



**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**BIOSSENSOR MAGNETOELÁSTICO PARA DIAGNÓSTICO
DE Sars-CoV-2**

Luiza Felippi de Lima

**CAXIAS DO SUL
2024**

Luiza Felippi de Lima

BIOSSENSOR MAGNETOELÁSTICO PARA DIAGNÓSTICO DE Sars-CoV-2

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Mariana Roesch Ely
Coorientadores: Prof. Dr. Cesar Aguzzoli
Prof. Dr. Cláudio Antônio Perottoni

CAXIAS DO SUL
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

L732b Lima, Luiza Felippi de

Biossensor magnetoelástico para diagnóstico de Sars-CoV-2 [recurso eletrônico] / Luiza Felippi de Lima. – 2024.

Dados eletrônicos.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2024.

Orientação: Mariana Roesch Ely.

Coorientação: Cesar Aguzzoli, Cláudio Antônio Perottoni.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Biossensores. 2. COVID-19. 3. Biotecnologia. 4. Magnetostricção. I. Ely, Mariana Roesch, orient. II. Aguzzoli, Cesar, coorient. III. Perottoni, Cláudio Antônio, coorient. IV. Título.

CDU 2. ed.: 537.634:578.834

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Márcia Servi Gonçalves - CRB 10/1500

Biossensor Magnetoelástico para Diagnóstico de Sars-Cov-2

Luiza Felippi de Lima

Tese submetida a banca examinadora designada pela coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em 24 de julho de 2024.

Banca examinadora

Orientadora: Prof. Dra. Mariana Roesch Ely
Universidade de Caxias do Sul – UCS

Coorientador: Prof. Dr. Cesar Aguzzoli
Universidade de Caxias do Sul – UCS

Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Antônio Perottoni
Universidade de Caxias do Sul – UCS

Dr. João Paulo Sinnecker
Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas – CBPF

Dra. Lucimeire Antonelli da Silveira
Universidade Federal de Goiás – UFG

Dr. Sidnei Moura e Silva
Universidade de Caxias do Sul – UCS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro e institucional que foi fundamental para a realização deste trabalho de doutorado. A bolsa concedida pela CAPES não só viabilizou minha dedicação exclusiva à pesquisa, como também possibilitou a realização do meu período de doutorado sanduíche através do Programa de Doutorado-sanduíche no Exterior (PDSE), enriquecendo significativamente minha formação acadêmica e profissional.

À minha orientadora, Prof. Dra. Mariana Roesch-Ely, e aos meus coorientadores, Prof. Dr. Cláudio A. Perottoni e Prof. Dr. Cesar Aguzzoli, manifesto meu sincero agradecimento pela orientação, apoio e incentivo constantes ao longo deste percurso. Suas valiosas contribuições, críticas construtivas e encorajamento foram essenciais para a realização deste trabalho. À minha orientadora, em especial, agradeço também pela oportunidade de realizar parte do meu doutorado em parceria com o *International Iberian Nanotechnology Laboratory* (INL).

Aos meus familiares, amigos e colegas que, de várias formas, contribuíram para a concretização deste projeto, meu muito obrigado.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
REFERENCIAL TEÓRICO	5
1.1 Pandemia e diagnóstico	5
1.2 Biossensores Magnetoelásticos	8
1.2.1 Material, princípio de funcionamento e medição	10
1.2.2 Influência de fatores extrínsecos na resposta dos biossensores	14
1.2.3 Funcionalização da superfície do biossensor	15
1.2.4 Amplificação da resposta com nanopartículas de ouro	20
1.2.5 Influência do posicionamento de massa na sensibilidade dos biossensores	22
1.2.6 Aplicações	24
OBJETIVOS	29
INFLUÊNCIA DE FATORES EXTRÍNSECOS	30
3.1 Introdução	30
3.2 Experimental	34
3.2.1 Avaliação do efeito da temperatura	35
3.2.2 Avaliação da corrente de polarização	35
3.2.3. Otimização da superfície dos sensores em relação à resistência a corrosão – Tratamentos térmicos	35
3.2.5. Otimização da superfície dos sensores em relação à resistência a corrosão – Proteção catódica	38
3.3 Resultados e discussão	38
3.4 Conclusões	47
FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE E DIAGNÓSTICO	49
4.1 Introdução	49
4.1.1 Funcionalização da superfície	49

4.1.2 Amplificação do sinal de resposta com AuNPs.....	55
4.2 Experimental	56
4.2.1 Limpeza da superfície	56
4.2.2 Formação da Self Assembled Monolayer	57
4.2.3 Imobilização dos anticorpos	58
4.2.4 Bloqueio da superfície	59
4.2.5 Diagnóstico.....	59
4.3 Resultados e discussão.....	60
4.4 Conclusão	73
INFLUÊNCIA DO POSICIONAMENTO DE MASSA NA SENSITIVIDADE DOS BIOSSENSORES MAGNETOELÁSTICOS	75
5.1 Introdução	75
5.2 Experimental	77
5.2.1 Posicionamento da massa	77
5.2.2 Funcionalização controlada.....	78
5.3 Resultados e discussão.....	80
5.4 Conclusão	90
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	92

