pressão de 10 a 15 kpsi, formando assim um disco transparente. Foi utilizado o espectrofotômetro Shimadzu, modelo IR Prestige-21 para obtenção do espectro de absorção na faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , conforme apresentado na Figura 19. Todas as medidas foram obtidas na Central Analítica de Química, localizada na UFMA, campus Dom Delgado.

Figura 19: Espectrofotômetro Infravermelho- Central Analítica-UFMA



Fonte: Próprio autor.

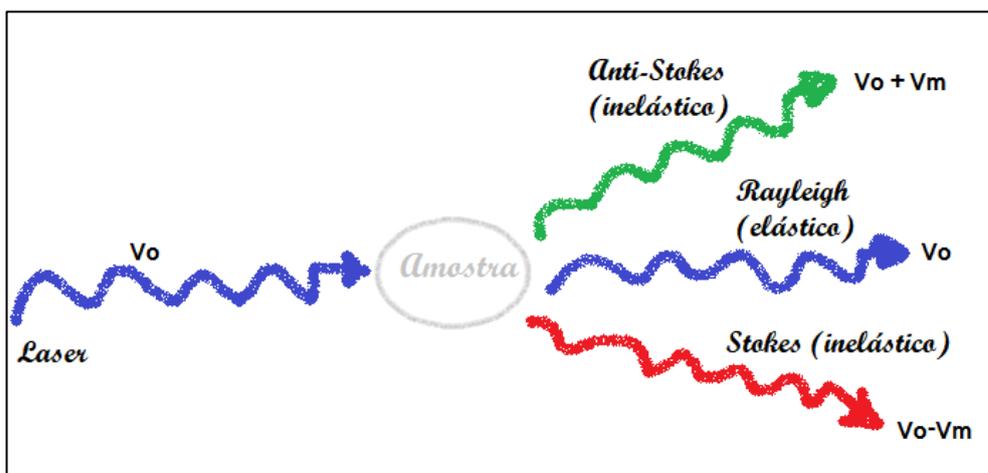
3.4.5. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman, uma técnica pioneiramente desenvolvida por Sir Chandrasekhara Venkata Raman em 1928, explicou os efeitos da luz ser espalhada por um objeto transparente. Em seu experimento, o físico indiano usou a luz solar como fonte, o líquido em um balde como coletor e seus olhos como detectores. Este fenômeno notável foi chamado de espalhamento Raman (Lilo et al., 2022).

É um fenômeno óptico linear que ocorre quando um feixe de luz monocromática é direcionado para o material. Cada fóton dessa luz monocromática, ao interagir com a amostra, pode trocar energia gerando ou destruindo fônons no material. Isso resulta na luz dispersa que possui um comprimento de onda diferente em relação ao comprimento de onda do fóton incidente. Logo, é uma técnica que desempenha um papel crucial na caracterização de alguns materiais, além de mapear as frequências dos modos normais do material, pois representa um método eficaz que não causa danos às amostras, uma vez que utiliza a luz como uma sonda (Gómez, 2018).

Neste sentido, se considerarmos uma substância sendo irradiada por uma fonte monocromática ocorrerá que a maior parte da luz passará através da amostra, entretanto, uma fração pequena resultará em dois tipos de espalhamento em diversas direções diferentes, em relação ao feixe incidente, podendo serem os mesmos, elástico ou inelástico (Bezerra, 2019), esse processo pode ser melhor observado na Figura 20

Figura 20: Esquema do espalhamento de luz por uma amostra na qual foi incidida radiação monocromática.



Fonte: Adaptado Pacheco, 2012.

Os fótons originados de uma fonte monocromática são inicialmente absorvidos, resultando em um aumento na vibração das moléculas. Posteriormente, essas moléculas liberam os fótons, retornando ao seu estado vibratório original, um processo conhecido como espalhamento elástico Rayleigh (conforme ilustrado na Figura 20). No entanto, a espectroscopia Raman se baseia no fenômeno do espalhamento inelástico da luz, que ocorre em aproximadamente 1% dos fótons absorvidos. Esse tipo de espalhamento ocorre quando as moléculas não retornam ao seu estado vibratório inicial. O espalhamento inelástico é composto por dois tipos de espalhamento: o espalhamento Stokes e o espalhamento Anti-Stokes. O espalhamento de Stokes ocorre quando a molécula emite um fóton com menor energia do que a absorvida, enquanto o espalhamento Anti-Stokes acontece quando a molécula emite um fóton com energia superior à absorvida. Esses fenômenos são a base da espectroscopia Raman, fornecendo informações valiosas sobre a composição e os modos vibracionais das moléculas analisadas (Santos et al., 2017; Morais et al., 2019 e Dhiman et al., 2021).

Esses três tipos de espalhamento de luz são ferramentas valiosas para a análise de amostras em diversas áreas, incluindo ciências dos materiais, fornecendo informações sobre a composição, estrutura e propriedades das substâncias em estudo.

Os espectros Raman foram obtidos através de um espectrômetro triplo Horiba-Jobin-Yvon (modelo T64000) operando em modo single (Figura 21), localizado no Laboratório de Espectroscopia Vibracional e Impedância – LEVI, na UFMA, Campus Dom Delgado. O equipamento opera com um Dispositivo Detector de Carga (CCD), resfriado com nitrogênio líquido. A fenda foi ajustada para fornecer uma resolução espectral de 2 cm^{-1} . Um laser com emissão em 532 nm (LAS-532-100 HREV) foi utilizado, operando-se a 14 mW, empregado como fonte de excitação.

Figura 21: Espectrômetro Raman Horiba-Jobin-Yvon (modelo T64000) - LEVI-UFMA.



Fonte: Próprio autor.

3.5. Caracterização Eletroquímica e Fotoeletroquímica- FEQs

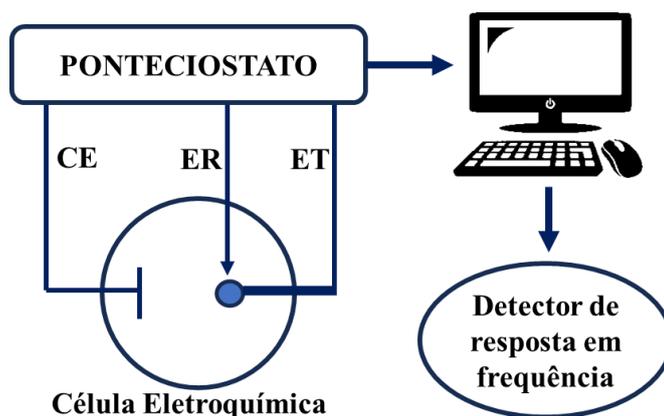
A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE), teve origem entre os anos 1880 e 1900, quando o matemático Oliver Heaviside introduziu o cálculo operacional a fim de apurar as equações diferenciais de circuitos elétricos. Heaviside relacionou a impedância de circuitos elétricos com a transformada de Laplace, entretanto, somente a partir de 1907 que o conceito de impedância foi utilizado (Ferreira et al., 2023).

A EIE é uma técnica versátil que encontra aplicação em uma ampla gama de estudos, abrangendo desde a análise do transporte de elétrons em dispositivos semicondutores até a investigação de processos cinéticos (Alves et al., 2000; Carvalho e Andrade, 2006). Esta técnica fornece uma visão detalhada das diversas características elétricas que ocorre na interface eletrodo/solução, e devido suas características, é utilizada em caracterizações eletroquímicas, podendo ser realizada em uma ampla faixa de frequência e em vários potenciais (Carvalho e Andrade, 2006).

Os gráficos de impedância podem ser representados de diferentes formas e, dentre os métodos principais, é possível citar o diagrama de Nyquist e Bode. O gráfico de Nyquist apresenta as componentes de impedância resistiva (Z) em função da reativa (Z''), enquanto que o diagrama de Bode apresenta o logaritmo do módulo da impedância ($|Z|$), o ângulo de fase (θ), em função do logaritmo da frequência (f) (Melo e Maia, 2016).

Basicamente, as medidas de impedância são obtidas por meio de um potenciostato, que realiza aplicação de uma corrente alternada a célula eletroquímica. Logo, a corrente alternada, com uma determinada frequência, é programada pelo computador e em seguida aplicada no eletrodo de trabalho através do potenciostato. A resposta do eletrodo é recebida pelo detector de resposta em frequência que encaminha os dados ao computador para processamento através do potenciostato conectado (Wolyneq, 2003; Melo e Maia, 2016), esse arranjo pode ser representado através da Figura 22.

Figura 22: Arranjo experimental das medidas de EIE. (CE - Contra Eletrodo; ER- Eletrodo de Referência; ET - Eletrodo de Trabalho).



Fonte: Adaptado Wolyneec, 2003.

As principais vantagens de se utilizar esta técnica é a possibilidade de identificar efeitos eletroquímicos através dos diversos parâmetros obtidos com os diagramas de impedância. Entretanto, apresenta algumas desvantagens que são a aplicação somente em meios condutores, a interpretação dos diagramas de impedância necessita de certo grau de conhecimento em eletroquímica e fenômenos de interface, além de ser um aparato instrumental bastante sofisticado e de difícil adaptação para medidas de campo (Melo e Maia, 2016).

É importante ressaltar, que em relação aos sistemas fotoeletroquímicos a EIE é considerada uma técnica fundamental, pois tem a capacidade de avaliar a resposta eletroquímica dos materiais na presença de luz, permitindo a caracterização de parâmetros importantes, como a eficiência de transferência de carga e a resistência de transporte de elétrons.

As medições eletroquímicas e FEQs foram todas realizadas em um pontenciostato/galvanostato Autolab modelo PGSTAT 128N da Metrohm-Autolab acoplado a um software Nova 2.1, para as medidas EIE utilizou-se o software FRA 2.0 (Figura 23), para obtenção dos dados.

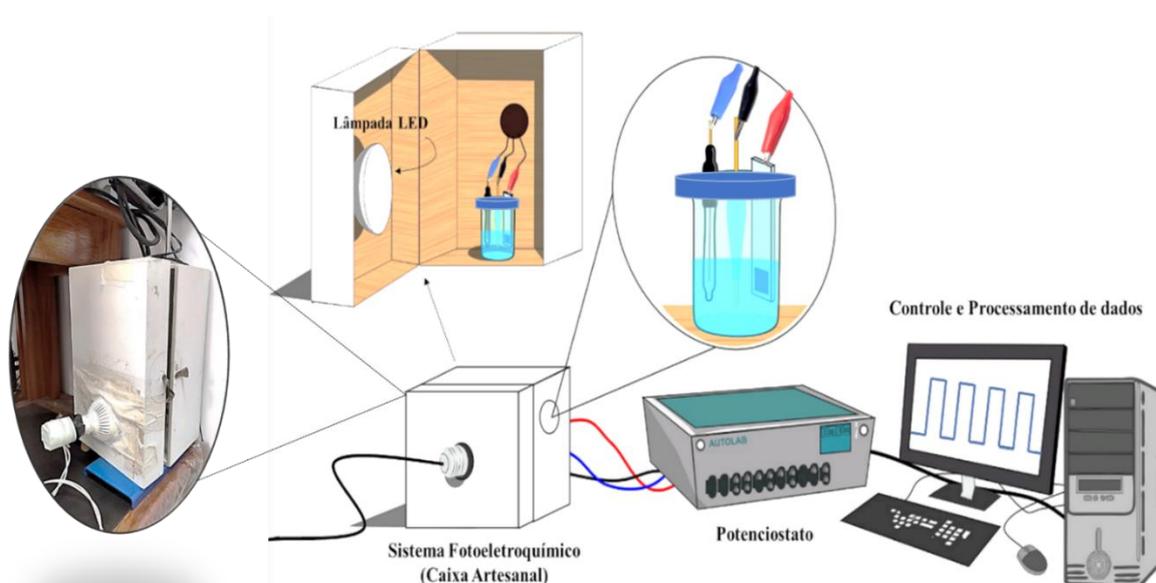
Figura 23: Potenciostato/Galvanostato utilizado no sistema FEQ.



Fonte: Próprio autor

Para as medições foi utilizado uma célula convencional composta por um eletrodo de trabalho (FTO - óxido de estanho dopado com flúor), um eletrodo de Ag/AgCl (KCl_{sat}) como eletrodo de referência e um fio de ouro, como eletrodo auxiliar. Como fonte luz para o sistema, usou-se uma lâmpada comercial de 36 W acoplada em uma caixa artesanal de MDF (Medium density Fiberboard). Este material é bastante popular devido sua versatilidade e fácil personalização. As medições EIE foram realizadas em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl contendo 5 mmol L^{-1} de ferricianeto $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ em uma frequência de 10^5 Hz a $0,1 \text{ Hz}$. O potencial aplicado foi calculado pela média dos picos de oxidação e redução empregando-se a voltametria cíclica, numa faixa de potencial de $-0,5$ a $0,8 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(KCl_{sat})}$. Na Figura 24 apresenta-se o esquema do sistema fotoeletroquímico utilizado.

Figura 24: Representação esquemática do sistema eletroquímico e FEQ.



Fonte: Próprio autor

3.6. Otimização dos parâmetros experimentais e operacionais dos sistemas fotoeletroquímicos propostos

Com o propósito de se obter o melhor desempenho para os imunossensores propostos foram otimizados os parâmetros operacionais e experimentais que influenciam a resposta analítica tais como concentração da molécula doadora, pH, solução tampão e potencial aplicado (E_{apl}). Cada um desses parâmetros será descrito nos subitens a seguir:

3.6.1. Concentração da Molécula doadora

Com objetivo de realizar a otimização do sistema para a plataforma FEQ PdNPs/CNS/ST/FTO avaliou-se o efeito da molécula doadora (ácido ascórbico - AA) sobre a fotocorrente. Para tanto, variou-se as concentrações de AA de 0 a $0,40 \text{ mol L}^{-1}$. O estudo foi realizado em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de TF, pH 7,0 e sob um potencial aplicado ao eletrodo de trabalho, $E_{\text{apl.}} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$. Em relação a plataforma FEQ $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ fixou-se a concentração de AA em $0,3 \text{ mol L}^{-1}$. As medidas foram realizadas em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de uma solução TF, pH 7,4, sob um $E_{\text{apl.}} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$.

3.6.2 pH (Potencial Hidrogeniônico) do meio sobre a resposta das plataformas FEQs

O efeito do pH no meio sobre a resposta da plataforma FEQ PdNPs/CNS/ST/FTO foi avaliado em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução TF na presença de $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de AA, numa faixa de pH 5,0 a 8,0, sob um $E_{\text{apl.}} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$. Para a plataforma FEQ $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ fixou-se o pH 7,4 sob um $E_{\text{apl.}} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$.

3.6.3 Solução Tampão

Após a otimização/escolha do pH do meio, a influência do tipo de solução tampão foi investigada para a plataforma PdNPs/CNS/ST/FTO, na qual verificou-se o sinal analítico em relação a molécula doadora para os seguintes eletrólitos: TF, HEPES, McIlvaine (MCV), Britton-Robinson (BR), PIPES e TRIS, todos em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sob $E_{\text{apl.}} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$. Em relação a plataforma $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$, avaliou-se o sinal analítico em relação a molécula doadora para os eletrólitos: TF, HEPES, MCV e BR. Este estudo foi realizado na

ausência e presença dos anticorpos S-Anti-SARS-COV-2 e N-Anti-SARS-CoV-2, avaliando-se o percentual de inibição de fotocorrente para cada solução tampão.

3.6.4 Potencial aplicado ($E_{apl.}$)

Após otimização/escolha do pH do meio e da solução tampão, avaliou-se o efeito do $E_{apl.}$ para a plataforma PdNPs/CNS/ST/FTO em tampão HEPES contendo $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de AA. Os $E_{apl.}$ testados foram -0,3; -0,2; -0,1; 0,0; 0,1; 0,2 e 0,3 V vs Ag/AgCl (KCl_{sat}). Para a plataforma BiVO₄/SrTiO₃/FTO fixou-se o $E_{apl.}$ em 0,0 V vs Ag/AgCl (KCl_{sat}), visando a sensibilidade do sistema.

3.6.5. Efeitos da Concentração dos anticorpos SARS-CoV-2 sobre as plataformas FEQs

Com objetivo de se obter a melhor resposta amperométrica para a plataforma fotoeletroquímica PdNPs/CNS/ST/FTO modificada com anticorpos SARS-CoV-2, após a otimização testou-se as seguintes concentrações dos anticorpos de S-Anti-SARS-CoV-2: 0, 1, 2,5, 5, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esses resultados foram realizados em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão HEPES, pH 7,0, sob um $E_{apl.}$ de 0,0 V vs Ag/AgCl (KCl_{sat}). Já para a plataforma BiVO₄/SrTiO₃/FTO, testou-se as concentrações 1, 3, 5, 7 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do anticorpo S-Anti-SARS-CoV-2 e N-Anti-SARS-CoV-2. Todos os resultados referentes a esta plataforma foram realizados em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão BR, pH 7,4, sob um $E_{apl.} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl (}KCl_{sat}\text{)}$.

3.6.6. Tempo de interação entre os antígenos e anticorpos de SARS-CoV-2

Após avaliarmos as melhores concentrações dos anticorpos de SARS-CoV-2 sobre as plataformas FEQs cujos valores fixados foram de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o imunossensor Anti-PdNPs/CNS/ST/FTO e $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o imunossensor Anti-BiVO₄/SrTiO₃/FTO, estudou-se o tempo de interação entre os antígenos e anticorpos de SARS-CoV-2 frente as fotocorrentes.

Neste contexto, é de grande importância o estudo da interação entre os imunossensores (plataformas FEQ modificadas com Anti-SARS-CoV-2) com os seus respectivos antígenos, uma vez que os valores da variação das fotocorrentes obtidas não podem ser nem muito pequenos e nem muito grandes, pois esse resultado pode comprometer a capacidade dos imunossensores de responderem com boa sensibilidade ou mesmo diminuir a faixa de resposta dos sistemas propostos frente as diferentes concentrações dos seus antígenos.

O imunossensor Anti-PdNPs/CNS/ST/FTO foi incubado com 100 pg mL^{-1} de antígenos SARS-CoV-2, em diferentes tempos de incubação (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 minutos). As medidas foram realizadas em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão HEPES, pH 7,0, sob um $E_{\text{apl.}} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$. Para o imunossensor Anti-BiVO₄/SrTiO₃/FTO utilizou-se uma concentração de antígenos de 10 pg mL^{-1} de S-SARS-CoV-2 e N- SARS-CoV-2, variando-se o tempo de interação em 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 minutos. Esses estudos foram realizados em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão BR, pH 7,4, sob um $E_{\text{apl.}} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$.

3.7. Caracterização analítica dos imunossensores Anti-PdNPs/CNS/ST/FTO e Anti-BiVO₄/SrTiO₃/FTO

Após a otimização dos parâmetros experimentais e operacionais, efeito da concentração do anticorpo e tempo de incubação, partiu-se para o estudo da caracterização analítica do imunossensor, na qual determinou-se o limite de detecção (LD) do sistema, bem como a faixa linear de trabalho, sensibilidade (coeficiente angular da equação da reta), precisão, exatidão e seletividade. O limite experimental de detecção (LD) foi determinado considerando, a razão sinal ruído igual a 3.

As curvas analíticas foram construídas através da relação linear entre o log da concentração do antígeno e a variação da fotocorrente. As seguintes concentrações do antígeno foram estudadas para cada imunossensor:

- **Anti-PdNPs/CNS/ST/FTO (Glicoproteína Espícula (S))**

[S-SARS-CoV-2] = 1 fg mL^{-1} , 10 fg mL^{-1} , 100 fg mL^{-1} , 1 pg mL^{-1} , 10 pg mL^{-1} , 100 pg mL^{-1} e 1000 pg mL^{-1} .

- **Anti-BiVO₄/SrTiO₃/FTO (Glicoproteína Espícula (S) e Nucleocapsídeo (N))**

[S-SARS-CoV-2] = $0,1 \text{ pg mL}^{-1}$, 1 pg mL^{-1} , 10 pg mL^{-1} , 100 pg mL^{-1} , 1 ng mL^{-1} , 10 ng mL^{-1} , 100 ng mL^{-1} e 1000 ng mL^{-1} .

[N-SARS-CoV-2] = $0,01 \text{ pg mL}^{-1}$, $0,1 \text{ pg mL}^{-1}$, 1 pg mL^{-1} , 10 pg mL^{-1} , 100 pg mL^{-1} , 1 ng mL^{-1} , 10 ng mL^{-1} , 100 ng mL^{-1} e 1000 ng mL^{-1} .

A **equação 1** representa a relação da fotocorrente em função do logaritmo da concentração utilizada neste trabalho para os imunossensores propostos: (**a-** é referente a interseção da reta, **b-** coeficiente angular e **C-** concentração do material biológico).

$$I(\mu\text{A}) = a + b \times [\log C (\text{pg mL}^{-1} \text{ ou ng mL}^{-1})] \text{ Equação 1}$$

3.8. Avaliação da precisão do imunossensor

O estudo da precisão do imunossensor foi feito realizando-se repetições de medidas com os imunossensores para SARS-CoV-2 no mesmo dia e em dias diferentes. A repetibilidade do imunossensor foi avaliada realizando-se vinte medidas sucessivas em um intervalo de tempo de 1000 segundos. Após esse procedimento calculou-se o desvio padrão relativo (DPR) para as fotocorrentes obtidas. Para o estudo da reprodutibilidade das medidas em relação ao preparo do imunossensor cinco eletrodos foram preparados nas mesmas condições e em dias diferentes. A precisão em relação ao preparo dos imunossensores também foi avaliada pelo DPR de todas as medidas obtidas.

3.9. Aplicação dos imunossensores em amostras de saliva artificial e exatidão do método

A saliva artificial, composta por Xilitol e sais minerais, como: Cloreto de sódio, potássio, cálcio e magnésio, foi adquirida em uma farmácia local. Inicialmente, o imunossensor S-Anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO foi testado preparando-se os antígenos de SARS-CoV-2 em diferentes concentrações em amostras de saliva artificial. As amostras foram enriquecidas com as seguintes concentrações do antígeno SARS-CoV-2: 1 fg mL⁻¹, 10 fg mL⁻¹, 100 fg mL⁻¹, 1 pg mL⁻¹, 10 pg mL⁻¹ e 100 pg mL⁻¹ e a quantificação da proteína nas amostras enriquecidas foi realizada pelo método de calibração externa. As porcentagens de recuperação foram calculadas através dos dados obtidos da curva analítica.

Os imunossensores S-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO e N-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO foram testados nas mesmas condições (preparando-se os antígenos de SARS-CoV-2 em diferentes concentrações em amostras de saliva artificial), entretanto as amostras foram enriquecidas com as seguintes concentrações da proteína SARS-CoV-2, 0,01 ng mL⁻¹, 1 ng mL⁻¹ e 100 ng mL⁻¹.

3.10. Seletividade

Para avaliar a seletividade dos imunossensores propostos frente aos materiais biológicos, utilizou-se uma concentração de 10 pg mL^{-1} das proteínas SARS-CoV-2 e uma concentração 100 vezes maior dos possíveis interferentes. As substâncias utilizadas foram escolhidas conforme alguns trabalhos reportados na literatura nos estudos de seletividade (Li et al., 2023; Chang et al., 2022). Os possíveis interferentes testados foram: albumina de Soro bovino (BSA), antígeno prostático específico (PSA), glicose, propil dimetil amina, citocromo C, ureia, troponina e dopamina. Todos os experimentos foram realizados nas condições otimizadas e os resultados apresentados em gráfico de percentual.

Capítulos 4 e 5

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão (Primeira plataforma)

Plataforma PdNPs/CNS/ST/FTO

4.1. Caracterização dos materiais que compõem a plataforma FEQ

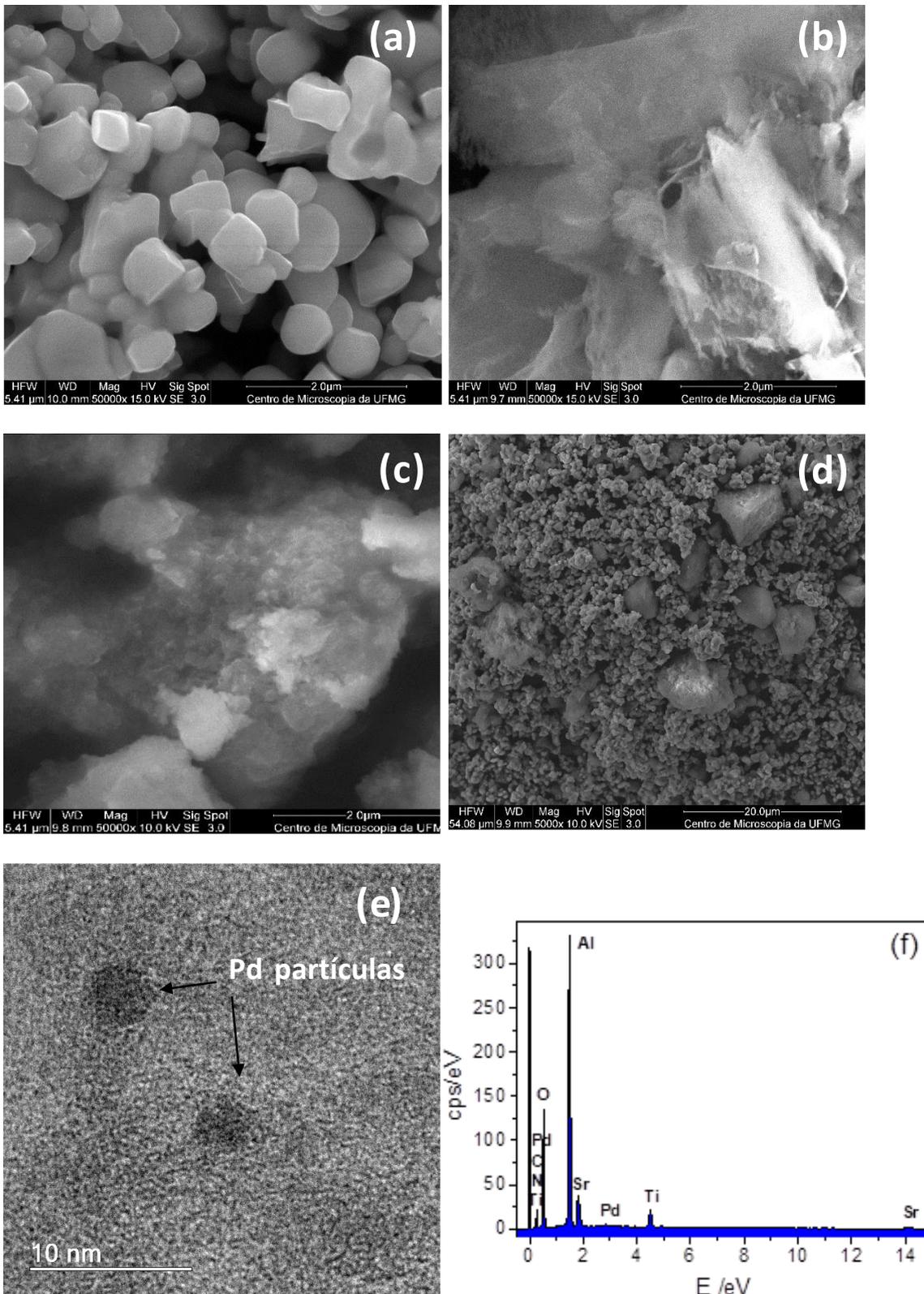
Os materiais que compõem a plataforma fotoeletroquímica e o material compósito completo foram caracterizados por MEV, EDS, MET, FTIR, RAMAN, DRX e EIE. Neste sentido, a Figura 25 mostra as imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para o (a) titanato de estrôncio, SrTiO_3 , (b) nitreto de carbono dopado com enxofre, $\text{g-C}_3\text{N}_4\text{-S}$, (c) nanopartículas de paládio aprisionadas em matriz de hidróxido de alumínio, Pd/AlO(OH) e (d) o material compósito (PdNPs/CNS/ST).

A imagem MEV para o SrTiO_3 mostra partículas nanométricas com bordas relativamente lisas. Essas partículas apresentam, em sua grande maioria, um formato que lembra um cubo. Por outro lado, o nitreto de carbono grafítico dopado com enxofre apresentou estruturas micrométricas de superfície esfoliada. Já a imagem MEV das nanopartículas de paládio aprisionadas na matriz de hidróxido de alumínio, Pd/AlO(OH) , mostra partículas micrométricas com um aspecto mais rugoso. Por outro lado, o compósito PdNPs/CNS/ST apresenta uma morfologia heterogênea com partículas de diferentes dimensões incluindo partículas micrométricas e nanométricas. Já a imagem MET, apresentada na Figura 25e, mostra a presença das nanopartículas de paládio no compósito PdNPs/CNS/ST as quais não podem ser vistas na imagem MEV devido ao seu pequeno tamanho (inferior a 10 nm).

Em relação as nanopartículas de paládio aprisionadas em matriz de hidróxido de alumínio, é importante ressaltar que as combinações desses materiais foram necessárias para melhorar a ancoragem das nanopartículas de paládio no FTO e promover maior estabilidade para a plataforma fotoeletroquímica. Por sua vez, quando as nanopartículas de paládio são colocadas diretamente na superfície do FTO, ocorre a lixiviação do material e, conseqüentemente, uma baixa estabilidade para a plataforma de PdNPs.

Por fim, a Figura 25f mostra o espectro EDS do compósito PdNPs/CNS/ST. Como pode ser visto nesta Figura, o espectro EDS mostrou a presença dos elementos Pd, Al, C, N, Ti, O e Sr na superfície do compósito, confirmando a presença dos diferentes tipos de materiais no compósito PdNPs/CNS/ST.

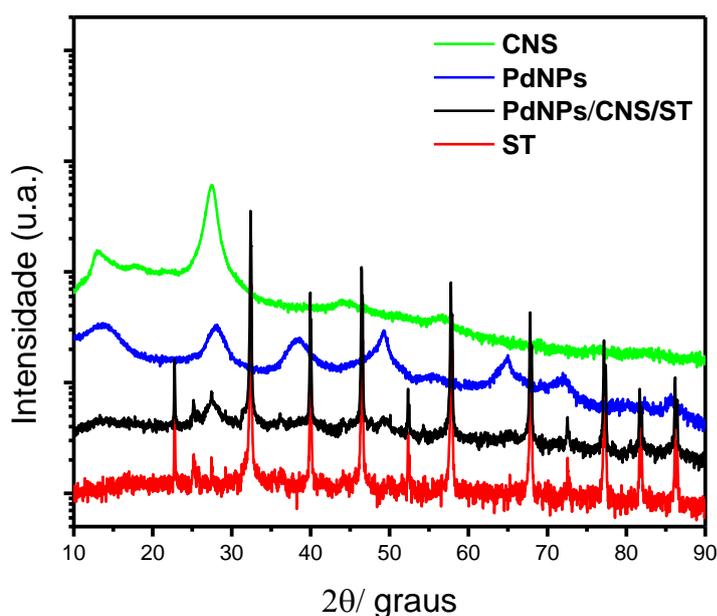
Figura 25: Imagens MEV para (a) titanato de estrôncio, SrTiO₃, (b) nitreto de carbono grafítico dopado com enxofre, g-C₃N₄-S, (c) nanopartículas de paládio aprisionadas em matriz de hidróxido de alumínio, Pd/AlO(OH) e (d) o material compósito PdNPs/CNS/ST, (e) imagem MET da amostra PdNPs/CNS/ST e (f) espectro EDS da amostra PdNPs/CNS/ST.



Posteriormente, realizou-se medidas de Difração de raios X para os materiais cujos difratogramas são apresentados na Figura 26. No padrão DRX para o ST (difratograma vermelho) é possível observar os picos correspondentes aos planos (100), (110), (111), (200), (210), (211), (220), (310), e (222) que pertencem à estrutura de perovskita cúbica com grupo espacial Pm-3m (JCPDS 00-35 -0734). Os picos próximos a 25,0° e 27,5° são impurezas não identificadas.

O difratograma do CNS (Figura 26, difratograma verde) mostra os dois picos (001) e (002) a 13,10° e 27,43°, respectivamente, correspondendo ao empilhamento de intercâmbios do sistema aromático, que são característicos de materiais grafiticos (Wang et al., 2008; Shao et al., 2016; Cao et al., 2017). Finalmente, na Figura 26, difratograma azul, podem ser observados picos característicos dos planos (020), (120), (031), (200), (002) e (251), que são atribuídos à estrutura nanocristalina do hidróxido de alumínio. Observa-se as características amorfas, além de uma estrutura ortorrômbica. Nota-se também que não há pico observado para o material Pd (Paládio), devido, provavelmente, a sua pequena quantidade no composto comercial Pd/AlO(OH) o qual apresenta apenas 0,5 % do metal Pd (em peso) (Goksu, 2015). Além disso, o DRX do material PdNPs/CNS/ST (difratograma preto) apresenta características dos três padrões citados acima, indicando a mistura dos três materiais estudados.

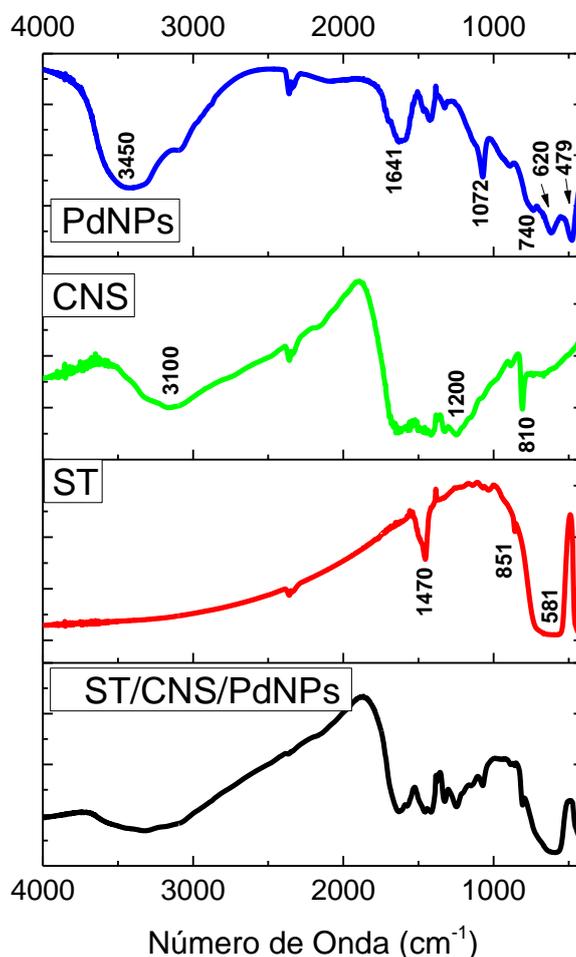
Figura 26: Padrões de DRX para o ST (SrTiO_3); CNS ($g\text{-C}_3\text{N}_4\text{-S}$); PdNPs (PdAlO(OH)) e PdNPs/CNS/ST.



A Figura 27 apresenta os espectros de FTIR para nanopartículas de paládio aprisionadas em matriz de hidróxido de alumínio (PdAlO(OH) ou PdNPs). As PdNPs (espectro azul) apresentam um pico em torno de 3450 cm^{-1} e uma banda fraca em 1641 cm^{-1} referente ao estiramento da água adsorvida. Além disso, as bandas em 1072 cm^{-1} e 740 , 620 e 479 cm^{-1} correspondem, respectivamente, aos grupos de vibração simétrica Al-OH e Al-O, respectivamente (Liu et al., 2012; Abdollahifar et al., 2014; Choi et al., 2018).

O espectro g-C₃N₄-S (CNS) (Figura 27, espectro verde) apresentou bandas em 3500 - 3000 cm^{-1} correspondentes à vibração de estiramento de probabilidade N-H atribuída a grupos amina não condensados e grupos O-H de moléculas de água adsorvidas. As bandas entre 1200 - 1700 cm^{-1} podem ser atribuídas aos modos de vibração de estiramento do heterociclo C-N aromático. Uma banda de absorção nítida que aparece em 810 cm^{-1} é atribuída à vibração de estiramento das unidades de triazinas (Guan et al., 2021). O espectro obtido para SrTiO₃, ST (Figura 27, espectro vermelho) mostra picos em torno de 1470 cm^{-1} que podem ser atribuídos aos modos de estiramento Sr-Ti-O (Rajkoomar et al., 2020). Os picos em torno de 851 cm^{-1} e 585 cm^{-1} correspondem à vibração e estiramento do Ti-O (Xian et al., 2014; Mohammadi et al., 2020). O espectro obtido para o compósito PdNPs/CNS/ST (Figura 27, espectro preto) indica a presença do ST com CNS e PdNPs, pois as bandas relacionadas a cada material são observadas para o compósito completo.

Figura 27: Espectros de FTIR para o PdNPs (PdAlO(OH)); CNS (g-C₃N₄-S); ST (SrTiO₃) e PdNPs/CNS/ST.



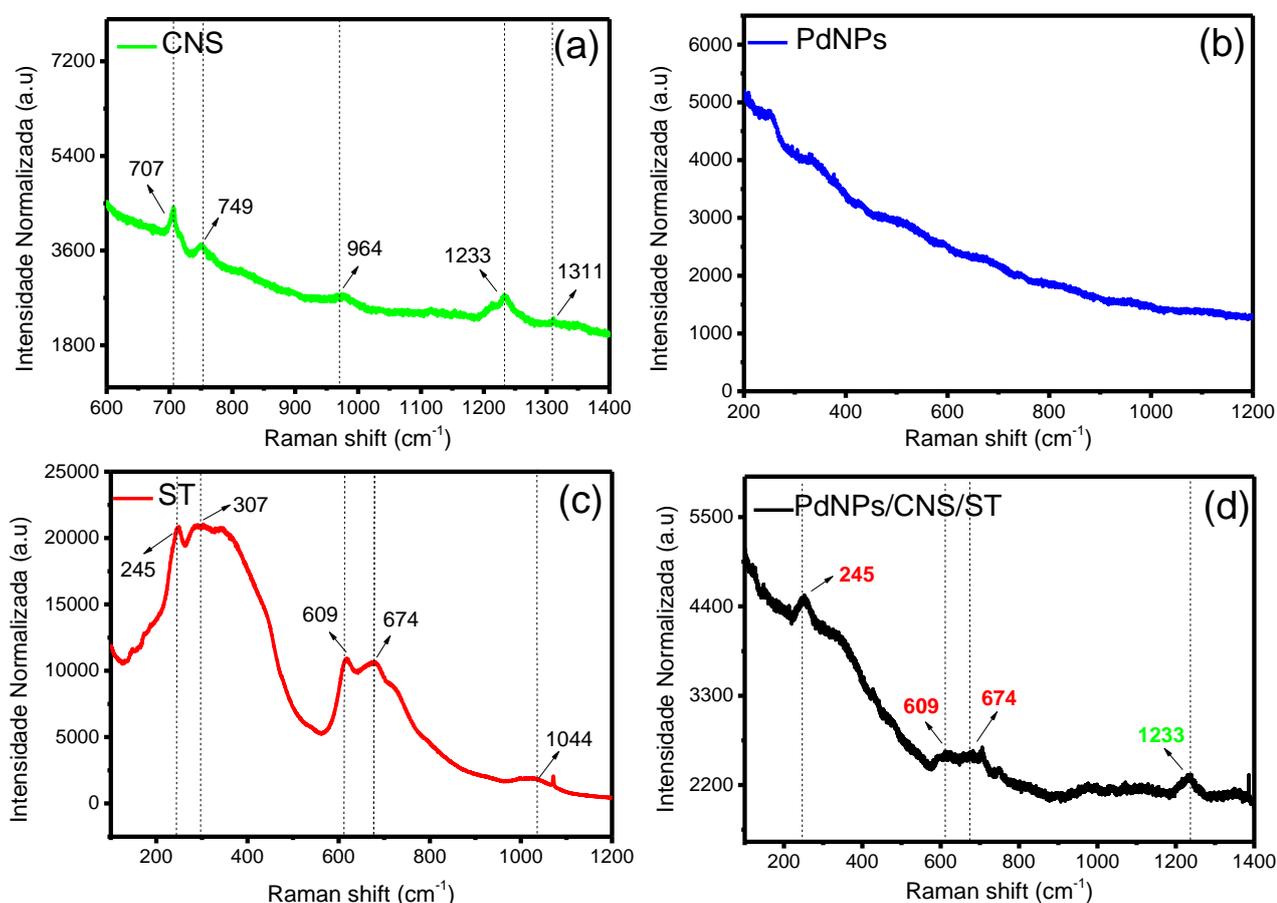
A Figura 28 mostra os espectros Raman dos materiais que compõem a plataforma, analisadas de forma individual e em conjunto. Os espectros Raman confirmam a obtenção do g-C₃N₄-S (CNS) (Figura 28a, espectro verde), por meio da síntese, mostrando bandas características em 707, 749, 964, 1233 e 1311 cm⁻¹, todos de acordo com a literatura (Fan et al., 2017; Li et al., 2020).

O espectro PdNPs (Figura 28b, espectro azul), mostra características amorfas do material, assim como já observado no DRX, entretanto é possível observar que esse material não apresenta bandas significativas no espectro Raman o que pode estar associado a presença de diferentes polimorfos cristalinos referentes ao hidróxido de alumínio. (Gangwar et al., 2015; Nettare et al., 2022). A Figura 28c, espectro vermelho, corresponde ao ST, pois sabe-se que este material apresenta uma estrutura de perovskita cúbica ideal em temperatura ambiente. Neste sentido, não era esperado que ocorresse espalhamento Raman de primeira ordem em uma estrutura de perovskita ideal, em vez disso, o espectro Raman corresponde ao espalhamento de segunda ordem. Portanto, conforme a literatura os modos 245, 307, 609, 674 e 1044 cm⁻¹ são

atribuídos ao modo Raman de segunda ordem, característicos do titanato de estrôncio (Yu-lei et al., 2003; Živojinović et al., 2017; Akilarasan et al., 2021).

Por fim a Figura 28d, espectro preto, é referente ao compósito PdNPs/CNS/ST. Assim como observado no DRX e FTIR, o compósito apresentou características do PdNPs e modos em 245, 609, 674 e 1233 cm^{-1} referentes ao ST e CNS, comprovando a combinação desses materiais.

Figura 28: Espectros Raman obtidos para o CNS ($g\text{-C}_3\text{N}_4\text{-S}$) (a); PdNPs ($\text{PdAlO}(\text{OH})$) (b), ST (SrTiO_3) (c) e PdNPs/CNS/ST (d).