SIGLAS, SÍMBOLOS, TERMOS E ABREVIACÕES

UCS	Universidade de Caxias do Sul
CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
INL	<i>International Iberian Nanotechnology Laboratory</i>
Mers-CoV	Síndrome Respiratória do Oriente Médio
Sars-CoV	Síndrome Respiratória Aguda Grave
Sars-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
RT-PCR	Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
POC	<i>Point-of-care</i>
LOD	Limite de detecção
CSFV	Febre suína clássica
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
SPR	Ressonância Plasmônica de Superfície
H	Campo magnético
f_0	Frequência fundamental de ressonância
E	Módulo de elasticidade
ρ	Densidade
ν	Coefficiente de Poisson
S_m	Sensitividade de massa
SAM	<i>Self Assembled Monolayers</i>
Ig	Imunoglobulinas
F_{ab}	Fragmento de ligação ao antígeno
F_c	Fragmento cristalizável
BSA	Albumina sérica bovina
AuNPs	Nanopartículas de ouro
AC	Campo magnético alternado
DC	Campo magnético de polarização estático
PVD	Deposição física de vapor
PBS	Tampão fosfato-salino
TT	Tratamentos térmicos
EDX	Espectroscopia de Fluorescência de Raios X por Dispersão em Energia
MEV/FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
11-MUA	Ácido 11-mercaptoundecanoico
ATR-FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre diferentes abordagens para diagnóstico em relação às suas principais vantagens e desvantagens [adaptado de (20)]	9
Tabela 2. Métodos para detecção de anticorpos E2 para a CSFV [adaptado de (22)].....	9
Tabela 3. Propriedades físicas e magnéticas da liga METGLAS 2628MB (30)	11
Tabela 4. Limite de detecção de biossensores magnetoelásticos para diversos patógenos (20)	26
Tabela 5. Espessura de camadas protetoras de Ti, Cr e Au em biossensores magnetoelásticos	33
Tabela 6. Tratamentos térmicos realizados nos sensores	36
Tabela 7. Mudança de frequência dos sensores após teste de resistência à corrosão em água ultrapura e PBS em função do tratamento térmico aplicado. Nenhuma mudança de frequência foi observada no sensor imerso em etanol.	46
Tabela 8. Comparação entre processos de limpeza da superfície de ouro	50
Tabela 9. Comparação entre as SAM utilizadas em biossensores	50
Tabela 10. Comparação entre as estratégias de ativação do 11-MUA com EDC/NHS	52
Tabela 11. Comparação entre parâmetros utilizados para a imobilização dos anticorpos em biossensores magnetoelásticos	54
Tabela 12. Métodos de limpeza superficial avaliados	57
Tabela 13. Parâmetros das retas ajustadas.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alinhamento dos domínios magnéticos no fenômeno de magnetoestricção quando um campo magnético (H) é aplicado em um material magnetoelástico [adaptado de (27)].	12
Figura 2. Funcionamento do biossensor em (a) interação biológica na superfície (b) sistema de detecção e (c) gráfico do espectro de frequência antes e após a interação (20).	13
Figura 3. Estrutura típica de um anticorpo IgG, em (a) estrutura de ligações e (b) cristalina (57).	18
Figura 4. Representação esquemática das três principais etapas da funcionalização: (I) SAM, (II) imobilização dos anticorpos e (III) bloqueio da superfície.	20
Figura 5. Representação esquemática das três principais etapas para o diagnóstico. 1) partículas virais são apresentadas às AuNPs, 2) AuNPs capturam as partícula virais e 3) se ligam à superfície do biossensor.	21
Figura 6. (a) S_m em função do posicionamento de massa e (b) deslocamento em função do posicionamento de massa (39).	23
Figura 7. (a) Sistema de saúde de monitoramento remoto e (b) controle de patógenos em ambientes públicos (20,86).	28
Figura 8. Configuração do sistema de medição dos sensores para este trabalho [adaptado de (87)]	31
Figura 9. Superfície dos sensores após 12 h de contato com as soluções de SAM na concentração de 5 mM (comprimento do sensor 5 mm).	36
Figura 10. Variação de temperatura ΔT devido ao auto aquecimento das bobinas do sistema no suporte polimérico (quadrados sólidos pretos) e no suporte de alumínio (triângulos sólidos azuis). Os quadrados abertos conectados pela linha.	39
Figura 11. (a) Espectro de frequência de ressonância para um sensor em líquido em diferentes correntes de polarização (b) cálculo da mudança de frequência em função da corrente	40
Figura 12. Frequência de ressonância (círculos sólidos pretos) e amplitude do sinal (quadrados abertos vermelhos) em relação ao tratamento térmico de quatro	

grupos de sensores. Os símbolos indicam os valores médios, enquanto as barras de erro correspondem ao desvio padrão entre medições de 30 sensores.	42
Figura 13. Superfície do sensor após teste de resistência à corrosão em água ultrapura, PBS e etanol em função do tratamento térmico aplicado. Cada imagem corresponde a dois sensores diferentes mostrando superfícies rugosa e lisas (barra de escala: 0,5 mm).	43
Figura 14. Imagens MEV/EDS da superfície do sensor após teste de corrosão em água ultrapura (corrosão do ferro) e PBS (cristalização de sal) para sensores com tratamento térmico antes e depois do revestimento (G4).	44
Figura 15. Imagens de MEV da superfície recoberta com Cr e Au. (a) lado rugoso e (b) lado liso. As setas vermelhas indicam as imperfeições no revestimento. As barras de escala correspondem a 5 μ m (magnificação de 10 e 15 kx)	45
Figura 16. Espectro de frequência de ressonância antes e depois de 24 h, e imagem da superfície do sensor com tratamento térmico antes e depois do revestimento após teste de resistência à corrosão em água ultrapura utilizando proteção catódica (barra de escala: 0,5 mm).	47
Figura 17. Estrutura química da molécula de 11-MUA	51
Figura 18. Representação das reações que ocorrem durante a ativação da superfície com a química EDC/NHS (114).	52
Figura 19. Estrutura química de um anticorpo IgG com os grupos funcionais presentes na superfície (adaptado de (115)).....	53
Figura 20. Métodos de conjugação de anticorpos em AuNPs (65).....	55
Figura 21. Ângulo de contato da água em função do tipo de limpeza superficial realizado.....	61
Figura 22. Ângulo de contato da água após 24 horas para as superfícies limpas com plasma	62
Figura 23. Espectro infravermelho do 11-MUA.....	63
Figura 24. Espectro da superfície lisa dos biossensores com 11-MUA na superfície em função de cada tipo de limpeza	63
Figura 25. Espectro de infravermelho de um sensor com 11-MUA (a) sem lavagem e (b) com cinco lavagens subsequentes.....	65
Figura 26. Espectro de infravermelho de um sensor com 11-MUA e anticorpos (a) sem lavagem e (b) com cinco lavagens subsequentes.....	66

Figura 27. Variação de frequência de ressonância em função do tempo para biossensores de teste (azul) e controle (preto)	68
Figura 28. Imagem de MEV/FEG da superfície do biossensor de teste para confirmar o tamanho das AuNPs. As medidas de diâmetro foram realizadas com o software de microscópio MIRA MEV/FEG da Tescan. A barra de escala da imagem corresponde a 200 nm.....	69
Figura 29. Imagens de MEV/FEG dos biossensores após o período de 30 minutos de análise. Em (a) biossensor de controle e (b) biossensor de teste .	70
Figura 30. Imagens MEV/EDS da superfície do biossensor confirmando a presença do sal (NaCl).....	71
Figura 31. Variação de frequência de ressonância dos biossensores de controle e de teste após período de 24 horas de ensaio	72
Figura 32. Imagens de MEV/FEG dos BSM após o período de 24 horas de análise. Em (a) biossensor de controle e (b) biossensor de teste	73
Figura 33. Imagens da simulação do posicionamento de massa na superfície do sensor (a delimitação contornada em preto exemplifica a região do sensor na qual a massa foi depositada) e imagens de MEV dos sensores utilizados para a parte experimental do trabalho.....	78
Figura 34. Sensor após o processo de limpeza com UV-O	79
Figura 35. Imagem da superfície do sensor com o padrão característico da vibração longitudinal para (a) o primeiro harmônico e (b) terceiro harmônico..	81
Figura 36. Variação da frequência de ressonância em função da posição da área depositada para o primeiro harmônico. Azul apresenta resultados da simulação e cinza do experimental.	82
Figura 37. Variação da frequência de ressonância em função da posição da área depositada para o terceiro harmônico. Azul apresenta resultados da simulação e cinza do experimental.	83
Figura 38. Variação da frequência de ressonância para o primeiro harmônico em função da posição e quantidade da massa depositada sobre os sensores	84
Figura 39. Variação da frequência de ressonância para o terceiro harmônico em função da posição e quantidade da massa depositada sobre os sensores	85
Figura 40. Avaliação da sensibilidade de massa apenas nas pontas dos biossensores para o primeiro harmônico (a) e o terceiro (b).	87

Figura 41. Funcionalização controlada da superfície para o primeiro harmônico, (a) padrão de vibração do sensor, (b) biossensor durante o processo de funcionalização e (c) imagem de microscopia óptica da superfície do biossensor após a interação com as AuNPs 88

Figura 42. Funcionalização controlada da superfície para o terceiro harmônico, (a) padrão de vibração do sensor, (b) biossensor durante o processo de funcionalização e (c) imagem de microscopia óptica da superfície do biossensor após a interação com as AuNPs 89

RESUMO

Biossensores magnetoelásticos pertencem à classe dos sensores mássicos e seu princípio de funcionamento é baseado na variação da frequência fundamental de ressonância. Esses biossensores destacam-se pela capacidade de detecção específica de patógenos mediante funcionalização estratégica de sua superfície. Nesta tese foi desenvolvido um biossensor magnetoelástico para detecção de Sars-CoV-2. Foram avaliados fatores extrínsecos que influenciam na sensibilidade dos sensores magnetoelásticos, *e.g.* a influência da temperatura de operação, campo magnético aplicado, tratamentos térmicos e ambiente corrosivo. Um suporte de alumínio foi empregado como dissipador de calor para evitar variações de frequência de ressonância provenientes do auto aquecimento do sistema, e uma fonte de corrente de polarização com estabilidade do campo de 0,01% foi utilizada para eliminar os efeitos provenientes das variações de corrente, garantindo que as variações de frequência de ressonância sejam exclusivamente provenientes de aumento de massa. A aplicação de tratamento térmico antes e depois do processo de revestimento resultou em melhorias na homogeneidade de resposta dos sensores, além do aumento na resistência à corrosão. A superfície do sensor foi funcionalizada para torná-lo específico para detecção da proteína recombinante de Sars-CoV-2. A imobilização dos agentes de bioreconhecimento na superfície do sensor foi confirmada pela técnica de ATR-FTIR e a utilização de AuNPs, para amplificar o sinal de resposta, permitiu a realização da detecção da proteína recombinante do Sars-CoV-2. Os biossensores utilizados neste trabalho apresentaram uma sensibilidade de massa de 196 Hz/ μ g. Alternativas para melhorar a sensibilidade de massa do biossensor foram avaliadas através de simulações computacionais dos modos de vibração dos sensores, bem como a resposta da variação de frequência em função da posição e quantidade de massa carregada na superfície. A partir dos resultados obtidos foi possível realizar a funcionalização controlada da superfície do biossensor com o objetivo de ampliar o sinal da resposta levando em consideração apenas as regiões de maior intensidade de vibração e eliminando os pontos cegos, nos quais a variação de frequência de ressonância devido a massa aderida é praticamente nula. Em síntese, foi desenvolvido e otimizado um biossensor magnetoelástico para a detecção específica da proteína recombinante do Sars-CoV-2. Além de confirmar a eficácia da funcionalização da superfície do sensor e a amplificação do sinal por AuNPs, este trabalho destacou a importância de fatores extrínsecos, na sensibilidade do dispositivo. As simulações computacionais permitiram a otimização da distribuição de massa na superfície do sensor, maximizando a sensibilidade e eliminando pontos cegos. Esses avanços, permitem a utilização do biossensor com maior precisão e confiabilidade, consolidando-se como uma ferramenta promissora para aplicações diagnósticas na detecção de vírus.