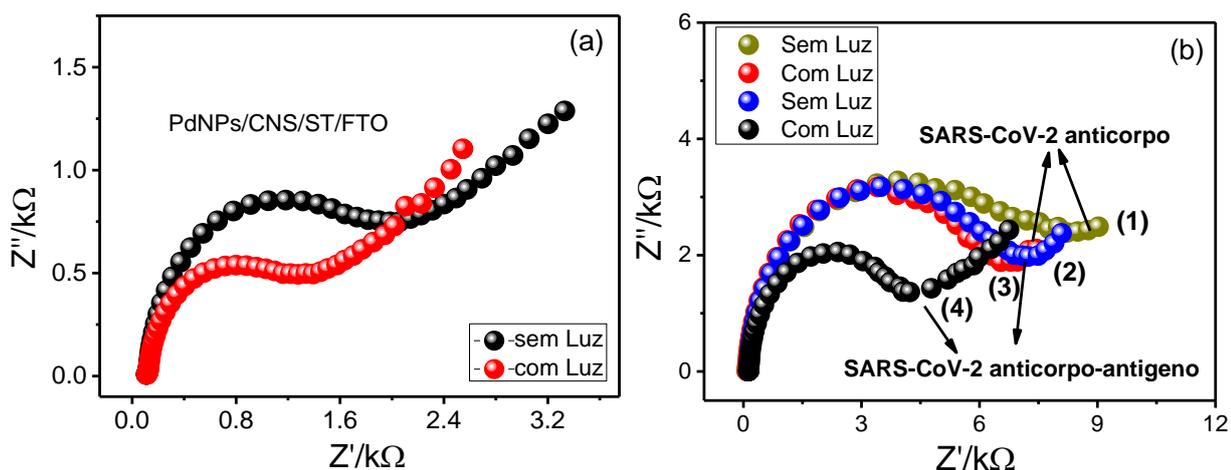


4.2. Caracterização do imunossensor por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

A Figura 29a mostra os espectros de impedância eletroquímica (EIE), denominados diagramas de Nyquist, os quais foram obtidos para o imunossensor fotoeletroquímico PdNPs/CNS/ST/FTO em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl contendo 5 mmol L^{-1} de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Essas

medidas foram realizadas em um potencial de circuito fechado na ausência (espectro preto) e presença de luz (espectro vermelho) em uma faixa de frequência de 10^5 Hz a 0,1 Hz. Observa-se, na presença de luz, há uma diminuição na resistência à transferência de carga entre a sonda redox e a superfície do FTO modificado. Esta diminuição sugere um aumento da fotogeração dos pares elétron/lacuna na superfície do FTO contendo o material compósito PdNPs/CNS/ST.

Figura 29: (a) Gráfico de Nyquist para o imunossensor FEQ PdNPs/CNS/ST/FTO em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução de KCl contendo 5 mmol L^{-1} de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, obtido em potencial fechado na ausência (espectro preto) e presença (espectro vermelho) de luz LED visível. (b) Gráficos de Nyquist para a plataforma anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO na ausência (espectro 1) e incidência de luz LED visível (espectro 2). Gráficos de Nyquist para o anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO na ausência (espectro 3) e incidência de luz LED visível (espectro 4) após incubação em solução de antígeno SARS-CoV. Experimentos também realizado em solução de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de KCl contendo 5 mmol L^{-1} de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.



A Figura 29b mostra a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) para o imunossensor anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO na ausência (espectro 1) e presença (espectro 2) de luz LED visível, bem como o EIE para o anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO previamente incubado em uma solução contendo o antígeno SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2/anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO) na ausência (espectro 3) e presença (espectro 4) de luz. Como pode ser observado, a incidência de luz proporciona uma diminuição da resistência à transferência de carga entre a sonda redox e a plataforma fotoeletroquímica.

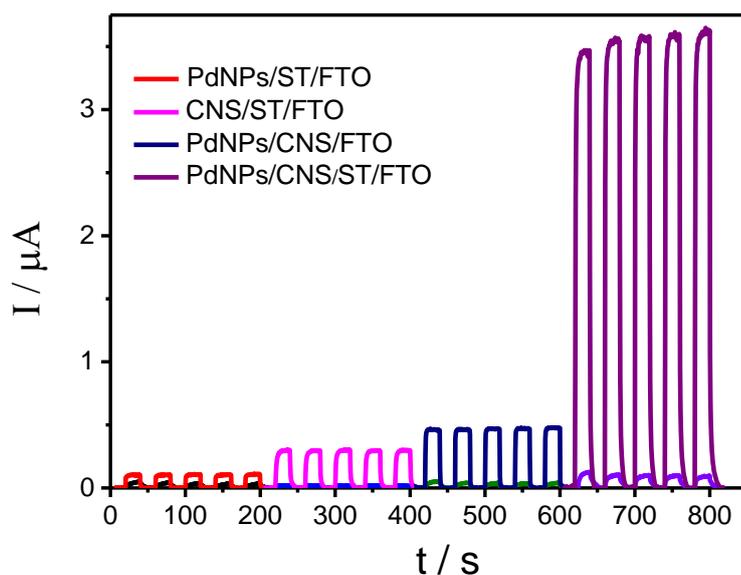
Esses resultados sugerem que o eletrodo modificado com PdNPs/CNS/ST é uma plataforma fotoeletroquímica sensível para monitoramento da interação do antígeno e do

anticorpo do SARS-CoV-2, uma vez que a interação antígeno-anticorpo promoveu uma alteração do sinal analítico obtido com a plataforma para a molécula sonda. Este estudo foi realizado em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução de KCl contendo 5 mmol L^{-1} de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, realizado em potencial de circuito fechado na ausência e presença de luz LED visível.

4.3. Estudo do comportamento amperométrico dos materiais que compõem a plataforma fotoeletroquímica – FEQ

Com o propósito de investigar a atividade fotocatalítica dos materiais que compõem a plataforma FEQ, foram obtidos amperogramas na presença da molécula doadora o ácido ascórbico (AA). Todos os amperogramas foram obtidos em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de TF, pH 7,0, contendo $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de AA e $E_{\text{apl.}} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$. A Figura 30 apresenta as respostas fotoeletroquímicas para os 4 eletrodos preparados separadamente: o eletrodo de FTO modificado com ST e PdNPs (amperograma vermelho), o eletrodo de FTO modificado com ST e CNS (amperograma rosa), o eletrodo de FTO modificado com PdNPs e CNS (amperograma azul) e por fim, o eletrodo de FTO modificado com ST, CNS e PdNPs (amperograma roxo).

Figura 30: Resposta FEQ para os materiais: PdNPs/ST/FTO (amperograma vermelho), CNS/ST/FTO (amperograma rosa), PdNPs/CNS/FTO (amperograma azul) e PdNPs/CNS/ST/FTO (amperograma roxo) na presença de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de AA em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de TF, pH 7,0, $E_{\text{apl.}} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$.



A comparação da fotocorrente das diferentes plataformas FEQs mostra que o FTO modificado com PdNPs/CNS/ST apresentou uma fotocorrente significativamente maior em

relação aos demais eletrodos. Este resultado provavelmente se deve ao forte sinergismo existente em relação ao titanato de estrôncio, nitreto de carbono grafitico dopado com enxofre e nanopartículas de paládio aprisionadas na matriz de hidróxido de alumínio. A combinação desses três materiais proporcionou um aumento na velocidade de transferência eletrônica do AA, favorecendo assim uma maior sensibilidade para o sistema. Assim, as melhores condições para obtenção do sinal analítico da molécula doadora foram ainda avaliadas através do estudo de sua concentração, pH do meio, tipo de solução tampão e potencial aplicado ao eletrodo de trabalho.

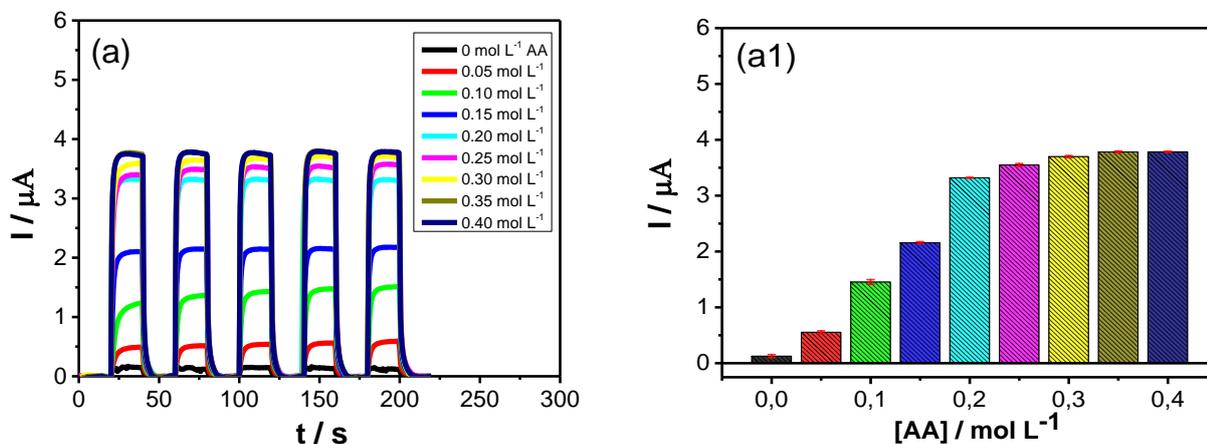
4.4. Otimização dos parâmetros experimentais e operacionais

A fim de se obter os melhores parâmetros experimentais e operacionais para a plataforma FEQ avaliou-se o efeito da concentração da molécula doadora, pH, solução tampão e potencial aplicado.

4.4.1. Concentração do ácido ascórbico como molécula doadora (AA)

A Figura 31(a) mostra o efeito da molécula doadora cujas medidas foram obtidas em diferentes concentrações de AA em 0,1 mol L⁻¹ de TF, pH 7,0 e E_{apl.} = 0,0 V vs Ag/AgCl (KCl_{sat}). Neste sentido, com o objetivo de otimizar o sistema proposto em relação a resposta do AA variou-se a sua concentração de 0 a 0,40 mol L⁻¹. Nota-se um aumento proporcional das fotocorrentes em relação ao aumento da concentração de AA, até não haver mais uma variação significativa. Nessa perspectiva levou-se em consideração utilizar a concentração 0,3 mol L⁻¹ de AA, pois a partir da mesma o valor de fotocorrente foi praticamente invariável, como pode ser observado na Figura 31(a1), a qual apresenta o gráfico de fotocorrente em função as concentrações de AA.

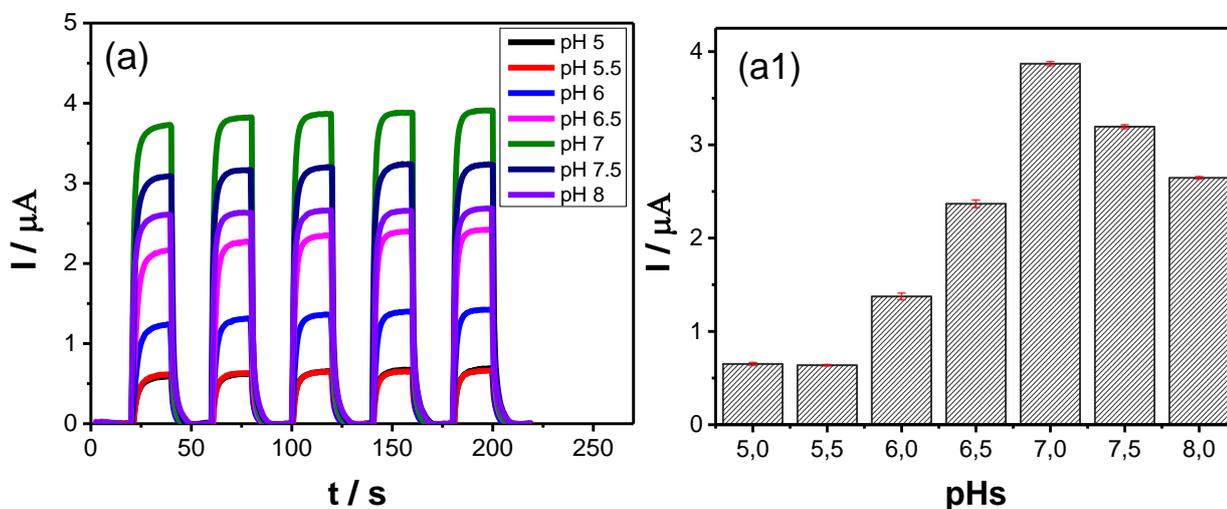
Figura 31: (a) Amperogramas para diferentes concentrações de AA em 0,1 mol L⁻¹ de TF, pH 7,0, E_{apl.} = 0,0 V vs Ag/AgCl (KCl_{sat}). (a1) Gráfico de fotocorrente em função da concentração de AA obtido a partir da Figura 31(a).



4.4.2. Efeito do pH

Posteriormente, o efeito de pH das soluções foi investigado sobre a presença de 0,3 mol L⁻¹ de AA, em diferentes valores de pH, em 0,1 mol L⁻¹ de TF e E_{apl.} = 0,0 V vs Ag/AgCl (KCl_{sat}). A Figura 32(a) apresenta os amperogramas referentes aos diferentes valores de pHs. Como pode ser observado nesta figura a resposta da plataforma FEQ permaneceu constante entre os valores de pH 5 e 5,5, e em seguida aumentou até o pH 7,0. Após esse pH, as correntes para os demais pHs diminuiu até o pH 8,0. A Figura 32 (a1) apresenta o gráfico de fotocorrente em função dos pHs. Percebe-se que o meio neutro proporcionou um maior valor de corrente para o AA, o que pode estar relacionado com a maior estabilidade da plataforma FEQ e o equilíbrio de Ionização do AA. Dessa forma, a solução de pH 7,0 foi a que apresentou maior valor de fotocorrente, sendo fixado para os demais estudos.

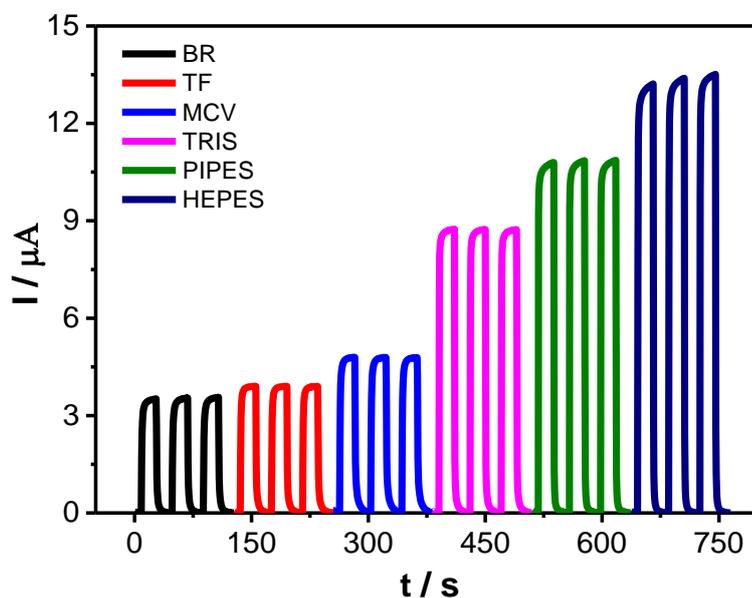
Figura 32: (a) Amperogramas de diferentes valores de pH em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de TF contendo $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de AA. $E_{\text{apl.}} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl (KCl}_{\text{sat}})$. (a1) Gráfico de fotocorrente em função do pH obtido a partir da Figura 32a.



4.4.3. Influência da Solução Tampão

A solução tampão também foi investigada utilizando-se seis tampões diferentes: o TF, HEPES, MCV, BR, PIPES e TRIS. As soluções foram utilizadas com o objetivo de verificar qual solução proporcionaria a melhor resposta frente ao sistema proposto. Nesse sentido, a Figura 33 apresenta os amperogramas referentes ao tipo de solução tampão em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 contendo $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de AA. Observa-se que a solução tampão que proporcionou a melhor resposta de fotocorrente frente ao AA, foi a obtida para o tampão HEPES, dessa forma, tal resultado pode estar associado a uma melhor difusão do AA no eletrólito, havendo uma melhor oxidação do AA na interface eletrodo/solução, conseqüentemente uma melhor resposta de fotocorrente. Neste sentido, fixou-se o tampão para os demais estudos.

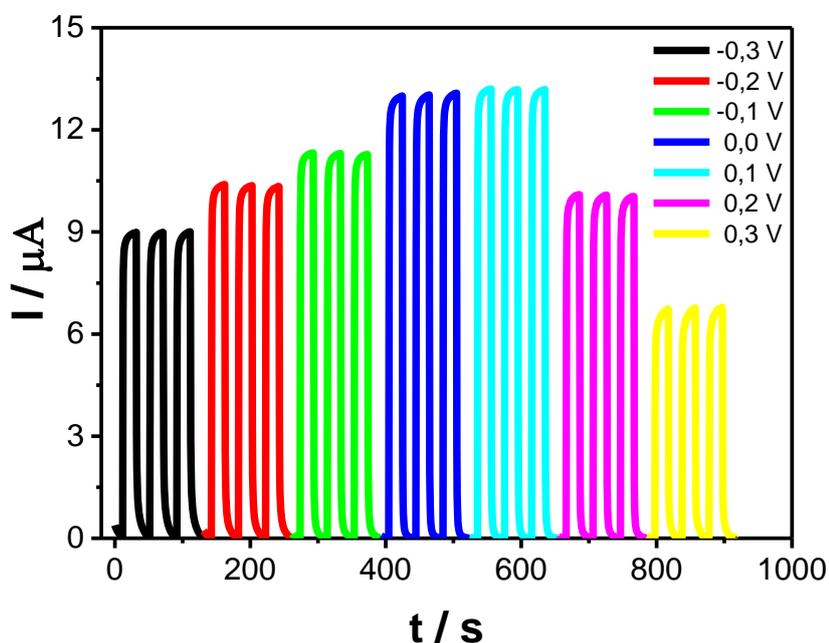
Figura 33: Amperogramas referentes ao tipo de solução tampão (0,1 mol L⁻¹, pH 7,0) contendo 0,3 mol L⁻¹ de AA. E_{apl.} = 0,0V vs Ag/AgCl (KCl_{sat}).



4.4.4. Estudo do Potencial Aplicado (E_{apl.})

Por fim, a Figura 34 mostra a resposta para o sistema FEQ proposto frente a aplicação de diferentes potenciais. Os resultados mostram que a fotocorrente aumenta significativamente de -0,3 a 0,0 V e que não houve uma diferença significativa entre 0,0 e 0,1 V. Do potencial -0,3 a 0,0 V ocorre um favorecimento no processo de oxidação do AA sobre a superfície do eletrodo que se mantém constante até 0,1 V. A partir desse potencial a fotocorrente gerada pela plataforma FEQ diminuiu consideravelmente devido provavelmente a baixa oxidação do analito em potenciais acima de 0,1 V. Entretanto levando-se em consideração a sensibilidade do sistema, bem como a possibilidade de se trabalhar com a plataforma num potencial onde necessita-se de baixa quantidade de energia para promover a oxidação do AA, optou-se em trabalhar com o E_{apl.} = 0,0 V.

Figura 34: Amperogramas referentes à diferentes valores de potenciais aplicados ao eletrodo de trabalho. Experimentos conduzidos em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão HEPES, pH 7,0.



Nessa perspectiva, após a otimização do sistema, os estudos posteriores para a plataforma FEQ PdNPs/CNS/ST/FTO foram realizados em $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de AA, em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão HEPES, pH 7,0 e sob $E_{apl.} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl (KCl}_{sat})$.

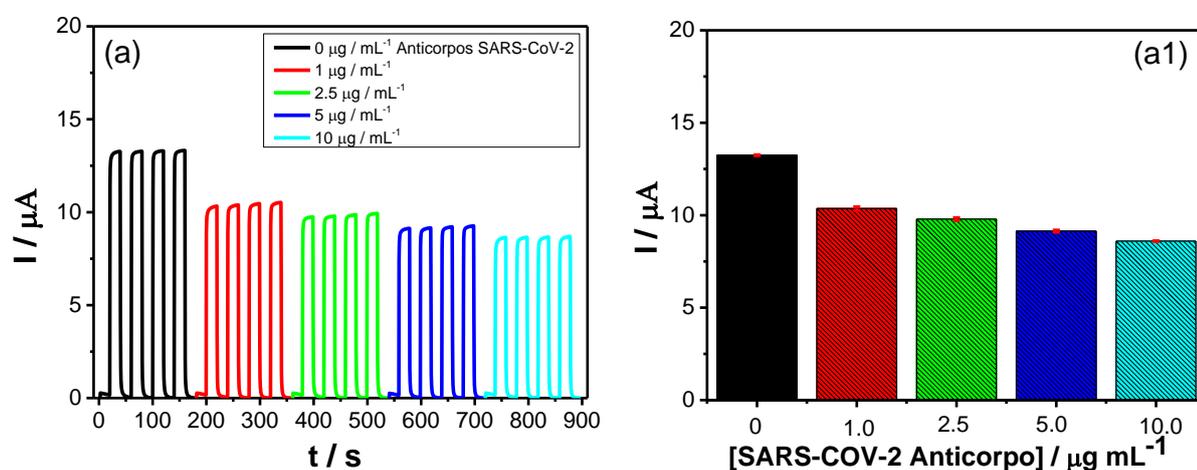
4.5 Efeitos da concentração do anti-SARS-CoV-2 e tempo de incubação/interação sobre a resposta na plataforma FEQ

Após a otimização da plataforma FEQ PdNPs/CNS/ST/FTO, alguns fatores como concentração de anticorpos SARS-CoV-2 imobilizados em sua superfície e o tempo de incubação/interação entre os antígenos e anticorpos de SARS-CoV-2 foram investigados. A Figura 35a mostra uma resposta amperométrica da plataforma FEQ PdNPs/CNS/ST/FTO modificada com anticorpos SARS-CoV-2 em diferentes concentrações $0 - 10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esses resultados foram realizados em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão HEPES, pH 7,0, sob um $E_{apl.}$ de $0,0 \text{ V vs Ag/AgCl (KCl}_{sat})$. A Figura 35a mostra que o aumento da concentração de anticorpos de 0 a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ proporciona uma diminuição gradual na fotocorrente da plataforma FEQ na presença de AA.

Esses resultados sugerem que o anticorpo SARS-CoV-2 dificulta a oxidação da molécula doadora, favorecendo a recombinação de cargas fotogeradas. Observa-se que após a

imobilização do anticorpo há variação na fotocorrente do sistema, que aumenta mais significativamente entre 0 e $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e permanece praticamente constante entre a concentração de 5 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, conforme pode ser observado na Figura 35 (a1). Então, considerando a pequena diferença entre as fotocorrentes para concentrações de anticorpos SARS-CoV-2 entre 5 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a economia do reagente, a concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi fixada para os demais estudos.

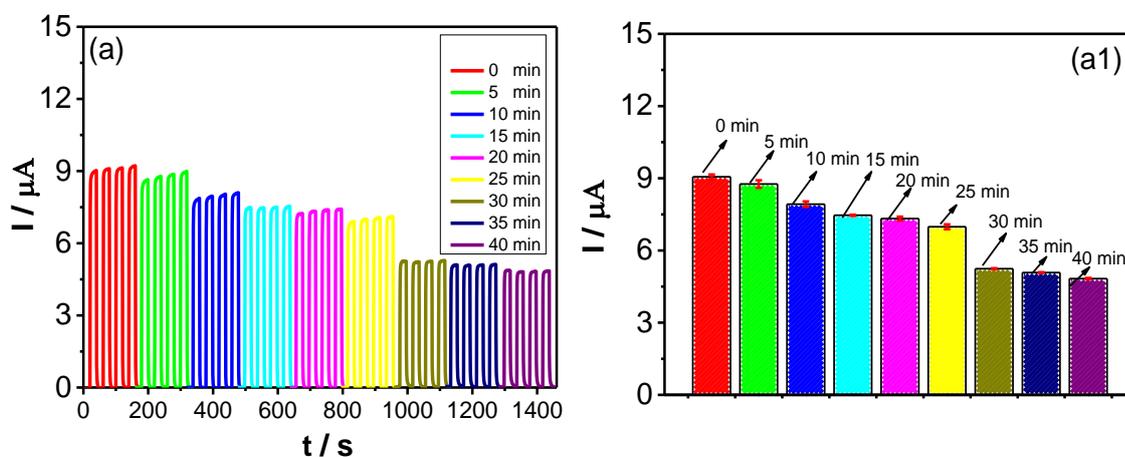
Figura 35: (a) Resposta amperométrica da plataforma FEQ PdNPs/CNS/ST/FTO para diferentes concentrações de anticorpos SARS-CoV-2 ($0 - 10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Experimentos realizados em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ do tampão HEPES, pH 7,0, $E_{\text{apl.}} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl (KCl sat)}$; $T_{\text{incubação}} = 30$ minutos; (a1) Gráfico obtido a partir da Fig. 35a.



O tempo de interação antígeno-anticorpo é extremamente importante para o desenvolvimento e aplicação de um imunossensor com o intuito de se encontrar o tempo mais adequado para que haja uma melhor interação entre os materiais biológicos no imunossensor contendo o anti-SARS-CoV-2. Assim, a Figura 36a mostra amperogramas para diferentes tempos de incubação (0; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; e 40 min) da plataforma anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO em uma solução de SARS-CoV-2.

A Figura 36(a1) mostra que há uma diminuição gradual da fotocorrente de AA na plataforma FEQ até um tempo de 30 minutos, indicando um aumento na recombinação de cargas fotogeradas na superfície do eletrodo. Após este tempo, observa-se que a fotocorrente não muda e permanece constante até 40 minutos. Nesse sentido, foi fixado um tempo de incubação de 30 minutos para a construção da curva analítica.

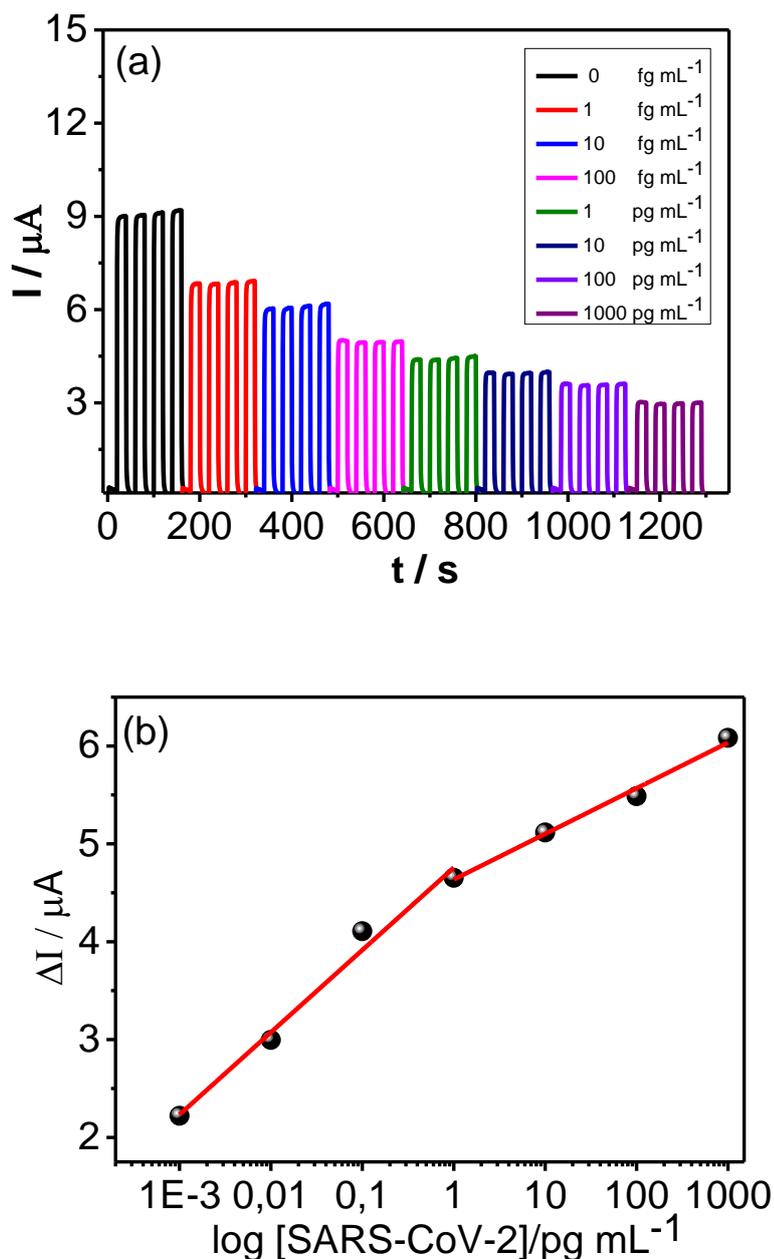
Figura 36: (a) Amperogramas obtidos para diferentes tempos de incubação (5 - 40 minutos) do antígeno SARS-CoV-2 na plataforma FEQ. (a1) Gráfico obtido a partir da Figura 36 (a).



4.6. Caracterização analítica do imunossensor FEQ anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO para detecção de SARS-CoV-2

Após serem definidas os parâmetros experimentais referentes ao imunossensor FEQ anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO, construiu-se uma curva analítica para a determinação de antígenos de SARS-CoV-2. A Figura 37a mostra os amperogramas para diferentes concentrações do antígeno SARS-CoV-2 (0 a 1000 pg mL^{-1}). Nesta Figura, pode-se observar que à medida que a concentração do antígeno foi aumentada, observou-se uma diminuição na fotocorrente do sistema. Como pode ser visto na Figura 37b, a associação entre SARS-CoV-2 e anticorpo imobilizado aumenta a variação da fotocorrente [$\Delta I = (I_0 - I)$] do imunossensor mostrando que a intensidade da fotocorrente é diretamente proporcional ao logaritmo das concentrações de antígeno de SARS-CoV-2, onde I_0 e I são a fotocorrente do imunossensor FEQ anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO antes e após o processo de reconhecimento imunológico de SARS-CoV-2, respectivamente.

Figura 37: (a) Resposta de fotocorrente para imunossensor anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO antes, com $[SARS-CoV-2] = 0 \text{ pg mL}^{-1}$ (amperograma preto) e após incubação de diferentes concentrações de SARS-CoV-2; 1 fg mL^{-1} ; 10 fg mL^{-1} ; 100 fg mL^{-1} ; 1 pg mL^{-1} ; 10 pg mL^{-1} ; 100 pg mL^{-1} ; 1000 pg mL^{-1} (demais amperogramas). (b) Curva analítica para detecção de antígenos SARS-CoV-2 com anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO. Medidas realizadas em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ do tampão HEPES, pH 7,0, contendo $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de AA, $E_{\text{apl.}} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat.})}$. $T_{\text{incubação}} = 30 \text{ minutos}$.



A curva analítica para a detecção de antígenos de SARS-CoV-2 exibiu duas boas relações lineares para concentrações variando de 1 a 100 fg mL⁻¹ e 1 a 1000 pg mL⁻¹. As equações de regressão linear foram $\Delta I/\mu A = 4,76 + 0,84 \log ([SARS-CoV-2] / pg mL^{-1})$, com um coeficiente de correlação de 0,992 e $\Delta I/\mu A = 4,64 + 0,47 \log ([SARS-CoV-2] / pg mL^{-1})$ com coeficiente de correlação de 0,996.

O método proposto é capaz de detectar experimentalmente 1 fg mL⁻¹ considerando a razão sinal ruído igual a 3. As características analíticas deste imunossensor FEQ foram comparadas com métodos relatados anteriormente. Pode ser visto na Tabela 2 que o imunossensor proposto exibe alguns características superiores ou semelhantes aos demais imunossensores para SARS-CoV-2 reportados na literatura.

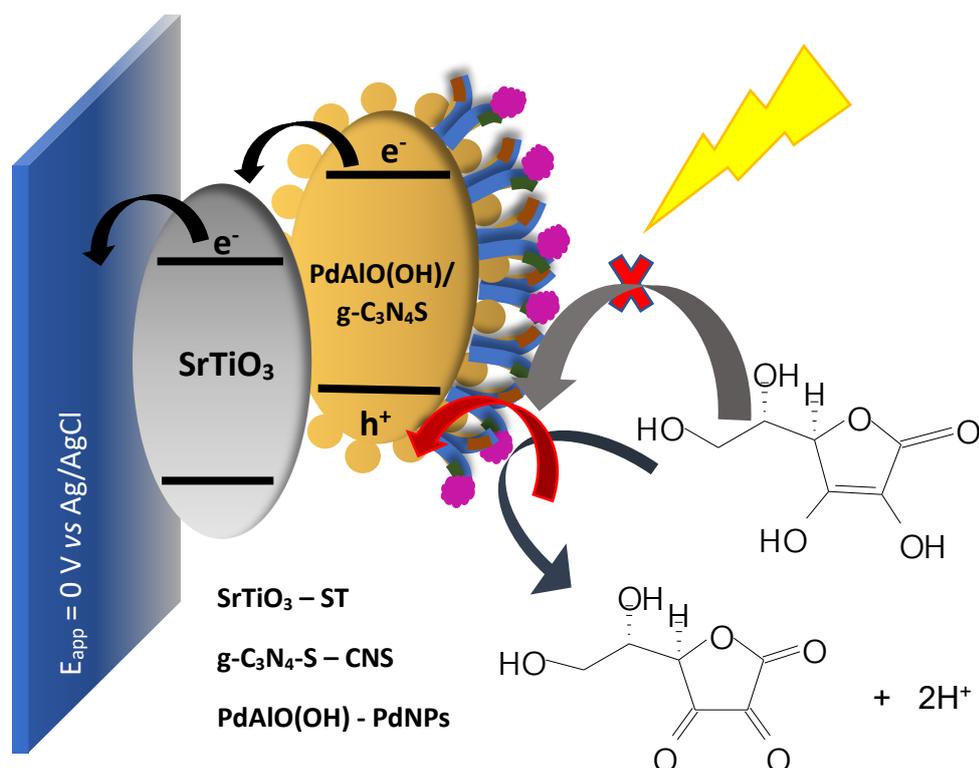
Tabela 2: Comparação de parâmetros analíticos para diferentes sensores eletroquímicos para empregados para determinação de SARS-CoV-2.

Métodos de Detecção	Faixa Linear	LD	Referências
Colorimétrico Eletroquímico	250 - 1000 ng mL ⁻¹ 1 pg mL ⁻¹ – 10 ng mL ⁻¹	47,8 ng mL ⁻¹ 1 pg mL ⁻¹	[Karakus et al, 2021]
Espectroscopia Raman com superfície aprimorada	1 - 2000 pg mL ⁻¹	4 pg mL ⁻¹	[Pramanik et al., 2021]
Eletroquímico	14 - 1400 nM	~0,7 nM	[Vadlamani et al., 2020]
Ressonância plasmônica de superfície localizada	0,1 ng mL ⁻¹ - 10 µg mL ⁻¹	~0,08 ng mL ⁻¹	[Funari et al., 2020]
Calorimétrico	0,2 - 3 ng µL ⁻¹	0,18 ng µL ⁻¹	[Moitra et al., 2020]
Eletroquímico	0,25 fg mL ⁻¹ – 1 µg mL ⁻¹	0,04 fg mL ⁻¹	[Rahmati et al., 2021]
Eletroquímico	1 - 1000 ng mL ⁻¹	0,96 ng mL ⁻¹ 0,14 ng mL ⁻¹	[Yakoh et al., 2021]
Eletroquímico	10 - 75 nM	4,7 nM	[Imran et al., 2021]
Fotoeletroquímico	1 - 100 fg mL ⁻¹ 1 - 1000 pg mL ⁻¹	1 fg mL ⁻¹	Este Trabalho

Posteriormente, foi proposto uma representação esquemática de detecção de SARS-CoV-2 sob iluminação de luz LED visível utilizando o imunossensor anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO FEQ (Figura 38).

De acordo com o mecanismo proposto, o material PdNPs/CNS na superfície da plataforma SrTiO₃/FTO captura fótons promovendo elétrons da banda de valência (BV) para a banda de condução (BC) dando origem a pares e⁻/h⁺. Assim, os elétrons fotogerados na banda condutora de PdNPs/CNS pode ser injetado na banda de condução (BC) da perovskita (SrTiO₃) e posteriormente para o eletrodo FTO e a lacuna na banda de valência (BV) do PdNPs/CNS pode ser transferido para a molécula doadora. Simultaneamente, a proteína SARS-CoV-2 presentes na amostra podem interagir com o anti-SARS-CoV-2 imobilizado, diminuindo a eficiência do sistema para produzir fotocorrente, já que interação anti-SARS-CoV-2/SARS-CoV-2 reduz a eficiência do material fotoativo para transferir lacunas para moléculas doadoras.

Figura 38: Representação esquemática do mecanismo proposto para a detecção fotoeletroquímica do imunossensor anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO.

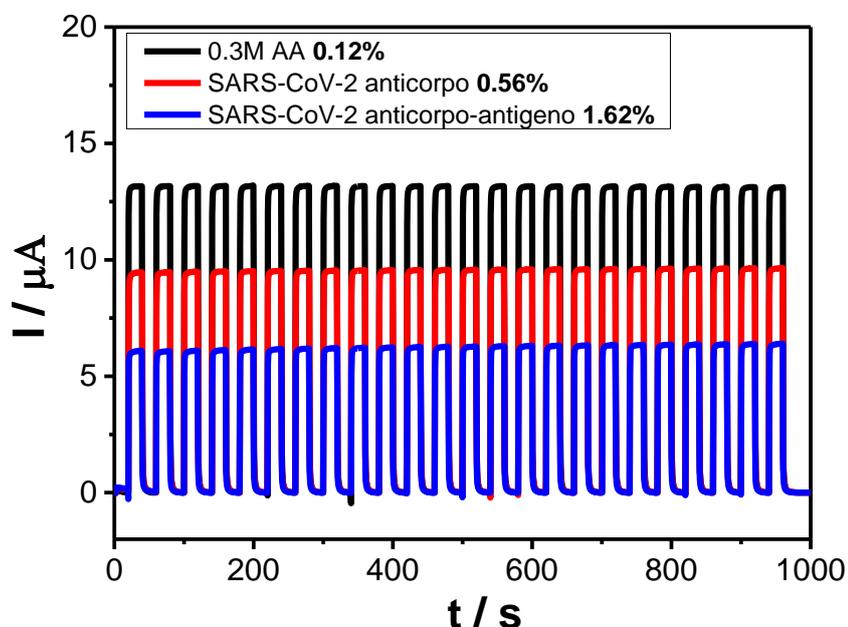


4.7. Avaliação da precisão do imunossensor

A avaliação da precisão do imunossensor FEQ PdNPs/CNS/ST/FTO foi realizada por meio da repetibilidade das medidas (Figura 39). Para este estudo, foram realizadas 24 medidas sucessivas da fotocorrente em um intervalo de tempo de 1000 segundos. Após realizar as medições, foi possível avaliar a precisão do imunossensor considerando o DPR de todos os

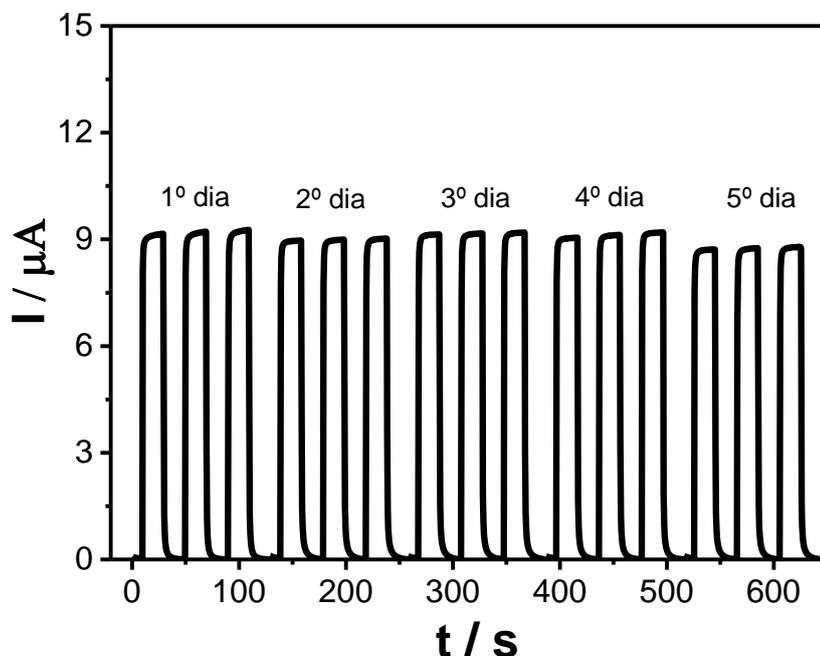
valores de fotocorrente. A partir dos resultados, pode-se observar que o imunossensor antes e após a imobilização com $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anticorpo SARS-CoV-2 e 100pg mL^{-1} de antígeno SARS-CoV-2 nos forneceu excelentes valores de DPR (0,12%, 0,56% e 1,62%), portanto pode-se inferir que o imunossensor possui boa repetibilidade para medições realizadas no mesmo dia útil.

Figura 39: Avaliação da repetibilidade das medições em 1000s, na presença de $0,3 \text{mol L}^{-1}$ AA (amperograma preto), plataforma modificada de anticorpo SARS-CoV-2 (amperograma vermelho) e plataforma modificada de anticorpo-antígeno SARS-CoV-2 (Amperograma azul). [Anti-SARS-CoV-2] = $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e [proteína SARS-CoV-2] = 100pg mL^{-1} .