Palavras-chave: biossensores, magnetoelástico, Sars-CoV-2, funcionalização

ABSTRACT

Magnetoelastic biosensors, categorized as mass sensors, operate by detecting variations in the fundamental resonance frequency. Their standout feature lies in their targeted pathogen detection capability, achieved through precise surface functionalization. In this thesis, a magnetoelastic biosensor was developed to detect Sars-CoV-2. Extrinsic factors influencing the sensitivity of magnetoelastic sensors were evaluated, e.g. the influence of operating temperature, applied magnetic field, thermal treatments, and corrosive environment. A support made of aluminum was used as a heat sink to prevent resonance frequency shifts due to self-heating, and a polarization bias current source with field stability of 0.01% was implemented to eliminate the effects of current variations. This ensured that any changes in resonance frequency were solely attributable to an increase in mass. Applying thermal treatment before and after the coating process improved the homogeneity of the sensor response and increased the corrosion resistance. The sensor's surface was functionalized to make it specific for detecting the recombinant Sars-CoV-2 protein. ATR-FTIR confirmed the immobilization of biorecognition agents on the sensor surface. Using AuNPs to amplify the response signal allowed the detection of the Sars-CoV-2 recombinant protein. The biosensors used in this work present a mass sensitivity of 196 Hz/ μg . Alternatives to improve the biosensor's mass sensitivity were evaluated through computational simulations of the sensors' vibration modes, as well as the frequency variation response as a function of the position and amount of mass loaded on the surface. From the results obtained, it was possible to carry out controlled functionalization of the biosensor surface to expand the response signal, taking into account only the regions with the highest vibration intensity and eliminating the blind spots in which the resonance frequency variation due to the adhered mass is practically zero. In summary, a magnetoelastic biosensor was developed and optimized for the specific detection of the recombinant Sars-CoV-2 protein. In addition to confirming the efficacy of the sensor surface functionalization and signal amplification using AuNPs, this work highlighted the importance of extrinsic factors on the device's sensitivity. Computational simulations allowed for the optimization of mass distribution on the sensor surface, maximizing sensitivity and eliminating blind spots. These advancements enable the biosensor to be used with greater precision and reliability, establishing it as a promising tool for diagnostic applications in virus detection.

Key-words: biosensors, magnetoelastic, Sars-CoV-2, functionalization

INTRODUÇÃO

O diagnóstico precoce para inúmeras patologias é fundamental para reduzir o risco de desenvolvimento de complicações graves. Em 2016, a Organização Mundial de Saúde lançou um alerta global para prevenção e combate ao Zika vírus. Poucos anos depois, em 2020, ocorreu o surgimento de um novo vírus, o Sars-CoV-2, que alcançou uma proporção planetária de infectados e desencadeou a pandemia da doença Covid-19. Neste cenário, é imprescindível a adoção de ferramentas de diagnóstico rápido, como uma medida fundamental para identificar precocemente infecções e agilizar a implementação de estratégias preventivas e de controle da doença. A disponibilidade limitada de testes rápidos, aliada à sua frequente baixa sensibilidade, acentua ainda mais a necessidade de melhorar e expandir essas soluções diagnósticas.

Dessa forma, o trabalho proposto nesta tese apresenta uma alternativa diagnóstica baseada em biossensores magnetoelásticos para doença Covid-19. Os sensores magnetoelásticos pertencem à classe dos sensores mássicos e podem apresentar alta sensibilidade. Na área biológica, esses sensores são majoritariamente utilizados para a detecção de bactérias. No entanto, ao utilizá-los para a detecção de vírus, cujas partículas são substancialmente mais leves que as bactérias, é preciso adotar uma abordagem mais robusta, com o controle cuidadoso de diversas variáveis para assegurar a credibilidade desses sensores. Como consequência, o desenvolvimento de um biossensor magnetoelástico com sensibilidade para a detecção viral representa uma meta ambiciosa a ser alcançada. No entanto, o progresso obtido neste estudo indica caminhos promissores para a utilização segura desses biossensores em aplicações diagnósticas.

Esta tese foi construída através de uma abordagem multidisciplinar, reunindo conhecimentos de áreas como física, eletrônica, biologia e virologia, e só foi possível através da colaboração de diferentes unidades de pesquisa. A maior parte do estudo foi realizada na Universidade de Caxias do Sul (UCS – Rio Grande do Sul, Brasil), porém o suporte do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF – Rio de Janeiro, Brasil) e do *International Iberian Nanotechnology Laboratory* (INL – Braga, Portugal) foi fundamental.

Esta tese foi organizada em seis capítulos, conforme apresentados a seguir:

O Capítulo **1** apresenta informações e conceitos importantes sobre biossensores magnetoelásticos, como o princípio de funcionamento e parâmetros que influenciam na sensibilidade de massa, a funcionalização da superfície e a utilização de nanopartículas de ouro para amplificação do sinal de resposta, o que torna o diagnóstico possível.

No Capítulo **2** são definidos o objetivo geral e os objetivos específicos da pesquisa.