Adicionalmente, para verificar a estabilidade da plataforma fotoeletroquímica após a imobilização de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do anticorpo SARS-CoV-2 na plataforma PdNPs/CNS/ST/FTO, cinco plataformas fotoeletroquímica foram preparadas da mesma forma e em diferentes dias úteis (Figura 40). Assim, calculou-se um DPR de cerca de 2,31% para as plataformas preparadas, o que sugere que a plataforma FEQ anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO apresenta boa reprodutibilidade

Figura 40: Resposta amperométrica para a plataforma FEQ anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO preparada em dias diferentes. Medidas realizadas em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ do tampão HEPES, pH 7,0, contendo $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ AA, $E_{\text{apl.}} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl (KCl}_{\text{sat.}})$. $[\text{Anti-SARS-CoV-2}] = 5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

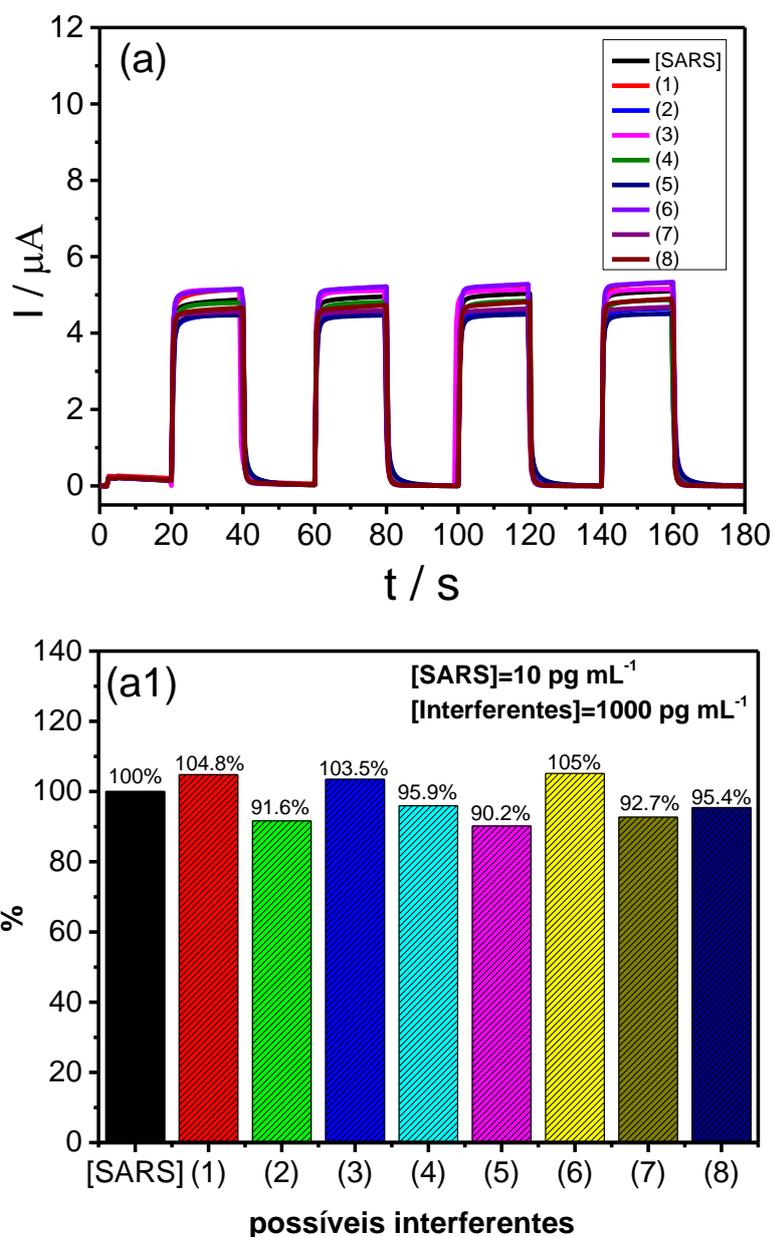


4.8. Seletividade do Imunossensor

Para o estudo de possíveis interferentes que podem afetar a detecção de SARS-CoV-2 nas amostras avaliou-se a influência dos seguintes compostos: glicose (1), citocromo C (2), ureia (3), propil dimetil amina (4), BSA (5), PSA (6), dopamina (7) e troponina (8). O estudo foi realizado na presença de 10 pg mL^{-1} da proteína SARS-CoV-2 e 1000 pg mL^{-1} das possíveis espécies interferentes conforme apresentados na Figura 41(a).

De acordo com os resultados da Figura 41(a1) foi possível observar que não houve uma alteração considerável em termos de percentual de fotocorrente apresentando valores próximos ou inferiores a 5%. Esse resultado indica que o imunossensor proposto apresenta uma boa seletividade para detecção de SARS-CoV-2 na presença dessas espécies, não sendo influenciado pelas respostas dos interferentes testados. Neste sentido, o imunossensor FEQ anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO mostrou-se como uma alternativa eficaz para detecção de SARS-CoV-2 podendo auxiliar no diagnóstico da doença e, conseqüentemente, no controle e combate do coronavírus.

Figura 41: (a) Respostas amperométricas para o imunossensor anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO na presença de possíveis espécies interferentes: Glicose (1), citocromo C (2), ureia (3), propil dimetil amina (4), BSA (5), PSA (6), dopamina (7) e troponina (8). (a1) Gráfico do percentual do efeito desses compostos na determinação de SARS-CoV-2. Medidas realizadas em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão HEPES (pH 7,0), contendo $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ AA, $E_{\text{apl.}} = 0,0 \text{ V}$ vs Ag/AgCl (KCl_{sat}).



4.9. Aplicação do imunossensor FEQ anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO em amostras de saliva artificial

Por fim, avaliou-se a precisão e a aplicabilidade da plataforma fotoeletroquímica projetada para detecção de SARS-CoV-2 em amostras de saliva artificial. Para tanto, preparou-se a proteína SARS-CoV-2 em diferentes concentrações em amostras de saliva artificial para aplicação do imunossensor anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO. As amostras foram enriquecidas com as seguintes concentrações dos antígenos SARS-CoV-2: 1 fg mL⁻¹, 10 fg mL⁻¹, 100 fg mL⁻¹, 1 pg mL⁻¹, 10 pg mL⁻¹ e 100 pg mL⁻¹ e a quantificação dos antígenos nas amostras enriquecidas foi realizada pelo método de calibração externa. Os valores de recuperação encontrados foram de 96,20% e 109,65% com valores baixos de desvio padrão (Tabela 3), indicando uma boa exatidão para o imunossensor proposto.

Tabela 3: Resultados da detecção de SARS-CoV-2 em amostras de saliva artificial usando o imunossensor FEQ anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO.

Amostra	[SARS-CoV-2] Adicionada	[SARS-CoV-2] Encontrada	% Recuperação
Saliva Artificial	1,00 fg mL ⁻¹	1,02 fg mL ⁻¹ (±0,06)	102,00
	10,00 fg mL ⁻¹	10,30 fg mL ⁻¹ (±0,02)	103,00
	100,00 fg mL ⁻¹	108,64 fg mL ⁻¹ (±0,03)	108,64
	1,00 pg mL ⁻¹	0,9989 pg mL ⁻¹ (±0,01)	99,89
	1,00 pg mL ⁻¹	9,62 pg mL ⁻¹ (±0,02)	96,20
	100,00 pg mL ⁻¹	109,65 pg mL ⁻¹ (±0,03)	109,65

Medidas realizadas em triplicata.

5. Resultados e Discussão (Segunda plataforma)

Plataforma BiVO₄/SrTiO₃/FTO

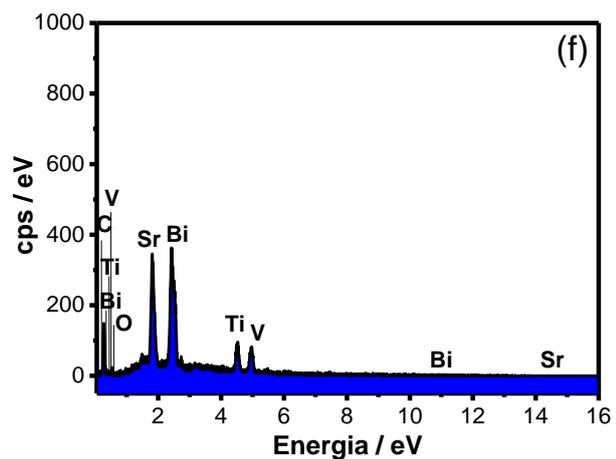
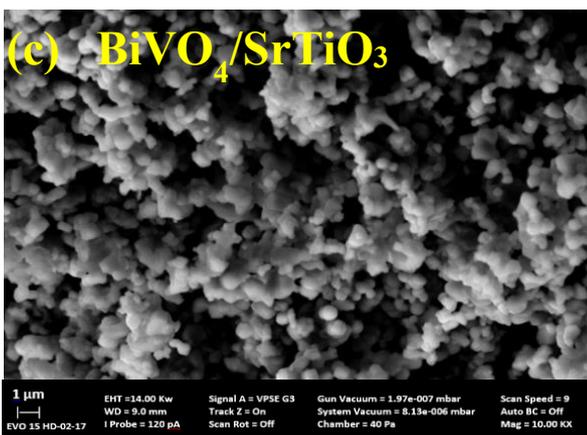
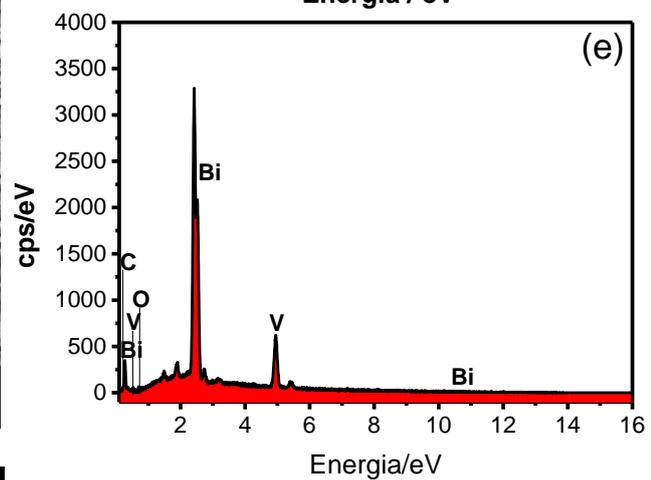
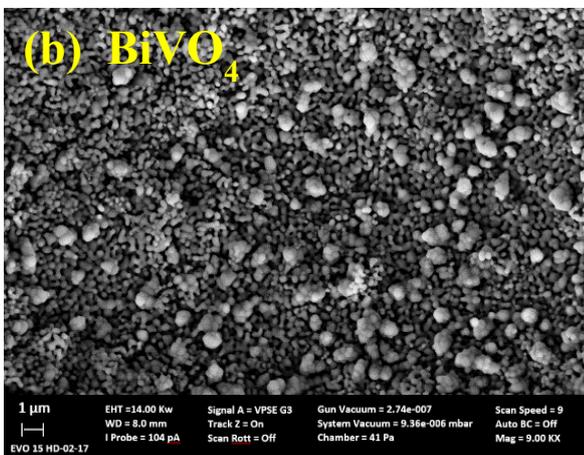
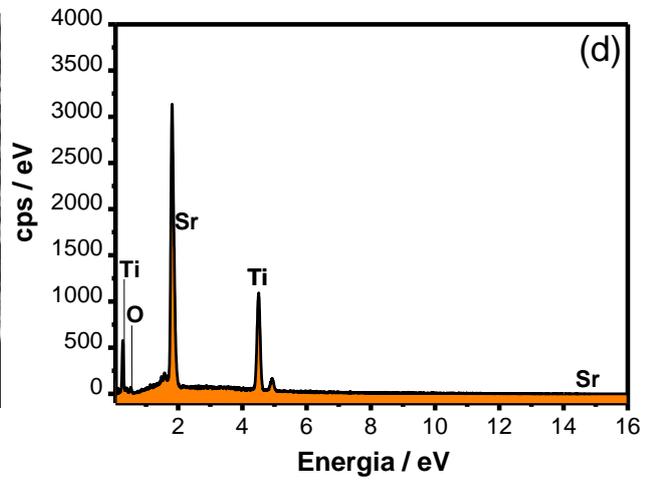
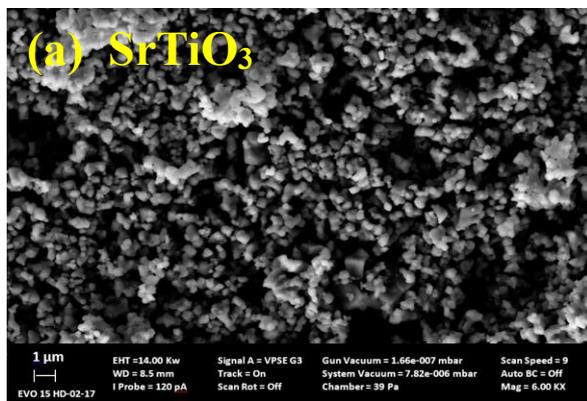
5.1. Caracterização dos materiais SrTiO₃, BiVO₄ e BiVO₄/SrTiO₃ por microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de raios X por energia dispersiva, difração de raio X e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

Com o objetivo de se obter informações sobre a caracterização morfológica e composicional dos materiais que compõem a plataforma proposta realizou-se a microscopia eletrônica de varredura, MEV e espectroscopia de raios X por energia dispersiva, EDS, respectivamente. A Figura 42a apresenta a imagem de MEV para SrTiO₃ na qual é possível visualizar partículas esféricas e aglomeradas para este material. O espectro EDS da amostra SrTiO₃ (Figura 42d) apresentou os picos referentes aos elementos que compõem o material. Picos intensos podem ser observados para o Estrôncio (Sr) e Titânio (Ti), respectivamente. A ausência de outros picos espectrais pode confirmar a pureza do material.

A imagem MEV para o BiVO₄, apresentada na Figura 42b, mostra uma morfologia de forma alongada formada por vários grãos policristalinos, que é característica da fase monoclinica do BiVO₄ e está de acordo com trabalhos relatados na literatura (Prado et al., 2018, Prado et al., 2020). Paralelamente, foi obtido o espectro EDS referente a amostra BiVO₄ (Figura 42e) cuja composição elementar da presença de Bismuto (Bi), Vanádio (V) e Oxigênio (O) foi confirmada.

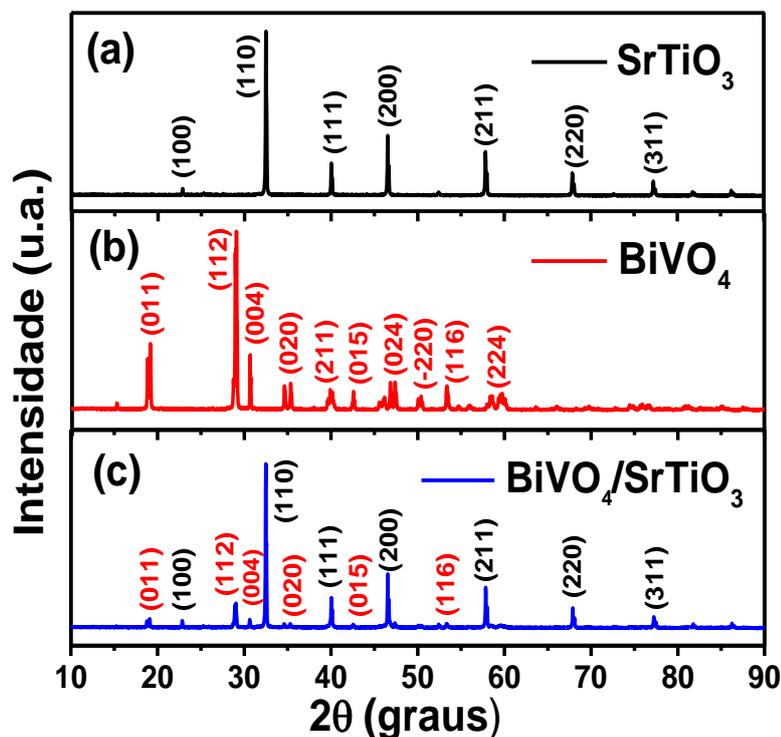
Por fim, a Figura 42c mostra a morfologia do material compósito BiVO₄/SrTiO₃, que apresenta aglomerações de pequenas partículas de diferentes tamanhos. O espectro EDS (Figura 37f), confirma a mistura de materiais, no qual é possível observar picos referentes a cada um dos materiais que compõem a plataforma. A composição percentual dos seguintes elementos foram encontrada: 63,94% para o Bi, 31,88% para o Sr, 15,36% para o V, 15,16% para o Ti e 1,89% para o O.

Figura 42: Imagens MEV para (a) SrTiO_3 ; (b) BiVO_4 e (c) $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3$ e os respectivos espectros de EDS obtidos para (d) SrTiO_3 , (e) BiVO_4 e (f) $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3$.



Adicionalmente, realizou-se a difração de raio X dos materiais. A Figura 43 mostra os padrões DRX para o SrTiO_3 , BiVO_4 e o composto $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3$. Para o SrTiO_3 (Figura 43a), os picos são observados em $22,8^\circ$, $32,4^\circ$, $40,0^\circ$, $46,5^\circ$, $52,4^\circ$, $57,8^\circ$, $67,8^\circ$ e $77,2^\circ$ correspondentes aos planos cristalinos (1 0 0), (1 1 0), (1 1 1), (2 0 0), (2 1 0), (2 1 1), (2 2 0) e (3 1 0), que são característicos da fase cúbica do SrTiO_3 (JCPDS 00-35-0734) (Raschetti et al., 2017; Lim et al., 2020; Le et al., 2021). O padrão DRX para o BiVO_4 (Figura 43b) contém picos correspondentes aos planos cristalinos (1 0 1), (0 1 1), (1 1 2), (0 0 4), (0 2 0), (2 1 1), (0 1 5), (0 2 4), (-2 2 0), (1 1 6) e (2 2 4), pertencentes à estrutura monoclinica do BiVO_4 (JCPDS 01-083-1698) (Raeisi et al., 2022; Prado et al., 2018). Por fim, para o composto (Figura 43c), observam-se picos característicos tanto da fase BiVO_4 quanto da fase SrTiO_3 .

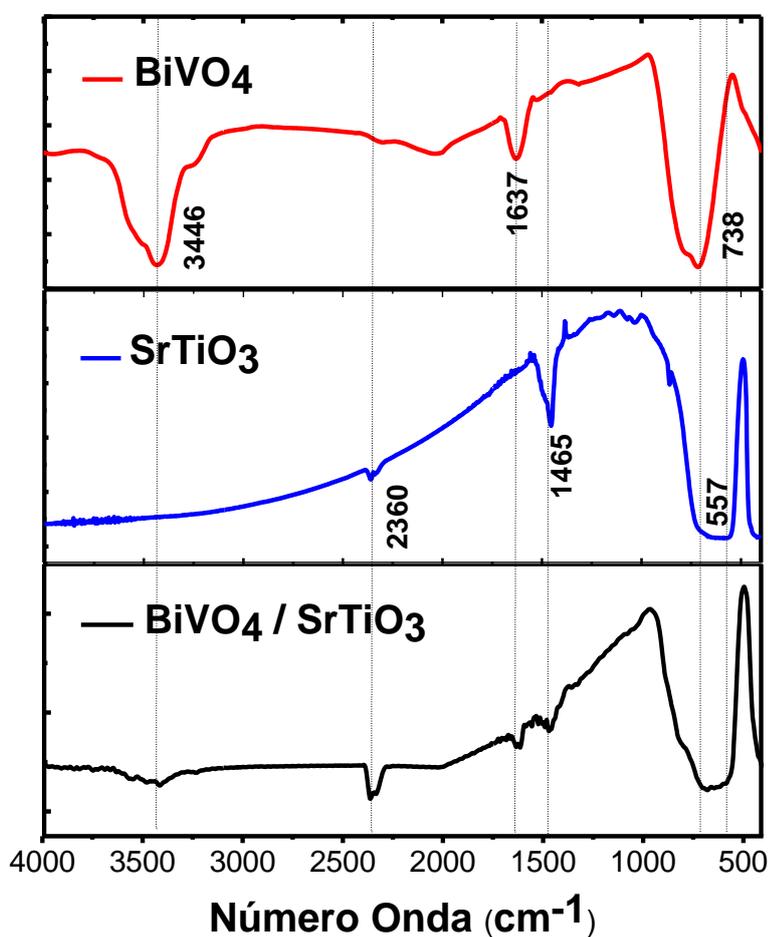
Figura 43: Padrões de difração de raios X do (a) SrTiO_3 , (b) BiVO_4 e (c) $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3$.



A Figura 44 mostra uma comparação dos espectros de FTIR dos materiais BiVO_4 (espectro vermelho), SrTiO_3 (espectro azul) e $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3$ (espectro preto). Observa-se que o espectro de FTIR para BiVO_4 apresenta um pico amplo e intenso na faixa de $3200\text{--}3550\text{ cm}^{-1}$ e um pico em 1637 cm^{-1} que podem ser correlacionadas com as vibrações de flexão e estiramento de moléculas de água adsorvidas (Ke et al., 2009; Fang et al., 2016). Uma banda evidente pode ser observada entre $700\text{ a }800\text{ cm}^{-1}$ característica do material a qual está associada à vibração de flexão do grupo VO_4^{3-} (Fang et al., 2016).

Para o espectro azul, referente ao SrTiO₃, nota-se uma banda por volta de 2300 cm⁻¹ que pode ser atribuído as deformações de moléculas de CO₂ adsorvidas (Troque et al., 2018). A banda em 1465 cm⁻¹ refere-se às vibrações de estiramento do Sr-Ti-O. O pico de absorção em 557 cm⁻¹ é característico da vibração de estiramento da ligação Sr-Ti. (Rajkoomar et al., 2020). O espectro do compósito BiVO₄/SrTiO₃ revelou a combinação dos materiais, pois apresentou as bandas características dos materiais individuais, indicando a presença de ambos no compósito.

Figura 44: Espectros de FTIR para os materiais BiVO₄, SrTiO₃ e BiVO₄/SrTiO₃, respectivamente.

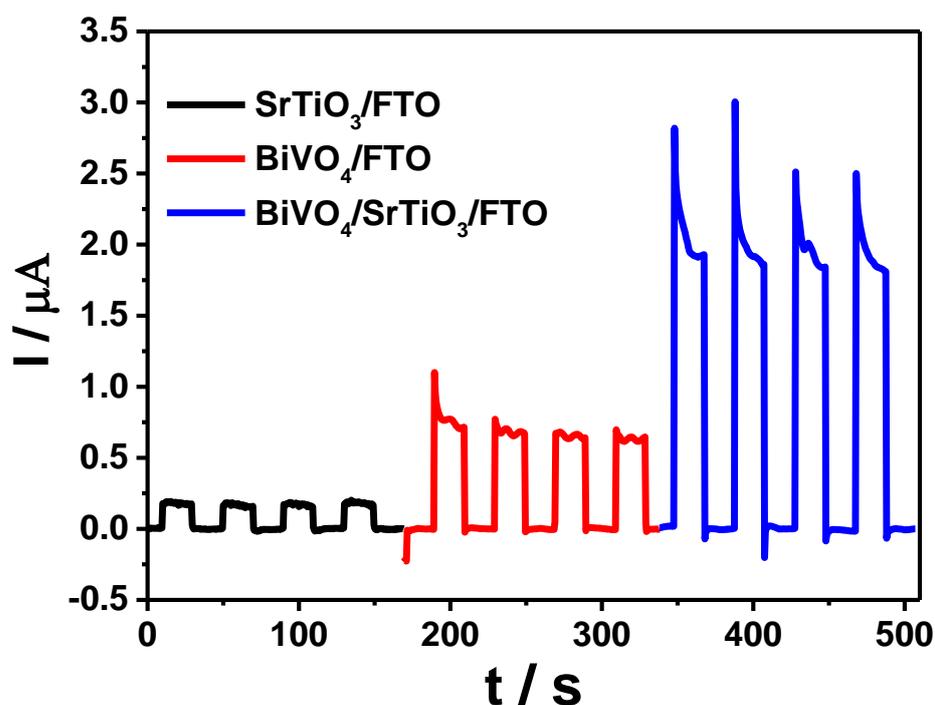


5.2. Caracterização eletroquímica e Medições FEQs

A Figura 45 mostra as medidas amperométricas pertencentes as plataformas SrTiO₃/FTO (amperograma preto), BiVO₄/FTO (amperogramas vermelho) e BiVO₄/SrTiO₃/FTO (amperograma azul). As medidas foram realizadas na ausência e incidência de luz LED, em 0,1 mol L⁻¹ de TF, pH 7,4, na presença de 0,3 mol L⁻¹ de AA e E_{apl.} 0.0V vs Ag/AgCl

(KCl_{sat}). Observa-se que a fotocorrente obtida para a plataforma BiVO₄/SrTiO₃/FTO, é significativamente elevada, comparada com as correntes das demais plataformas (SrTiO₃/FTO e BiVO₄/FTO), sugerindo que há uma eficiente transferência de elétrons da molécula doadora (AA) para as plataformas, devido a uma menor recombinação de cargas elétron/lacuna (e⁻/h⁺), que conseqüentemente gera o aumento de fotocorrente, resultando na eficácia da combinação desses materiais.

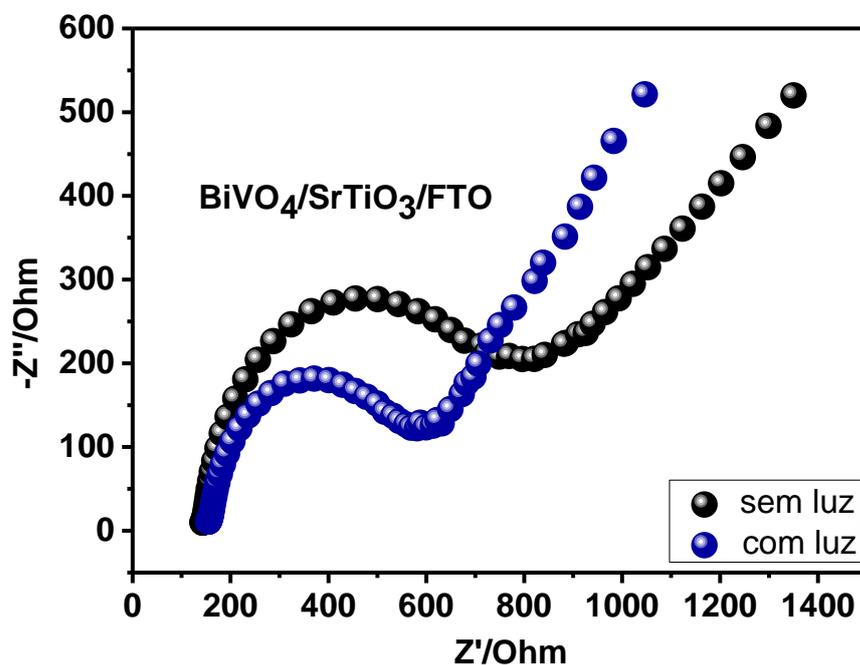
Figura 45: Medidas amperométricas obtidas para as plataformas FEQs SrTiO₃/FTO (amperograma preto); BiVO₄/FTO (amperograma vermelho); BiVO₄/SrTiO₃/FTO (amperograma azul). As medidas foram realizadas em solução tampão TF 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4 e E_{apl.} 0,0 V vs Ag/AgCl (KCl_{sat}), contendo 0,3 mol L⁻¹ de AA.



A técnica espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) fornece uma visão detalhada das características elétricas e comportamento geral do sistema. Neste sentido, foram realizadas medidas EIE para se avaliar a resistência a transferência de carga na interface eletrodo/solução. A Figura 46 mostra a curva de Nyquist para a plataforma BiVO₄/SrTiO₃/FTO. Os experimentos foram obtidos em 0,1 mmol L⁻¹ de KCl contendo 5 mmol L⁻¹ ferricianeto de potássio, na ausência (espectro preto) e incidência de luz (espectro azul), num E_{apl.} de 0,3 V vs Ag/AgCl (KCl_{sat}). Através dos resultados é possível notar que a plataforma é sensível a

iluminação e que durante a incidência de luz há uma menor resistência de transferência de carga (390Ω), comparado com a resistência a transferência de carga do material na ausência de luz (610Ω), dessa forma há uma elevada taxa de portadores (e^-/h^+) na superfície do FTO.

Figura 46: Curva de nyquist para a plataforma $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ na ausência (espectro preto) e presença de luz LED (espectro azul). Gráfico obtido em solução de KCl $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ contendo $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $E_{\text{apl.}} = 0,3 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$.



A Figura 47 mostra os EIS para o imunossensor FEQs S-Anti-SARS-CoV e N-Anti-SARS-CoV na ausência (espectros preto e verde) e incidência de luz LED (espectros vermelho e azul), respectivamente. De acordo com o gráfico apresentado, observa-se que os imunossensores FEQs apresentam uma sensibilidade eficaz para o controle de SARS-CoV-2, indicando a interação entre a plataforma, através da propriedade de transporte de carga entre o material semiconductor no eletrodo e o eletrólito. Os valores de resistência de transferência de carga das plataformas são mostrados na tabela 4, na qual os espectros de Nyquist foram obtidos e simulados utilizando-se um circuito baseado na resistência da solução (R_s), associado a um resistor (R_{ct} - Resistência a transferência de carga) e um elemento de constante de fase (Y_0).

Figura 47: Curva de nyquist para os imunossensores (S-Anti-SARS CoV/BiVO₄/SrTiO₃/FTO e N-Anti-SARS-CoV/BiVO₄/SrTiO₃/FTO na ausência (espectro verde e preto) e presença de luz LED (espectro azul e vermelho). Gráficos obtido em 0,1 mmol L⁻¹ de KCl contendo 5 mmol L⁻¹ K₃[Fe (CN)₆] e E_{apl.} = 0,3 V vs Ag/AgCl (KCl_{sat}).

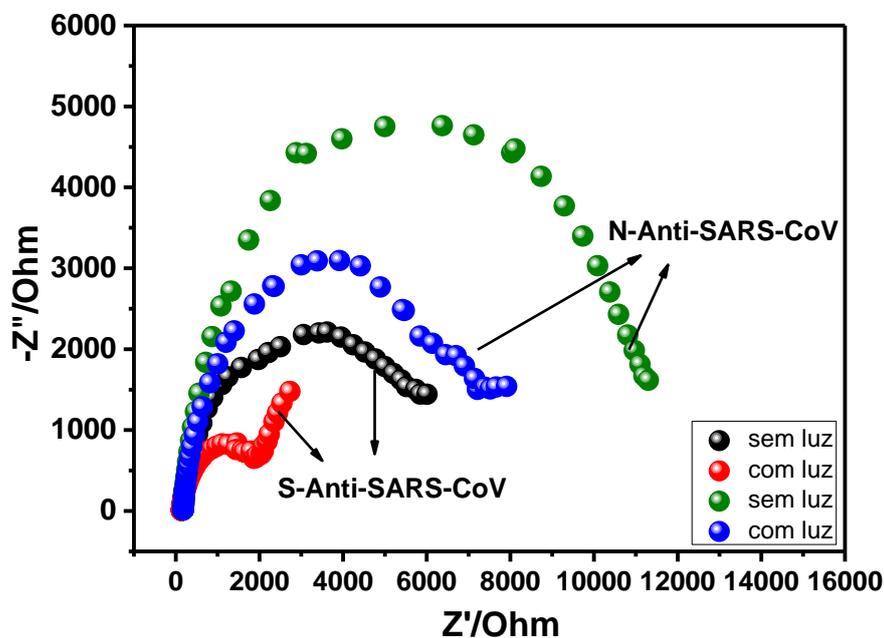


Tabela 4: Valores dos parâmetros e componentes utilizados nos gráficos de nyquist para as plataformas BiVO₄/SrTiO₃/FTO, N-Anti-SARS-CoV/BiVO₄/SrTiO₃/FTO e S-Anti-SARS-CoV/BiVO₄/SrTiO₃/FTO.

BiVO₄/SrTiO₃/FTO	R _s (Ω)	R _{ct} (Ω)	Y _o (μΩ)	N
Com luz	153,47	390	13,97	0,904
Sem luz	143,86	610	13,83	0,909
N- Anti-SARS-CoV				
Com luz	176,47	6567,1	12,36	0,912
Sem luz	178,2	10717	10,33	0,931
S- Anti-SARS-CoV				
Com luz	142,04	1585,2	24,36	0,901
Sem luz	141,82	5150,6	27,87	0,874

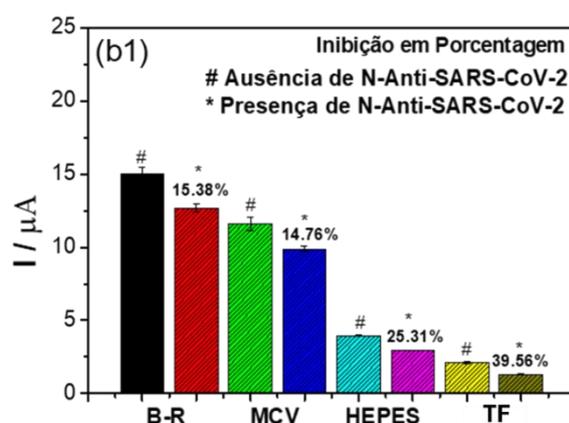
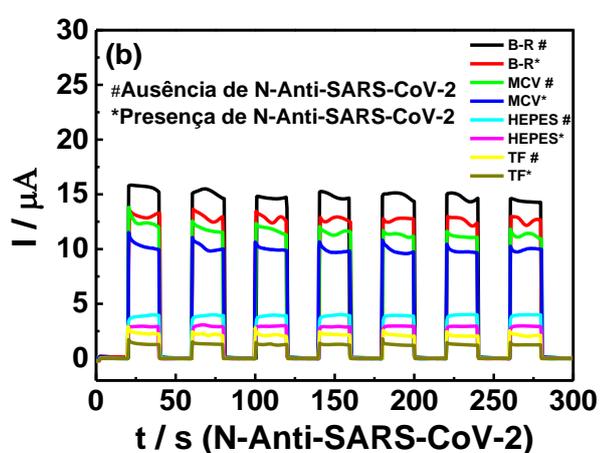
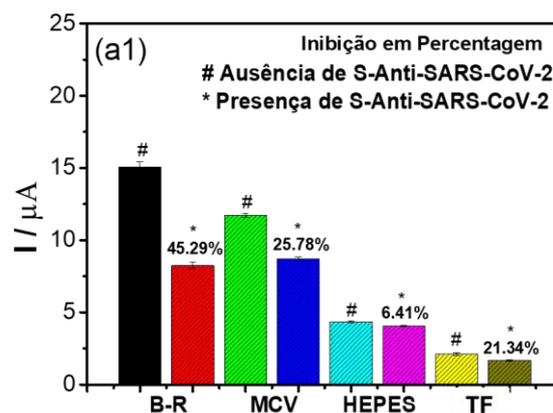
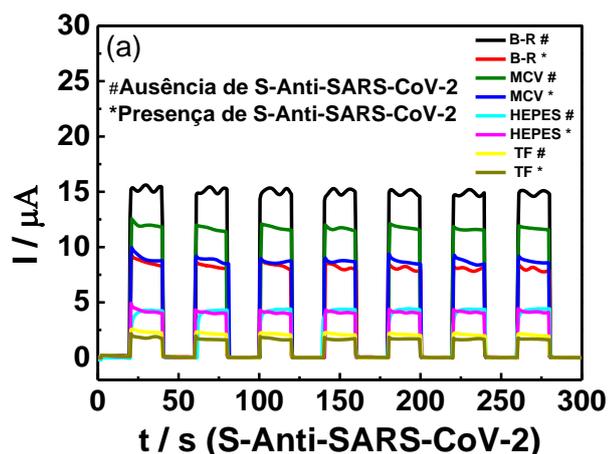
5.3. Otimização dos parâmetros experimentais

Para a obtenção de uma melhor resposta do sinal analítico para a plataforma FEQ modificada e não modificada com anticorpos de SARS-CoV-2 realizou-se o estudo de diferentes soluções tampões. Para cada imunossensor proposto foi avaliado o percentual de inibição de fotocorrente. Neste sentido, a Figura 48 mostra as medidas amperométricas para quatro tampões o BR, MCV, HEPES e TF. Conforme as Figuras 48a e 48b, observa-se os amperogramas para cada tampão em $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de AA e os amperogramas obtidos para cada plataforma modificada com $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos anticorpos espícula e nucleocapsídeo. Na Figura 48a1, é possível notar os percentuais de inibição de fotocorrente para cada plataforma modificada com o anticorpo espícula (S-Anti-SARS-CoV/BiVO₄/SrTiO₃/FTO). A maior fotocorrente foi obtida para o tampão BR tendo-se um percentual de inibição de fotocorrente neste tampão de 45,29%, bem maior comparado a demais plataformas que foram 25,78%, 6,41% e 21,34%, respectivamente.

Para comparação, a Figura 48b1 mostra a inibição de fotocorrente para cada plataforma modificada com o anticorpo nucleocapsídeo (N-Anti-SARS-CoV/BiVO₄/SrTiO₃/FTO), A maior fotocorrente foi obtida para o tampão BR, entretanto, neste tampão a inibição de fotocorrente foi 15,38%, maior quando comparada à corrente do tampão MCV (14,76%) e bem menor comparado as correntes dos tampões HEPES e TF (25,31% e 39,56%, respectivamente).

No entanto, como visamos trabalhar com a maior fotocorrente devido a necessidade do monitoramento da diminuição do sinal analítico, logo o tampão BR, pH 7,4, foi escolhido para as demais medidas. Assim a possibilidade da obtenção dessa maior fotocorrente pode ser atribuída ao efeito de algum íon utilizado no preparo desta solução tampão (ácido acético, ácido bórico e ácido fosfórico).

Figura 48: (a) Medidas amperométricas para a plataforma BiVO₄/SrTiO₃/FTO modificada com anticorpos espícula (S-Anti-SARS-CoV-2), em diferentes soluções tampão a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4 contendo $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de AA e $E_{\text{apl.}} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$. (a1) Fotocorrente em função de diferentes soluções tampão e avaliação do percentual de inibição da fotocorrente pelo anticorpo espícula para cada solução tampão. (b) Medições amperométricas para plataforma BiVO₄/SrTiO₃/FTO modificada com anticorpo nucleocapsídeo (N-Anti-SARS-CoV-2), em diferentes soluções tampão em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4, contendo $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de AA e $E_{\text{apl.}} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$. (b1) Fotocorrente em função de diferentes soluções tampão e avaliação do percentual de inibição da fotocorrente do anticorpo nucleocapsídeo para cada solução tampão.

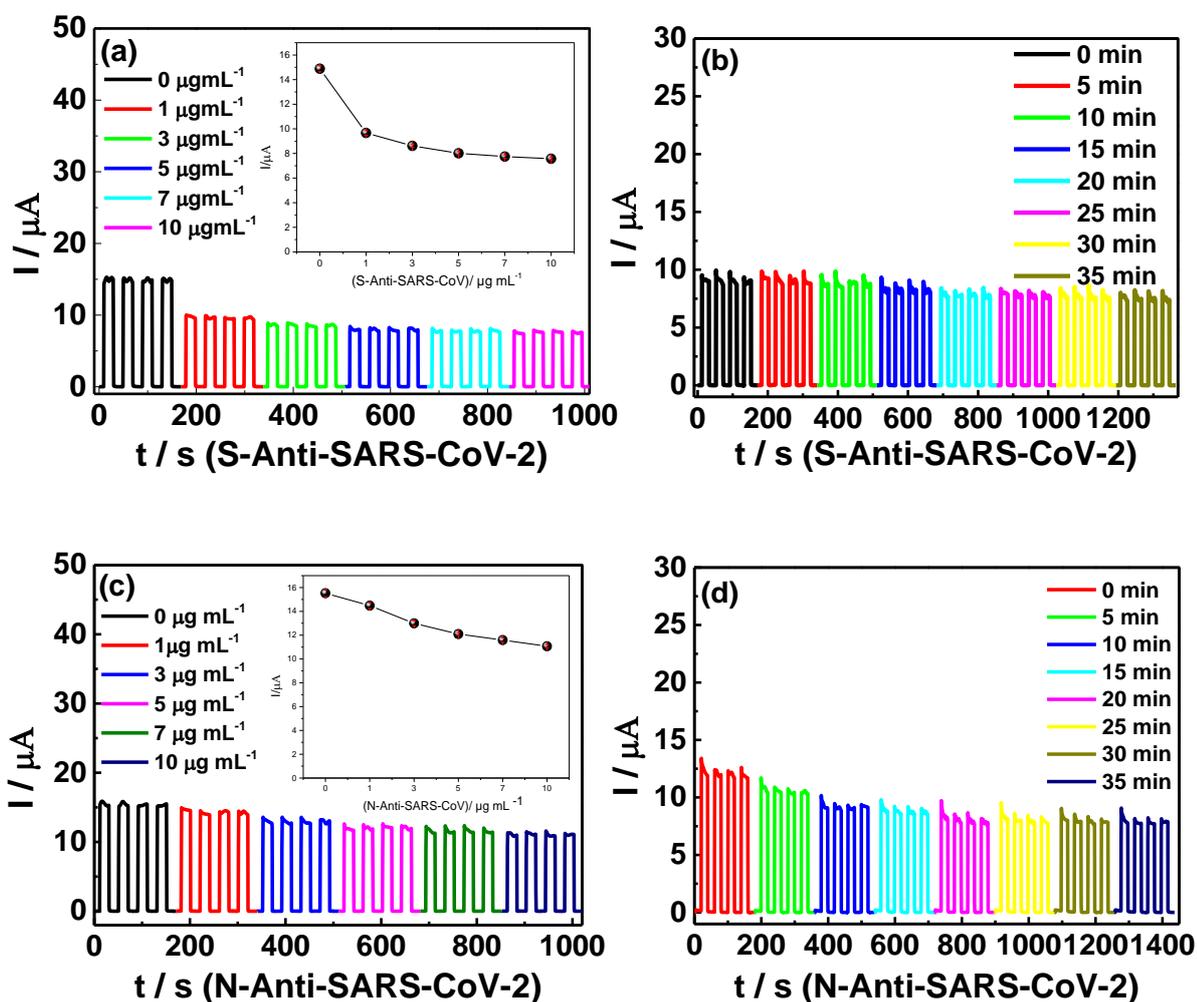


A próxima condição experimental avaliada foi a concentração de anticorpos SARS-CoV-2e spícula e nucleocapsídeo no desempenho analítico da plataforma para detectar proteínas N e S. A Figura 49a mostra as medidas amperométricas para a plataforma $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ modificada apenas com anticorpos espícula, em diferentes concentrações ($0, 1, 3, 5, 7$ e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Conforme observado, a resposta da fotocorrente diminui gradativamente com o aumento da concentração do anticorpo até $3 \mu\text{g mL}^{-1}$, e acima desta concentração não se observa alteração significativa na fotocorrente. Essa redução na fotocorrente é esperada, pois a imobilização do anticorpo espícula na superfície dificulta a oxidação do AA. Em estudo paralelo, a Figura 49c mostra as medidas amperométricas para a plataforma $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ modificada apenas com anticorpos nucleocapsídeo, nas mesmas condições de concentração ($0, 1, 3, 5, 7$ e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Observa-se que embora o percentual de inibição da fotocorrente após a imobilização com anticorpo nucleocapsídeo tenha sido menor, quando comparado aos anticorpos espícula, ainda há uma redução da fotocorrente no sistema após a incubação com concentrações crescentes de anticorpos nucleocapsídeo.

Levando em consideração a menor quantidade de reagente e a mínima variação da fotocorrente, a concentração intermediária de $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi escolhida para estudos posteriores. O estudo do tempo de interação entre as proteínas alvo N e S e os anticorpos é imensamente importante para o imunossensor obter a maior eficácia de hibridização entre a plataforma e as proteínas alvo. A Figura 49b mostra a resposta amperométrica realizada para diferentes tempos de incubação de 0 a 35 minutos, para o imunossensor S-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO em solução de proteína S-SARS-CoV-2. Uma diminuição significativa na fotocorrente é observada por até 20 minutos.