O Capítulo **3** trata sobre fatores extrínsecos, tais como temperatura, corrente de polarização e processos de corrosão, que influenciam na sensibilidade dos sensores magnetoelásticos, e podem impactar negativamente na sua performance. Parte dos resultados apresentados nesse capítulo foram publicados no artigo "*Role of extrinsic factors on magnetoelastic resonance biosensors sensitivity*" e permitiram a realização de medidas mais precisas dos biossensores.

Com o sistema de medição e os sensores otimizados, o Capítulo **4** aborda o processo de funcionalização da superfície, visando conferir especificidade ao biossensor para a detecção do Sars-CoV-2. Os resultados obtidos demonstraram o potencial dos biossensores para essa aplicação. Entretanto, enfrentaram-se dificuldades relacionadas a reprodutibilidade desses resultados. Por esse motivo, no Capítulo **5** foram exploradas alternativas para superar esses desafios e melhorar a sensibilidade de massa dos biossensores. Este capítulo evidencia que o posicionamento da massa na superfície do biossensor exerce uma influência significativa na sensibilidade de massa destacando, assim, a importância da funcionalização controlada da superfície. Nesta etapa final do trabalho, foram realizadas análises de simulações computacional para mostrar e explicar como os padrões de ressonância dos sensores magnetoelásticos estão ligados ao posicionamento da massa. Ensaio experimentais confirmaram a tendência dos resultados simulados.

Por fim, o Capítulo **6** resume as conclusões gerais alcançadas ao longo deste estudo. Além disso, são exploradas perspectivas promissoras e delineada a continuidade da pesquisa.

CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS

Artigo publicado

LIMA, Luiza Felippi de et al. Role of extrinsic factors on magnetoelastic resonance biosensors sensitivity. **Measurement Science and Technology**, 2024. <https://doi.org/10.1088/1361-6501/ad1e1d>

Artigo submentido para publicação

Andreatta, A. J. da S.; **Lima, L. F. de**; Aguzzoli, C.; Perottoni, C. A.; Zorzi, J. E. Analix: an external agent detection software based on magnetoelastic sensors. **Journal of Open Source Software**, 2024.

Participação em Congressos

LIMA, L. F.; DUTRA, R.; SILVA, B. G.; SOMMER, R. L.; AGUZZOLI, C.; ROESCH-ELY, M.; PEROTTONI, C. Effects of heat treatment on magnetoelastic sensors for application in biosensors, 2023.

LIMA, L. F.; MACHADO, K. G.; DUTRA, R.; SOMMER, R. L.; AGUZZOLI, C.; PEROTTONI, C. A.; ROESCH-ELY, M. Surface functionalization of magnetoelastic sensors and gold nanoparticles for medical applications, 2023.

LIMA, L. F.; BERTELLI, V.; FROZZA, C.S.; GIRARDELLO, F.; AGUZZOLI, C.; ROESCH-ELY, M. Caracterização da imobilização de anticorpos em biossensores magnetoelásticos por ART-FTIR, 2023.

SOUZA, W. V.; **LIMA, L. F.**; GIRARDELLO, F.; MACHADO, K. G.; SOMMER, R. L.; CHECCA, R.; LOUZADA, D. R.; AGUZZOLI, C.; ROESCH-ELY, M. Cytotoxic evaluation of gold nanoparticles synthed via magnetron sputtering in mammalian fibroblasts (MRC-5), 2023.

MACHADO, K. G.; **LIMA, L. F.**; AGUZZOLI, C.; SOUZA, W. V.; CHECCA, R.; LOUZADA, D. R.; SOMMER, R. L.; ROESCH-ELY, M. Comparison of two gold

nanoparticle functionalization approaches for SARS-CoV-2 antigen capture, 2023.

Trabalhos de Iniciação científica

BERTELLI, V.; **LIMA, L. F.**; AGUZZOLI, C.; PEROTTONI, C. A.; ROESCH-ELY, M. CARACTERIZAÇÃO DOS SENSORES MAGNETOELÁSTICOS PARA APLICAÇÕES EM BIOSSENSORES. Em: XXXI Encontro de Jovens Pesquisadores & XIII Mostra Acadêmica de Inovação e Tecnologia, 2023, Caxias do Sul.

CAVION, C.; **LIMA, L. F.**; PEROTTONI, C. A.; ROESCH-ELY, M.; ZORZI, J. E. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA FREQUÊNCIA DE RESSONÂNCIA DE SENSORES MAGNETOELÁSTICOS. Em: XXIX Encontro de Jovens Pesquisadores, XI Mostra Acadêmica de Inovação e Tecnologia, 2021, Caxias do Sul.

MIOLA, L. S.; CAVION, C.; **LIMA, L. F.**; PEROTTONI, C. A.; ZORZI, J. E. SENSORES MAGNETOELÁSTICOS: O ESTADO DA ARTE. Em: XXIX Encontro de Jovens Pesquisadores, XI Mostra Acadêmica de Inovação e Tecnologia, 2021, Caxias do Sul.

Co-orientação em trabalho de conclusão de curso

Carolina Cavion. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM NA LEITURA PRECISA DE SENSORES MAGNETOELÁSTICOS PARA A APLICAÇÃO EM BIOSSENSORES. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Engenharia Química) - Universidade de Caxias do Sul.

Referencial teórico

O surgimento da pandemia da doença Covid-19, no início de 2020, desencadeou um alerta global aos sistemas de saúde, destacando a urgência na implementação de ferramentas de diagnóstico rápidas, sensíveis e de fácil acesso. Nesse contexto, os biossensores magnetoelásticos se destacam como uma opção promissora para diagnóstico, devido à sua alta sensibilidade. Pertencentes à classe dos sensores mássicos, esses dispositivos respondem às variações de massa na superfície, através de alterações na sua frequência de ressonância. Neste capítulo serão apresentadas informações e conceitos importantes associados aos biossensores magnetoelásticos.