Após este tempo, a resposta da fotocorrente manteve-se praticamente constante. Da mesma forma, para a Figura 49d, avaliou-se o tempo de incubação do imunossensor N-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO em solução de proteína N-SARS-CoV-2, e a resposta fotocorrente também permaneceu constante após 20 minutos. Portanto, o tempo de incubação de 20 minutos foi fixado para os próximos estudos.

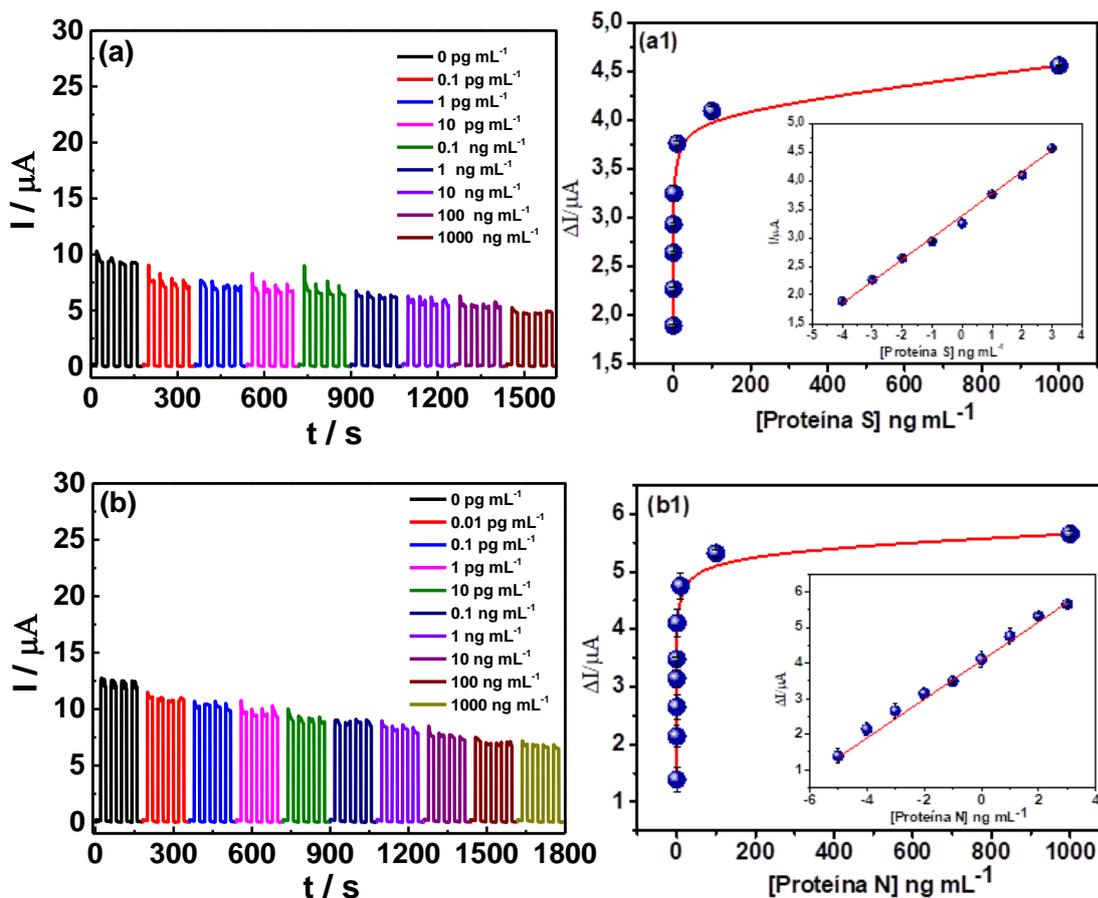
Figura 49: (a) Amperograma para plataforma $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ modificado com diferentes concentrações de anticorpos S ($0-10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Gráfico inserido: fotocorrente vs. concentração de anticorpo S. (b) Amperograma obtido para diferentes tempos de incubação para a detecção da proteína alvo S-SARS-CoV-2 (10 pg mL^{-1}) de 0 a 35 min (c) Amperograma para a plataforma $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ modificada com diferentes concentrações de N anticorpos ($0-10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Gráfico inserido: fotocorrente vs concentração de anticorpo N. (d) Amperograma obtido para diferentes tempos de incubação para a detecção da proteína alvo N-SARS-CoV-2 (10 pg mL^{-1}) de 0 a 35 min. Todas as medidas foram realizadas em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4, $E_{\text{apl}} = 0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}$. Todos os experimentos continham $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de AA.



5.4. Desempenho analítico do imunossensor FEQ (S ou N) -Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO

A curva de calibração analítica obtida com o imunossensor FEQ para detectar ambas as proteínas SARS-CoV-2 é apresentada na Figura 50. A Figura 50a mostra a resposta amperométrica para a plataforma S-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO em diferentes concentrações de proteína S de 0,1 a 1000 ng mL⁻¹. Esta Figura mostra que o aumento da concentração da proteína S-SARS-CoV-2 é proporcional à diminuição da fotocorrente. Isso ocorre devido à interação entre o antígeno e o anticorpo na superfície do eletrodo. A Figura 50a1 apresenta a curva de calibração da concentração da proteína S-SARS-CoV-2 para a faixa de concentração investigada. Para esta configuração de detecção, a menor concentração detectável de proteína S é de 0,1 ng mL⁻¹, expressa pela seguinte equação: $\Delta I/\mu A = 3.38 + 0.383 \log ([\text{SARS-COV-Espícula}] / \text{ng mL}^{-1})$, com um coeficiente de correlação de 0.998 (n=8). Nas mesmas condições experimentais, obteve-se a curva para a plataforma N-Anti-SARS-CoV/BiVO₄/SrTiO₃/FTO (Figura 50b), exibindo uma faixa linear de 0,01pg mL⁻¹ - 1000 ng mL⁻¹ (Figura 50b1), apresentando a seguinte equação da reta: $\Delta I/\mu A = 4.06 + 0.54 \log ([\text{SARS-COV-Nucleocapsídeo}] / \text{ng mL}^{-1})$, com coeficiente de correlação de 0.996 (n=9). O imunossensor proposto obteve amplas faixas lineares para detecção de SARS-CoV-2, podendo detectar experimentalmente 0,1 pg mL⁻¹ e 0,01 pg mL⁻¹. Estes parâmetros foram comparados com outros trabalhos reportados na literatura.

Figura 50: (a) Amperogramas obtidos para o imunossensor S-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO antes da incubação e após a incubação em diferentes concentrações de proteína S (0-1000 ng mL⁻¹). (a1) Curva de calibração para diferentes concentrações de proteína S. As medidas foram realizadas em tampão BR 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4, E_{apl.} = 0,0 V vs Ag/AgCl (KCl_{sat}). (b) Amperogramas obtidos para o imunossensor N-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO antes da incubação e após a incubação em diferentes concentrações de proteína N (0-1000 ng mL⁻¹). (b1) Curva de calibração para diferentes concentrações de proteína N. Todos os experimentos continham 0,3 mol L⁻¹ de AA. Tempo de incubação = 20 minutos.



A tabela 5, mostra diferentes técnicas e parâmetros analíticos utilizados para detecção de SARS-CoV-2. Como pode ser observado na tabela os trabalhos realizados por outros pesquisadores apresentam excelentes resultados de detecção das proteínas S ou N. Nota-se que o imunossensor proposto obteve uma faixa linear próxima e/ou até melhor que alguns trabalhos, além de um tempo de incubação de 20 minutos. Em relação as plataformas FEQ, observa-se que o E_{apl} de 0,0 V foi semelhante ou superior ao demais imunossensores, entretanto é importante ressaltar que a maioria das plataformas desenvolvidas realizam a detecção de apenas uma proteína e utilizam a lâmpada de Xenônio (Xe), tendo um custo mais elevado, bem como um sistema comercial de alto custo, enquanto que o sistema proposto faz a detecção de duas proteínas de SARS-CoV-2 e utiliza apenas uma lâmpada LED comercial de 36 W, acoplada a uma caixa artesanal.

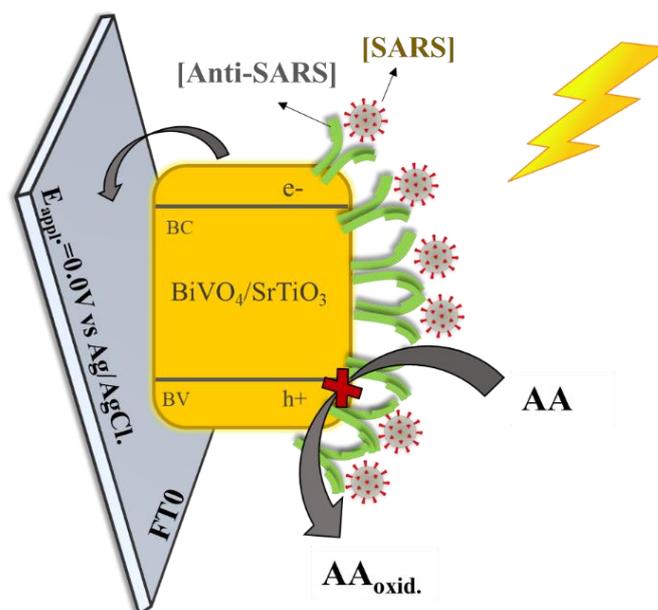
Tabela 5: Diferentes parâmetros analíticos para determinação de SARS-CoV-2 relatados na literatura e comparação com o imunossensor desenvolvido SARS-CoV-2.

Método	Deteção	Faixa Linear	LD	E_{apl}	Lâmpada	Referência
Eletroquímico	PLpro	1 pg mL ⁻¹ a 10 µg mL ⁻¹	1 pg mL ⁻¹	-	-	[Liang Qizhi et al., 2023]
Eletroquímico	Proteína Espícula	0,1-1000 ag mL ⁻¹	0,01ag mL ⁻¹	-	-	[Liv, 2021]
Eletroquímico	Proteína Espícula	1-1000 ng mL ⁻¹	0,11 ng mL ⁻¹	-	-	[Yakoh et al., 2021]
Calorimétrico	Proteína Espícula	1-100 ng mL ⁻¹	1 ng mL ⁻¹	-	-	[Prainito et al., 2022]
Calorimétrico	Proteína Nucleocapsídeo	0,3-1000 ng mL ⁻¹	0,038 ng mL ⁻¹	-	-	[Oh et al., 2022]
Calorimétrico	Proteína Espícula	10-100 ng mL ⁻¹	11 ng mL ⁻¹	-	-	[Fu et al., 2021]
Transistor de efeito de campo (FET)	Proteína Espícula	1 fg mL ⁻¹ a 10 pg mL ⁻¹	1 fg mL ⁻¹	-	-	[Seo et al., 2020]
Sensores Plasmônicos	Proteína Espícula	4-12 fM	4,2 fM	-	-	[Ahmadivand et al., 2021]
Quimioluminescência	Proteína Espícula	0,2-100 ng mL ⁻¹	0,1 ng mL ⁻¹	-	-	[Liu et al.,2021]
Fotoeletroquímica	Proteína Nucleocapsídeo	0,001- 50 ng mL ⁻¹	0,38 pg mL ⁻¹	0,0 V	100W LED	[Chang et al., 2022]
Fotoeletroquímica	Proteína Nucleocapsídeo	1-100 ng mL ⁻¹	2,9 pg mL ⁻¹	0 0 V	300W Xe	[Guo et al., 2023]
Fotoeletroquímica	Proteína Espícula	0,1-1000 ng mL ⁻¹	0,53 ng mL ⁻¹	0,0 V	300W Xe	[Li et al., 2023]
Fotoeletroquímica	Proteína Espícula	0,5-32 nM	0,12 nM	0,05 V	Xe	[Tabrizi et al., 2021]
Fotoeletroquímica	Proteína Espícula e Nucleocapsídeo	0,1 pg mL ⁻¹ - 1000 ng mL ⁻¹ 0,01 pg/mL - 1000 pg/mL	0,1 pg mL ⁻¹ 0,01 pg mL ⁻¹	0,0 V	36W LED	Este Trabalho

*PLpro- Protease de cisteína semelhante à papaína.

Posteriormente, foi proposto um mecanismo que ilustra o procedimento de detecção de SARS-CoV-2 para o imunossensor $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ modificado com anticorpo N ou anticorpo S na presença de luz (Figura 51). De acordo com a ilustração, uma vez que a luz incide sobre o sensor, o BiVO_4 no compósito transfere elétrons da banda de valência (BV) para as bandas de condução (BC). Como resultado, os elétrons fotogerados na banda de condução do BiVO_4 são inseridos na banda de condução do SrTiO_3 e posteriormente no eletrodo substrato. Ao mesmo tempo, a interação entre a proteína alvo e o anticorpo SARS-CoV-2 ocorre bloqueando a eficiência do sistema em gerar uma fotocorrente. Nesse sentido, o ácido ascórbico (AA) atua como doador de elétrons capturando os buracos fotogerados com a incidência da luz.

Figura 51: Mecanismo proposto para detecção de FEQ usando o imunossensor $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ modificado com o anticorpo espícula ou nucleocapsídeo para detecção de SARS-CoV-2. (BC= Banda de Condução; BV=Banda de Valência).



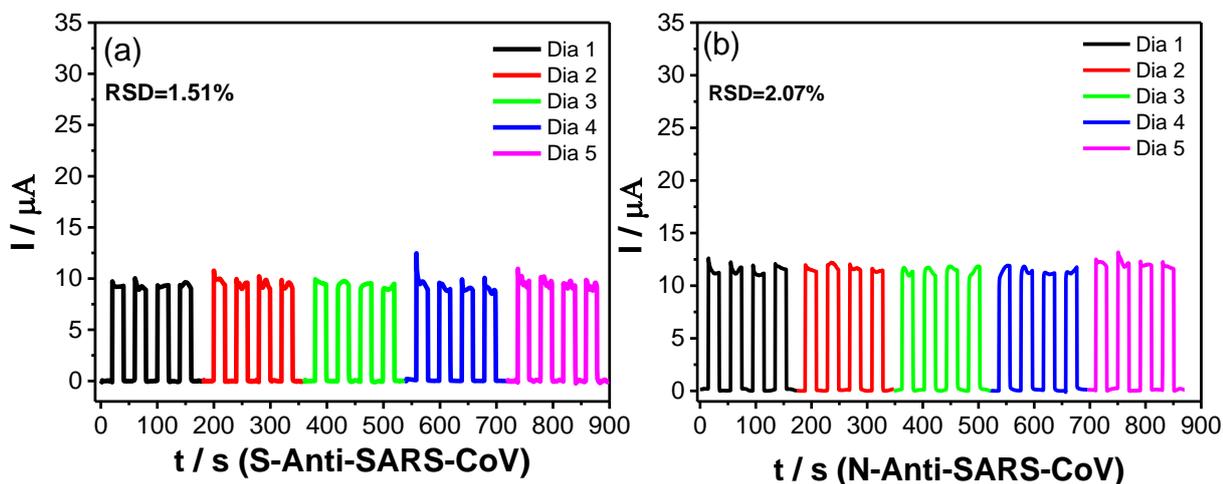
5.5. Precisão do imunossensor

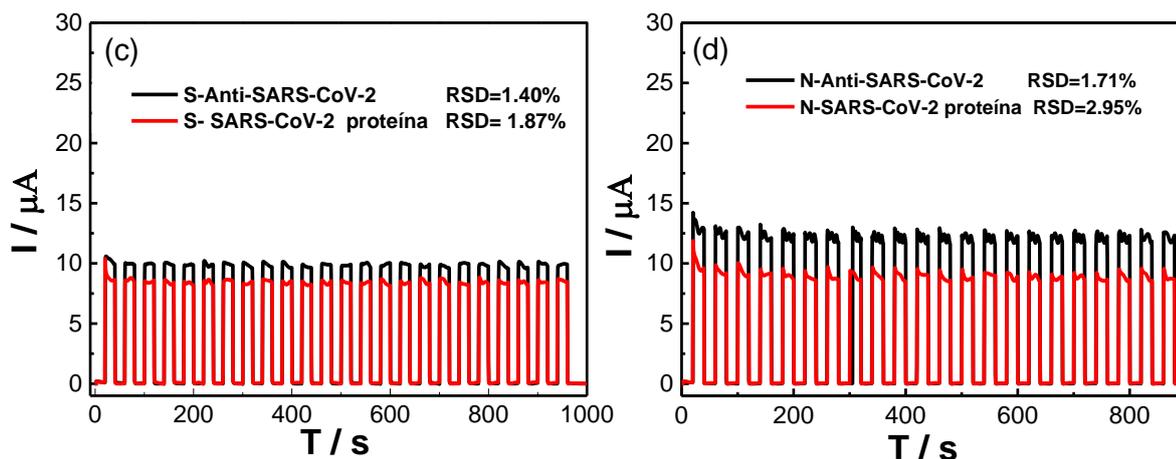
Para avaliar a reprodutibilidade do imunossensor FEQ, as respostas foram monitoradas repetindo-se as medições em diferentes horários e dias, respectivamente. As Figuras 52a e 52b representam a resposta obtida para cada medição do imunossensor em cinco dias diferentes. Conforme observado nestas Figuras, a fotocorrente medida permaneceu praticamente a mesma nos diferentes dias, obtendo os valores de desvio padrão de 1,51% e 2,07% para S-Anti-SARS-

CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO e N-Anti- SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO, respectivamente. Esses valores indicam que ambos os imunossensores propostos apresentam boa reprodutibilidade.

Paralelamente, a repetibilidade do imunossensor foi avaliada, as Figuras 52c e 52d mostram as respostas amperométricas para os imunossensores realizadas no mesmo dia, por meio de 24 medições contínuas em 1000s. Os amperogramas pretos mostram a resposta obtida pelos sensores na ausência da proteína alvo S e N, e os amperogramas vermelhos correspondem à resposta do sensor quando expostos às proteínas alvo. Com essas medidas foi possível avaliar a precisão dos imunossensores, onde foi obtido um DPR menor que 5% em todas as medidas, indicando consistência entre as medidas, além de estabilidade e confiabilidade, portanto os imunossensor relatado apresenta boa precisão.

Figura 52: Reprodutibilidade da resposta do imunossensor das medições em dias diferentes para (a) S-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO e (b) N-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO (c) e (d) Repetibilidade das medições em 1000s, para cada plataforma modificada (anticorpo S ou N) antes (linhas pretas) e após a detecção da proteína alvo (linhas vermelhas). [Anti-SARS-CoV-2] = 3 µg mL⁻¹; [proteína SARS-CoV-2] = 10 µg mL⁻¹.

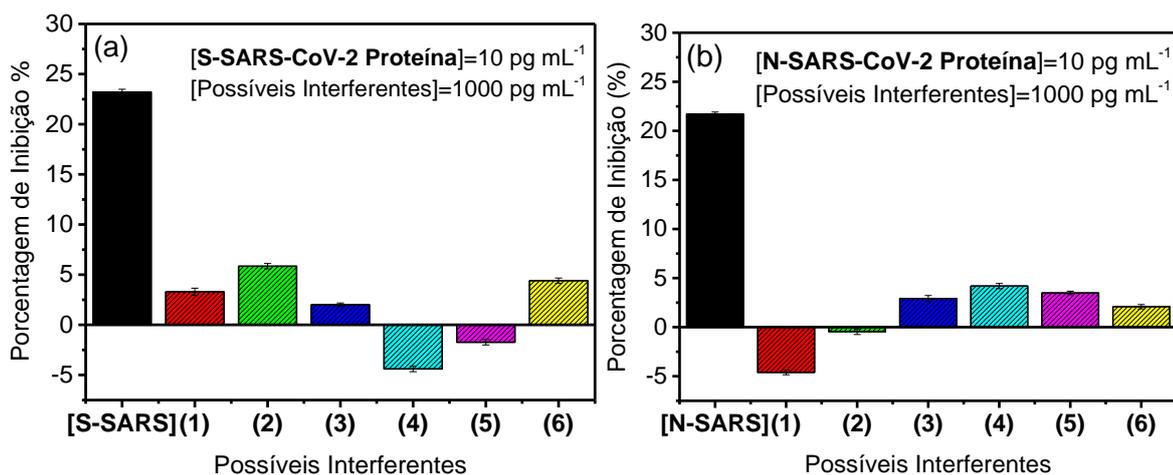




5.6. Estudo de possíveis interferentes e aplicação em amostras de saliva artificial

Com o objetivo de se avaliar a seletividade dos imunossensores S-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO e N-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO, as possíveis espécies que podem interferir na resposta das plataformas desenvolvidas foram analisadas. Dessa forma, a Figura 53 mostra os gráficos de percentual de inibição para o imunossensor S-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO (Figura 53a) e N-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO (Figura 53b), contendo 10 pg mL⁻¹ da proteína SARS-CoV-2 e 1000 pg mL⁻¹ dos interferentes. Através dos resultados apresentados é possível notar uma boa seletividade para detecção de SARS-CoV-2. Os percentuais de inibição baixo, sugerem que o imunossensor FEQ é uma excelente alternativa para o diagnóstico e controle de SARS-CoV-2.

Figura 53: Gráfico de Percentual de inibição do imunossensor (a) S-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO e (b) N-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO em: (1) dopamina; (2) BSA; (3) glicose, (4) PSA; (5) ácido úrico; (6) troponina. Todas as medidas realizadas em solução 0,1 mol L⁻¹ de BR (pH 7,4) contendo 0,3 mol L⁻¹ de AA, sob E_{apl.} = 0,0 V vs Ag/AgCl (KCl_{sat.}) e Tempo de incubação= 20 minutos.



Em análise final, os imunossensores FEQ propostos (S-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO e N-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO) foram aplicados a amostras de saliva artificial para avaliar seu desempenho analítico. Para cada imunossensor, foram analisadas 3 concentrações de amostras diferentes (0,01, 1 e 100 ng mL⁻¹), e a quantificação de SARS-CoV-2 foi realizada pelo método de calibração externa.

Os resultados apresentados na Tabela 6 mostra os percentuais de recuperação obtidos que variaram de 97,00% a 107,20%. Essas porcentagens de recuperação foram próximas a 100%. Observa-se quer a concentração de 0,01 ng mL⁻¹ apresentou uma maior incerteza na detecção, já as concentrações 1 e 100 ng mL⁻¹ apresentaram melhores resultados, sugerindo que o imonussensor FEQ pode ser bem-sucedido para a detecção das proteínas espícula e nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 mostrando uma boa precisão.

Tabela 6: Resultados obtidos para detecção de SARS-CoV-2 em amostras de saliva artificial.

Amostra Saliva Artificial	Adicionada (ng mL⁻¹)	Encontrada (ng mL⁻¹)	Recuperação (%)
[S-SARS-CoV proteína]	0,01	0,0103 (± 0,08)	103,00
	1,00	1,07 (± 0,07)	107,00
	100,00	103,51 (± 0,03)	103,51
[N-SARS-CoV proteína]	0,01	0,0097 (± 0,60)	97,00
	1,00	1,072 (± 0,40)	107,20
	100,00	104,95 (± 0,30)	104,95

Capítulo 6

Considerações Finais

6. Considerações Finais

Os resultados apresentados confirmaram que as sínteses do g-C₃N₄-S ou CNS (Nitreto de Carbono dopado com enxofre) e do BiVO₄ (Vanadato de Bismuto) realizadas no presente trabalho foram alcançadas com sucesso. Estes materiais foram utilizados na construção das plataformas imunossensoras FEQs PdNPs/CNS/ST/FTO e BiVO₄/SrTiO₃/FTO.

As plataformas desenvolvidas apresentaram uma excelente resposta na presença da molécula doadora mostrando a eficácia da combinação desses materiais quando comparadas com as plataformas dos materiais analisados individualmente.

As caracterizações dos materiais foram realizadas por MEV, EDS, DRX, MET, RAMAN e FTIR. As análises de MEV e EDS, confirmaram a morfologia e composição dos materiais. A imagem de MET realizada para a plataforma PdNPs/CNS/ST/FTO evidenciou e confirmou a presença das nanopartículas de paládio nos materiais do FTO. O DRX forneceu informações sobre os picos correspondentes aos planos cristalinos, característicos de cada fase dos materiais, comprovando as suas combinações. As análises de FTIR e RAMAN apresentaram bandas e picos característicos de cada um dos materiais que compõem as plataformas.

As análises realizadas por espectroscopia de impedância eletroquímica conduzidas nas duas plataformas, tanto na ausência como na presença das espécies biológicas, indicaram uma redução na resistência a transferência de carga entre a superfície do eletrodo e a solução na presença de luz, resultando na eficiência do processo de separação de cargas fotogeradas.

Após a otimização dos sistemas e os estudos das interações anticorpos-antígenos, foi possível realizar a construção da curva analítica para os dois imunossensores desenvolvidos. A primeira plataforma imunossensora (anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO) exibiu duas boas correlações lineares para concentrações dos antígenos variando de 1 a 100 fg mL⁻¹ e 1 a 1000 pg mL⁻¹, já a segunda plataforma foi idealizada para detectar duas proteínas (espícula e nucleocapsídeo). Para a plataforma S-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO a faixa obtida foi de 0,1 pg mL⁻¹ a 1000 ng mL⁻¹, enquanto que a plataforma N-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO foi de 0,01 pg mL⁻¹ a 1000 ng mL⁻¹, podendo detectar um LD experimental de 1 fg mL⁻¹, 0,1 pg mL⁻¹ e 0,01 pg mL⁻¹, respectivamente.

Em relação aos estudos de precisão, as análises dos valores de DPR revelaram que os imunossensores desenvolvidos demonstraram uma boa precisão e exatidão durante a execução das medidas fotoeletroquímicas. O estudo de possíveis interferentes atestou a excelente

seletividade dos imunossensores para as proteínas do SARS-CoV-2, não havendo influência significativa no sinal analítico gerado pelas outras espécies.

Neste sentido, foi possível realizar o desenvolvimento de imunossensores FEQ para detecção viável das proteínas do SARS CoV-2 baseado em uma lâmpada LED comercial de baixo custo e baixa potência combinada a uma caixa artesanal para controle de incidência de luz. Por fim, os imunossensores projetados são dispositivos viáveis para determinação sensível, precisa e exata das proteínas de SARS-CoV-2 em amostras de saliva artificial, podendo ser considerados alternativas promissoras para detecção de SARS CoV-2 em amostras biológicas não invasivas como saliva devido à sua alta sensibilidade e detectabilidade.

6.1. Perspectivas

Validação Clínica e Adaptabilidade:

Conduzir estudos com amostras reais para confirmar a eficácia e confiabilidade dos imunossensores. Além disso, é importante avaliar a possibilidade de adaptar os sistemas para a detecção de variantes do vírus, garantindo a relevância dos dispositivos mesmo frente às mutações

REFERÊNCIAS

ABDI, M.; MAHDIKHAH, V.; SHEIBANI, S. Visible light photocatalytic performance of La-Fe co-doped SrTiO₃ perovskite powder. **Optical Materials**, v.102, p.109803, 2020.

ABDOLLAHIFAR, M.; ZAMANI, M.R.; BEIYGIE, E.; NEKOU EI, H. Synthesis of micro-mesopores flower-like γ -Al₂O₃ nano-architectures. **J. Serb. Chem. Soc.**79(8):1007–1017, 2014.

ABDORAHIM, M.; RABIEE, M.; NAGHAVI, S.; TAHRIRI, A.M.; YAZDANPANA H, S.; ALAVI S. H.; TAYEBI, L. Nanomaterials-based electrochemical immunosensors for cardiac troponin recognition: An illustrated review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 337-347, 2016.

AHMADIVAND, A.; GERISLIOGLU, B.; RAMEZANI, Z.; KAUSHIK, A.; MANICKAM, P.; GHOREISHI, S. A. Functionalized terahertz plasmonic metasensors: Femtomolar-level detection of SARS-CoV-2 spike proteins. **Biosensors and Bioelectronics**. v.177, p.112971, 2021.

AKILARASAN, M.; TAMILALAGAN, E.; CHEN, S.M.; MAHESHWARAN, S.; CHEN, T.W.; AL-MOHAIMEED A.M.; AL-ONAZI, W.A.; ELSHIKH, M.S. An eco-friendly low-temperature synthetic approach towards micro-pebble-structured GO@SrTiO₃ nanocomposites for the detection of 2,4,6-trichlorophenol in environmental samples. **Mikrochim Acta**. v.188, n.3, p. 72, 2021.

ALVES, V.A.; SILVA, L.A.; BOODTS, J.F.C. Impedance study of the oxygen evolution on the IrO₂/TiO₂/CeO₂ system in acidic medium. **Polish Journal of Chemistry**, v.74, n.3, p.421-428, 2000.

ANTIOCHIA, R. Electrochemical biosensors for SARS-CoV-2 detection: Voltametric or impedimetric transduction? **Bioelectrochemistry**, v.147, p.108190, 2022.

AZEVEDO, S. A.; LARANJEIRA, J.A.S.; MARTINS, N.F.; SAMBRANO, J.R. Ag doping effect on electronic and thermoelectric properties of SrTiO₃ (0 0 1) surface. **Computational Materials Science**, v. 227, p.112274, 2023.

BAI, Y.; LENG, D.; FENG, T.; KUANG, X.; FAN, D.; REN, X.; LI, Y., WEI, Q.; JU, H. A split-type photoelectrochemical immunosensor based on a high-performance In₂O₃/BiVO₄ photoelectrode modulated by a ZIF-8 protective layer. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 382, p.133479, 2023.

BASTOS, M.L.; TAVAZIVA, G.; ABIDI, S.K.; CAMPBELL, J.R.; HARA OUI, L.P.; JOHNSTON, J.C.; LAN, Z; LAW, S.; MACLEAN, E.; TRAJMAN, A.; MENZIES, D.; BENEDETTI, A.; AHMAD KHAN, F. Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. **BMJ**. v. 370, p.m2516, 2020.

BETTAIEB, F.; PONSONNET, L.; LEJEUNE, P.; OUADA H.B.; MARTELET, C.; BAKHROUF, A.; JAFFRÉZIC-RENAULT, N.; OTHMANE, A. Immobilization of E. coli bacteria in three-dimensional matrices for ISFET biosensor design, **Bioelectrochemistry**, v. 71, p. 118–125, 2007.

BEZERRA, R. D. S. Obtenção e caracterização de uma nova dispersão sólida de dapsona utilizando o ácido oxálico como conformador. **Dissertação** (Mestrado) - Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, 2019.

BIN ADNAN, M. A.; ARIFIN, K.; MINGGU, L. J.; KASSIM, M. B. Titanate-based perovskites for photochemical and photoelectrochemical water splitting applications: A review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.43, n.52, 2018.

BRITO, S. B. P.; BRAGA, I. O.; CUNHA, C. C.; PALÁCIO, M. A. V.; TAKENAMI, I. Pandemia da COVID-19: o maior desafio do século XXI. **Vigil Sanit Debate**, v.8, n.2, p.54–63, 2020.

BROUGHTON, J.P; DENG, X; YU, G; FASCHING, C.L; SERVELLITA, V.; SINGH, J.; MIAO, X.; STREITHORST, J.A.; GRANADOS, A.; SOTOMAYOR-GONZALEZ, A.; ZORN, K.; GOPEZ, A.; HSU, E.; GU, W.; MILLER, S.; PAN, C.Y.; GUEVARA, H.; WADFORD, D.A.; CHEN, J.S.; CHIU, C.Y. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. **Nature Biotechnology**, v.38, n.7, p.870-874, 2020.

BURGHARDT, R.C.; DROLESKEY, R. Current Protocols in Microbiology, 2B.1.1-2B.1.39, 2006.

CALLISTER, J. W. D. Ciência e engenharia de materiais: uma introdução, 5ª ed., Rio de Janeiro: LTC, 2002.

CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. Biophysical Chemistry: Part I. **San Francisco: W. H. Freeman and Company**, 1980.

CAO, J.; QIN, C.; WANG, Y.; ZHANG, H.; SUN, G.; ZHANG, Z. Solid-state method synthesis of SnO₂-Decorated g-C₃N₄ nanocomposites with enhanced Gas-sensing property to ethanol. **Materials**. v. 10, n.6, p. 604, 2017.

CARTER, L. J.; GARNER, L. V.; SMOOT, J. W.; LI, Y.; ZHOU, Q.; SAVESON, C. J.; SASSO, M. J.; GREGG, C. A.; SOARES, J. D.; BESKID, R. T.; JERVEY, R. S.; LIU, C. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. **ACS Central Science**, v.6, n.5, p.591–605, 2020.

CARVALHO, L. A. E ANDRADE, A.R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p.796-804, 2006.

CHANG, H.; JIANG, M.; ZHU, Q.; LIU, A.; WU, Y.; LI, C.; JI, X.; GONG, L.; LI, S.; CHEN, Z.; KONG, L.; HAN L. A novel photoelectrochemical immunosensor based on TiO₂@Bi₂WO₆ hollow microspheres and Ag₂S for sensitive detection of SARS-COV-2 nucleocapsid protein, **Microchemical Journal**, v. 182, p.107866, 2022.

CHEN, M.; QIN, R.; JIANG, M.; YANG, Z.; WEN, W.; LI, J. Clinical applications of detecting IgG, IgM or IgA antibody for the diagnosis of COVID-19: A meta-analysis and systematic review. **Int J Infect Dis**. v. 104, p.415-422, 2021.

CHEN, T.; WANG, Y.; ZHANG, S.; GAO, Z.; ZHAO, D.; WU, J.; SHEN, K.; SUN, B. Cathodic photoelectrochemical sensor developed for glutathione detection based on carrier transport in a Ti_3C_2Tx/AgI heterojunction. **Analytica Chimica Acta**, v. 1233, p. 340487, 2022.

CHEONG, J.; YU, H.; LEE, C. Y.; LEE, J. U.; CHOI, H. J.; LEE, J.H.; LEE, H.; CHEON, J. Publisher Correction: Fast Detection of Sars-Cov-2 Rna Via the Integration of Plasmonic Thermocycling and Fluorescence Detection in a Portable Device. *Nature Biomedical Engineering*, v. 5, n. 1, p. 125, 2021.

CHOI, E.; SONG, K.; AN, S.; LEE, K.; YOUN, M.; PARK, K.; JEONG, S.; KIM, H. Cu/ZnO/AlOOH catalyst for methanol synthesis through CO₂ hydrogenation. **Korean J Chem Eng**, v. 35, p.73-81, 2018.

CHOUDARY, B.M.; MADHI, S.; CHOWDARI, N.S.; KANTAM. M.L.; SREEDHAR, B. Layered Double Hydroxide Supported Nanopalladium Catalyst for Heck-, Suzuki-, Sonogashira-, and Stille-Type Coupling Reactions of Chloroarenes. **J Am Chem Soc.** v.124, n.47, p.14127-14136, 2002.

CORDEIRO, M.A.L.; LEITE, E.R. Estudo da sinterização de nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão in situ. **Cerâmica**, v. 61, p. 269-275, 2015.

CORMAN, V. M.; LANDT, O.; KAISER, M.; MOLENKAMP, R.; MEIJER, A.; CHU, D. K.; BLEICKER, T.; BRUNINK, S.; SCHNEIDER, J.; SCHMIDT, M.L.; MULDER D.G.; HAAGMANS, B. L.; VAN DER VEER, B.; VAN DEN BRINK, S.; WIJSMAN, L.; GODERSKI, G.; ROMETTE, J. L.; ELLIS, J.; ZAMBON, M.; PEIRIS, M.; GOOSSENS, H.; REUSKEN, C.; M. P. KOOPMANS, M. P.; DROSTEN, C. Detection of 2019 Novel Coronavirus (2019-Ncov) by Real-Time Rt-Pcr. **Euro Surveill**, v. 25, n. 3, p. 2000045, 2020.

COUGO, C.D.G. Utilização da Técnica Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para Estimativa das Concentrações de Carboidratos e de Lipídeos em *Scenedesmus* sp. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia), UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, Porto Alegre, 2017.

CRUZ, D. C. F. Espectroscopia Micro-Raman e MEV/EDS aplicados a minerais do craton São Francisco evidência da formação de pirita mediada biogenicamente e suas conexões com a ordem da vida. 68F. **Dissertação** (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2019.

CUI, X.; FANG, X.; ZHOU, Y.; REN, Z.; WEI, L.; ZHENG, Y.; YIN, H.; WANG, J.; AI, S. Photoelectrochemical immunosensor for RNA methylation detection based on the enhanced photoactivity of Bi₂S₃ nanorods by g-C₃N₄ nanosheets. **Microchemical Journal**, v.183, p.108031, 2022.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores, Porto Alegre, **EDIPUCRS**, 2007.

DEEKS, J.J.; DINNES, J.; TAKWOINGI, Y.; DAVENPORT, C.; SPIJKER, R.; TAYLOR-PHILLIPS, S.; ADRIANO, A.; BEESE, S.; DRETZKE, J.; FERRANTE DI RUFANO, L.; HARRIS, I.M.; PRICE, M.J.; DITTRICH, S.; EMPERADOR, D.; HOO, L.; LEEFLANG,

M.M.G.; VAN DEN BRUEL, A. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2020.

DEVADOSS, A.; SUDHAGAR, P.; TERASHIMA, C.; NAKATA, K.; FUJISHIMA, A. Photoelectrochemical biosensors: New insights into promising photoelectrodes and signal amplification strategies. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 24, p. 43–63, 2015.

DHIMAN, A.; LEWIS, N. S.; DILLARD, T.; SUDARSHAN, M.; TOMAR, V. Advancements in mechanical Raman spectroscopy for applications in energetic materials. **Energetic Materials Frontiers**, v. 2, p. 193-200, 2021.

DOMÍNGUEZ, S.; BERENQUER, A.; LINARES, A.; CAZORLA, D. Inorganic materials as supports for palladium nanoparticles: Application in the semi-hydrogenation of phenylacetylene. **J. Catal.** v.257, p.87-95, 2008.

DUARTE, C. L. JUCHEM, P. L. PULZ, M. G. BRUM, T. M. CHODUR, N. LICCARDO, A. FISCHER, C. A. & ACAUAN, R. B. Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros, **Pesquisas em Geociências**, v. 30, n. 2, p. 3–15, 2003.

FAITA, F. L. Síntese de Nanomateriais Calcogênicos (In-Te e Zn-S) e Caracterização de Suas Propriedades Físicas. **Dissertação** (Mestrado em Física), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

FAN, C.; MIAO, J.; XU, G.; LIU, J.; LV, J.; WU, Y. Graphitic carbon nitride nanosheets obtained by liquid stripping as efficient photocatalysts under visible light. **RSC Adv.**, v.7, p. 37185, 2017.

FANG, S.; XUE, S.; WANG, C.; WANG, G.; WANG, X.; LIANG, Q.; LIA, Z.; XU, S. Fabrication and characterization of CdS/BiVO₄ nanocomposites with efficient visible light driven photocatalytic activities. **Ceramics International**, v. 42, p. 4421–4428, 2016.

FERREIRA, D.L.; ALVES, E.M.; SOUSA, G. R.; FERREIRA, P.H.B.; FIGUEIREDO, J. M.A.; LEITE, N.B.; MORETO, J. A. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica: Princípios Básicos e Algumas Aplicações. **Revista Virtual Química**, p.1-17, 2023.

FERREIRA, M.A. Síntese e caracterização de materiais à base de titanato de estrôncio (srtio₃) e suas aplicações fotocatalíticas. **Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Química)**, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2018, 105 p.

FIGUEIREDO, A. Imunossensores Potenciométricos para a Detecção da Proteína NS1 do vírus da Dengue. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós- Graduação em Física, Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, 2013.

FREIRES, A.S. Explorando biossensores fotoeletroquímicos para determinação de moléculas de interesse ambiental e clínico. **Tese (Doutorado em Biotecnologia)**, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

FU, Z.; ZENG, W.; CAI, S.; LI, H.; DING, J.; WANG, C.; CHEN, Y.; HAN, N.; YANG, R. Porous Au@Pt nanoparticles with superior peroxidase-like activity for colorimetric detection

of spike protein of SARS-CoV-2. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 604, p.113–121, 2021.

FUJIMOTO, T. G. Microestrutura e propriedades elétricas e dielétricas do titanato de estrôncio puro e contendo aditivos. Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, **Dissertação de Mestrado em Ciências**, São Paulo, 2016.

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. **Biosens. Bioelectron.** p.169, 2020.

FURUTA, T.; MIURA, K. First-principles study of ferroelectric and piezoelectric properties of tetragonal SrTiO₃ and BaTiO₃ with in-plane compressive structures. **Solid State Communications**, v.150, p.2350-2353, 2010.

GANGWAR, J.; GUPTA, B.K.; TRIPATHI, S.K.; SRIVASTAVA, A.K. Phase dependent thermal and spectroscopic responses of Al₂O₃ nanostructures with different morphogenesis. **Nanoscale**, v.7, p.13313-13344, 2015.

GILLANI, S.S.A.; JAWADA, A.; ZEBAB, I.; SHAKILC, M.; TAHIRC, M.B.; AHMADA, R. Effect of Li, K and Be doping on phase stability, band structure and optoelectronic response of SrTiO₃ perovskite for semiconductor devices: A computational insight. **Optik-International Journal for Light and Electron Optics**, v. 227, p.166044, 2021.

GNIEWEK, A.; ZIÓLKOWSKI, J.J.; TRZECIAK, A.M.; ZAWADZKI, M.; GRABOWSKA, H.; WRZYSZCZ, J. Palladium nanoparticles supported on alumina-based oxides as heterogeneous catalysts of the Suzuki–Miyaura reaction. **J Catal.** v. 254, n.1, p. 121-130, 2008.

GOBBO, L. A. Aplicação da difração de raios-X e método de rietveld no estudo de cimento Portland. **Tese (Doutorado)** - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GOKSU, H. Recyclable aluminium oxy-hydroxide supported Pd nanoparticles for selective hydrogenation of nitro compounds via sodium borohydride hydrolysis. **New J. Chem.** v. 39, p. 8498–8504, 2015.

GÓMEZ, L.K.S. Desenvolvimento e aplicações da técnica espectroscopia Raman anti-Stokes coerente multiplex. **Dissertação (Mestrado em Ciências)**, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

GONÇALVES, T.M. Caracterização de filmes finos obtidos por deposição de vapor químico assistido a plasma (PECVD) e deposição e implantação iônica por imersão em plasma (PIIID). **Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Materiais)**, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Sorocaba, 2012.

GUAN, K.; LI, J.; LEI, W.; WANG, H.; TONG, Z.; JIA, Q.; ZHANG, H.; ZHANG, S. Synthesis of sulfur doped g-C₃N₄ with enhanced photocatalytic activity in molten salt. **J. Materiomics.** v. 7, p.1131–1142, 2021.

GUAN, S.; FU, X.; TANG, Y.; PENG, Z. Synthesis and photoelectrochemical performance of AuAg@CdS double-walled nanotubes. **Chemical Physics Letters**, v. 682, p.128-132, 2017.

GUO, A.; PEI, F.; FENG, S.; HU, W.; ZHANG, P.; XIA, M.; MU, X.; TONG, Z.; WANG, F.; LIU, B. A photoelectrochemical immunosensor based on magnetic all-solid-state Z-scheme

heterojunction for SARS-CoV-2 nucleocapsid protein detection. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v.374, p.132800, 2023.

HAN, J.-H.; LEE, D.; CHEW, C.H.C.; KIM T.; PAK, J.J. A Multi-Virus Detectable Microfluidic Electrochemical Immunosensor for Simultaneous Detection of H1N1, H5N1, and H7N9 Virus Using ZnO Nanorods for Sensitivity Enhancement. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 228, p. 36-42, 2016.

HAN, W.; KANG, X.; HE, W.; JIANG, L.; LI, H.; XU, B. A new method for disease diagnosis based on hierarchical BRB with power set. **Heliyon**. v.9, n.2, p.e13619, 2023.

HARRIS, D. A. Química Analítica Quantitativa. Rio de Janeiro: **LTC**, 2008.

HE, X.; LAU, E. H. Y.; WU, P.; DENG, X.; WANG, J.; HAO, X.; LAU, Y.C.; WONG, J. K.; GUAN, Y.; TAN, X.; MO, X.; CHEN, Y.; LIAO, B.; CHEN, W.; HU, F.; ZHANG, Q.; ZHONG, M.; WU, Y.; ZHAO, L.; ZHANG, F.; Cowling, B. J.; Li, F.; Leung, G. M. Author Correction: Temporal Dynamics in Viral Shedding and Transmissibility of Covid-19. **Nature Medicine**, v.26, n. 9, p. 1491-93, 2020.

HUANG, C.; WANG, Y.; LI, X.; REN, L.; ZHAO, J.; HU, Y.; ZHANG, L.; FAN, G.; XU, J.; GU, X.; CHENG, Z.; YU, T.; XIA, J.; WEI, Y.; WU, W.; XIE, X.; YIN, W.; LI, H.; LIU, M.; XIAO, Y.; GAO, H.; GUO, L.; XIE, J.; WANG, G.; JIANG, R.; GAO, Z.; JIN, Q.; WANG, J.; CAO, B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet**, v. 395, p.497–506, 2020.

IKETANI, S.; LIU, L.; GUO, Y.; LIU, L.; CHAN, J. F.-W.; HUANG, Y.; WANG, M.; LUO, Y.; YU, J.; CHU, H.; CHIK. K.K.-H.; YUEN, T. T.-T.; YIN, M. T.; SOBIESZCZYK, M. E.; HUANG, Y.; YUEN, K.-Y.; WANG, H. H.; SHENG, Z.; HO, D. D. Antibody evasion properties of SARS-CoV-2 Omicron sublineages. **Nature**, v. 604, p. 553–556, 2022.

IMRAN, S.; AHMADI, S.; KERMAN, K. Electrochemical biosensors for the detection of SARS-CoV-2 and other viruses. **Micromachines**, v. 12, n.2, p.174, 2021.

INSAIDOO, M.; ULLAH, A.; DZIWORNU, R.K.; AMOAKO, S.; ABDUL-MUMUNI, A. COVID-19 pandemic and stock market performance: A comparative study of emerging economies. **Heliyon**, v. 9, n.5, p.e16054, 2023.

ISER, B. P. M.; SLIVA, I.; RAYMUNDO, V. T.; POLETO, M. B.; SCHUELTER-TREVISOL, F.; BOBINSKI, F. Definição de caso suspeito da COVID-19: uma revisão narrativa dos sinais e sintomas mais frequentes entre os casos confirmados. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.29, n.3, p.e2020233, 2020.

JIA, M.; LIAO, X.; LING FANG, L.; JIA, B.; LIU, M.; LI, D.; ZHOU, L.; KONG, W. Recent advances on immunosensors for mycotoxins in foods and other commodities. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 136, p.116193, 2021.

KAFESHANI, M. A.; MAHDIKHAH, V.; SHEIBANI, S. Facile preparation and modification of SrTiO₃ through Ni–Cd co-doping as an efficient visible-light-driven photocatalyst. **Optical Materials**, v. 133, p.11308, 2022.

KARA, B.Y.; YAZICI, M.; KILBAS, B.; GOKSU, H. A practical and highly efficient reductive dehalogenation of aryl halides using heterogeneous Pd/AlO(OH) nanoparticles and sodium borohydride. **Tetrahedron**, v. 72, n. 39, p.5898-5902, 2016.

KARAKOZOV, B.K.; KOZLOVSKIY, A.L.; JANSEITOV, D.M.; ZDOROVETS, M.V. Study of phase transformation dynamics, structural and optical properties of ferroelectric SrTiO₃ ceramics. **Optical Materials**, v. 121, p.111625, 2021.

KARAKUS, E.; ERDEMIR, E.; DEMIRBILEK, N.; LIV, L. Colorimetric and electrochemical detection of SARS-CoV-2 spike antigen with a gold nanoparticle-based biosensor. **Anal. Chim. Acta**. p.1182, 2021.

KARIM, S.S.A.; KARIM, Q.A. Omicron SARS-CoV-2 variant: a new chapter in the COVID-19 pandemic. **Lancet**. v.398, n. 10317, p.2126-2128, 2021.

KATZ, E. A. Perovskite: Name Puzzle and German-Russian Odyssey of Discovery. **Helvetica Chimica Acta**. v.103, n.6, p.e2000061, 2020.

KAUSHIK, A.; YNDART, A.; KUMAR, S.; JAYANT, R.D.; VASHIST, A.; BROWN, A.N.; LI, C.Z.; NAIR, M. A sensitive electrochemical immunosensor for label-free detection of Zika-virus protein. **Sci Rep**. v.8, n.1, p. 9700, 2018.

KE, C.; WU, Y.; SONG, Z.; ZHENG, M.; ZHU, H.; GUO, H.; SUN, H.; LIU, M. A novel competitive fluorescence colorimetric dual-mode immunosensor for detecting ochratoxin A based on the synergistically enhanced peroxidase-like activity of AuAg NCs-SPCN nanocomposite. **Food Chemistry**. v. 437(Pt 2), p.137930, 2024.

KE, D.; PENG, T.; MA, L.; CAI, P.; DAI, K. Effects of Hydrothermal Temperature on the Microstructures of BiVO₄ and Its Photocatalytic O₂ Evolution Activity under Visible Light. **Inorganic Chemistry**, v. 48, p.4685–4691, 2009.

KNOLL, M. Aufladepotential und sekundaremission elektronenbestrahlter Korper. **Z. Tech. Phys**. v.16, p. 467-475, 1935.

KUDO, E.; ISRAELOW, B.; VOGELS, C.B.F.; LU, P.; WYLLIE, A. L.; TOKUYAMA, M.; ARVIND VENKATARAMAN, A.; BRACKNEY, D. E.; OTT, I. M.; PETRONE, M. E.; EARNEST, R.; LAPIDUS, S.; MUENKER, M. C.; MOORE, A.J., CASANOVAS-MASSANAI, A.; TEAM, Y. I. R.; OMER, S. B.; CRUZ, C. S. D.; FARHADIAN, S. F.; KO, I. A.; GRUBAUGH, N. D.; IWASAK, A. Detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex RT-qPCR. **PLoS Biology**, v.18, n.10, p.1-9, 2020.

KUMAR, N.; SHETTI, N.P.; JAGANNATH, S.; AMINABHAVI, T.M. Electrochemical sensors for the detection of SARS-CoV-2 virus. **Chem Eng J**. v. 430, p.132966, 2022.

ŁĄCZ, A.; ŁAŃCUCKI, Ł.; LACH, R.; KAMECKI, B.; DROŹDŹ, E. Structural and electrical properties of Cr-doped SrTiO₃ porous materials. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.43, n.18, p.8999–9005, 2018.

LE, M.-V.; VO, N.-Q.-D.; LE, Q.-C.; TRAN, V.A.; PHAN, T.Q.-P.; HUANG, C.-W.; NGUYEN, V.-H. Manipulating the Structure and Characterization of Sr_{1-x}La_xTiO₃ Nanocubes toward the Photodegradation of 2-Naphthol under Artificial Solar Light. **Catalysts**, v. 11, p.564, 2021.

LI, G.; FAN, Y.; LAI, Y.; HAN, T.; LI, Z.; ZHOU, P.; PAN, P.; WANG, W.; HU, D.; LIU, X.; ZHANG, Q.; WU, J. Coronavirus infections and immune responses. **J Med Virol.** v. 92, n.4, p. 424-432, 2020.

LI, H.; XUE, Y.; WANG, W. Femtomole level photoelectrochemical aptasensing for mercury ions using quercetin-copper (II) complex as the DNA intercalator. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 54, p. 317-322, 2014.

LI, H.; ZHAO, J.; WU, T.; FU, Z.; ZHANG, W.; LIAN, Z.; CAI, S.; YANG, R. Dual ligand-induced photoelectrochemical sensing by integrating Pt/MoS₂ heterostructure and Au polyhedra for sensitive detection of SARS-CoV-2. **Sensors and Actuators: B. Chemical**, v.376, p.132970, 2023.

LI, J.; WANG, F.; MENG, L.; HAN, M.; GUO, Y.; SUN, C. Controlled synthesis of BiVO₄/SrTiO₃ composite with enhanced sunlight-driven photofunctions for sulfamethoxazole removal. **J Colloid Interface Sci**, v.485, p.116-122, 2017.

LI, P.; WANG, L.; LI, H. Application of recoverable nanosized palladium (0) catalyst in Sonogashira reaction. **Tetrahedron.** v.61, n.36, p. 8633-8640, 2005.

LI, W.; CHEN, Q.; ZHONG, Q. One-pot fabrication of mesoporous g-C₃N₄/NiS cocatalyst counter electrodes for quantum-dot-sensitized solar cells. **J. Mater Sci**, 2020.

LIA, H.; ZHAO, J.; WU, T.; FU, Z.; ZHANG, W.; LIAN, Z.; SHUANGFEI CAIA, S.; YANG, R. Dual ligand-induced photoelectrochemical sensing by integrating Pt/MoS₂ heterostructure and Au polyhedra for sensitive detection of SARS-CoV-2. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 376, p.132970, 2023.

LIANG, Q.; HUANG, Y.; WANG, M.; KUANG, D.; YANG, J.; YI, Y.; SHI, H.; LI, J.; YANG, J.; LI, G. An electrochemical biosensor for SARS-CoV-2 detection via its papain-like cysteine protease and the protease inhibitor screening. **Chemical Engineering Journal**, v.452, p. 139646, 2023.

LILLO, T.; MORAIS, C. L. M.; SHENTON, C.; RAY, A.; GURUSINGHE, N. Revising Fouriertransform infrared (FT-IR) and Raman spectroscopy towards brain cancer detection. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 38, p. 102785, 2022.

LIM, P. F.; LEONG, K. H.; SIM, L. C.; OH, W.-D.; CHIN, Y. H.; SARAVANAN, P.; DAI, C. Mechanism insight of dual synergistic effects of plasmonic Pd-SrTiO₃ for enhanced solar energy photocatalysis. **Applied Physics A**, v.126, n.7, p. 1-10, 2020.

LIMA, F.L.O.; GOMES, L.N.L.; SANTOS, C.S.C.; OLIVEIRA, G.A.L. Diagnóstico da COVID-19: importância dos testes laboratoriais e dos exames de imagem. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, e259997162, 2020.

LIMA, F.M.R. Obtenção e caracterização de plataformas fotoeletroquímicas à base de titanato de bário (batio₃) visando o desenvolvimento de imunossensores. **Tese (Doutorado em Ciências dos Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, 2022.**

LIU, C.; SHIH, K.; GAO, Y.; LI, F.; WE, L. Dechlorinating transformation of propachlor through nucleophilic substitution by dithionite on the surface of alumina. **J. Soils Sediments**, v.12, p.724–733, 2012.

LIU, D.; JU, C.; HAN, C.; SHI, R.; CHEN, X.; DUAN, D.; YAN, J.; YAN, X. Nanozyme chemiluminescence paper test for rapid and sensitive detection of SARS-CoV-2 antigen. **Biosensors and Bioelectronics**, v.173, 2021.

LIU, L.; IKETANI, S.; GUO, Y.; CHAN, J.F.; WANG, M.; LIU, L.; LUO, Y.; CHU, H.; HUANG, Y.; NAIR, M.S.; YU, J.; CHIK, K.K.; YUEN, T.T.; YOON, C.; TO, K.K.; CHEN, H.; YIN, M.T.; SOBIESZCZYK, M.E.; HUANG, Y.; WANG, H.H.; SHENG, Z.; YUEN, K.Y.; HO, D.D. Striking Antibody Evasion Manifested by the Omicron Variant of Sars-Cov-2. **Nature**, v.602, n.7898, p. 676-681, 2022.

LIV, L. Electrochemical immunosensor platform based on gold-clusters, cysteamine and glutaraldehyde modified electrode for diagnosing COVID-19. **Microchemical Journal**, v.168, 2021.

LOPES, T.A. Uso de difratometria de raios-x na quantificação da fração volumétrica de fases em aço inoxidável supermartensítico. **Relatório final**, Centro Universitário da FEI, São Bernardo do Campo, 2018.

LOTFI, S.; ASSANI, A.; SAADI, M.; AHSAINI, H.A. Synthesis, structural and microstructural properties of Bismuth Vanadate BiVO₄. **Materialstoday: Proceedings**, 2023.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Quím. Nova**, v. 29, n.6, 2006.

LUTTENS, A.; GULLBERG, H.; ABDURAKHMANOV, E.; VO, D.D.; AKABERI, D.; TALIBOV, V.O.; NEKHOTIAEVA, N.; VANGEEL, L.; DE JONGHE, S.; JOCHMANS, D.; KRAMBRICH, J.; TAS, A.; LUNDGREN, B.; GRAVENFORS, Y.; CRAIG, A.J.; ATILAW, Y.; SANDSTRÖM, A.; MOODIE, L.W.K.; LUNDKVIST, Å.; VAN HEMERT, M.J.; NEYTS, J.; LENNERSTRAND, J.; KIHILBERG, J.; SANDBERG, K.; DANIELSON, U.H.; CARLSSON, J. Ultralarge Virtual Screening Identifies SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors with Broad-Spectrum Activity against Coronaviruses. **Journal of the American Chemical Society**, v.144, p.2905-2920, 2022.

MADHOUSH, M-R.; SARRAFZADEH, M-H.; HOSSEINIAN, A. Molecular insight into water desalination mechanism through g-C₃N₄ nano-slit membranes: Effect of slit sizes, terminal groups, and number of layers. **Journal of Molecular Liquids**, v.392, p.123532, 2023.

MAGALHÃES, L. A. Desenvolvimento de Metodologia para Determinação de Sílica Cristalina Respirável para Particulado de Minério Brasileiro por Difração de Raios X. **Dissertação** (Mestrado em Química), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

MAGALHÃES, R.S.; JUNIOR, W.D.M.; SOUZA, A.E.; TEIXEIRA, S.R.; LI, M.S.; LONGO, E. Síntese de BaTiO₃ e SrTiO₃ pelo método hidrotermal assistido por micro-ondas utilizando anatase como precursor de titânio. **Química Nova**, v. 40, n. 2, p. 166-170, 2017.

MALATHI, A.; MADHAVAN, J.; ASHOKKUMAR, M.; ARUNACHALAM, P. A review on BiVO₄ photocatalyst: Activity enhancement methods for solar photocatalytic applications. **Applied Catalysis A, General**, v. 555, p. 47–74, 2018.

MARTINS, K.M.; SANTOS, L. W.; ÁLVARES, A. C. M. A importância da imunização: revisão integrativa. **REIcEn- Revista de Iniciação Científica e Extensão**, v. 2, n.2, p.96-101, 2019.

MASCARO, L.H.; POCKETT, A.; MITCHELS, J.M.; PETER, L.M. CAMERON, P.J. CELORRIO, V., FERMIN, D.J.; SAGU, J.S.; WIJAYANTHA, K.G.U.; KOCIOK-KOHN, G.; MARKEN, F. One-step preparation of the BiVO₄ film photoelectrode, **J. Solid State Electrochem.** v.19, p. 31–35, 2015.

MELO, R. S.; MAIA, F. T. M. Avaliação do Uso de Circuitos Equivalentes na Análise por Impedância Eletroquímica de Revestimentos Anticorrosivos. *Revista de Engenharias da Faculdade Salesiana*, n. 02, p. 2-9, 2016.

MENG, X.; ZOU, S.; LI, D.; HE, J.; FANG, L.; WANG, H.; YAN, X.; DUAN, D.; GAO, L. Nanozyme-strip for rapid and ultrasensitive nucleic acid detection of SARS-CoV-2. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 217, p.114739, 2022.

MOHAMMAD, A.; KHAN, M. E.; CHO, M. H. Sulfur-doped-graphitic-carbon nitride (S-g-C₃N₄) for low cost electrochemical sensing of hydrazine. **Journal of Alloys and Compounds**, n. 816, p.152522, 2020.

MOHAMMADI, P.; GHORBANI-SHAHNA, F.; BAHRAMI, A.; RAFATI, A.A.; FARHADIAN, M. Plasma-photocatalytic degradation of gaseous toluene using SrTiO₃/rGO as an efficient heterojunction for by-products abatement and synergistic effects. **J. Photochem. Photobiol. Chem.** v.394, 2020.

MOITRA, P.; ALAFEEF, M.; DIGHE, K.; FRIEMAN, M.B.; PAN, D. 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.

MOJSOSKA, B.; LARSEN, S.; OLSEN, D.A.; MADSEN, J.S.; BRANDSLUND, I.; ALATRAKTCHI, F.A. Rapid SARS-CoV-2 Detection Using Electrochemical Immunosensor. **Sensors (Basel)**. v.21, n.2, p.390, 2021.

MONTEIRO, T. O. ; SANTOS NETO, A. G. ; MENEZES, A. S. ; DAMOS, F. S. ; LUZ, R. C. S. ; FATIBELLO-FILHO, ORLANDO . Photoelectrochemical determination of cardiac troponin I as biomarker of myocardial infarction using a Bi₂S₃ film electrodeposited on BiVO₄ coated fluorine-doped tin oxide electrode. **BIOSENSORS**, v. 13, p. 379-394, 2023.

MONTEIRO, T. O. Sensores fotoeletroquímicos explorando o tetracianoetileno de lítio (LiTCNE) na determinação do antioxidante terc-butil hidroquinona (TBHQ). 2017. 107f. **Dissertação** (Mestrado em Química Analítica) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017.

MORAIS, C. L. M.; LILO, T.; ASHTON, K. M.; DAVIS, C.; DAWSON, T. P.; GURUSINGHE, N.; MARTIN, F. L. Determination of meningioma brain tumour grades using Raman microspectroscopy imaging. **Analyst**, v. 144, p. 7024-7031, 2019.

MORALES-NARVAEZ, E.; DINCER, C. The impact of biosensing in a pandemic outbreak: COVID-19. **Biosensors Bioelectronics**, v.163, p.112274, 2020.

MOREIRA, A. F.; SANTOS, S. R. B.; COSTA JUNIOR, A. G. Construção e caracterização de um fotômetro destinado ao uso de aulas experimentais de química sobre a lei de beer-lambert. **HOLOS**, v. 2, p. 142-151, 2016.

MOREIRA, D. C. I.; FEITOSA, G. A.; ABREU, C. R. de C. As doenças virais no mundo contemporâneo: uma revisão bibliográfica. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 5, n. 10, p. 247–257, 2022.

MOREIRA, M. L. Titanatos de alcalinos terrosos: a ordem associada à desordem. **Tese de doutorado**, Universidade Federal de São Carlos-UFSCAR, 2010, 113f.

MOSTAFA, M.M.; SEDIK, G.A.; ELZANFALY, E. S.; NADIM, A.H. Development of potentiometric immunosensor for determination of live attenuated Varicella Vaccine: Potency and stability studies. **Analytical Biochemistry**, v. 683, p.115367, 2023.

NAGATANI, T.; SAITO S.; SATO, M.; YAMADA, M. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system. **Scanning Microscopy**. v.11, p. 901-909, 1987.

NETTAR, C. B.; BHOWMIK, R.N.; A.K. SINHA, A.K. A comparative study of the lattice structure, optical band gap, electrical conductivity and polarization at different stages of the heat treatment of chemical routed Al(OH)₃. **Ceramics International**, v. 48, n. 8, p.10677-10687, 2022.

NKWACHUKWU, O.V.; AROTIBA, O.A. Perovskite Oxide-Based Materials for Photocatalytic and Photoelectrocatalytic Treatment of Water. **Front Chem**, v. 9, p.634630, 2021.

NOGUEIRA, J.M.R; SILVA, L.O.P. Diagnóstico laboratorial da COVID-19 no Brasil. **RBAC**, v.52, n.2, p. 117-21, 2020.

NUNOO-MENSAH, J.W.; RIZK, M.; CAUSHAJ, P.F.; GIORDANO, P.; FORTUNATO, R.; DULSKAS, A.; BUGRA D.; DA COSTA PEREIRA, J.M.; ESCALANTE, R.; KODA, K.; SAMALAVICIUS, N.E.; MAEDA, K.; CHUN, H. K. ISUCRS COVID-19 Participating Investigator Group. COVID-19 and the Global Impact on Colorectal Practice and Surgery. **Clin colorectal cancer**. v.19, n.3, p.178-190, 2020.

OH, H-K.; KIM, K.; PARK, J.; IM, H.; MAHER, S.; KIM, M-G. Plasmon color-preserved gold nanoparticle clusters for high sensitivity detection of SARS-CoV-2 based on lateral flow immunoassay. **Biosensors and Bioelectronics**, v.205, p.114094, 2022.

OLIVEIRA, A.L.M. Síntese e Caracterização de pós e filmes finos de SrSn_{1-x}Ti_xO₃. **Tese de doutorado**, Université de Rennes- UFPB, 2013, 213f.

ÖZKARAFKILI, M.A.; ÖZKURT, H.; BARDAKÇI, M.İ.; AKILLI, I.K.; YANÇ, U.; ALTUNTAŞ, Y.; ÖZDEMİR, H.M. Comparison of chest computed tomography findings of RT-PCR negative and RT-PCR positive cases in COVID-19 patients. **Clin Imaging**, v.82, p.7-12, 2022.

PACHECO, L.H. Estudo do potencial de aplicação de nanopartículas de ouro dispersas em material graxo para detecção de moléculas orgânicas via observação de efeito Raman intensificado por superfície (SERS). **Dissertação** (Mestrado em Química e Biotecnologia), Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2012.

PADILHA, A. F. Materiais de engenharia. [S. l.]: **Hemus**, 1997.

PAN, T.; TANG, Y.; LIAO, Y.; CHEN, J.; LI, Y.; WANG, J.; LI, L.; LI, X. BiVO₄ modifying with cobalt-phosphate cluster cocatalyst for persulfate assisted photoelectrocatalytic degradation of tetracycline. **Molecular Catalysis**, v. 549, p.113527, 2023.

PAVÃO, A.L.; JANOTTI, L.; MOURA, M.L.; GOUVÊA, C.; GRABOISET, V. Considerações sobre o diagnóstico laboratorial da Covid-19 no Brasil. Observatório Covid-19 Fiocruz, 2020. Nota técnica. 20p. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/42557>. Acesso em: 30 novembro 2020.

PEELING, R.W.; WEDDERBURN, C.J.; GARCIA, P.J.; BOERAS, D.; FONGWEN, N.; NKENGASONG, J.; SALL, A.; TANURI, A.; HEYMANN, D.L. Serology testing in the COVID-19 pandemic response. **Lancet Infect Dis**, v. 20, n.9, p. e245-e249, 2020.

PETRALIA, S.; CONOCI, S. Pcr Technologies for Point of Care Testing: Progress and Perspectives. **ACS Sensors**, v.2, n.7 , p.876-91, 2017.

PHOON, B. L.; LAI, C. W.; JUAN, J. C.; SHOW, P.-L.; PAN, G.-T. Recent developments of strontium titanate for photocatalytic water splitting application. **International Journal of Hydrogen Energy**. v.44, n. 28, p.14316-14340, 2019.

PRADHAN, J.; NAYAK, R. L.; SAHOO, M. P. K.; PATTANAIK, A. K. Activating and modulating ferroelectric and optical properties in La/Nd co-doped SrTiO₃ ceramics. **Journal of Alloys and Compounds**, v.876, p.160131, 2021.

PRADO, T. M.; BADARÓ, C.C.; MACHADO, R.G.; FADINI, P.S.; FATIBELLO-FILHO, O.; MORAES, F.C. Using Bismuth Vanadate/Copper Oxide Nanocomposite as Photoelectrochemical Sensor for Naproxen Determination in Sewage. **Electroanalysis**, v. 32, n 9, p. 1930-37, 2020.

PRADO, T.M.; CINCOTTO, F.H.; FATIBELLO-FILHO, O.; MORAES, F.C. Bismuth Vanadate/Reduced Graphene Oxide Nanocomposite Electrode for Photoelectrochemical Determination of Diclofenacin Urine. **Electroanalysis**, v. 30, p. 2704–2711, 2018.

PRAINITO, C.D.; ESHUN, G.; OSONGA, F.J.; ISIKA, D.; CENTENO, C.; SADIK, O.A. Colorimetric Detection of the SARS-CoV-2 Virus (COVID-19) in Artificial Saliva Using Polydiacetylene Paper Strips. **Biosensors**, v.12,p. 804, 2022.

PRAMANIK, A.; GAO, Y.; PATIBANDLA, S.; MITRA, D.; MCCANDLESS, M.G.; FASSERO, L.A.; GATES, K.; TANDON, R.; RAY, P.C. The rapid diagnosis and effective inhibition of coronavirus using spike antibody attached gold nanoparticles. **Nanoscale Adv.** v.3, p.1588–1596, 2021.

QIN, Y.; LI, Y.; HU, Y. Emerging Argonaute-based nucleic acid biosensors. **Trends in Biotechnology**, v.40, n. 8, 2022.

RAEISI, A.; CHERMAHINI, N. A.; MOMENI, M. M. A novel photocatalytic and photoelectrocatalytic system for oxidative desulfurization of model fuel using BiVO₄@HKUST-1 composite in powder and deposited on fluorine-doped tin oxide. **Journal of Photochemistry & Photobiology A: Chemistry**, v.433, p.114190, 2022.

RAHMATI, Z.; ROUSHANI, M.; HOSSEINI, H.; CHOUBIN, H. Electrochemical immunosensor with Cu₂O nanocube coating for detection of SARS-CoV-2 spike protein. **Microchim. Acta**. v.188, p.105, 2021.

RAMEZANI, F.; GHASEMI-KASMANB, M.; NOSRATIYANA, N.; GHASEMID, S.; FEIZI, F. Acute administration of sulfur-doped g-C₃N₄ induces cognitive deficits and exacerbates the levels of glial activation in mouse hippocampus. **Brain Research Bulletin**, v.176, p.54–66, 2021.

RAMOS, T.M. Potencialidades da microscopia eletrônica (Transmissão e Varredura) e microscopia confocal como ferramentas para análises de amostras biológicas. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

RAJKOOMAR, N.; Murugesan, A.; Prabu, S.; Gengan, R.M. Synthesis of methyl piperazinyl-quinolinyl α aminophosphonates derivatives under microwave irradiation with Pd–SrTiO₃ catalyst and their antibacterial and antioxidant activities. **Taylor & Francis**, v. 195, p.1031-1038, 2020.

RASCHETTI, M.; BYZYNSKI, G.; RIBEIRO, C.; LONGO, E. N-Doping SrTiO₃@SrCo₃ Heterostructure Electrode: Synthesis, Electrochemical Characterization, and Varistor Application. **Ceramics International**, v.43, n.15, p.11722-32, 2017.

RICCARDI, C.S.; COSTA, P.I.; YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico, **Química Nova**, v. 25, n. 2, p.316-320, 2002.

ROBINSON, A. L. Electron Microscope Inventors Share Nobel Physics Prize. **Science**, v. 234, n. 4778, 1986.

RUSLING, J. F.; KUMAR, C. V.; GUTKINDE, J. S.; PATELE, V. Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of câncer. **Analyst**, v. 135, p. 2496–2511, 2010.

SANTOS, H.; SILVA, L.P.C.; PASSOS, F.B. Aplicação de Óxidos Mistos do Tipo Perovskita para Obtenção de Gás de Síntese a Partir da Conversão do Metano. *Revista Virtual Química*, v.7, n.4, p.1441-1468, 2015.

SANTOS, M. C. D.; MORAIS, C. L. M.; NASCIMENTO, Y. M.; ARAUJO, J. M. G.; LIMA, K. M. G. Spectroscopy with computational analysis in virological studies: A decade (2006–2016). **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, p. 244-256, 2017.

SEO, G.; LEE, G.; KIM, M. J.; BAEK, S-H.; CHOI, M.; KU, K. B.; LEE, C-S.; JUN, S.; PARK, D.; KIM, G. H.; KIM, S-J.; LEE, J-O.; KIM, T. B.; PARK, C. E.; KIM, S. I. 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, p.5135–5142, 2020.

SHAO, L.; JIANG, D.; XIAO, P.; ZHU, L.; MENG, S.; CHEN, M. Enhancement of g-C₃N₄ nanosheets photocatalysis by synergistic interaction of ZnS microsphere and RGO inducing multistep charge transfer. **Appl. Catal. B Environ.** v.198, p.200–210, 2016.

SHEN, M.; ZHOU, Y.; YE, J.; ABDULLAH AL-MASKRI, A. A.; KANG, Y.; ZENG, S.; CAI, S. Recent Advances and Perspectives of Nucleic Acid Detection for Coronavirus. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.10, n.02, p. 97-101, 2020.

SHIMADZU. New Concept in Multifunction X-Ray Diffractometry for the 21st Century Shimadzu X-ray Diffractometer XRD-7000. Disponível em: <https://shimadzu.ru/sites/shimadzu.seg/files/SMO/brochures/c141e006j-XRD-7000.pdf>.

SILVA, C.S. Espectroscopia no Infravermelho para Aplicações Forenses: documentoscopia e identificação de sêmen em tecidos. **Tese Doutorado**, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

SOUZA, A. E.; SILVA, R.A.; SANTOS, G. T. A.; MOREIRA, M.L.; TEIXEIRA, S. R.; LONGO, E. Efeito do tempo de sintetização em nanopartículas de sr₂ti₃ pelo método hidrotermal assistido por microondas. **54º Congresso Brasileiro de Cerâmica**, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 2010.

SPURGEON, S.R.; OPHUS, C.; JONES, L.; PETFORD-LONG, A.; KALININ, S.V.; OLSZTA, M.J.; DUNIN-BORKOWSKI, R.E.; SALMON, N.; HATTAR, K.; YANG, W.D.; SHARMA, R.; DU, Y.; CHIARAMONTI, A.; ZHENG, H.; BUCK, E.C.; KOVARIK, L.; PENN, R.L.; LI, D.; ZHANG, X.; MURAYAMA, M.; TAHERI, M.L. Towards data-driven next-generation transmission electron microscopy. **Nat Mater.** v. 20, n.3, p.274-279, 2021.

SUO, T.; LIU, X.; FENG, J.; GUO, M.; HU, W.; GUO, D.; HU, W.; GUO, D.; ULLAH, H.; YANG, Y.; ZHANG, Q.; WANG, X.; SAJID, M.; HUANG, Z.; DENG, L.; CHEN, T.; LIU, F.; XU, K.; LIU, Y.; ZHANG, Q.; LIU, Y.; XIONG, Y.; CHEN, G.; LAN, K.; CHEN, Y. ddPCR: a more accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n.1, p.1259–1268, 2020.

TABRIZI, M. A.; NAZARI, L.; ACEDO, P. A photo-electrochemical aptasensor for the determination of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 receptor-binding domain by using graphitic carbon nitride-cadmium sulfide quantum dots nanocomposite. **Biosensors and Bioelectronics**, v.196, p.113729, 2022.

TANG, W.; LIU, T.; ZHANG, M.; YUAN, F.; ZHOU, K.; LAI, R.; LIAN, Y.; XING, S.; XIONG, W.; ZHANG, M.; GAO, F.; ZHAO, B.; DI, D. The roles of metal oxidation states in perovskite semiconductors. **Matter**, v.6, p.3782–3802, 2023.

TONG, T.; ZHANG, M.; CHEN, W.; HUO, X.; XU, F.; YAN, H.; LAI, C.; WANG, W.; HU, S.; QIN, L.; HUANG, D. Recent advances in carbon-based material/semiconductor composite photoelectrocatalysts: Synthesis, improvement strategy, and organic pollutant removal. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 500, p.215498, 2024.

TRABUCCHI, A.; BOMBICINO, S.S.; MARFÍA I. J.; ADRIANA VICTORIA SABLJIC, V. A.; IACONO, F. R.; SMITH, I.; MC CALLUM, J. G.; TARGOVNIK, M. A.; WOLMAN, J. F.; FINGERMAN, M.; ALONSO, G. L.; MIRANDA, V. M.; VALDEZ, N. S. Novel bridge multi-species ELISA for detection of SARS-CoV-2 antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 511, p.113365, 2022.

TRONTO, J.; LEROUX, F.; DUBOIS, M.; TAVIOT, C.; VALIM, J.B. Hybrid organic–inorganic materials: Layered hydroxy double salts intercalated with substituted thiophene monomers. **J Phys Chem Solids**. v.67, n.5-6, p. 978-982, 2006.

TROQUE, B.F.; ELIZIÁRIO, S.A.; GODINHO, M.J.; KIMINAMI, R. H. G. A. Síntese in situ pelo método hidrotérmico de heteroestruturas de titanato-ferritas e sua atividade fotocatalítica. **Cerâmica**, v.64, p.248-253, 2018.

TRZECIAK A.M., AUGUSTYNIAK A.W. The role of palladium nanoparticles in catalytic C–C cross-coupling reactions. **Coord. Chem. Rev.** v.384, p.1–20, 2019.

UZUNIAN, A. Coronavirus SARS-CoV-2 and Covid-19. **J Bras Patol Med Lab**. v. 56, p. 1-4, 2020.

VADLAMANI, B.S.; UPPAL, T.; VERMA, S.C.; MISRA, M. Functionalized TiO₂ Nanotube-Based Electrochemical Biosensor for Rapid Detection of SARS-CoV-2. **Sensors**, v. 20, n.20, p.5871, 2020.

VEISI, P.; DORRAJI, M.S.S.; VATANPOUR, V.; RASOULIFARD, M.H.R. Dimensional effect of ZnO-g-C₃N₄ heterostructures on hydrophilic and anti-fouling properties of the PVDF/PAN composite membrane: Dye rejection. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v.11, p.110249, 2023.

VERNET, R.; CHARRIER, E.; GROGG, J.; MACH, N. A Quantitative ELISA Protocol for Detection of Specific Human IgG against the SARS-CoV-2 Spike Protein. **Vaccines**, v. 9, n.7, p.770, 2021.

VIEIRA, M.E.M.; SILVA, M.L.S.; OLIVEIRA, L.F.C.; PERRONE, I.T.; STEPHANI, R. Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) acoplada ao microscópio eletrônico de varredura (MEV): fundamentos e aplicações em produtos lácteos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, e262101018622, 2021.

VON ARDENNE M. Das Elektronen-Rastermikroskop. Theoretische Grundlagen. **Z. Tech. Phys.** v. 109, p.553-572, 1938.

WAHL, R.; VOGTENHUBER, D.; KRESSE, G. SrTiO₃ and BaTiO₃ revisited using the projector augmented wave method: Performance of hybrid and semilocal functionals. **Physical Review B**, v.78, p.104116, 2008.

WALDMAN, E.A.; SATO, A.P.S. Trajetória das doenças infecciosas no Brasil nos últimos 50 anos: um contínuo desafio. **Rev Saude Publica**, v. 50, p.68, 2016.

WANG, B.; WEI, C-Y.; WANG, K-W.; FU, B.; YONG CHEN, Y.; HAN, Y.; ZHANG, Z. Fabrication of near infrared light responsive photoelectrochemical immunosensor for in vivo detection of melanoma cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 239, p.115601, 2023.

WANG, G. L.; JIAO, H. J.; LIU, K. L.; WU, X. M.; DONG, Y. M.; LI, Z. J.; ZHANG, C. A novel strategy for the construction of photoelectrochemical sensors based on quantum dots and electron acceptor: The case of dopamine detection. **Electrochemistry Communications**, v. 41, p. 47-50, 2014.

WANG, J.; KUO, M.; ZENG, P.; XU, L.; CHEN, S.; PENG, T. Few-layer BiVO₄ nanosheets decorated with SrTiO₃: Rh nanoparticles for highly efficient visible-light-driven overall water splitting. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 279, p. 119377, 2020.

WANG, N.; PAN, R.; JI, L.; JIANG, D.; CHEN, H-Y. Photoelectrochemical analysis of the alkaline phosphatase activity in single living cells. **Analyst**, v. 146, p. 5528-5532, 2021.

WANG, W.; HUANG, X.; WU, S.; ZHOU, Y.; WANG, L.; SHI, H.; LIANG, Y.; ZOU, B. Preparation of p-n junction Cu₂O/BiVO₄ heterogeneous nanostructures with enhanced visible-light photocatalytic activity. **Applied Catalysis B: Environmental**, v.134-135, p. 293-301, 2013.

WANG, X.; MAEDA, K.; THOMAS, A.; TAKANABE, K.; XIN, G.; CARLSSON, J.M.; DOMEN, K.; ANTONIETTI, M. A metal-free polymeric photocatalyst for hydrogen production from water under visible light. **Nat. Mater**, v. 8, n.1, p.76–80, 2008.

WANG, Y.; TIAN Y.; YAN, L.; SU, Z. DFT Study on Sulfur-Doped g-C₃N₄ Nanosheets as a Photocatalyst for CO₂ Reduction Reaction. **Journal of Physical Chememistry**, v.122, p.7712–7719, 2018.

WATSON, J.; WHITING, P. F.; BRUSH, J. E. Interpreting a covid-19 test result. **BMJ**, v.369, p. m1808, 2020.

WEI, H.; ZHANG, C.; DU, X.; ZHANG, Z. Research progress of biosensors for detection of SARS-CoV-2 variants based on ACE2. **Talanta**, v. 251, p. 123813, 2023.

WOLYNEC, S. Técnicas Eletroquímicas em Corrosão. São Paulo: Edusp – **Editora da Universidade de São Paulo**, 2003.

WORD HEALTH ORGANIZATION CORONAVIRUS DISEASE (COVID-19), 2023. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/coronavirus-disease-\(covid-19\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/coronavirus-disease-(covid-19)). Acessado: 29 de novembro de 2023.

WU, G-H, WU Y-F, LIU X-W, RONG M-C, CHEN X-M, CHEN X. An electrochemical ascorbic acid sensor based on palladium nanoparticles supported on graphene oxide. **Anal. Chim. Acta**, v.745, p.33–37, 2012.

WU, Z., & MCGOOGAN, J. M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China. **JAMA**, v.323, n.13, p. 1239-1242, 2020.

XIAN, T.; YANG, H.; DI, L.; MA, J.; ZHANG, H.; DAI, J. Photocatalytic reduction synthesis of SrTiO₃-graphene nanocomposites and their enhanced photocatalytic activity. **Nanoscale Res. Lett.** v.9, n.1, p. 327, 2014.

XU, B.; ZHANG, Y.; LI, L.; SHAO, Q.; HUANG X. Recent progress in low-dimensional palladium-based nanostructures for electrocatalysis and beyond. **Coord. Chem. Rev**, v.459, 2022.

YAKOH, A.; PIMPITAK, U.; RENGPIPAT, S.; HIRANKARN, N.; CHAILAPAKUL, O.; CHAIYO, S. Paper-based electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: Detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen. **Biosensors Bioelectronics**, v.176, p.112912, 2021.

YANG, X.; FEI, Z.; ZHAO, D.; HAN ANG, W.; LI, Y.; DYSON, P.J. Palladium Nanoparticles Stabilized by an Ionic Polymer and Ionic Liquid: A Versatile System for C–C Cross-Coupling Reactions. **Inorg Chem.** v.47, n.8, p. 3292-3297, 2008.

YOTSUMOTO NETO, S. Desenvolvimento de imunossensores fotoeletroquímicos para detecção de *Leishmania (L.) infantum*. **Tese (Doutorado em Biotecnologia)**, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

YOUSSEF, H. A.; KOLHATKAR, G.; AMAECHI, C. I.; KATOCH, R.; GONZÁLEZ, Y.; MERLEN, A.; RUEDIGER, A. Giant step bunching on SrTiO₃ thin films grown epitaxially on vicinal MgO (100) surfaces. **Applied Surface Science**, v. 570, p.151266, 2021.

YU-LEI, D.; GUANG, C.; MING-SHENG, Z.; SENZU, Y. Phonon Characteristics of Polycrystalline Cubic SrTiO₃ Thin Films, **Chin.Phys.Lett** ,v.20, n.9, p. 1561, 2003.

ZAVJALOV, A.P.; LYUBAS, G.A.; SHARAFUTDINOV, M.R.; TARASOV, I.A.; BELOV, A.A.; SHICHALIN, O.O.; PAPYNOV E.K.; KRIVENTSOV, V.V.; KOSYANOV, D. YU. Fabrication and thermoelectric properties of SrTiO₃–TiO₂ composite ceramics. **Ceramics International**, v. 48, p. 36500–36514, 2022.

ZHENG, Y.; ZHOU, L.; YANG, Z.; YU, X.; SONG, Z.; HE, Y. High sensitivity SARS-CoV-2 detection using graphene oxide-multiplex qPCR. **Analytica Chimica Acta**, v.1234, p.340533, 2022.

ZHANG, L.; GUO, W.; LV, C.; LIU, X.; YANG, M.; GUO, M.; FU, Q. Electrochemical biosensors represent promising detection tools in medical field. **Advanced Sensor and Energy Materials**, v. 2, p. 100081, 2023.

ZHANG, L.; MOHAMED, H. H.; DILLERT, R.; BAHNEMANN, D. Kinetics and mechanisms of charge transfer processes in photocatalytic systems: A review. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v.13, n.4, p.263-276, 2012.

ZHANG, X.; YU, W.; GUO, Y.; LI, S.; CHEN, Y.; WANG, H.; BIAN, Z. Recent advances in photoelectrocatalytic advanced oxidation processes: From mechanism understanding to catalyst design and actual applications. **Chemical Engineering Journal**, v.455, p.140801, 2023.

ZHAO, C-Q.; DING, S-N. Perspective on signal amplification strategies and sensing protocols in photoelectrochemical immunoassay. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 391, p. 1–14, 2019.