1.1 Pandemia e diagnóstico

Diferentes tipos de coronavírus circulantes são responsáveis por causar desde resfriados comuns até doenças mais graves, como a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (Mers-CoV) e a Síndrome Respiratória Aguda Grave (Sars-CoV). Em dezembro de 2019, um novo coronavírus chamado de Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (Sars-CoV-2) surgiu na província de Hubei, na China, e se espalhou pelo mundo. Em março de 2020, a doença infecciosa Covid-19, causada pelo Sars-CoV-2, foi caracterizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma pandemia (1–4).

Uma das principais diferenças entre o Sars-CoV-2 e os demais vírus da família coronavírus é o alto número de pessoas infectadas que não apresentam sintomas da doença, mas tem capacidade de transmitir o vírus. Além disso, pessoas infectadas podem transmitir o vírus antes mesmo de apresentarem sintomas claros, tornando-o altamente transmissível. A principal rota de transmissão do vírus é de pessoa para pessoa, por meios de inalação direta de gotículas contaminadas, que são lançadas ao meio ambiente através da fala, espirros ou tosse (2).

Os sintomas da Covid-19 são semelhantes ao de uma gripe comum, como dores no corpo, tosse e febre. Porém, outras manifestações clínicas foram observadas, tais como fraqueza, mal-estar, dificuldade respiratória, dor de garganta, perda de paladar e olfato. Diversas variantes do vírus já foram identificadas – alfa, beta, gama e delta – e os sintomas mudam de acordo com cada uma delas (5). Embora os sintomas mais graves e óbito possam ocorrer em todas as idades, eles foram observados principalmente em indivíduos que se enquadram em grupos de risco, como idosos ou pessoas afetadas por comorbidades (6). Segundo dados disponibilizados pela OMS (4), o número de pessoas infectadas pelo vírus até o momento superou 773 milhões de casos e causou mais de 7 milhões de mortes.

O surgimento de vacinas e os esforços para imunização da população mundial foram imprescindíveis para o controle e prevenção da doença. Em 05 de maio de 2023 foi declarado o fim da pandemia da Covid-19, ou seja, a doença deixou de ser uma emergência de saúde global. No entanto, ela ainda representa uma ameaça para a saúde devido a possibilidade de futuros rebotes (4). Dessa forma, estratégias para diagnosticar e rastrear os casos da doença de forma rápida, massiva e efetiva ainda são essenciais.

A Covid-19 é identificada principalmente por meio de diagnóstico molecular do genoma viral pelo exame de reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (2). Devido à alta sensibilidade e especificidade, o RT-PCR é a técnica padrão ouro para detecção de Sars-CoV-2. O teste busca detectar material genético do vírus através da amplificação pela reação em cadeia da polimerase. Para isso, muitas cópias de uma região específica do RNA do vírus são geradas durante o ensaio. Os elementos necessários para um teste de RT-PCR são: amostra, primers, nucleotídeos e DNA polimerase. Todos esses elementos são colocados em um tubo de ensaio juntamente com uma solução tampão e submetidos a ciclos de aquecimento e resfriamento, em um termociclador. As principais etapas do ciclo são: desnaturação (96 °C), anelamento dos primers (55 °C) e extensão dos primers (72 °C). Este ciclo se repete em torno de 25 – 35 vezes em uma reação típica de PCR, que geralmente tem duração de 2 a 4 horas, dependendo do comprimento da região de RNA a ser copiada. Se a reação for eficiente, a região

de interesse pode gerar de uma ou poucas cópias, até bilhões. Por esse motivo, mesmo cargas virais muito baixas, podem ser detectadas por essa técnica (7).

O exame de RT-PCR é conduzido em laboratórios de referência devido à necessidade de equipamentos sofisticados, reagentes específicos e profissionais treinados. Contudo, sua realização pode demandar até dois dias para conclusão (8), tornando-se um ponto crítico em estratégias de tomada de decisão que dependem da identificação e isolamento ágil de indivíduos infectados. Além disso, o custo elevado associado ao teste pode ser uma barreira significativa em diversos países (9).

Por essas razões, novos testes rápidos foram implementados em locais de atendimento, conhecidos como *point-of-care* (POC). Esses testes proporcionam resultados imediatos, destacando-se por sua agilidade e eficácia. Muitos desses testes são baseados na tecnologia de imunocromatografia de fluxo lateral – um exemplo clássico desse tipo de teste é o de gravidez. Sua natureza de baixo custo, facilidade de utilização e dispensa de instrumentos complexos para processamento das amostras, os tornam altamente acessíveis e práticos (10).

Os testes de antígeno, que foram amplamente utilizados durante a pandemia, estão entre as opções de testes rápidos disponíveis para a Covid-19. Assim como os testes moleculares, os testes de antígenos têm como objetivo detectar a presença do vírus em indivíduos sintomáticos ou assintomáticos e são conduzidos com amostras provenientes do trato respiratório. A principal vantagem desses testes em relação ao RT-PCR inclui a simplicidade de utilização, pois podem ser realizados no próprio local de atendimento mediante a simples aplicação de um cotonete em contato com o reagente. Além disso, apresentam agilidade nos resultados, que são obtidos em um intervalo de 15 a 30 minutos. Outra vantagem associada ao uso de testes POC é a possibilidade de realizar um novo teste em um curto intervalo de tempo, devido ao custo reduzido, permitindo um monitoramento periódico do indivíduo (11,12).