ZHAO, Y.; XIANG, J.; CHENG, H.; LIU, X.; LI, F. Flexible photoelectrochemical biosensor for ultrasensitive microRNA detection based on concatenated multiplex signal amplification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 194, p.113581, 2021.

ZHOU, F.; YU, T.; DU, R.; FAN, G.; LIU, Y.; LIU, Z.; XIANG, J.; WANG, Y.; SONG, B.; GU, X.; GUAN, L.; WEI, Y.; LI, H.; WU, X.; XU, J.; TU, S.; ZHANG, Y.; CHEN, H.; CAO, B. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **Lancet**, v.395, p.1054–1062, 2020.

ZHU, J.; LI, H.; ZHONG, L.; XIAO, P.; XU, X.; YANG, X.; Zhao, Z.; LI, J. Perovskite Oxides: Preparation, Characterizations, and Applications in Heterogeneous Catalysis. **ACS Catalysis**, v. 4, n.9, 2917–2940, 2014.

ZHU, Z.; ZHOU, N.; LI, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, L. Step scheme Fe₂O₃/S doped g-C₃N₄ heterojunction photocatalysts for photo-fenton norfloxacin and tetracycline degradation. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v.160, p. 107423, 2023.

ZIVOJINOVIC, J.; PAVLOVIC, V.P.; KOSANOVIC, D.; MARKOVIC, S.; KRSTIC, J.; VLADIMIR A.; BLAGOJEVIC, V.A.; PAVLOVIC, V.B. The influence of mechanical activation on structural evolution of nanocrystalline SrTiO₃ powders. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 695, p.863-870, 2017.

ZOULEH, R. S.; RAHIMNEJAD, M.; NAJAFPOUR-DARZI, G.; SABOUR, D.; ALMEIDA, J. M.S.; BRETT, C.M.A. A catalase enzyme biosensor for hydrogen peroxide at a poly (safranin T)-ternary deep eutectic solvent and carbon nanotube modified electrode. **Microchemical Journal**, v. 195, p. 109475, 2023.



Evaluation of a photoelectrochemical platform based on strontium titanate, sulfur doped carbon nitride and palladium nanoparticles for detection of SARS-CoV-2 spike glycoprotein S1

Chirlene N. Botelho^a, Suringo S. Falcão^a, Rossy-Eric P. Soares^b, Silma R. Pereira^b, Alan S. de Menezes^c, Lauro T. Kubota^d, Flavio S. Damos^{a,*}, Rita C.S. Luz^{a,**}

^a Departamento de Química, Laboratório de Sensores, Dispositivos e Métodos Analíticos, Universidade Federal do Maranhão, 65080-805, São Luís, MA, Brazil

^b Departamento de Biologia, Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Maranhão-UFMA, 65080-805, São Luís, MA, Brazil

^c Departamento de Física, Central Analítica de Materiais, Universidade Federal do Maranhão, CEP, 65080-805, São Luís, MA, Brazil

^d Instituto de Química, Laboratório de Eletroquímica, Eletroanalítica e Desenvolvimento de Sensores, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

SARS CoV-2
Photoelectrochemical platform
SrTiO₃
Palladium nanoparticles
g-C₃N₄-S

ABSTRACT

This work aims to develop a photoelectrochemical (PEC) platform for detection of SARS-CoV-2 spike glycoprotein S1. The PEC platform is based on the modification of a fluorine-doped tin oxide (FTO) coated glass slide with strontium titanate (SrTiO₃ or ST), sulfur-doped carbon nitride (g-C₃N₄-S or CNS) and palladium nanoparticles entrapped in aluminum hydroxide matrix (PdAlO(OH) or PdNPs). The PEC platform was denoted as PdNPs/CNS/ST/FTO and it was characterized by SEM, TEM, FTIR, DRX, and EIS. The PEC response of the PdNPs/CNS/ST/FTO platform was optimized by evaluating the effects of the concentration of the donor molecule, the nature of the buffer, pH, antibody concentration, potential applied to the working electrode, and incubation time. The optimized PdNPs/CNS/ST/FTO PEC platform was modified with 5 μg mL⁻¹ of antibody for determination of SARS-CoV-2 spike glycoprotein S1. A decrease in the photocurrent was observed with an increase in the concentration of SARS-CoV-2 from 1 fg mL⁻¹ to 1000 pg mL⁻¹ showing that the platform is a promising alternative for the detection of S1 protein from SARS-CoV-2. The designed PEC platform exhibited recovery percentages of 96.20% and 109.65% in artificial saliva samples.

1. Introduction

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is responsible for the COVID-19, which was announced as a pandemic by the World Health Organization (WHO) on March 11, 2020 due to millions of cases confirmed globally (World Health Organization, 2020). Nowadays, COVID-19 has become a huge public health issue that has infected more than 271 million and killed more than 5.3 million people worldwide (World Health Organization, 2021). The fifth wave of COVID-19 caused by the emergence of the omicron variant, which is characterized by deletions and more than 30 mutations, brought greater transmissibility, higher viral binding affinity and immune escape. In addition, there are still uncertainties regarding the behavior of this variant, including in relation to vaccine-mediated immunity (Karim and

Karim, 2021). Therefore, the development of devices to confirm/detect quickly and in a reliable form the infection by SARS-CoV-2 virus is of high importance nowadays since the early and fast diagnosis of infected patients can delay the spread of this infectious disease (Yakoh et al., 2021; Morales-Narvaez and Dincer, 2020). In this sense, there has been proposed a number of methods for the detection of the corona virus based on several different strategies including detection the viral nucleic acids during acute infection (Chu et al., 2020), methods based on artificial intelligence (Pirouz et al., 2020), serological assay (Amanat et al., 2020), and sensors (Kumar et al., 2022).

In addition, there are many reliable, robust and well-established commercially available methods based on different operational principles for the SARS-CoV-2 detection including those based on quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), enzyme-

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: flavio.damos@ufma.br (F.S. Damos), rita.luz@ufma.br (R.C.S. Luz).

<https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100167>

Received 11 March 2022; Received in revised form 3 May 2022; Accepted 14 May 2022

Available online 22 May 2022

2590-1370/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

linked immunosorbent assay (ELISA), and conventional lateral flow immunoassays. The RT-PCR has been presented as the gold standard method for the COVID-19 diagnosis and it can be performed by minimally invasive sampling procedures, however, has been related some difficulties in the use of the RT-PCR including false-negative rate range up to 37% (Mehmandoust et al., 2022). The ELISA is a simple and safe assay for serum and plasma samples from infected patients and it involves multiple liquid handling steps. The conventional lateral flow immunoassays (LFIA) are quick, reliable and low cost tests based on the application of a drop of sample on an immunochromatographic stick; however, the conventional lateral flow immunoassays present limitations in quantitative and sensitive analyses of SARS-CoV-2 detection (Li, and Lillehoj, 2021; Oliveira et al., 2020; Yadav et al., 2021). Therefore, a specific, reliable, easy to use, simple, fast, and portable method for the quantitative and sensitive detection of SARS-CoV-2 is a feasible alternative to commercially applied methods.

In this context, the photoelectrochemical methods stand out as a promising approach for the development of sensors for immunodiagnosis of SARS-CoV-2 biomarkers. It has attracted growing interest in bioanalysis since the excitation (light) and detection (current) signals are of different nature, such as this technique can operate with low background signal contributing for a high sensitivity (Zhang et al., 2019).

An essential issue for the establishment of an efficient photoelectrochemical sensor is the choice of the material exploited in the development of the photoelectroactive platform, since it determines the efficiency of photogenerated charges lifetime and the intensity of the photocurrent (Zhang et al., 2019).

The semiconductors are among the most exploited materials in development of photoelectrochemical sensors, since these materials can absorb light from an incident radiation source to produce electron/hole couples and generate photocurrent (Bard, 2001). Due to the capability of the semiconductors in conversion of photon-to-current, they are widely used for construction of detectors for photoelectrochemical systems and photocatalytic applications. In addition, it is also possible to improve the conversion efficiency of the semiconductors through the interaction of these materials with sensitizing species and/or by combining two or more photoactive materials.

Semiconductors based on ceramic materials have received high attention in the development of devices based on photo-to-electron conversion (Rozhansky and Zakheim, 2005) due to its exquisite properties including ferroelectricity, piezoelectricity, electro-optical, magneto-optical properties, good chemical resistance, resistance to use in high temperatures etc. (Magalhães et al., 2017). Among the ceramic based materials, perovskites, such as strontium titanate (SrTiO_3) presents very interesting characteristics to development of sensors such as high chemical and thermal stability (Yang et al., 2020). However, SrTiO_3 presents a high band gap such as it presents low capability to produce electron/holes pairs under incidence of visible light.

Graphitic carbon nitride ($\text{g-C}_3\text{N}_4$) has attracted considerable attention, especially in the recent years, in the fields of photocatalysis, photoelectrochemistry, and electrochemistry owing to its ability to be doped and its tunable structure, photocatalytic and photoelectronic properties (Sagara et al., 2016; Yu et al., 2017). However, the undoped $\text{g-C}_3\text{N}_4$ can not exhibit a photocatalytic performance as good as expected owing to fast recombination of photoinduced charge carriers (Niu et al., 2012; Li et al., 2014; Fu et al., 2017). In order to solve this problem, several strategies has been proposed (Chai et al., 2017; Zhou et al., 2018; Guo et al., 2020), including the doping with metal and/or non-metal chemical elements which has showed to be one of the most effective methods to improve the electronic structure and photoelectrochemical properties of the $\text{g-C}_3\text{N}_4$. In this sense, several non-metal dopants have been investigated, including sulfur (Wang et al., 2018; Li et al., 2019). The doping of $\text{g-C}_3\text{N}_4$ by sulfur has indicated that the dopant can play a significant role in tuning the electronic structure, reducing the band gap, broadening the light responsive region, assisting the separation of

photo-generated charge carriers, thus creating more active sites on $\text{g-C}_3\text{N}_4$ (Jiang et al., 2017; Wang et al., 2018; Li et al., 2019).

Palladium is highly exploited in electrocatalysis of a number of species (Li et al., 2005; Tronto et al., 2006; Domínguez-Domínguez et al., 2008) and it is highly exploited as nanoparticles supported on several materials in order to obtain palladium-supported nanoparticles of high stability and high surface-to-volume ratio (Choudary et al., 2002; Yang et al., 2008; Gniewek et al., 2008). In addition, palladium nanoparticles based materials has been exploited in catalytic and electrocatalytic reactions of many species (Trzeciak and Augustyniak, 2019; Xu et al., 2022). The proposed PEC immunosensor exploits ascorbic acid as donor molecule. Thus, Pd nanoparticles were employed in order to improve the electrochemical oxidation of the donor molecule (Wu et al., 2012).

In this context, the present work exploits the use of SrTiO_3 combined to sulfur doped $\text{g-C}_3\text{N}_4$ and nanoparticles of palladium supported in aluminum hydroxide as a photoelectrochemical platform for detection of SARS-CoV-2 spike glycoprotein S1.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and solutions

All chemicals were of analytical grade and they were used without further purification steps. Strontium titanate (SrTiO_3), palladium nanoparticles trapped in aluminum hydroxide matrix ($\text{Pd}/\text{AlO}(\text{OH})$), 2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-yl] sulfonic ethane (HEPES), chitosan (1%), glutaraldehyde (5%), bovine albumin (BSA) (1%), and thiourea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$) were purchased from Sigma-Aldrich, USA.

Anti-SARS-CoV-2 spike glycoprotein S1 antibody (Ab273074) and SARS-CoV-2 spike glycoprotein S1 (Ab272105) were purchased from abcam, USA. These proteins were denoted as anti-SARS-CoV-2 and SARS-CoV-2, respectively. Monobasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), acetic acid (CH_3COOH), sodium hydroxide (NaOH), ascorbic acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ or AA), and boric acid (H_3BO_3) were purchased from Isofar - Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda, Brazil. Ethanol was purchased from Merck - Brazil. All working solutions were prepared with water purified in an OS100LXE system from GEHAKA Company.

2.2. Preparation of sulfur-doped carbon nitride and construction of the PdNPs/CNS/ST/FTO PEC platform

Sulfur-doped carbon nitride ($\text{g-C}_3\text{N}_4\text{-S}$ or CNS) was synthesized using thiourea (H_2NCSNH_2) as precursor under high temperature heating conditions using a muffle, according to (Guan et al., 2021). Firstly, a certain amount of the precursor was weighed, taken to the muffle, keeping the temperature at 550°C for 2 h, then the material was cooled to room temperature. A yellow $\text{g-C}_3\text{N}_4\text{-S}$ (CNS) product obtained was ground to a fine powder with aid of a mortar and pestle.

For the construction of the PEC platform, 3 mg of SrTiO_3 (ST), 1 mg of CNS and 3 mg of $\text{Pd}/\text{AlO}(\text{OH})$ (represented as PdNPs) were weighed for dispersion in 20 μL of deionized water for further mixing and homogenization. Then 20 μL of this dispersion was removed to be placed directly on the surface of the FTO electrode, which was dried at room temperature and then taken to the heating plate at a temperature of 350°C for 30 min, thus forming a film of the composite material PdNPs/CNS/ST on the FTO surface.

Then, a stock solution of SARS-CoV-2 antibody was prepared at a concentration of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ with phosphate buffer solution (PBS) from which SARS-CoV-2 antibody solutions were prepared at concentrations: 1, 2.5 and $5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

For the modification of the PdNPs/CNS/ST/FTO platform with SARS-CoV-2 antibody, 15 μL of chitosan (1% m/v) and 15 μL of glutaraldehyde (5% m/v) were mixed. From this solution an aliquot of 10 μL was removed and mixed with 10 μL of the SARS-CoV antibody solution. Then, 10 μL of this last solution was added to the surface of the PdNPs/CNS/ST/FTO platform and the platform modified with SARS-CoV-2

antibody was left to dry for 30 min. After this step, 10 μL of BSA (0.5% m/v) was added to the antibody-modified platform, which was allowed to dry for 10 min, and washed with deionized water to remove weakly adsorbed species, obtaining the anti-SARS-CoV-2 immunosensor (anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO). Finally, the study of the SARS-CoV-2/anti-SARS-CoV-2 interaction was performed by incubating the surface of the immunosensor with 10 μL of SARS-CoV-2 solutions for 30 min. Then, the amperograms were recorded by applying a potential of 0.0 V vs Ag/AgCl_(Sat. KCl).

2.3. Characterization of the materials used to build the PEC platform

The SEM measurements were carried out in a Scanning Electron Microscope - FEI Quanta 200 FEG and TEM measurements were performed on a Tecnai G2-20 Transmission Electron Microscope - FEI SuperTwin 200 kV.

FT-IR measurements were performed to identify the functional groups of the materials exploited to construct the PEC platform. For this purpose, a KBr pellet was prepared mixing KBr powder to the compounds to be analyzed (1 wt%). The mixtures were pressed in specific molds with a pressure of 10–15 kpsi, thus forming a disc. In order to obtain the FTIR spectra, a Shimadzu spectrophotometer, IR model Prestige-21 was used in the spectral range from 4000 to 400 cm^{-1} . The crystal structure of the materials were analyzed by X-ray diffraction (XRD) device using a Bruker D8 Advance diffractometer, with a CuK α radiation tube operating at 40 kV/40 mA. XRD measurements were performed with a 2θ in the range of 10°–90°, with a step size of 0.02° and counting time of 0.5 s.

2.4. Electrochemical and photoelectrochemistry measurements

The electrochemical and photoelectrochemical measurements (PEC) were performed with an Autolab potentiostat/galvanostat model PGSTAT 128N from Metrohm-Autolab coupled to a Nova 2.1 software. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurements were also performed with an Autolab potentiostat/galvanostat model PGSTAT 128N from Metrohm-Autolab equipped with a frequency response analyser (FRA 2) in a frequency ranging from 10⁵ Hz to 0.1 Hz. In both cases, a three-electrode conventional cell composed of a working electrode (FTO - Fluorine-Doped Tin Oxide), an Ag/AgCl electrode as reference electrode and a gold electrode as auxiliary electrode. The PEC measurements were performed with a commercial lamp of 30 W as light source attached to a homemade dark box.

2.5. Preparation and analysis of saliva samples

In order to evaluate the applicability of the immunosensor were performed analysis of artificial saliva samples acquired at a local drugstore. The detection of the SARS-CoV-2 was performed with the anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO immunosensor platform by using the external calibration method.

The samples were prepared containing different concentrations of SARS-CoV-2 (1 fg mL⁻¹, 10 fg mL⁻¹, 100 fg mL⁻¹, 1 pg mL⁻¹, 10 pg mL⁻¹ and 100 pg mL⁻¹) and then the immunosensor (anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO) was incubated with 10 μL of each sample for 30 min. Before the recognition of SARS-CoV-2 spike glycoprotein S1, 10 μL of BSA (0.5% m/v) was added on the sensor surface for 5 min in order to block non-specific bindings. Finally, for the PEC measurements, the immunosensor was washed with deionized water and measurements were performed in 0.1 mol L⁻¹ HEPES buffer solution (pH 7.0), containing 0.3 mol L⁻¹ of AA, $E_{\text{ap}} = 0.0$ V.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the materials used to build the PEC platform

The Fig. 1 shows the scanning electron microscopy (SEM) images of (a) strontium titanate, SrTiO₃, (b) sulfur-doped carbon nitride, g-C₃N₄-S, (c) palladium nanoparticles trapped in aluminum hydroxide matrix, Pd/AlO(OH), and (d) the composite material (PdNPs/CNS/ST). The SEM image of SrTiO₃ show nanometric particles with edges relatively smooth. On the other hand, the sulfur doped carbon nitride presented micrometer structures of exfoliated surface.

The SEM image of the palladium nanoparticles trapped in aluminum hydroxide matrix, Pd/AlO(OH) show rugous micrometric particles (Fig. 1c). On the other hand, the PdNPs/CNS/ST composite presents a heterogeneous morphology with particles of different dimensions including micrometric and nanometric particles. TEM image presented in Fig. 1e show the presence of the palladium nanoparticles in the PdNPs/CNS/ST composite. Fig. 1f show the EDX spectrum of the PdNPs/CNS/ST sample. As can be seen, the EDX spectrum has shown the presence of Pd, Al, C, N, Ti, O, and Sr elements on the surface of composite suggesting the successful preparation of PdNPs/CNS/ST sample.

The materials that make up the PEC platform and the complete composite material were characterized by FTIR and X-Ray Diffraction (XRD) techniques. In this sense, Fig. 2 shows the FTIR spectra for palladium nanoparticles trapped in aluminum hydroxide matrix (PdAlO(OH) or PdNPs). The PdNPs (blue spectrum) show a peak around 3450 cm^{-1} and a weak band at 1641 cm^{-1} referring to the elongation of adsorbed water. In addition, bands at 1072 cm^{-1} and 740, 620 and 479 cm^{-1} correspond, respectively, to the symmetrical vibration Al–OH and Al–O groups, respectively (Liu et al., 2012; Abdollahifar et al., 2014; Choi et al., 2018).

The g-C₃N₄-S (CNS) spectrum (Fig. 2, Green spectrum) presented bands in 3500–3000 cm^{-1} corresponding to the stretching vibration of N–H probability attributed to uncondensed amine groups and O–H groups from adsorbed water molecules. The bands between 1200 and 1700 cm^{-1} can be assigned to stretching vibration modes of the aromatic CN heterocycle and a sharp absorption band appearing at 810 cm^{-1} is assigned to the stretching vibration of the triazine units (Guan et al., 2021). The spectrum obtained for SrTiO₃, ST (Fig. 2, red spectrum) shows peaks around 1470 cm^{-1} that can be attributed to the elongation modes of the carboxylate group (COOH). The peaks around 851 cm^{-1} and 585 cm^{-1} correspond to the vibration and elongation of Ti–O (Xian et al., 2014; Mohammadi et al., 2020). The spectrum obtained for the PdNPs/CNS/ST composite (Fig. 2, black spectrum) indicate the presence of the ST with CNS and PdNPs, since the bands related to each material are observed for the complete composite.

Fig. 3 shows the diffractograms of the materials that make up the composite. In the ST XRD pattern (red diffractogram) it is possible to observe the peaks corresponding to the planes (100), (110), (111), (200), (210), (211), (220), (310), and (222) that belong to the cubic perovskite structure with space group Pm-3m (ICDD-01-084-0444). The peaks close to 25.0° and 27.5° are impurities not identified.

The CNS diffractogram (Fig. 3, green diffractogram) shows the two (001) and (002) peaks at 13.10° and 27.43°, respectively, corresponding to interlayer stacking of the aromatic system, that are characteristic of graphitic materials (Wang et al., 2008; Shao et al., 2016; Cao et al., 2017). Finally, in Fig. 3, blue diffractogram, peaks characteristic of the planes (020), (120), (031), (200), (002), and (251) can be observed, which are attributed to the nanocrystalline structure of the aluminum oxide hydroxide, with orthorhombic structure and space group Amam. It is also noted that there is no peak observed for the PdNPs material, as observed in the FTIR spectrum (Fig. 2, blue spectrum), which is due to the Pd/AlO(OH) compound (described as PdNPs) presenting only 0.5% Pd metal (by weight) (Goksu, 2015). In addition, the XRD spectrum of the material PdNPs/CNS/ST (black diffractogram) shows characteristics of the three above-mentioned patterns, indicating the mixing of the

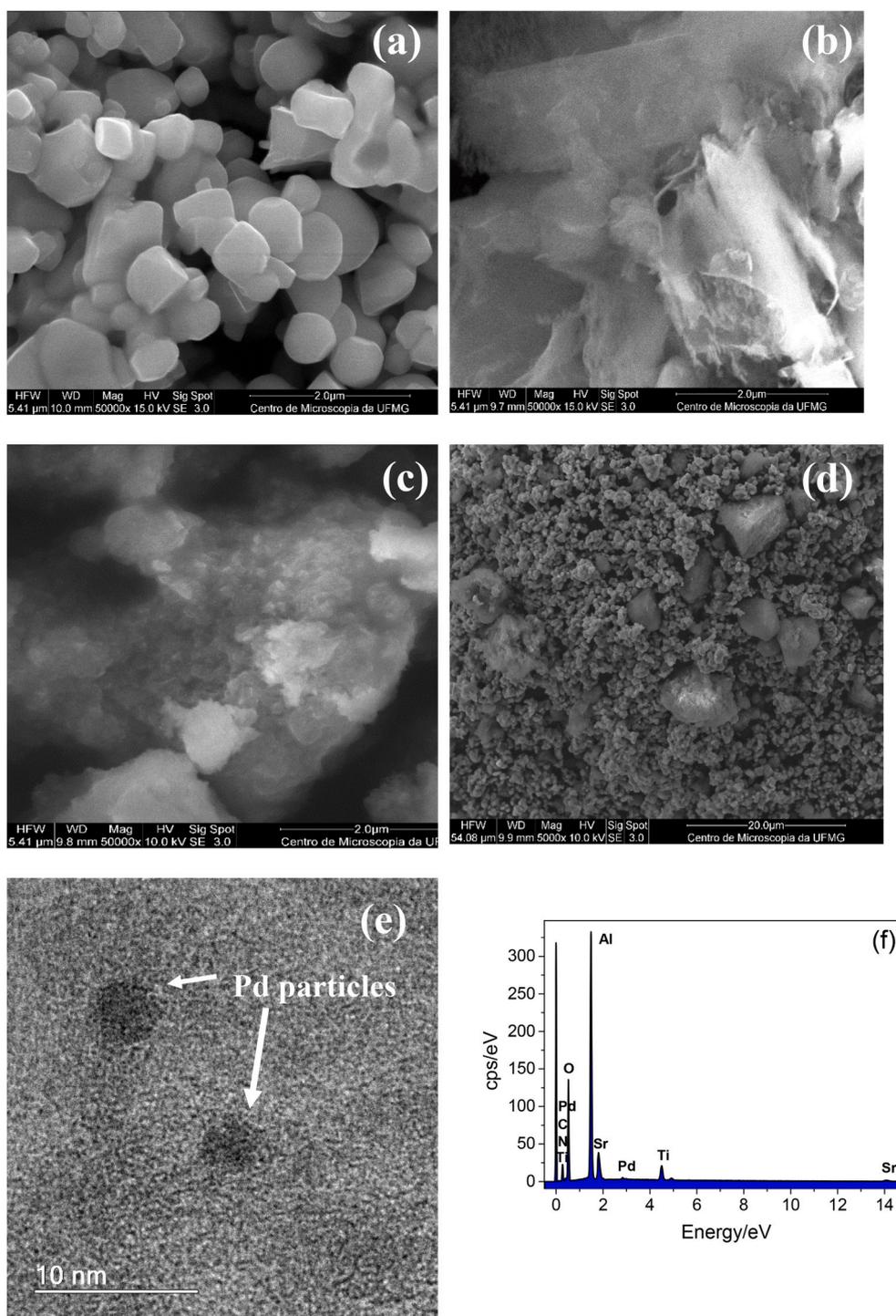


Fig. 1. SEM images of scanning electron microscopy images of (a) strontium titanate, SrTiO_3 , (b) sulfur-doped carbon nitride, $\text{g-C}_3\text{N}_4\text{-S}$, (c) palladium nanoparticles trapped in aluminum hydroxide matrix, $\text{Pd/AlO}(\text{OH})$, and (d) the composite material (PdNPs/CNS/ST), (e) TEM image of PdNPs/CNS/ST sample, (f) and EDX spectrum of the PdNPs/CNS/ST sample.

three studied materials.

3.2. Electrochemical and photoelectrochemistry measurements

Fig. 4a shows the amperograms referring to the FTO platforms modified with PdNPs/ST , CNS/ST , PdNPs/CNS , and PdNPs/CNS/ST/FTO in the presence of a 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer solution (PBS) in the absence and presence of 0.2 mol L^{-1} AA, under an applied potential of 0.0Vv Ag/AgCl and incidence of chopped light. For all

photoelectrochemical platforms, there is a significant increase in photocurrents when they are in the presence of the donor molecule. The increase of the photocurrent in the presence of donor molecule is due to a lower recombination of the photogenerated electron/hole pairs due to the transfer of electrons from the AA to the platforms. However, the comparison of the photocurrent of the different modified FTO electrodes shows that the FTO modified with PdNPs/CNS/ST presented a significantly higher photocurrent compared to the other electrodes. This result is probably due to the strong synergism existing in relation to strontium

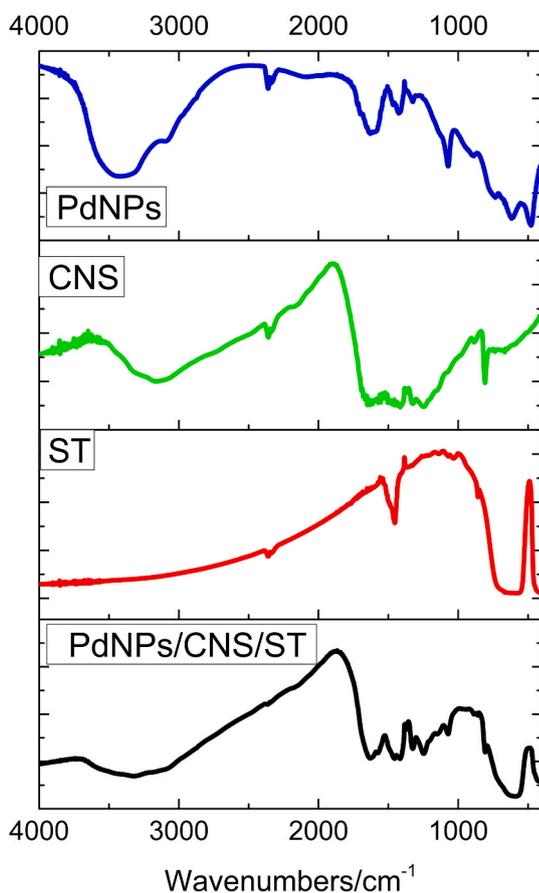


Fig. 2. FTIR spectra for PdNPs, CNS, ST, and PdNPs/CNS/ST.

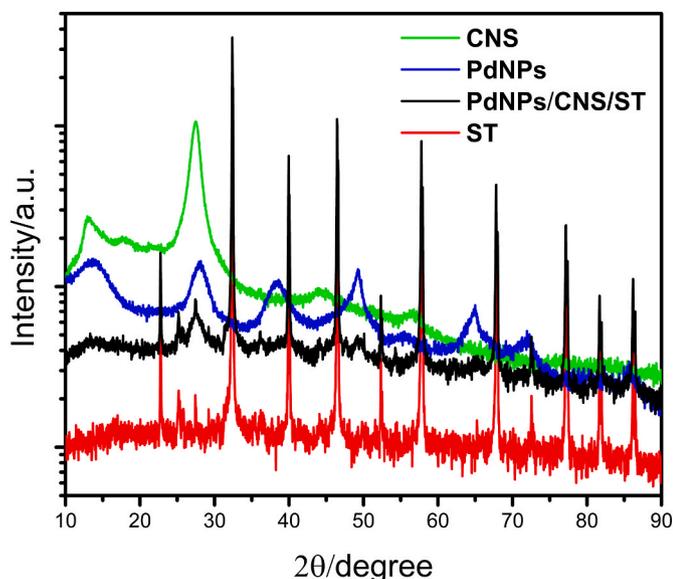


Fig. 3. DRX spectra for the ST (SrTiO_3); CNS ($\text{g-C}_3\text{N}_4\text{-S}$); PdNPs (PdAlO(OH)), and PdNPs/CNS/ST.

titanate, sulfur-doped carbon nitride and palladium nanoparticles trapped in aluminum hydroxide matrix. The combination of these three materials provided an increase in the speed of electronic transfer of ascorbic acid, thus favoring a greater sensitivity of the system. The figure inserted in Fig. 4a shows the Nyquist diagrams for the PdNPs/CNS/ST/FTO platform in the presence of 0.1 mol L^{-1} KCl containing 5

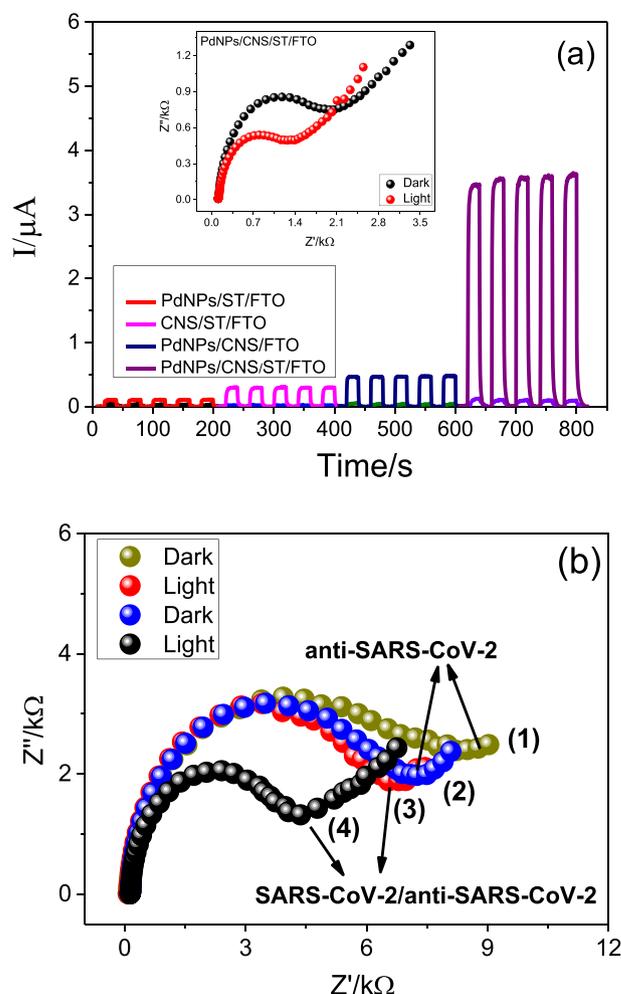


Fig. 4. (a) Amperograms obtained for PdNPs/ST/FTO (red amperogram), CNS/ST/FTO (pink amperogram), PdNPs/CNS/FTO (blue amperogram), PdNPs/CNS/ST/FTO (purple amperogram). Experiments carried out in 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer solution, pH 7.0. $E_{\text{appl.}} = 0.0 \text{ V}$ vs Ag/AgCl. Inset of Fig. 4(a): Nyquist plots for the PdNPs/CNS/ST/FTO platform without and with incidence of visible LED light. (b) Nyquist plots for the anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO platform without (spectrum 1) and with incidence of visible LED light (spectrum 2), Nyquist plots for the anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO platform without (spectrum 3) and with incidence of visible LED light (spectrum 4) after incubation in a SARS-CoV-2 solution. EIS experiments performed in 0.1 mmol L^{-1} KCl solution containing 5 mmol L^{-1} $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ and $E_{\text{appl.}} = 0.3 \text{ V}$ vs Ag/AgCl. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

mmol L^{-1} of $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. The electrochemical impedance spectra (EIS) were obtained in the absence (black spectrum) and presence (red spectrum) of visible LED light. According to this figure, it is observed that in the presence of light there is a decrease in the resistance to charge transfer between the redox probe and the surface of the modified FTO. This decrease suggests an increased photogeneration of the electron/hole pairs on the surface of the FTO containing the PdNPs/CNS/ST composite material.

Fig. 4b shows the EIS for the anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO immunosensor platform in the absence (spectrum 1) and presence (spectrum 2) of visible LED light as well as the EIS for the anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO immunosensor platform previously incubated in a solution containing the SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2/anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO immunosensor platform) in the absence (spectrum 3) and presence (spectrum 4) of light. As can be seen, the incidence of light provides a decrease of the charge transfer resistance

between the redox probe and the PEC platform. These results suggest that the electrode modified with PdNPs/CNS/ST is a sensitive electrochemical platform for monitoring of SARS-CoV-2, since the SARS-CoV-2/anti-SARS-CoV-2 interaction has promoted a change of the analytical signal obtained with the platform for the probe molecule. Thus, the best conditions for obtaining the analytical signal of the donor molecule were further evaluated through the study of its concentration, pH of the medium, type of buffer solution and potential applied to the working electrode.

Fig. S1a shows an increase of the photocurrent with an increase of the concentration of ascorbic acid (AA) from 0 to 0.4 mol L⁻¹. As can be seen, the photocurrent has increased significantly from 0 up to 0.3 mol L⁻¹ and for AA concentrations higher than 0.3 mol L⁻¹ there is very low variation of the photocurrent of the platform for the donor molecule (Fig. S1a and S1a1) indicating that for concentrations higher than 0.3 mol L⁻¹ is reaching a saturation of the response due to the more difficult oxidation of the donor molecule on the photoelectrochemical platform surface.

Fig. S1b shows the amperograms obtained for 0.1 mol L⁻¹ PBS with pH values ranging from 5.0 to 8.0. The photocurrent values increase from pH 5.0 up to pH 7.0 and decrease for pH values higher than 7.0 (Fig. S1b1). This result suggests that in an electrolyte that has an equal concentration of hydronium ions and hydroxyl ions, there is greater stability for the photoelectrochemical platform and, consequently, a better response for the donor molecule. In this sense, an electrolyte solution with a pH value of 7.0 was used for the other studies.

Fig. S1c shows amperograms for different buffers (Britton-Robinson – BR; Phosphate – PBS; Mcllvaine – MC; Tris(hydroxymethyl)amino-methane hydrochloride – TRIS; Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid) – PIPES; and N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) – HEPES). According to Fig. S1c it is observed that a higher photocurrent was achieved with the HEPES buffer. The HEPES buffer may act as an effective antenna molecule to some semiconductors improving the visible light photoactivity (Qiu et al., 2018; Yotsumoto Neto et al., 2019). Thus, the HEPES buffer probably can interact with the photoactive composite improving the photocurrent of the photoelectrochemical platform.

Fig. S1d shows the photocurrent responses of the platform for different potentials applied to the working electrode (from -0.3 to +0.3 V vs Ag/AgCl) to favor AA oxidation and verify at which potential the maximum oxidation of the donor molecule occurs. Based on the amperograms, it is observed that the photocurrent increased from -0.3 V to 0.0 V and remained constant between 0.0 and 0.1 V. At potentials higher than 0.1 V, a decrease in the platform photocurrent is observed, probably due to higher charge recombination. In this context, the 0.0 V potential was chosen to be applied to the working electrode in further studies.

Fig. S2a shows an amperometric response of the PdNPs/CNS/ST/FTO platform modified with SARS-CoV-2 antibody at different concentrations 0–10 µg mL⁻¹. These studies were performed in 0.1 mol L⁻¹ HEPES buffer solution, pH 7.0, under an applied potential (E_{appl.}) of 0.0 V vs Ag/AgCl. This figure shows that increasing the antibody concentration from 0 to 10 µg mL⁻¹ provides a gradual decrease in the photocurrent of the photoelectrochemical platform in the presence of AA. These results suggest that the SARS CoV-2 antibody makes the oxidation of the donor molecule more difficult, favoring the recombination of photogenerated charges. It is observed that after the immobilization of the antibody, there is a variation in the photocurrent of the system, which increases more significantly between 0 and 5 µg mL⁻¹ and remains practically constant between the concentration of 5 and 10 µg mL⁻¹. Due to the small difference between photocurrents for SARS-CoV-2 antibody concentrations between 5 and 10 µg mL⁻¹ and the economy of the reagent, the concentration of 5 µg mL⁻¹ was chosen for the other studies.

The SARS-CoV-2/anti-SARS-CoV-2 interaction time is extremely important for the development and application of an immunosensor in

order to find a better interaction between biological materials on the anti-SARS-CoV-2 modified platform. Thus Fig. S2b shows amperograms for different incubation times (0; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; and 40 min) of the anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO immunosensor platform in a solution of SARS-CoV-2. Fig. S2b shows that there is a gradual decrease in the photocurrent of AA on the PEC platform up to a time of 30 min with the increase of the incubation time, indicating an increase in the recombination of photogenerated charges on the electrode surface. After this time, it is observed that the photocurrent does not change and remains constant up to 40 min. In this sense, an incubation time of 30 min was fixed for the construction of the analytical curve.

The evaluation of the precision of the PdNPs/CNS/ST/FTO platform was performed in the presence of 0.3 mol L⁻¹ AA through the repeatability of 24 successive measurements of the photocurrent performed within a time interval of 1000 s. Fig. S2c shows the amperograms for the PdNPs/CNS/ST/FTO PEC platform (black amperogram), SARS-CoV-2 antibody modified PdNPs/CNS/ST/FTO platform (red amperogram) and the SARS-CoV-2/anti-SARS-CoV-2 modified PdNPs/CNS/ST/FTO platform (blue amperogram). After performing the measurements, it was possible to assess the precision of the sensor considering the relative standard deviation (RSD) of all photocurrent values (0.12%, 0.56% and 1.62%, respectively). From the results, it can be seen that the immunosensor before and after the immobilization of SARS-CoV-2/anti-SARS-CoV-2 provided us with excellent values of RSD, so the immunosensor platform has good repeatability for measurements performed on the same working day. Additionally, in order to verify the stability of the platform after the immobilization of 5 µg mL⁻¹ of the SARS-CoV-2 antibody on the PdNPs/CNS/ST/FTO platform, five PEC platforms were prepared in the same way and on different working days (Fig. S2d) Fig. S1d. Thus, a RSD of about 2.3% was calculated for the prepared platforms, which suggests that the anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO immunosensor platform presents good reproducibility.

Fig. 5a shows the amperograms for different concentrations of SARS-CoV-2 (from 0 to 1000 pg mL⁻¹). In this figure, it can be seen that as the concentration of SARS-CoV-2 was increased, a decrease in the photocurrent of the system was observed. As can be seen in Fig. 5b, the association between SARS-CoV-2 and immobilized antibody increases the shift of the photocurrent [(ΔI = (I₀ - I)] of the immunosensor, showing that the photocurrent intensity is proportional to the logarithm of SARS-CoV-2 concentration, where I₀ and I are the photocurrent of the anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO immunosensor platform before and after incubating with SARS-CoV-2, respectively.

The analytical curve for SARS-CoV-2 exhibited two good linear relationships for concentrations ranging from 1 to 1000 fg mL⁻¹ and 1–1000 pg mL⁻¹. The linear regression equations were ΔI/µA = 4.76 + 0.84 log ([SARS-CoV-2]/pg mL⁻¹), with a correlation coefficient of 0.992 and ΔI/µA = 4.64 + 0.47 log ([SARS-CoV-2]/pg mL⁻¹) with a correlation coefficient of 0.996. The proposed method is able to experimentally detect 1 fg mL⁻¹. The analytical characteristics of this PEC immunosensor were compared to previously reported methods. It can be seen from Table S1 (Funari et al., 2020; Imran et al., 2021; Karakus et al., 2021; Moitra et al., 2020; Pramanik et al., 2021; Rahmati et al., 2021; Vadlamani et al., 2020; Yakoh et al., 2021) show that the proposed PEC immunosensor exhibits some superior characteristics or similar to the others immunosensors for SARS-CoV-2.

The mechanism by which the anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO PEC immunosensor detects the presence of SARS-CoV-2 under visible LED light illumination is presented in Fig. 6. According to the proposed mechanism, the PdNPs/g-C₃N₄S material on the surface of the SrTiO₃/FTO platform captures photons promoting electrons from valence band to conducting band giving rising to e⁻/h⁺ couples. Thus the electron photogenerated at conducting band of PdNPs/g-C₃N₄S can be injected in the conduction band of the perovskite (SrTiO₃) and later to the FTO electrode and the hole in the valence band of the PdNPs/g-C₃N₄S can be transferred to the hole scavenger molecule. Simultaneously, the SARS-CoV-2 protein present in the sample can interact with the immobilized

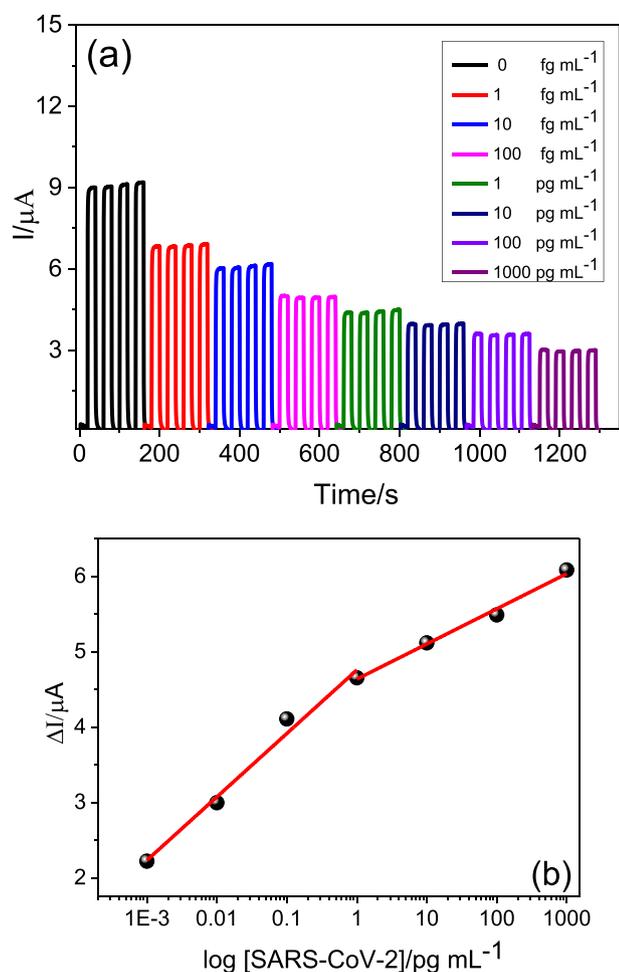


Fig. 5. (a) Photocurrent response for anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO immunosensor for blank (black amperogram) and after incubating in different concentrations of SARS-CoV-2: 1 fg mL⁻¹; 10 fg mL⁻¹; 100 fg mL⁻¹; 1 pg mL⁻¹; 10 pg mL⁻¹; 100 pg mL⁻¹; 1000 pg mL⁻¹ (other amperograms). (b) Analytical curve for SARS-CoV-2 detection with the anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO immunosensor platform. Measurements carried out in 0.1 mol L⁻¹ HEPES solution (pH 7.0) containing 0.3 mol L⁻¹ AA. $E_{app} = 0.0$ V vs Ag/AgCl_(sat. KCl). $t_{inc} = 30$ min. The RSD was less than 1%.

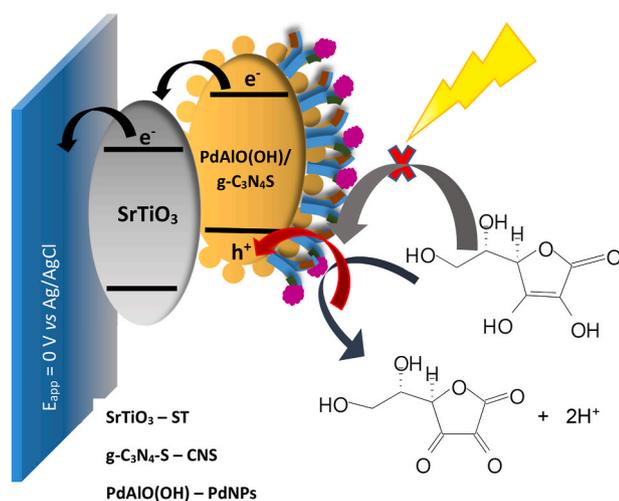


Fig. 6. Schematic representation of the proposed mechanism for the photoelectrochemical detection of the immunosensor anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO.

anti-SARS-CoV-2, decreasing the efficiency of the system to produce photocurrent since the anti-SARS-CoV-2/SARS-CoV-2 interaction reduces the efficiency of the photoactive material to transfer holes to donor molecules.

4. Application of the photoelectrochemical immunosensor in artificial saliva samples

In order to evaluate the accuracy and the applicability of the designed immunosensing platform in artificial saliva samples, the anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO PEC sensor was tested to target SARS-CoV-2 at different concentrations in artificial saliva samples. The samples were spiked with the following concentrations of SARS-CoV-2: 1 fg mL⁻¹, 10 fg mL⁻¹, 100 fg mL⁻¹, 1 pg mL⁻¹, 10 pg mL⁻¹ e 100 pg mL⁻¹ and the quantification of the biological material in the spiked samples was performed by the external calibration method. The found recovery values were between 96.20% and 109.65% (Table S2) with low values of relative standard deviation, indicating good accuracy and precision. The results suggest that the developed PEC immunosensor is a promising strategy for the detection of SARS-CoV-2.

5. Conclusion

The present work reports the development of a PEC immunosensor for feasible SARS CoV-2 spike glycoprotein detection based on a low cost commercial LED lamp of low power combined to a homemade box to control the incidence of light. The electrochemical response of the PdNPs/CNS/ST/FTO platform was highly sensitive to light incidence onto the PEC cell suggesting an improved electron-hole separation under visible LED light illumination. The interaction between SrTiO₃ particles with g-C₃N₄-S and palladium nanoparticles improved the PEC efficiency of the sensing platform under visible LED light, reflecting on a wide linear response range and a low limit of detection for SARS CoV-2 S1 protein. The designed immunosensor is a feasible device to sensitive, accurate and precise determination of SARS-CoV-2 in artificial saliva samples. The anti-SARS-CoV-2/PdNPs/CNS/ST/FTO PEC immunosensor may be a promising alternative for detection of SARS CoV-2 in non-invasive biological samples as saliva due its high sensitivity and detectability.

CRediT authorship contribution statement

Chirlene N. Botelho: Formal analysis, Writing - original draft. **Suringo S. Falcão:** Formal analysis; Writing - review & editing. **Rossy-Eric P. Soares:** Supervision, Writing - review & editing. **Alan S. de Menezes:** XRD analyzes, Supervision, Writing - review & editing. **Silma R. Pereira:** Supervision, Writing - review & editing. **Lauro T. Kubota:** Supervision, Writing - review & editing. **Flavio S. Damos:** Supervision, Writing - review & editing. **Rita C. S. Luz:** Supervision, Writing - review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

The authors are grateful to Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioanalítica (465389/2014-7); Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão - FAPEMA (INFRA-03186/18, INFRA-03195/18, UNIVERSAL-01057/19), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (308204/2018-2; 309828/2020-1). The authors gratefully acknowledge the Analytical Center of UFMA that provided the FTIR spectra. C. N.

Botelho acknowledge to FAPEMA for the scholarship. The authors gratefully acknowledge to the Microscopy Center/UFMG that provided the morphological images and EDX spectrum.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100167>.

References

- Abdollahifar, M., Zamani, M.R., Beiygic, E., Nekouei, H., 2014. Synthesis of micro-mesopores flower-like γ -Al₂O₃ nano-architectures. *J. Serb. Chem. Soc.* 79 (8), 1007–1017.
- Amanat, F., Stadlbauer, D., Strohmaier, S., Nguyen, T.H.O., Chromikova, V., McMahon, M., Jiang, K., Arunkumar, G.A., Polanco, J., Bermudez-Gonzalez, M., Caplivski, D., Cheng, A., Kedzierska, K., Vapalahti, O., Hepojoki, J.M., Simon, V., Krammer, F., 2020. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat. Med.* 26 (7), 1033–1036.
- Bard, A.J., 2001. Faulkner LR. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Cao, J., Qin, C., Wang, Y., Zhang, H., Sun, G., Zhang, Z., 2017. Solid-state method synthesis of SnO₂-Decorated g-C₃N₄ nanocomposites with enhanced Gas-sensing property to ethanol. *Materials* 10 (6), 604.
- Chai, B., Yan, J.T., Wang, C.L., Ren, Z.D., Zhu, Y.C., 2017. Enhanced visible light photocatalytic degradation of Rhodamine B over phosphorus doped graphitic carbon nitride. *Appl. Surf. Sci.* 391, 376–383.
- Choi, E., Song, K., An, S., Lee, K., Youn, M., Park, K., Jeong, S., Kim, H., 2018. Cu/ZnO/AIOOH catalyst for methanol synthesis through CO₂ hydrogenation. *Kor. J. Chem. Eng.* 35, 73–81.
- Choudary, B.M., Madhi, S., Chowdari, N.S., Kantam, M.L., Sreedhar, B., 2002. Layered double hydroxide supported Nanopalladium catalyst for Heck-, Suzuki-, Sonogashira-, and Stille-type coupling reactions of chloroarenes. *J. Am. Chem. Soc.* 124 (47), 14127–14136.
- Chu, D.K.W., Pan, Y., Cheng, S.M.S., Hui, K.P.Y., Krishna, P., Liu, Y., Poon, L.L.M., 2020. Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia. *Clin. Chem.* 66 (4), 549–555.
- Domínguez-Domínguez, S., Berenguer, A., Linares, A., Cazorla, D., 2008. Inorganic materials as supports for palladium nanoparticles: application in the semi-hydrogenation of phenylacetylene. *J. Catal.* 257 (1), 87–95.
- Fu, J.W., Yu, J.G., Jiang, C.J., Cheng, B., 2017. g-C₃N₄-based heterostructured photocatalysts. *Adv. Energy Mater.* 8, 1701503.
- Funari, R., Chu, K.Y., Shen, A.Q., 2020. Detection of antibodies against SARS-CoV-2 spike protein by gold nanoparticles in an opto-microfluidic chip. *Biosens. Bioelectron.* 169, 112578.
- Gniewek, A., Ziolkowski, J.J., Trzeciak, A.M., Zawadzki, M., Grabowska, H., Wrzyszc, J., 2008. Palladium nanoparticles supported on alumina-based oxides as heterogeneous catalysts of the Suzuki–Miyaura reaction. *J. Catal.* 254 (1), 121–130.
- Goksu, H., 2015. Recyclable aluminium oxy-hydroxide supported Pd nanoparticles for selective hydrogenation of nitro compounds via sodium borohydride hydrolysis. *New J. Chem.* 39, 8498–8504.
- Guan, K., Li, J., Lei, W., Wang, H., Tong, Z., Jia, Q., Zhang, H., Zhang, S., 2021. Synthesis of sulfur doped g-C₃N₄ with enhanced photocatalytic activity in molten salt. *J. Materiomics.* 7, 1131–1142.
- Guo, F., Wang, L.J., Sun, H.R., Li, M.Y., Shi, W.L., 2020. High-efficiency photocatalytic water splitting by a N-doped porous g-C₃N₄ nanosheet polymer photocatalyst derived from urea and N, N-dimethylformamide. *Inorg. Chem. Front.* 7, 1770–1779.
- Imran, S., Ahmadi, S., Kerman, K., 2021. Electrochemical biosensors for the detection of SARS-CoV-2 and other viruses. *Micromachines* 12 (2), 174.
- Jiang, L., Yuan, X., Pan, Y., Liang, J., Zeng, G., Wu, Z., Wang, H., 2017. Doping of graphitic carbon nitride for photocatalysis: a review. *Appl. Catal., B* 217, 388–406.
- Karakus, E., Erdemir, E., Demirbilek, N., Liv, L., 2021. Colorimetric and electrochemical detection of SARS-CoV-2 spike antigen with a gold nanoparticle-based biosensor. *Anal. Chim. Acta* 1182, 338939.
- Karim, S.S.A., Karim, Q.A., 2021. Omicron SARS-CoV-2 variant: a new chapter in the COVID-19 pandemic. *Lancet* 398, 2126–2128, 10317 Erratum in: *Lancet.* 2022; 399 (10320):142. PMID: 34871545; PMCID: PMC8640673).
- Kumar, N., Shetti, N.P., Jagannath, S., Aminabhavi, T.M., 2022. Electrochemical sensors for the detection of SARS-CoV-2 virus. *Chem. Eng. J.* 430, 132966.
- Li, J., Lillehoj, P.B., 2021. Microfluidic magneto immunosensor for rapid, high sensitivity. *ACS Sens.* 6 (3), 1270–1278.
- Li, P., Wang, L., Li, H., 2005. Application of recoverable nanosized palladium (0) catalyst in Sonogashira reaction. *Tetrahedron* 61 (36), 8633–8640.
- Li, Y., Sun, Y., Dong, F., Ho, W.K., 2014. Enhancing the photocatalytic activity of bulk g-C₃N₄ by introducing mesoporous structure and hybridizing with graphene. *J. Colloid Interface Sci.* 436, 29–36.
- Li, Y.F., Wang, S., Chang, W., Zhang, L.H., Wu, Z.S., Song, S.Y., Xing, Y., 2019. Preparation and enhanced photocatalytic performance of sulfur doping terminal-methylated g-C₃N₄ nanosheets with extended visible-light response. *J. Mater. Chem.* 7, 20640–20648.
- Liu, C., Shih, K., Gao, Y., Li, F., We, L., 2012. Dechlorinating transformation of propachlor through nucleophilic substitution by dithionite on the surface of alumina. *J. Soils Sediments* 12, 724–733.
- Magalhães, S.R., Junior, W.D.M., Souza, A.E., Teixeira, S.R., Li, M.S., Longo, E., 2017. Synthesis of BaTiO₃ and SrTiO₃ by microwave assisted hydrothermal method (mah) using anatase as titanium precursor. *Quim. Nova* 40 (2), 166–170.
- Mehmandoust, M., Pinar Gumus, Z., Soylak, M., Erk, N., 2022. Electrochemical immunosensor for rapid and highly sensitive detection of SARS-CoV-2 antigen in the nasal sample. *Talanta* 240, 123211.
- Mohammadi, P., Ghorbani-Shahna, F., Bahrami, A., Rafati, A.A., 2020. Farhadian M. Plasma-photocatalytic degradation of gaseous toluene using SrTiO₃/rGO as an efficient heterojunction for by-products abatement and synergistic effects. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 394, 112460.
- Moitra, P., Alafeef, M., Dighe, K., Frieman, M.B., Pan, D., 2020. Selective Naked-eye detection of SARS-CoV-2 mediated by N Gene targeted antisense oligonucleotide capped plasmonic nanoparticles. *ACS Nano* 14 (6), 7617–7627.
- Morales-Narvaez, E., Dincer, C., 2020. The impact of biosensing in a pandemic outbreak: COVID-19. *Biosens. Bioelectron.* 163, 112274.
- Niu, P., Zhang, L., Liu, G., Cheng, H.M., 2012. Graphene-Like carbon nitride nanosheets for improved photocatalytic activities. *Adv. Funct. Mater.* 22 (22), 4763–4770.
- Oliveira, B.A., Oliveira, L.C., Sabino, E.C., Okay, T.S., 2020. SARS-CoV-2 and the COVID-19 disease: a mini review on diagnostic methods. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 62, 44.
- Pirouz, B., Haghshenas, S.S., Haghshenas, S.S., Piro, P., 2020. Investigating a serious challenge in the sustainable development process: analysis of confirmed cases of COVID-19 (new type of coronavirus) through a binary classification using artificial intelligence and regression analysis. *Sustainability* 12, 2427.
- Pramanik, A., Gao, Y., Patibandla, S., Mitra, D., McCandless, M.G., Fassero, L.A., Gates, K., Tandon, R., Ray, P.C., 2021. The rapid diagnosis and effective inhibition of coronavirus using spike antibody attached gold nanoparticles. *Nanoscale Adv.* 3, 1588–1596.
- Qiu, Z., Shu, J., Tang, D., 2018. Nayf4:yb, er upconversion nanotransducer with in-situ fabrication of Ag₂S for near-infrared light responsive photoelectrochemical biosensor. *Anal. Chem.* 90 (20), 12214–12220.
- Rahmati, Z., Roushani, M., Hosseini, H., Choobin, H., 2021. Electrochemical immunosensor with Cu₂O nanocube coating for detection of SARS-CoV-2 spike protein. *Microchim. Acta* 188, 105.
- Rozhansky, I.V., Zakheim, D.A., 2005. Modeling of the electrical properties of polycrystalline ceramic semiconductors with submicron grains. *Microelectron. Eng.* 81 (2), 494–502.
- Sagara, N., Kamimura, S., Tsubota, T., Ohno, T., 2016. Photoelectrochemical CO₂ reduction by a p-type boron-doped g-C₃N₄ electrode under visible light. *Appl. Catal., B* 192, 193–198.
- Shao, L., Jiang, D., Xiao, P., Zhu, L., Meng, S., Chen, M., 2016. Enhancement of g-C₃N₄ nanosheets photocatalysis by synergistic interaction of ZnS microsphere and RGO inducing multistep charge transfer. *Appl. Catal. B Environ.* 198, 200–210.
- Tronto, J., Leroux, F., Dubois, M., Taviot, C., Valim, J.B., 2006. Hybrid organic–inorganic materials: layered hydroxy double salts intercalated with substituted thiophene monomers. *J. Phys. Chem. Solid.* 67 (5–6), 978–982.
- Trzeciak, A.M., Augustyniak, A.W., 2019. The role of palladium nanoparticles in catalytic C–C cross-coupling reactions. *Coord. Chem. Rev.* 384, 1–20.
- Vadlamani, B., Uppal, T., Verma, S., Misra, M., 2020. Functionalized TiO₂ nanotubebased electrochemical biosensor for rapid detection of SARS-CoV-2. *Sensors* 20 (20), 5871.
- Wang, H., Bian, Y.R., Hu, J.T., Dai, L.M., 2018. Highly crystalline sulfur-doped carbon nitride as photocatalyst for efficient visible-light hydrogen generation. *Appl. Catal., B* 238, 592–598.
- Wang, X., Maeda, K., Thomas, A., Takanabe, K., Xin, G., Carlsson, J.M., Domen, K., Antonietti, M., 2008. A metal-free polymeric photocatalyst for hydrogen production from water under visible light. *Nat. Mater.* 8 (1), 76–80.
- Word Health Organization, 2020. Coronavirus disease (COVID-19) situation report – 134. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200602-covid-19-sitrep-134.pdf?sfvrsn=cc95e5d5_2. (Accessed 9 September 2021).
- Word Health Organization, 2021. WHO coronavirus disease (COVID-19) Dashboard. https://covid19.who.int/?gclid=CjwKCAjwnK36BRBVEiwAsMT8WJ3y00_BUzvrLsvb13uthuoTH0cc45gyEubpYRyEqAzl3aZb6TYxoCcMQ0AvDBwE. (Accessed 20 December 2021).
- Wu, Geng-huang, Wu, Yan-fang, Liu, Xi-wei, Rong, Ming-cong, Chen, Xiao-mei, Chen, Xi, 2012. SERS based lateral flow immunoassay for point-of-care detection of SARS-CoV-2 in clinical samples. *ACS Appl. Bio Mater.* 4 (4), 2974–2995.
- Yakoh, A., Pimpitak, U., Rengpipat, S., Hirankarn, N., Chailapakul, O., Chaiyo, S., 2021. Paper-based electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen. *Biosens. Bioelectron.* 176, 112912.
- Yang, X., Fei, Z., Zhao, D., Ang, W.H., Li, Y., Dyson, P.J., 2008. Palladium nanoparticles Stabilized by an ionic polymer and ionic liquid: a versatile system for C–C cross-coupling reactions. *Inorg. Chem.* 47 (8), 3292–3297.
- Yang, Y., Wang, L.-J., Wang, X.-P., Chen, J.-X., Yang, X.-W., Li, M.-H., Deng, M.-J., 2020. Perovskite-type SrTiO₃ thin film preparation and field emission properties. *Vacuum* 178 (1), 109466.

- Yotsumoto Neto, S., Lima, M.I.S., Pereira, S.R.F., Goulart, L.R., Luz, R.C.S., Damos, F.S., 2019. Immunodiagnostic of leprosy exploiting a photoelectrochemical platform based on a recombinant peptide mimetic of a *Mycobacterium leprae* antigen. *Biosens. Bioelectron.* 143, 111625.
- Yu, H.J., Shi, R., Zhao, Y.X., Bian, T., Zhao, Y.F., Zhou, C., Waterhouse, G.I.N., Wu, L.Z., Tung, C.H., Zhang, T.R., 2017. Alkali-assisted synthesis of nitrogen deficient graphitic carbon nitride with tunable band structures for efficient visible-light-driven hydrogen evolution. *Adv. Mater.* 29, 1605148.
- Zhang, H., Li, H., Li, J., Sun, H., Zhou, L., Wang, R., 2019. A novel photoelectrochemical sensor based on Gr-SiNWs-Si/Pt electrode for sensing of Hydroquinone. *Int. J. Electrochem. Sci.* 14, 1794–1808.
- Zhou, C., Shi, R., Shang, L., Wu, L.Z., Tung, C.H., Zhang, T.R., 2018. Template-free large-scale synthesis of g-C₃N₄ microtubes for enhanced visible light-driven photocatalytic H₂ production. *Nano Res.* 11, 3462–3468.

Photoelectrochemical biosensing platform for the SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins

Chirlene Nascimento Botelho¹ | Alan Silva de Menezes² |
 Saimon Moraes Silva³ | Lauro Tatsuo Kubota⁴  | Flávio Santos Damos¹ |
 Rita de Cássia Silva Luz¹

¹Department of Chemistry, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil

²Department of Physics, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil

³Department of Biochemistry and Chemistry, Biomedical and Environmental Sensor Technology Centre, La Trobe Institute for Molecular Science, La Trobe University, Melbourne, Victoria, Australia

⁴Institute of Chemistry, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

Correspondence

Flávio Santos Damos and Rita de Cássia Silva Luz, Department of Chemistry, Federal University of Maranhão, 65080-805 São Luís, MA, Brazil.

Email: rita.luz@ufma.br and flavio.damos@ufma.br

Funding information

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioanalítica, Grant/Award Number: 465389/2014-7; FAPEMA, Grant/Award Number: INFRA-02021/21, INFRA-02050/21, INFRA-02203/2021, UNIVERSAL-06535/22, POS-GRAD-02432/21; CNPq, Grant/Award Number: 308718/2022-4, 309828/2020-1, 305806/2020-3, 313324/2021-2

Abstract

The COVID-19 pandemic is still a continuing worldwide challenge for public health systems. Early and ultrasensitive identification of the infection is essential for preventing the spread of COVID-19 by pre-symptomatic or asymptomatic individuals, particularly in the community and in-home settings. This work presents a versatile photoelectrochemical (PEC) immunosensor for SARS-CoV-2 detection based on a composite material formed by bismuth vanadate (BiVO₄) and strontium titanate (SrTiO₃). The PEC platform was denoted as BiVO₄/SrTiO₃/FTO, and it can be tuned for the detection of either Spike (S) or Nucleocapsid (N) protein by simply altering the antibody immobilized on the platform's surface. Chemical, morphological, and electrochemical characterizations were performed by X-Ray Diffraction, Scanning Electron microscopy, Energy-dispersive X-ray spectroscopy, Electrochemical Impedance Spectroscopy, and Amperometry. With a simple sensing architecture of the PEC platform, it was possible to achieve a linear response range of 0.1 pg mL⁻¹ to 1000 ng mL⁻¹ for S protein and 0.01 pg mL⁻¹ to 1000 ng mL⁻¹ for N protein. The PEC immunosensors presented recovery values for the two SARS-CoV-2 proteins in artificial saliva samples between 97% and 107.20% suggesting a good accuracy for the proposed immunosensors.

KEYWORDS

biosensing, BiVO₄, PEC, SrTiO₃, SARS-CoV-2

1 | INTRODUCTION

The spread of coronavirus disease (COVID-19) around the globe has led to immense social and economic losses [1, 2]. Although the spread of the disease was considerably reduced due to vaccine discovery and vaccination

campaigns, other highly contagious virus mutations (e.g., Omicron variant) spread worldwide in 2022 [3–6]. To exemplify that, around March 2022, the amount of confirmed positive Omicron infections surpassed 400.000 cases per day in South Korea [7]. This number shows that innovative and versatile biosensing technologies

capable of rapidly and precisely detecting severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) are still needed for controlling future viral infection outbreaks.

The most used technique for COVID-19 diagnostics during this pandemic was reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), a laboratory-based technique that presents high sensitivity and result accuracy [8–10]. Nevertheless, RT-PCR requires a complicated sample pre-treatment process, and obtaining the final results take around 3–4 hours per sample analyzed [3, 11–13]. Additionally, RT-PCR testing is costly and requires a specialized laboratory facility with expensive instrumentations and well-trained personnel. Thus, RT-PCR is not ideal for mass COVID-19 testing, especially in underdeveloped countries and remote communities. Therefore, rapid antigen lateral flow assay tests have been approved in many different countries to overcome these drawbacks. The rapid lateral flow assay tests sold on the market can accomplish on-site diagnosis within 10 minutes. However, they don't present a good detection sensitivity, where their sensitivity reduces to less than 50% for infected people with low virus levels, including early infected or asymptomatic patients [14–19].

In this context, many researchers worldwide have focused on the search for new highly sensitive analytical systems that provide increasingly faster results for detecting SARS-CoV antigens. Among these systems, photoelectrochemical (PEC) sensors are a promising alternative for detecting SARS-CoV antigens. These devices are based on photoactive electrodes that can convert the received photoirradiation into an electrical signal. They are based on photoactive materials, which are essential and crucial for the good performance of PEC sensors. With the advantages of low cost, simple operation, and rapid response, the photoactive materials make PEC sensors very attractive to be used as an analytical tool.

In this work, we developed a highly sensitive PEC platform by combining the photoactive materials strontium titanate (SrTiO_3) and bismuth vanadate (BiVO_4) into a composite and using fluorine-doped tin oxide (FTO) as an electrode substrate. The SrTiO_3 is a perovskite that presents interesting photochemical properties and is non-toxic and relatively inexpensive [20]. Currently, SrTiO_3 is becoming a promising material in PEC applications. However, SrTiO_3 has disadvantages, such as a high band gap value ($\cong 3.2$ eV) and low visible light absorption [21]. Therefore, to solve these limitations, several strategies have already been proposed in the literature to improve the photocatalytic performance of materials, such as doping with other elements or combination with other semiconductor materials. Thus, a photoactive material that has been shown to be attractive

due to its low cost, high crystallinity, durability, good stability, a material of easy synthesis, and non-toxicity is bismuth vanadate (BiVO_4) [22, 23]. BiVO_4 is an important semiconductor that is widely used in photocatalytic processes such as the decomposition of dyes and the production of hydrogen, owing its ability of light absorption in the visible region with a band gap $\cong 2.4$ eV [22]. Materials with improved characteristics can be obtained by combining together the properties of BiVO_4 with the properties of SrTiO_3 . BiVO_4 and SrTiO_3 are n-type semiconductors with excellent photostability and high chemical stability [24–26], which makes them very interesting to be used in photoelectrochemical sensors. BiVO_4 has been combined with other materials for detecting different proteins with good sensitivity, such as procalcitonin [27, 28], carcinoembryonic antigen [29], CD44 [30], and PSA [31, 32]. The combined use of BiVO_4 and SrTiO_3 has shown promising results for photocatalytic applications [33] and water-splitting [34]. However, to our knowledge, $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3$ is being used, for the first time, to construct PEC immunosensors for detecting SARS-CoV-2. PEC sensors are attractive for SARS-CoV-2 immunosensing, whose responses are based on the interaction between light and photoelectroactive materials. The on/off photocurrent responses exhibit a continuous signal baseline with high reproducibility and low standard deviation, improving the detection of the species of interest [35–37]. The specificity of our immunosensors towards SARS-CoV-2 detection is provided by the immobilization of anti-SARS-CoV-2 spike glycoprotein S1 antibody or anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid protein antibody on the $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3$ composite. They specifically bind to the spike (S) protein or nucleocapsid (N) protein, respectively.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Reagents

The reagents used were of analytical grade and used as received. Disodium phosphate (Na_2HPO_4), sodium hydroxide (NaOH), boric acid (H_3BO_3), ascorbic acid (AA), phosphoric acid (H_3PO_4), monobasic sodium phosphate (NaH_2PO_4), citric acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), ethylene glycol, and potassium chloride (KCl) were all acquired from Isofar – Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda (Duque de Caxias, RJ-Brazil). Strontium titanate (SrTiO_3), 2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-yl] ethane sulfonic (HEPES), glutaraldehyde (5%), chitosan (1%), bovine serum albumin (BSA) (1%), ammonium vanadate (NH_4VO_3), bismuth nitrate ($\text{BiNO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), potassium ferricyanide ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) were purchased from Sigma-

Aldrich (St. Louis, MO, USA). Anti-SARS-CoV-2 spike glycoprotein S1 antibody (Ab273074), anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid protein antibody (Ab272852), target SARS-CoV-2 spike glycoprotein S1 (Ab272105), and target SARS-CoV-2 nucleocapsid protein (Ab273530) were purchased from Abcam (USA). Ethanol was purchased from Merck – Brazil. All solutions were prepared using deionized water obtained by GEAKA Ultrapurifier.

2.2 | Electrochemical and photoelectrochemical measurements

For the PEC measurements, a traditional three-electrode cell was used, containing a reference electrode Ag|AgCl (3 M KCl), a gold counter electrode, and the working electrode (Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO). All measurements were carried out using a potentiostat/galvanostat model PGSTAT 128 N from Metrohm-Autolab connected to Nova 2.1 and FRA 2 software. This system used a commercial LED lamp of 36 W coupled to a customized box as a power source. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurements were obtained in 0.1 molL⁻¹ potassium chloride containing 5 mmolL⁻¹ K₃[Fe (CN)₆] in a frequency range of 0.1 Hz to 10⁵ Hz with a closed-circuit potential of 0.3 V vs Ag|AgCl (3 M KCl).

2.3 | Synthesis of the BiVO₄

This procedure was slightly adapted from the method reported by Prado *et al.* [38]. A mass of 0.4850 g of (BiNO₃)₃·5H₂O was precisely weighed and then transferred to a falcon tube containing 5 mL of ethylene glycol and sonicated for 40 minutes. Next, a mass of 0.1175 g of NH₄VO₃ was precisely weighed and transferred to a falcon tube containing 5 mL of deionized water, and this solution was heated in a water bath until the complete dissolution of solids. In the final step, the second solution was slowly dropped into the bismuth solution under constant stirring, forming a yellowish-colored bismuth vanadate (BiVO₄) suspension. The resulting solution was then centrifuged, and the supernatant solution was removed.

2.4 | Construction of the BiVO₄/SrTiO₃/FTO photoelectrochemical sensor

The FTO substrate was immersed in ethanol and sonicated for 10 minutes and then rinsed thoroughly using

deionized water. This procedure was carried out to remove any impurities or species adsorbed on the electrode surface. For the electrode modification, 10 mg of SrTiO₃ was first weighed and dispersed in 0.02 mL of deionized water. Subsequently, 0.02 mL of the BiVO₄ suspension was added to the SrTiO₃ solution. From this resulting mixture, 0.02 mL was removed and drop-casted on the surface of the FTO electrode, which was left to dry at room temperature and then placed on a heating plate at 100 °C for 30 minutes. Finally, the FTO electrode was placed in the muffle at 500 °C for 1 hour, thus forming the BiVO₄/SrTiO₃/FTO PEC platform.

Initially, different concentrations of SARS-CoV-2 antibodies (1, 3, 5, 7, or 10 µg mL⁻¹) were prepared in phosphate buffer (pH 7.4), starting from a stock solution of 10 µg mL⁻¹. BiVO₄/SrTiO₃/FTO platform was modified with SARS-CoV-2 antibodies, which target either N or S protein, using 0.02 mL of chitosan (1%) mixed with 0.02 mL of glutaraldehyde (5%) forming the solution 1. From this solution 1, 0.01 mL was taken and mixed with 0.01 mL of either of the SARS-CoV-2 antibody solution, obtaining solution 2. Finally, 0.01 mL of the solution was taken 2, added to the surface of the BiVO₄/SrTiO₃/FTO sensor, allowing it to dry for 20 minutes. After this procedure, 0.01 mL of BSA (1%) was added to the photoelectrochemical platform, leaving it to rest for 10 minutes. BSA was used as a blocking agent. Subsequently, the platform was rinsed with deionized water to remove any weakly adsorbed species, obtaining the Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO immunosensor. The system was incubated for 20 minutes to occurs the interaction between antigen and antibody.

2.5 | Structural and morphological characterization of the PEC sensor using X-ray diffraction and scanning electron microscopy

The structural analysis of the PEC sensor was performed through X-Ray diffraction (XRD) technique, using a D8 Advance diffractometer (Bruker), with CuK α radiation ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) tube, operating at 40 kV/40 mA, equipped with the LynxEye linear detector. The measurements were performed in the 10°–90° 2 θ range, with 0.02° step size and a counting time of 0.5 s/step.

The morphological and elemental composition of the sample surfaces were characterized using Scanning Electron Microscopy (SEM) and X-ray Energy Dispersive Spectroscopy (EDS). The SEM images were obtained using Zeiss microscopy, model EVO HD and EDS analyses were performed with a Bruker's XFLASH EDS detector.

2.6 | Electrochemical and photoelectrochemical measurements

For the PEC measurements, a traditional three-electrode cell was used, containing a reference electrode Ag|AgCl (3 M KCl), a gold counter electrode, and the working electrode Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO. All measurements were carried out using a potentiostat/galvanostat model PGSTAT 128 N from Metrohm-Autolab connected to Nova 2.1 and FRA 2 software. This system used a commercial LED lamp of 36 W as a power source coupled to a customized box. Electrochemical impedance spectroscopy measurements were obtained in 0.1 molL⁻¹ potassium chloride containing 5 mmolL⁻¹ K₃[Fe (CN)₆] in a frequency range of 0.1 Hz to 10⁵ Hz with a closed-circuit potential of 0.3 V vs Ag|AgCl (3 M KCl).

2.7 | Studies of the PEC BiVO₄/SrTiO₃/FTO immunosensor in artificial saliva samples

After system optimization, the applicability of the immunosensor directly in artificial saliva samples was evaluated. Artificial saliva was obtained from a local pharmacy in São Luís, Maranhão – Brazil. The method used for protein quantification was an external calibration curve. Three different concentrations of samples (0.01, 1, 100 ngmL⁻¹) were prepared for each S-SARS-CoV-2 and N-SARS-CoV-2 protein. Subsequently, 0.01 mL of each sample was drop-casted on the sensor's surface and incubated for 20 minutes. All PEC measurements were performed in 0.1 molL⁻¹ Britton-Robinson buffer, pH 7.4 and E_{appl.} = 0.0 V, containing 0.3 molL⁻¹ AA.

3 | RESULTS AND DISCUSSIONS

3.1 | X-ray diffraction and scanning electron microscopy characterization of the SrTiO₃, BiVO₄, and BiVO₄/SrTiO₃ materials

Figure 1 shows the XRD patterns for SrTiO₃, BiVO₄ and the complete composite BiVO₄/SrTiO₃. For SrTiO₃ (Figure 1a), peaks are observed at 22.8°, 32.4°, 40.0°, 46.5°, 57.8°, 67.8° and 77.2° corresponding to the (1 0 0), (1 1 0), (1 1 1), (2 0 0), (2 1 1), (2 2 0), and (3 1 0) planes, which are characteristic of the SrTiO₃ cubic phase (JCPDS 00–35–0734) [39–41]. The XRD pattern for BiVO₄ (Figure 1b) contain peaks corresponding to the crystal planes (0 1 1), (1 1 2), (0 0 4), (0 2 0), (2 1 1), (0 1 5), (0 2

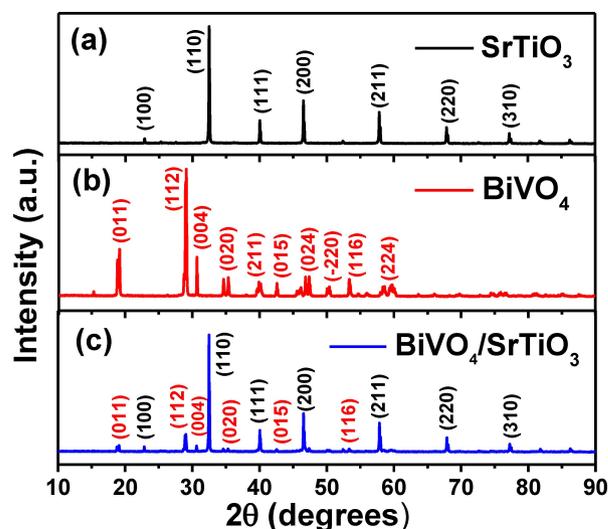


FIGURE 1 X-ray diffraction patterns for (a) SrTiO₃, (b) BiVO₄ and (c) BiVO₄/SrTiO₃.

4), (−2 2 0), (1 1 6) and (2 2 4), related to the monoclinic structure of BiVO₄ (JCPDS 01-083-1698) [22, 38]. Finally, for the composite (Figure 1c), it is observed characteristic peaks from both BiVO₄ and SrTiO₃ phases.

Morphological and qualitative elemental characterization of the materials was performed using SEM and EDS, respectively. Figure 2a presents the SEM image for SrTiO₃, where it is possible to see agglomerated particles for this material. SEM image for BiVO₄, presented in Figure 2b, shows irregular particles with different sizes, which is characteristic of the monoclinic BiVO₄ phase [38, 42]. Finally, Figure 2c shows the morphology of the BiVO₄/SrTiO₃ composite material, which presents agglomerations of small particles of different sizes.

Figures S1 (a–c) show the EDS spectra of each material. From the presented results, it can be seen the elements of the BiVO₄ and SrTiO₃ compounds and their combination to form the BiVO₄/SrTiO₃ composite. The EDS spectrum of BiVO₄ presented a peak to aluminum (Al), probably of stub [43].

3.2 | Electrochemical characterization of the PEC sensor

Figure 3a shows the amperometric measurements for SrTiO₃ (black amperogram), BiVO₄ (red amperogram), and BiVO₄/SrTiO₃ (blue amperogram), all immobilized on the FTO electrode. The measurements were performed in 0.1 molL⁻¹ phosphate buffer (PBS), pH 7.4, in the presence of 0.3 molL⁻¹ of AA and E_{appl.} = 0.0 V vs Ag|AgCl in the absence and presence of LED light. It is observed that the photocurrent obtained for the BiVO₄/SrTiO₃/FTO platform is significantly higher compared to

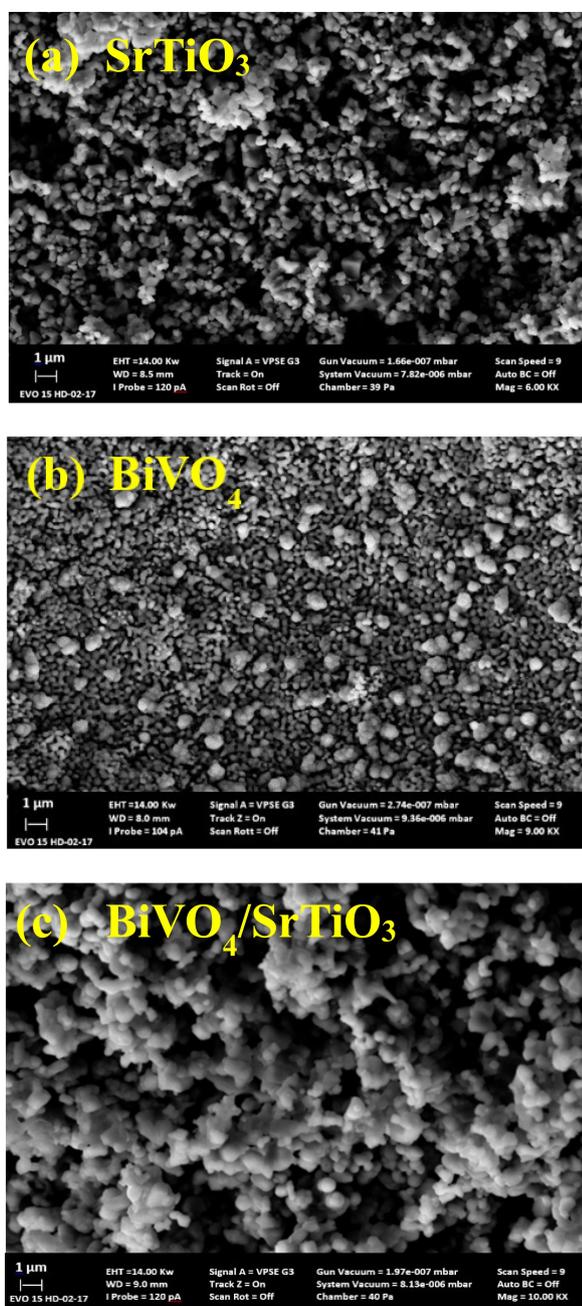


FIGURE 2 SEM images for (a) SrTiO₃; (b) BiVO₄ and (c) BiVO₄/SrTiO₃.

the response obtained for the BiVO₄/FTO and SrTiO₃/FTO platforms. This result suggests an efficient transfer of electrons from the donor molecule (AA) to the BiVO₄/SrTiO₃/FTO platform due to the lower recombination of electron/hole charges (e⁻/h⁺), which consequently generates an increase in the photocurrent. It can be observed, in the light presence, a lower response for SrTiO₃ than that observed for BiVO₄, which can be due to the difference in the band gap of the materials. On the other hand, the higher response observed for BiVO₄/SrTiO₃ composite is probably due to the higher efficiency of the composite in promoting charge separation, improving

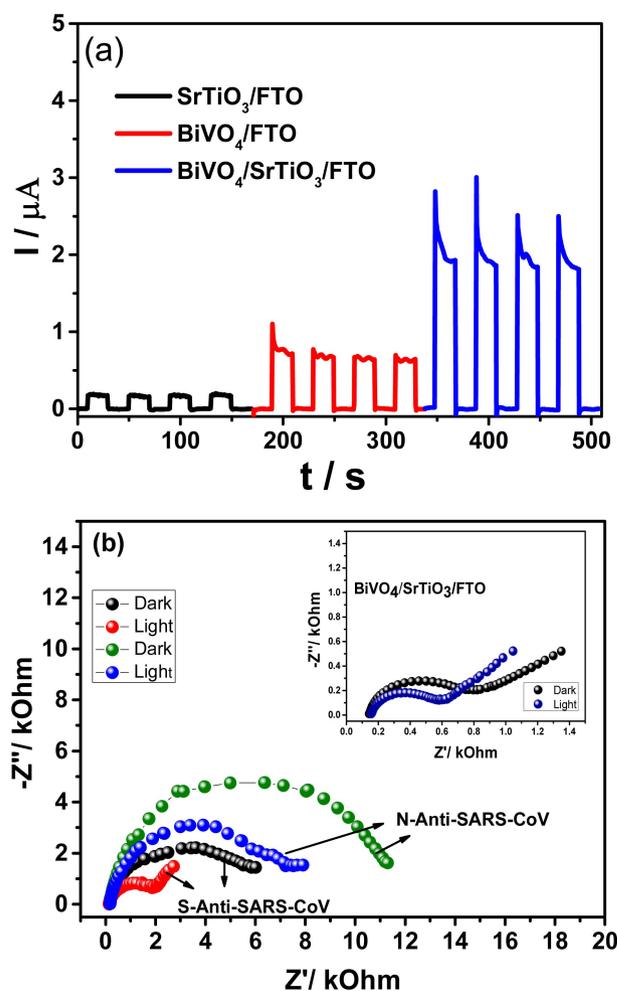


FIGURE 3 (a) Amperograms obtained for SrTiO₃/FTO (black line); BiVO₄/FTO (red line), and BiVO₄/SrTiO₃/FTO (blue line). Measurements were performed in 0.1 mol L⁻¹ PBS, pH 7.4 and $E_{\text{appl.}} = 0.0 \text{ V}$ vs Ag|AgCl, containing 0.3 mol L⁻¹ AA. (b) Nyquist plot for the immunosensors (S and N) Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO in the absence (green and black spectrum) and presence of LED light (blue and red spectrum). Inset graph Figure 3b: Nyquist plot for the BiVO₄/SrTiO₃/FTO platform in the absence (black spectrum) and presence of LED light (blue spectrum). Graphs obtained in 0.1 mol L⁻¹ KCl solution containing 5 mmol L⁻¹ K₃[Fe(CN)₆] and $E_{\text{appl.}} = 0.3 \text{ V}$ vs Ag|AgCl.

the photoelectrochemical activity, which may be due to the formation of a BiVO₄/SrTiO₃ heterojunction [44, 45].