A desvantagem dos testes rápidos de antígeno em comparação com o RT-PCR, está na sua sensibilidade moderada, com respostas que dependem do período de viremia em que o indivíduo se encontra durante a testagem, assim como a carga viral presente. Em quadros assintomáticos ou em casos de baixa carga viral, esses testes podem resultar em falsos negativos (13).

A pandemia destacou a urgência de testes rápidos e periódicos para uma gestão eficaz da doença. Além disso, evidenciou a falta de preparo global em relação aos dispositivos de diagnóstico, comprometendo a capacidade de realizar testagens rápidas e em larga escala. Diante desse cenário, surgiu uma demanda significativa por abordagens POC que ofereçam detecção rápida, acessibilidade econômica e facilidade de uso, não apenas para o monitoramento da Covid-19, mas também para diversas outras patologias. Nesse contexto, os biossensores magnetoelásticos se apresentam como uma alternativa interessante e promissora (14,15).

1.2 Biossensores Magnetoelásticos

Biossensores são dispositivos analíticos de detecção que convertem eventos de reconhecimento biomolecular em sinais físico-químicos mensuráveis. São compostos principalmente por elementos de reconhecimento biológico e transdutores. As principais classes de biossensores incluem dispositivos eletroquímicos, ópticos e mássicos (16,17).

Nos últimos anos, uma variedade de biossensores de alta sensibilidade e especificidade foi desenvolvida para aplicações nas mais diversas áreas, que incluem medicina, biomedicina, alimentos e monitoramento de ambiente (18). Contudo, existem desafios significativos no desenvolvimento de soluções que sejam simultaneamente simples, rápidas e acessíveis para biossensores, visando oferecer monitoramento POC. Os critérios essenciais para diagnósticos POC demandam dispositivos de medição portáteis e de trabalho rápido, capazes de fornecer diversos parâmetros fisiológicos e conduzir análises a níveis biomoleculares e celulares (19).

A Tabela 1 oferece uma análise comparativa das diferentes abordagens utilizadas para o diagnóstico, destacando as principais vantagens e desvantagens associadas a cada uma delas. Por meio dessa comparação, é possível entender melhor as características distintivas de cada técnica, bem como avaliar sua eficácia, precisão e custo, dentre outros aspectos relevantes para uma determinada aplicação ou cenário clínico.

Tabela 1. Comparação entre diferentes abordagem para diagnóstico em relação às suas principais vantagens e desvantagens [adaptado de (20)]

Abordagem	Vantagem	Desvantagem
PCR	Sensível Específico	Etapas complexas de pré-tratamento Instrumentos sofisticados e custo elevado
Piezoelétrico	Rápido Sensível Específico	Fragilidade
Magnetoelástico	Rápido Sensível Específico <i>Wireless</i>	Depende do uso de bobinas Corrente parasita
Óptico	Rápido Sensível Específico	Etapas complexas de pré-tratamento Instrumentos sofisticados
Eletroquímico	Rápido Sensível Custo baixo	Baixa estabilidade e repetibilidade para amostras complexas

Um parâmetro importante para qualquer ferramenta utilizada para diagnóstico médico e identificação de patógenos é o limite de detecção (LOD). O LOD consiste na concentração mínima do alvo em análise que pode ser detectada com diferença significativa do sinal de base (21). No entanto, o LOD de cada técnica é influenciado por diversos parâmetros, tais como sensibilidade, seletividade, relação sinal-ruído, efeitos de matriz, entre outros. Esses parâmetros serão discutidos com mais detalhes para os biossensores magnetoelásticos no tópico 1.2.6. A Tabela 2 apresenta uma comparação entre o LOD de diferentes métodos para detecção de anticorpos E2 para a febre suína clássica (CSFV).

Tabela 2. Métodos para detecção de anticorpos E2 para a CSFV [adaptado de (22)]

Abordagem	LOD (ng/mL)
ELISA*	100
SPR**	10
Magnetoelástico	2,466

* *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*, ** Ressonância Plasmônica de Superfície

Na área dos biossensores, os magnetoelásticos são uma alternativa importante para o uso como POC pela sua versatilidade. Além disso, essa classe de sensores têm despertado interesse para sua aplicação como biossensor devido à possibilidade de monitoramento *wireless*, sem que seja necessária a utilização de conexões físicas ou contatos elétricos. Diversos parâmetros biológicos podem ser avaliados com esses biossensores, como a concentração de glicose no sangue (23), a coagulação do sangue (24), o monitoramento de deformação óssea e taxa de degradação de osso artificial (25,26).

Recentemente, foram publicados três artigos de revisão em periódicos científicos de elevado impacto, abordando a utilização de biossensores magnetoelásticos no contexto diagnóstico. Nas publicações, os autores destacaram a relevância do desenvolvimento de sensores versáteis, capazes de monitorar continuamente o ambiente, e enfatizaram como esses dispositivos podem constituir uma área de pesquisa importante nos próximos anos. Além disso, os artigos publicados oferecem diretrizes aos pesquisadores no campo de biossensores magnetoelásticos, explorando possibilidades para melhorar o desempenho de detecção e ampliar as áreas de aplicação desses dispositivos (20,22,27).

1.2.1 Material, princípio de funcionamento e medição

Os sensores magnetoelásticos são fabricados na forma de fitas pelo processo de *melt spinning*. Nesse método, uma liga metálica é fundida em alta temperatura e vertida sobre um disco de resfriamento com rotação controlada. Esse processo resulta em um resfriamento rápido e impede a cristalização da estrutura para mantê-la amorfa (28). Como consequência deste tipo de processamento, a fita obtida apresenta diferença significativa de rugosidades em cada um dos lados, ou seja, o lado que solidifica em contato com o rolo de resfriamento exibe uma rugosidade superior em comparação ao lado que solidifica em exposição ao vácuo do ambiente (29).