The insertion of Figure 3b shows the Nyquist curve for the BiVO₄/SrTiO₃/FTO platform. The experiments were carried out in 0.1 mol L⁻¹ of KCl containing 5 mmol L⁻¹ ferricyanide in the absence (black spectrum) and presence of light (blue spectrum), measured in a closed circuit ($E_{\text{appl.}} = 0.3 \text{ V}$). These results show that there is a lower charge transfer resistance in the presence of light, thus a high rate of carriers (e⁻/h⁺). Figure 3b shows the Nyquist plots for the PEC platforms modified with S-Anti-SARS-CoV-2 and N-Anti-SARS-CoV-2 in the absence (black and green spectra) and

presence of LED light (red and blue spectrum), respectively. As can be seen in this figure, the electrochemical response was affected by the SARS-CoV-2 antibodies indicating the interaction between the PEC platform and the antibodies.

The charge transfer resistance values obtained for the $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ platform in the presence and absence of light were 390Ω and 610Ω , respectively. In addition, the charge transfer resistances obtained for the S-Anti-SARS-CoV-2/ $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ immunosensor in presence and absence of light were $1.59 \text{ k}\Omega$ and $5.92 \text{ k}\Omega$ while for the N-Anti-SARS-CoV-2/ $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ immunosensor in the presence and absence of LED Light were $7.39 \text{ k}\Omega$ and $11.20 \text{ k}\Omega$, respectively.

Figure 4 shows the amperometric measurements for the PEC platform carried out in four different buffer solutions: Britton-Robinson (B-R), McIlvaine (MCV), N-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES), and PBS. Figures 4a and 4b present the amperograms obtained for the $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ platform in each buffer solution containing 0.3 mol L^{-1} of AA

before and after modification with $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ of S and N antibodies, respectively. In Figure 4a1 is presented the percentages of photocurrent inhibition for each platform modified with the S antibody (S-Anti-SARS-CoV-2/ $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$).

The highest photocurrent was obtained for the B-R buffer, with a percentage of photocurrent inhibition in this case of 45.29%. It is much higher when compared to other buffer solutions, which were 25.78%, 6.41%, and 21.34%, respectively. Figure 4b1 shows photocurrent inhibition for each platform modified with the N antibody (N-Anti-SARS-CoV-2/ $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$).

The highest photocurrent, as expected, was also obtained for the B-R buffer; however, in this buffer, photocurrent inhibition was 15.38%, higher than MCV buffer (14.76%) and much lower compared to HEPES buffer and PBS (25.31% and 39.56%, respectively). Considering that it is an immunosensor, where the aim is to work with the highest photocurrent possible, the B-R buffer, pH 7.4, was chosen for the subsequent measurements. Thus, the highest photocurrent can be possibly

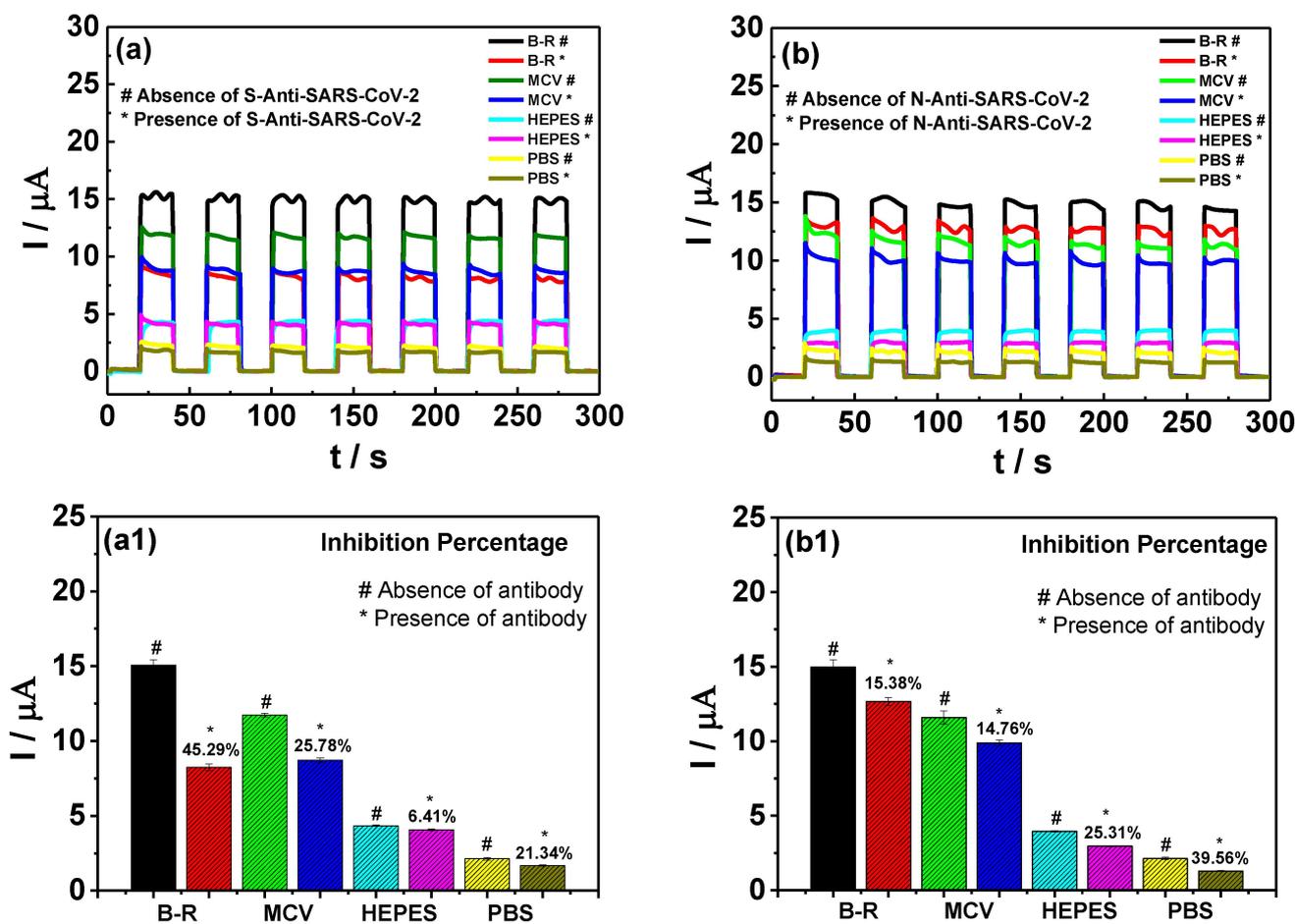


FIGURE 4 (a) Amperometric measurements for $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ and S-Anti-SARS-CoV-2/ $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ obtained in different buffer solutions at 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4 containing 0.3 mol L^{-1} of AA and $E_{\text{appl.}} = 0.0 \text{ V}$. (a1) Photocurrents obtained from Figure 4(a). (b) Amperometric measurements for $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ and N-Anti-SARS-CoV-2/ $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ obtained in different buffer solutions at 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4 containing 0.3 mol L^{-1} of AA and $E_{\text{appl.}} = 0.0 \text{ V}$. (b1) Photocurrents obtained from Figure 4(b).

attributed to the number of ions that are used in the preparation of this buffer solution (acetic acid, boric acid, and phosphoric acid), providing greater ionic strength in the electrolyte and consequently improving the photocurrent of the PEC immunosensor.

The next experimental condition evaluated was the impact of S- and N-Anti-SARS-CoV-2 antibodies amount on the platform analytical performance for detecting N and S proteins. Figure 5a shows the amperometric measurements for the $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ platform modified using S antibody solutions of different concentrations (0, 1, 3, 5, 7, and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$). As observed, the photocurrent gradually decreases with the increase of antibody concentration until $3 \mu\text{g mL}^{-1}$, and above this concentration, no significant change in photocurrent is observed. This reduction in photocurrent is expected as immobilizing the S antibody on the surface is expected to difficult AA oxidation. In a parallel study, Figure 5c shows the amperometric measurements for the $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ platform modified with N antibodies only under the same concentration conditions (0, 1, 3, 5, 7,

and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$). It is observed that even though the percentage of photocurrent inhibition after immobilization with antibody was lower when compared to the S antibodies, there is still a reduction of photocurrent in the system and after incubation with increasing concentrations of N antibodies. The intermediate concentration of $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ was chosen for further studies taking into account the reagent consumption and the minimum variation in photocurrent. The study of the interaction time between target N and S proteins and antibody is immensely important for the immunosensor to obtain the highest interaction efficacy between the platform and target proteins. Figure 5b shows the amperometric response performed for different incubation times ranging from 0–35 minutes for the S-Anti-SARS-CoV-2/ $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ immunosensor in S protein solution. A significant decrease in photocurrent is observed for up to 20 minutes. After this time, the photocurrent response remained practically constant. Similarly, for Figure 5d, the incubation time for the N-Anti-SARS-CoV-2/ $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ immunosensor in N protein solution was

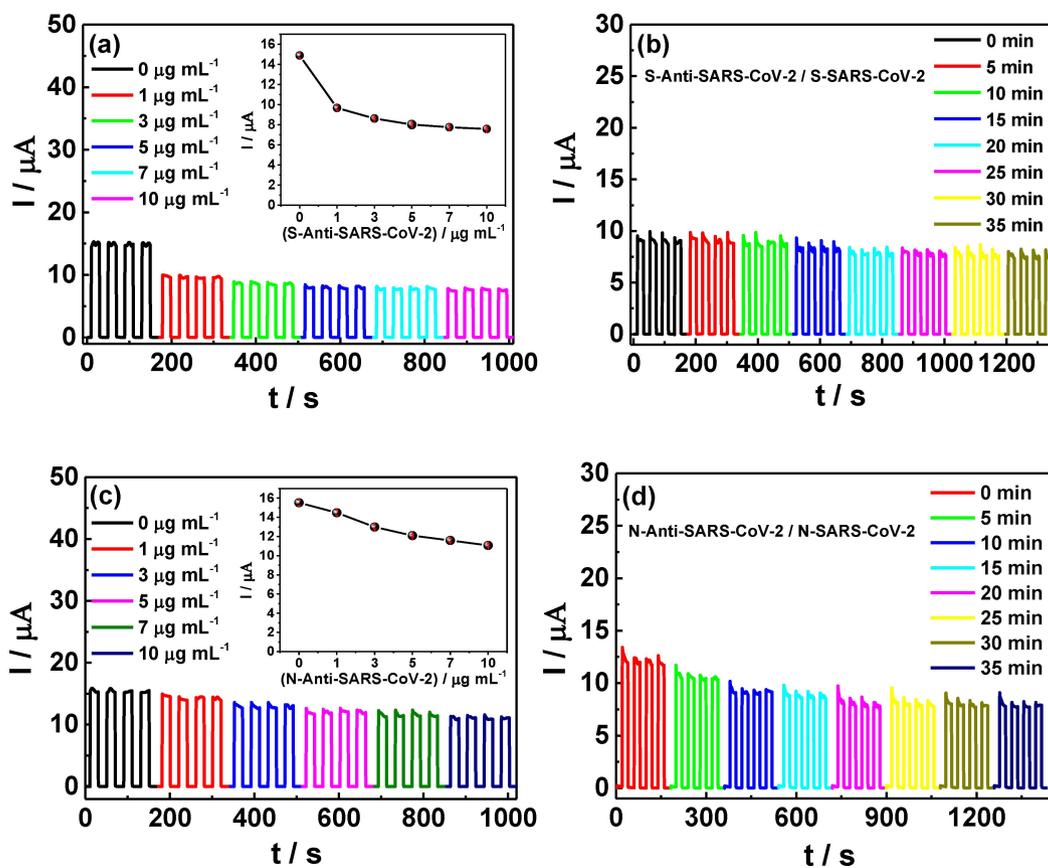


FIGURE 5 (a) Amperogram for the $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ platform modified with different concentrations of S antibodies (0– $10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Inset graph: photocurrent vs. concentration of S antibody. (b) Amperograms obtained for different incubation times (0 to 35 min) of the immunosensor with the target S-SARS-CoV-2 protein (10 pg mL^{-1}). (c) Amperogram for the $\text{BiVO}_4/\text{SrTiO}_3/\text{FTO}$ platform modified with different concentrations of N antibodies (0– $10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Inset graph: photocurrent vs concentration of N antibody. (d) Amperograms obtained for different incubation times (0 to 35 min) of the immunosensor with the target N-SARS-CoV-2 protein (10 pg mL^{-1}). All measurements were performed in B–R buffer 0.1 mol L^{-1} contain 0.3 mol L^{-1} of AA, pH 7.4, $E_{\text{appl.}} = 0.0 \text{ V}$ vs Ag|AgCl.

evaluated, and the photocurrent response also remained almost constant after 20 minutes. Therefore, the incubation time of 20 minutes was fixed for the next studies.

The analytical calibration curve using the PEC immunosensor for detecting both SARS-CoV-2 proteins is presented in Figure 6. Figure 6a shows the amperometric response for the S-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO platform in different concentrations of S protein from 0.1 to 1000 ng mL⁻¹. This figure shows that the increase in the concentration of S-SARS-CoV-2 protein is proportional to the decrease in photocurrent. This occurs due to the interaction between antigen and antibody on the surface of the electrode. Figure 6a1 presents the calibration curve S-SARS-CoV-2 protein concentration for the concentration range investigated. For this sensing configuration, the lowest detectable concentration of S protein is 0.1 ng mL⁻¹.

Under similar experimental conditions, the calibration curve for the N-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO immunosensors was obtained (Figure 6b), showing a linear response for the concentrations of target N

protein ranging from 0.01 pg mL⁻¹–1000 ng mL⁻¹ (Figure 6b1). The lowest detectable concentration of target N protein was 0.01 pg mL⁻¹.

Scheme 1 illustrates the SARS-CoV-2 proposed mechanism for the BiVO₄/SrTiO₃/FTO PEC platform modified with S-Anti-SARS-CoV-2 or N-Anti-SARS-CoV-2 in the presence of light. As shown in the scheme, the incidence of light on the platform can promote the generation of electron-hole couples in composite such as the photo-generated electrons can be transferred FTO while ascorbic acid molecules can harvest the holes. At the same time, the interaction between the target protein and the SARS-CoV-2 antibody can occur blocking the efficiency of the system in generating photocurrent. It is observed that the photocurrent decreases proportionally with the increase in the concentration of SARS-CoV-2.

Table 1 [46–58] shows different techniques and analytical parameters reported in the literature for the detection of SARS-CoV-2. As can be seen, the proposed immunosensors reported in this manuscript presents a sensitivity comparable to or better than the analytical sensitivity reported in some works. In addition, an

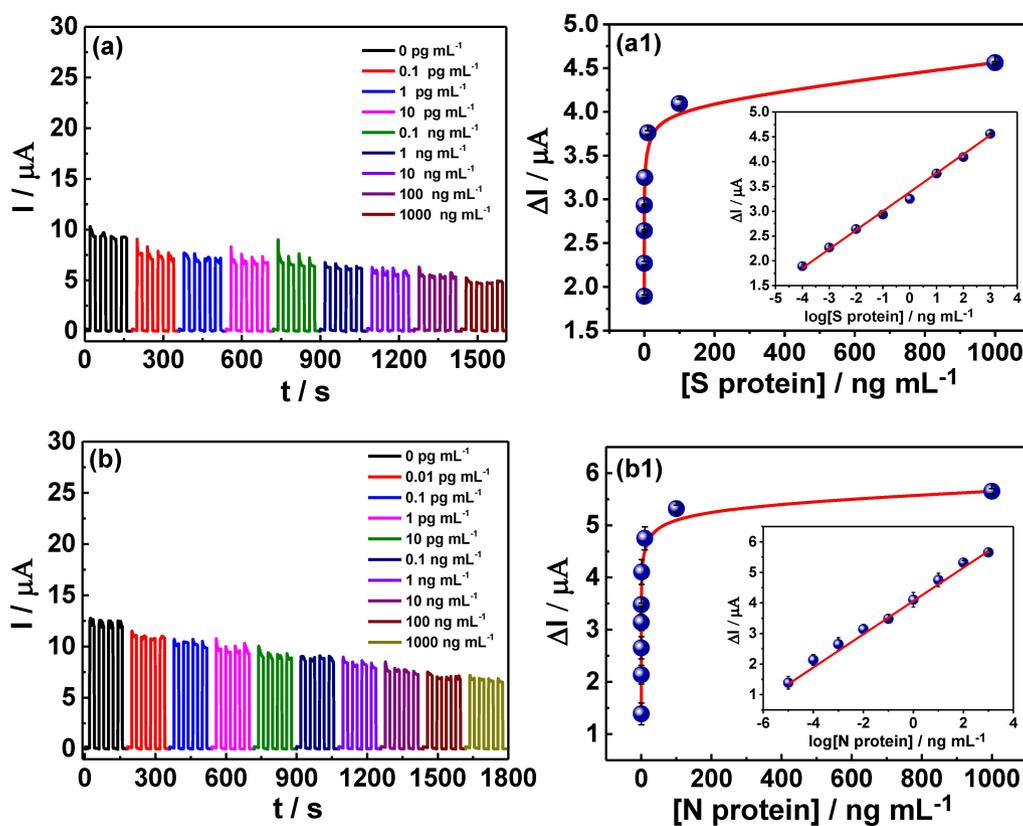
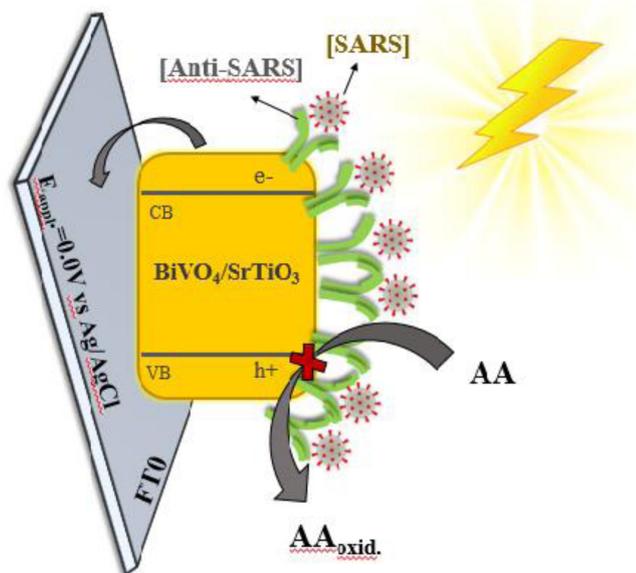


FIGURE 6 (a) Amperograms obtained for the S-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO immunosensor before incubation and after incubation in different concentrations of S protein (0–1000 ng mL⁻¹). (a1) Calibration curve for different concentrations of S protein. (b) Amperograms obtained for the N-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO immunosensor before incubation and after incubation in different concentrations of N protein (0–1000 ng mL⁻¹). (b1) Calibration curve for different concentrations of N protein. All measurements were performed in B–R buffer 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4, $E_{\text{appl.}} = 0.0$ V vs Ag|AgCl. All experiments contained 0.3 mol L⁻¹ of AA. Incubation time = 20 min.

incubation time of 20 min was sufficient to obtain wide working ranges.

Repeatability and reproducibility are essential to achieving precise measurements, ensuring reliability, and obtaining quality biosensors. The reproductibility was



SCHEME 1 Proposed mechanism for the PEC detection using the BiVO₄/SrTiO₃/FTO platform modified with either the Spike or Nucleocapsid antibodies for detection of SARS-CoV-2 antigens. (CB = Conduction Band; VB = Valence Band).

evaluated comparing the PEC response of different platforms obtained at different days (Figures 7a and 7b). On the other hand, in order to evaluate the repeatability of the sensor response, the PEC response of the same platform was monitored several times (Figures 7c and 7d). From these measurements, the relative standard deviation were calculated. As observed in these figures, the measured photocurrent remained practically the same on the different days, resulting in standard deviation values of 1.51 % and 2.07 % for S-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO and N-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO, respectively. These values indicate that both proposed immunosensors present good reproducibility. Figures 7c and 7d show the amperometric responses for both immunosensors performed on the same working day through 24 continuous measurements in 1000 s. The black amperograms show the response obtained by the sensors in the absence of the target proteins S and N, and the red amperograms correspond to the sensor response when exposed to the target proteins. With these measurements, it was possible to evaluate the accuracy of the immunosensors, where a relative standard deviation of less than 5 % was obtained in all measurements, indicating consistency between measurements, stability, and reliability. Therefore, the immunosensors reported in this work have good precision.

In a final investigation, the proposed S-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO and N-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO PEC immunosensors were applied to

TABLE 1 Different analytical parameters for determination of SARS-CoV-2 reported in the literature and comparison with the immunosensor developed in this manuscript.

Method	Target protein	Concentration range	Detection limit	E _{appl.} (V)	Light source	Reference
Electrochemical	PLpro	1 pg mL ⁻¹ –10 μg mL ⁻¹	1 pg mL ⁻¹	–	–	[46]
Electrochemical	S protein	0.1–1000 ag mL ⁻¹	0.01 ag mL ⁻¹	–	–	[47]
Electrochemical	S protein	1–1000 ng mL ⁻¹	0.11 ng mL ⁻¹	–	–	[48]
Calorimetric	S protein	1–100 ng mL ⁻¹	1 ng mL ⁻¹	–	–	[49]
Colorimetric	N protein	0.3–1000 ng mL ⁻¹	0.038 ng mL ⁻¹	–	–	[50]
Colorimetric	S protein	10–100 ng mL ⁻¹	11 ng mL ⁻¹	–	–	[51]
Field-effect transistor	S protein	1 fg mL ⁻¹ –10 pg mL ⁻¹	1 fg mL ⁻¹	–	–	[52]
Plasmonic metasensors	S protein	4–12 fM	4.2 fM	–	–	[53]
Chemiluminescent	S protein	0.2–100 ng mL ⁻¹	0.1 ng mL ⁻¹	–	–	[54]
Photoelectrochemical	N protein	0.001–50 ng mL ⁻¹	0.38 pg mL ⁻¹	0.0	100 W LED	[55]
Photoelectrochemical	N protein	10 pg mL ⁻¹ –100 ng mL ⁻¹	2.9 pg mL ⁻¹	0.0	300 W Xe	[56]
Photoelectrochemical	S protein	0.1–1000 ng mL ⁻¹	0.53 ng mL ⁻¹	0.1	300 W Xe	[57]
Photoelectrochemical	S protein	0.5–32 nM	0.12 nM	0.05	150 W Xe	[58]
Photoelectrochemical	S protein	0.1 pg mL ⁻¹ –1000 ng mL ⁻¹	0.1 pg mL ⁻¹	0.0	36 W LED	T.w
Photoelectrochemical	N protein	0.01 pg mL ⁻¹ –1000 ng mL ⁻¹	0.01 pg mL ⁻¹	–	–	–

*PLpro-Papain-like cysteine protease. T.w. = This work

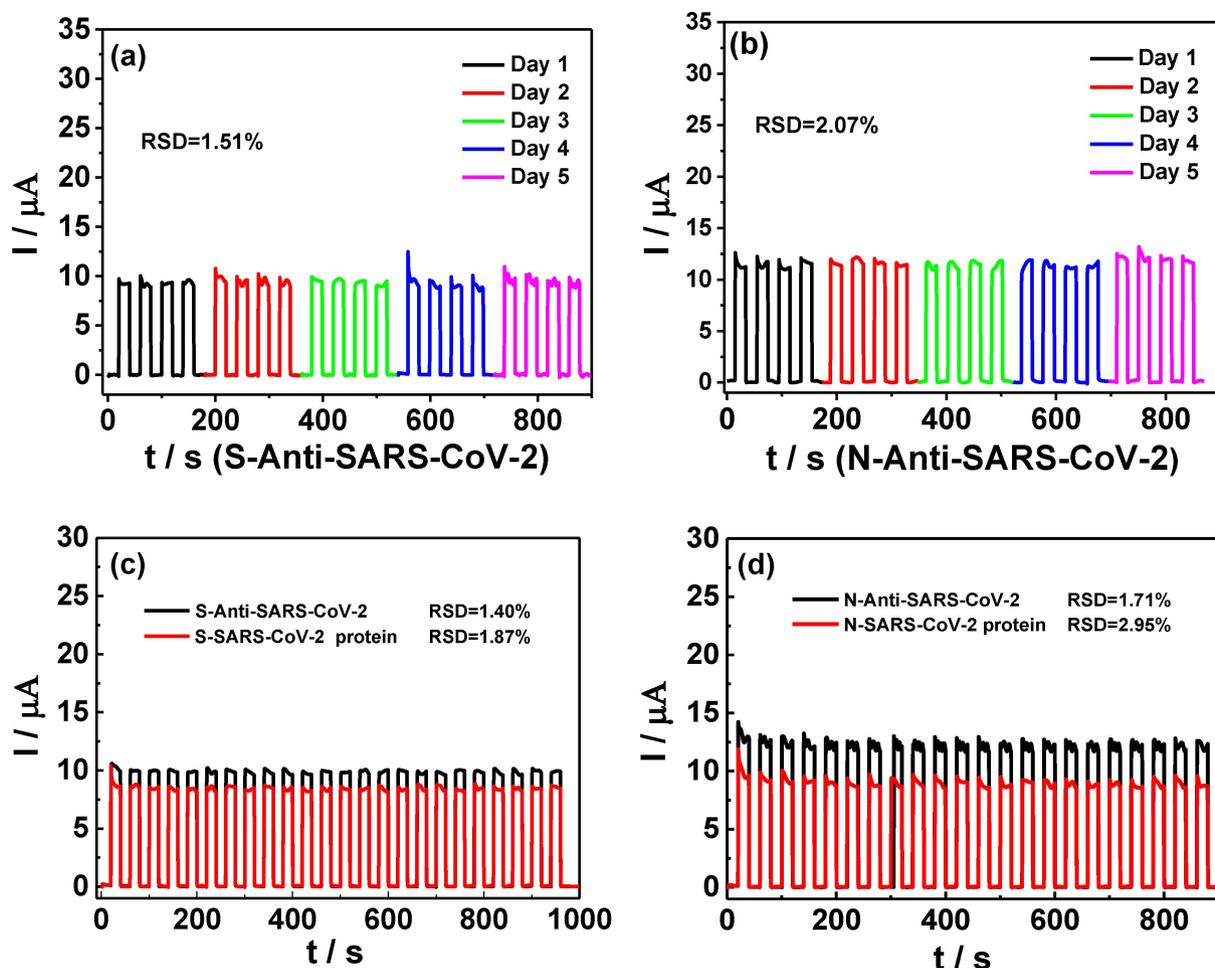


FIGURE 7 Reproducibility of the immunosensor response performed at different days for (a) S-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO and (b) N-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO. Repeatability of measurements in 1000 s, for each modified platform (S or N antibody) before (black line) and after spiking of the target protein (red line). [Anti-SARS-CoV-2] = 3 μg mL⁻¹; [SARS-CoV-2 protein] = 10 pg mL⁻¹.

TABLE 2 Results obtained for detection of SARS-CoV-2 in samples of artificial saliva.

Samples artificial saliva	Added (ng mL ⁻¹)	Founded (ng mL ⁻¹)	Recovery (%)
[SARS-CoV	0.01	0.0103 (±0.08)	103.00
S-protein]	1.00	1.07 (±0.07)	107.00
	100.00	103.51 (±0.03)	103.51
[SARS-CoV	0.01	0.0097 (±0.60)	97.00
N-protein]	1.00	1.072 (±0.40)	107.20
	100.00	104.95 (±0.30)	104.95

artificial saliva samples in order to evaluate their analytical performance. For each immunosensor, 3 different sample concentrations (0.01, 1, and 100 ng mL⁻¹) were analyzed, and the quantification of SARS-CoV-2 was performed by the external calibration method.

Table 2 shows the recovery percentages obtained, which ranged from 97.00% to 107.20%. These recoveries

percentages were close to 100%, suggesting that the PEC sensor can successfully detect the Spike and Nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2, showing good accuracy.

4 | CONCLUSION

Here, we report the development of PEC immunosensors based on an FTO film composed of bismuth vanadate and strontium titanate. The combination of these materials with S- and N-Anti-SARS-CoV-2 antibodies was efficient for detecting Spike and Nucleocapsid proteins. The PEC system was constructed using a commercial LED lamp and a handmade box. Furthermore, this approach proved to be efficient under the incidence of light. These properties lead to wide linear ranges and lower detection limits, making the immunosensors viable for detecting S-SARS-CoV-2 and N-SARS-CoV-2 proteins in artificial saliva, with good accuracy and low standard deviation values. The N-Anti-SARS-CoV-2/BiVO₄/SrTiO₃/FTO

immunosensor presented higher capability to detect lower concentrations of its target protein.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioanalítica (465389/2014-7) FAPEMA (Grants: INFRA-02021/21; INFRA-02050/21; INFRA-02203/2021; UNIVERSAL-06535/22; POS-GRAD-02432/21), CNPq (Grants: 308718/2022-4; 309828/2020-1; 305806/2020-3; 313324/2021-2), and FINEP for financial support. We are also thankful to the Multiuser Centre for Research in Materials and Biosystems (CeMatBio) of the Federal University of Maranhão (UFMA) for the support with the XRD and SEM/EDS measurements.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Lauro Tatsuo Kubota  <http://orcid.org/0000-0001-8189-2618>

REFERENCES

1. G. Bonaccorsi, F. Pierri, M. Cinelli, A. Flori, A. Galeazzi, F. Porcelli, A. L. Schmidt, C. M. Valensise, A. Scala, W. Quattrociochi, F. Pammolli, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 15530–15535.
2. J. Gao, Y. Yin, K. R. Myers, K. R. Lakhani, D. Wang, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 6188.
3. L. Liu, S. Iketani, Y. Guo, J. F. Chan, M. Wang, L. Liu, Y. Luo, H. Chu, Y. Huang, M. S. Nair, J. Yu, K. K. Chik, T. T. Yuen, C. Yoon, K. K. To, H. Chen, M. T. Yin, M. E. Sobieszczyk, Y. Huang, H. H. Wang, Z. Sheng, K. Y. Yuen, D. D. Ho, *Nature* **2022**, *602*, 676–681.
4. D. Planas, N. Saunders, P. Maes, F. Guivel-Benhassine, C. Planchais, J. Buchrieser, W. H. Bolland, F. Porrot, I. Staropoli, F. Lemoine, H. Pere, D. Veyer, J. Puech, J. Rodary, G. Baele, S. Dellicour, J. Raymenants, S. Gorissen, C. Geenen, B. Vanmechelen, T. Wawina-Bokalanga, J. Marti-Carreras, L. Cuyppers, A. Seve, L. Hocqueloux, T. Prazuck, F. A. Rey, E. Simon-Lorriere, T. Bruel, H. Mouquet, E. Andre, O. Schwartz, *Nature* **2022**, *602*, 671–675.
5. L. Scott, N. Y. Hsiao, S. Moyo, L. Singh, H. Tegally, G. Dor, P. Maes, O. G. Pybus, M. U. G. Kraemer, E. Semenova, S. Bhatt, S. Flaxman, N. R. Faria, T. de Oliveira, *Science* **2021**, *374*, 1454–1455.
6. N. Wolter, W. Jassat, S. Walaza, R. Welch, H. Moultrie, M. Groome, D. G. Amoako, J. Everatt, J. N. Bhiman, C. Scheepers, N. Tebela, N. Chiwandire, M. du Plessis, N. Govender, A. Ismail, A. Glass, K. mLisana, W. Stevens, F. K. Treurnicht, Z. Makatini, N. Y. Hsiao, R. Parboosing, J. Wadula, H. Hussey, M. A. Davies, A. Boule, A. von Gottberg, C. Cohen, *Lancet* **2022**, *399*, 437–446.
7. Y. Joung, K. Kim, S. Lee, B. S. Chun, S. Lee, J. Hwang, S. Choi, T. Kang, M. K. Lee, L. Chen, J. Choo, *ACS Sens.* **2022**, *7*, 3470–3480.
8. J. P. Broughton, X. Deng, G. Yu, C. L. Fasching, V. Servellita, J. Singh, X. Miao, J. A. Streithorst, A. Granados, A. Sotomayor-Gonzalez, K. Zorn, A. Gopez, E. Hsu, W. Gu, S. Miller, C. Y. Pan, H. Guevara, D. A. Wadford, J. S. Chen, C. Y. Chiu, *Nat. Biotechnol.* **2020**, *38*, 870–874.
9. V. M. Corman, O. Landt, M. Kaiser, R. Molenkamp, A. Meijer, D. K. Chu, T. Bleicker, S. Brunink, J. Schneider, M. L. Schmidt, D. G. Mulders, B. L. Haagmans, B. van der Veer, S. van den Brink, L. Wijsman, G. Goderski, J. L. Romette, J. Ellis, M. Zambon, M. Peiris, H. Goossens, C. Reusken, M. P. Koopmans, C. Drosten, *Euro Surveill.* **2020**, *25*, 2000045.
10. M. Shen, Y. Zhou, J. Ye, A. A. Abdullah Al-Maskri, Y. Kang, S. Zeng, S. Cai, *J Pharm Anal.* **2020**, *10* (2), 97–101.
11. J. Cheong, H. Yu, C. Y. Lee, J. U. Lee, H. J. Choi, J. H. Lee, H. Lee, J. Cheon, *Nat Biomed Eng.* **2020**, *4*, 1159–1167.
12. X. He, E. H. Y. Lau, P. Wu, X. Deng, J. Wang, X. Hao, Y. C. Lau, J. Y. Wong, Y. Guan, X. Tan, X. Mo, Y. Chen, B. Liao, W. Chen, F. Hu, Q. Zhang, M. Zhong, Y. Wu, L. Zhao, F. Zhang, B. J. Cowling, F. Li, G. M. Leung, *Nat. Med.* **2020**, *26* (9), 1491–1493.
13. S. Petralia, S. Conoci, *ACS Sens.* **2017**, *2* (7), 876–891.
14. K. Dighe, P. Moitra, M. Alafeef, N. Gunaseelan, D. Pan, *Biosens. Bioelectron.* **2022**, *200*, 113900.
15. H. Harpaldas, S. Arumugam, C. Campillo Rodriguez, B. A. Kumar, V. Shi, S. K. Sai, *Lab Chip.* **2021**, *21*(23), 4517–48.
16. Z. Qin, R. Peng, I. K. Baravik, X. Liu, *Matter* **2020**, *3* (3), 628–651.
17. D. Wang, S. He, X. Wang, Y. Yan, J. Liu, S. Wu, S. Liu, Y. Lei, M. Chen, L. Li, J. Zhang, L. Zhang, X. Hu, X. Zheng, J. Bai, Y. Zhang, Y. Zhang, M. Song, Y. Tang, *Nat Biomed Eng.* **2020**, *4* (12), 1150–1158.
18. R. Weissleder, H. Lee, J. Ko, M. J. Pittet, *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12* (546), 1–5.
19. Y. Zhou, Y. Wu, L. Ding, X. Huang, Y. Xiong, *Trends Analyt Chem.* **2021**, *145*, 116452.
20. M. A. Kafeshani, V. Mahdikhah, S. Sheibani, *Opt. Mater.* **2022**, *133*, 113080.
21. M. Abdi, V. Mahdikhah, S. Sheibani, *Opt. Mater.* **2020**, *102*, 109803.
22. A. Raeisi, A. N. Chermahini, M. M. Momeni, *J. Photochem. Photobiol. A* **2022**, *433*, 114190.
23. T. Łęcki, H. Hamad, K. Zarębska, E. Wierzyńska, M. Skomp-ska, *Electrochim. Acta* **2022**, *434*, 141292.
24. T. M. Prado, A. Carrico, F. H. Cincotto, O. Fatibello-Filho, F. C. Moraes, *Sens. Actuators B* **2019**, *285*, 248–253.
25. H. Luo, A. H. Mueller, T. M. McCleskey, A. K. Burrell, E. Bauer, Q. X. Jia, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112* (15), 6099–6102.
26. J. Xue, C. Gao, L. Zhang, K. Cui, W. He, J. Yu, *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6* (28), 4697–703.

27. S. Li, Z. Xing, J. Feng, L. Yan, D. Wei, H. Wang, D. Wu, H. Ma, D. Fan, Q. Wei, *Sens. Actuators B* **2020**, 329, 129244.
28. J. Feng, F. Li, L. Liu, X. Liu, Y. Qian, X. Ren, X. Wang, Q. Wei, *Sens. Actuators B* **2020**, 308, 127685.
29. X. Li, J. Huang, J. Ding, M. Xiu, K. Huang, K. Cui, J. Zhang, S. Hao, Y. Zhang, J. Yu, Y. Huang, *Biosensors* **2023**, 13, 103.
30. R. A. Soomro, S. Jawaid, N. H. Kalawar, M. Tunesi, S. Karakus, A. Kilislioglu, M. Willander, *Biosens. Bioelectron.* **2020**, 166, 112439.
31. Y. Li, X. Dai, L. He, Y. Bu, J.-P. Ao, *J. Mater. Chem. B* **2022**, 10, 870–879.
32. J. Shu, Z. Qiu, Z. Lin, G. Cai, H. Yang, D. Tang, *Anal. Chem.* **2016**, 88(24), 12539–12546.
33. J. Li, F. Wang, L. Meng, M. Han, Y. Guo, C. Sun, *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, 485, 116–122.
34. J. Wang, M. Kuo, P. Zeng, L. Xu, S. Chen, T. Peng, *Appl. Catal. B* **2020**, 119377.
35. S. A. Alves, L. L. Soares, L. A. Goulart, L. H. Mascaro, *J. Solid State Electrochem.* **2016**, 20 (9), 2461–2470.
36. M. Chen, Y. Zheng, J. Gao, C. Li, C. Yu, Q. Wang, *Microchim. Acta* **2017**, 184 (7), 2275–80.
37. J. Wang, H. Xu, S. Li, B. Yan, Y. Shi, C. Wang, Y. Du, *Analyst* **2017**, 142 (24), 4852–4861.
38. T. M. Prado, F. H. Cincotto, O. Fatibello-Filho, F. C. Moraes, *Electroanalysis* **2018**, 30 (11), 2704–2711.
39. M. Raschetti, G. Byzinski, C. Ribeiro, E. Longo, *Ceram. Int.* **2017**, 43 (15) 11722–11732.
40. P. F. Lim, K. H. Leong, L. C. Sim, W. D. Oh, Y. H. Chin, P. Saravanan, C. Dai, *Appl. Phys. A* **2020**, 126(7), 1–10.
41. M. V. Le, N.-Q.-D. Vo, Q.-C. Le, V. A. Tran, T.Q.-P. Phan, C.-W. Huang, V.-H. Nguyen, *Catalysts* **2021**, 11, 564.
42. T. M. Prado, C. C. Badaró, R. G. Machado, P. S. Fadini, O. Fatibello-Filho, F. C. Moraes, *Electroanalysis* **2020**, 32 (9), 1930–1937.
43. O. F. Lopes, K. T. G. Carvalho, G. K. Macedo, V. R. Mendonça, W. Avansi, C. Ribeiro, *New J. Chem.* **2015**, 39(8), 6231–6237.
44. X. Xiao, Y. Zhao, T. Liu, J. Zhang, J. Wang, *Russ. J. Phys. Chem.* **2022**, 96, 3038–3044.
45. J. Li, F. Wang, L. Meng, M. Han, Y. Guo, C. Sun, *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, 485, 116–122.
46. Q. Liang, Y. Huang, M. Wang, D. Kuang, J. Yang, Y. Yi, H. Shi, J. Li, J. Yang, G. Li, *Chem. Eng. J.* **2023**, 452, 139646.
47. L. Liv, *Microchem. J.* **2021**, 168, 106445.
48. A. Yakoh, U. Pimpitak, S. Rengpipat, N. Hirankarn, O. Chailapakul, S. Chaiyo, *Biosens. Bioelectron.* **2020**, 112912.
49. C. D. Prainito, G. Eshun, F. J. Osonga, D. Isika, C. Centeno, O. A. Sadik, *Biosensors* **2022**, 12(10), 804.
50. H.-K. Oh, K. Kim, J. Park, H. Im, S. Maher, M.-G. Kim, *Biosens. Bioelectron.* **2022**, 205, 114094.
51. Z. Fu, W. Zeng, S. Cai, H. Li, J. Ding, C. Wang, Y. Chen, N. Han, R. Yang, *J. Colloid Interface Sci.* **2021**, 604, 113–121.
52. G. Seo, G. Lee, M. J. Kim, S.-H. Baek, M. Choi, K. B. Ku, C.-S. Lee, S. Jun, D. Park, H. G. Kim, S.-J. Kim, J.-O. Lee, B. T. Kim, E. C. Park, S. I. Kim, *ACS Nano* **2020**, 14, 5135–5142.
53. A. Ahmadivand, B. Gerislioglu, Z. Ramezani, A. Kaushik, P. Manickam, S. A. Ghoreishi, *Biosens. Bioelectron.* **2021**, 177, 112971.
54. D. Liu, C. Ju, C. Han, R. Shi, X. Chen, D. Duan, J. Yan, X. Yan, *Biosens. Bioelectron.* **2021**, 173, 112817.
55. H. Chang, M. Jiang, Q. Zhu, A. Liu, Y. Wu, C. Li, X. Ji, L. Gong, S. Li, Z. Chen, L. Kong, L. Han, *Microchem. J.* **2022**, 182, 107866.
56. A. Guo, F. Pei, S. Feng, W. Hu, P. Zhang, M. Xia, X. Mu, Z. Tong, F. Wang, B. Liu, *Sens. Actuators B Chem.* **2023**, 374, 132800.
57. H. Li, J. Zhao, T. Wu, Z. Fu, W. Zhang, Z. Lian, S. Cai, R. Yang, *Sens. Actuators B* **2023**, 376, 132970.
58. M. A. Tabrizi, L. Nazari, P. Acedo, *Sens. Actuators B Chem.* **2021**, 345, 130377.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

Correction added on 17.07.2023: Correction of uploading the Supporting information.

How to cite this article: C. Nascimento Botelho, A. Silva de Menezes, S. Moraes Silva, L. Tatsuo Kubota, F. Santos Damos, R. de Cássia Silva Luz, *Electroanalysis* **2023**, 35, e202200572. <https://doi.org/10.1002/elan.202200572>