Em geral, o material utilizado para a fabricação dos sensores é uma liga ferromagnética amorfa, composta por 45% em massa de ferro, 45% de níquel, 7% de molibdênio e 3% de boro. Existem também ligas ricas em manganês, zinco, gálio, alumínio, térbio e disprósio. Algumas ligas bastante utilizadas pela

indústria de sensores, apresentam composição $Fe_{40}Ni_{38}Mo_4B_{18}$ e da $Fe_{81}B_{13.5}Si_{3.5}C_2$. A empresa Metglas é uma das principais produtoras deste material, que é comercializado com o nome de METGLAS 2628MB (30). A Tabela 3 apresenta os valores das propriedades físicas e magnéticas da liga. Também conhecidos como “vidros metálicos”, por apresentarem estrutura amorfa, esses materiais exibem propriedades físicas e magnéticas muito interessantes devido à sua microestrutura homogênea livre de anisotropia magnetocristalina (31). Comparados com materiais de estrutura cristalina, as ligas magnetoelásticas amorfas exibem maior eficiência na conversão de energia elástica-magnética, e por isso são ideais para aplicação como sensores (32).

Tabela 3. Propriedades físicas e magnéticas da liga METGLAS 2628MB (30)

Propriedade	Valor
Densidade (g/cm ³)	7,90
Dureza Vickers (carga de 50 g)	740
Módulo de elasticidade (GPa)	100-120
Resistência à tração (GPa)	1-2
Expansão térmica (ppm/°C)	11,7
Temperatura de cristalização (°C)	410
Módulo de Young (GPa)	200
Indução de saturação (T)	0,88
Magnetoestricção de saturação (ppm)	12
Temperatura de Curie (°C)	353

O princípio de funcionamento dos sensores magnetoelásticos é baseado nos efeitos magnetostrictivo e magnetoelástico do material amorfo. A magnetoestricção, ou efeito Joule, promove a movimentação das paredes de domínio magnético e faz com que o corpo expanda ou encolha em função de um campo magnético (H) aplicado, ou seja, converte energia magnética em elástica (Figura 1). Por outro lado, o efeito magnetoelástico, ou efeito Villari, consiste na mudança no estado magnético do material quando uma tensão mecânica é aplicada e, dessa forma, converte energia elástica em magnética. O comportamento dinâmico desses processos resulta na propagação de ondas elásticas acústicas ao longo do substrato magnético. As ondas elásticas dentro

do material magnetoelástico geram um fluxo magnético, fazendo com que o sensor entre em estado de ressonância. Por fim, essa ressonância elástica pode ser captada de maneira remota, por meio de métodos magnéticos, acústicos ou ópticos para detecção (27,33,34).

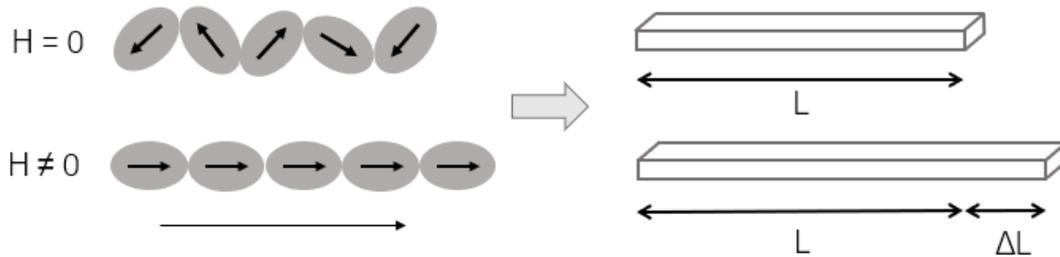


Figura 1. Alinhamento dos domínios magnéticos no fenômeno de magnetoestricção quando um campo magnético (H) é aplicado em um material magnetoelástico [adaptado de (27)].

Cada sensor apresenta uma frequência fundamental de ressonância, f_0 , determinada pela Equação 1, onde L , E , ρ e ν representam o comprimento do sensor, o módulo de elasticidade, a densidade e o coeficiente de Poisson.

$$f_0 = \frac{1}{2L} \sqrt{\frac{E}{\rho(1-\nu)}} \quad (1)$$

A atratividade desse material para aplicação em sensores reside na capacidade de sua frequência fundamental f_0 ser sensível a diversos fatores externos que induzem forças de amortecimento na superfície dos sensores (34,35). Uma dessas forças de amortecimento resulta do carregamento de massa sobre a superfície. Esse carregamento afeta as propriedades da onda acústica em propagação (e. g. velocidade e amplitude) o que leva a uma mudança na frequência fundamental de ressonância do sensor (36). Esse efeito provoca redução no valor da f_0 que é inversamente proporcional ao acréscimo de massa na superfície (34). A Equação 2 apresenta a relação de variação de frequência (Δf), na qual m_0 é a massa inicial do sensor e f_c é a frequência de ressonância do sensor após o carregamento de massa.

$$\Delta f = f_c - f_0 = -f_0 \frac{\Delta m}{2m_0} \quad (2)$$

Na área dos biossensores, esses dispositivos destacam-se pela capacidade de detecção específica de patógenos. Essa detecção ocorre por meio do acoplamento do patógeno à superfície do sensor, que conseqüentemente ocasiona um aumento de massa e resulta na diminuição da frequência fundamental de ressonância do sensor. Por isso, os biossensores magnetoelásticos pertencem à classe dos sensores mássicos e seu princípio de detecção é baseado em pequenas variações de massa. O princípio de funcionamento de um biossensor magnetoelástico é ilustrado na Figura 2.

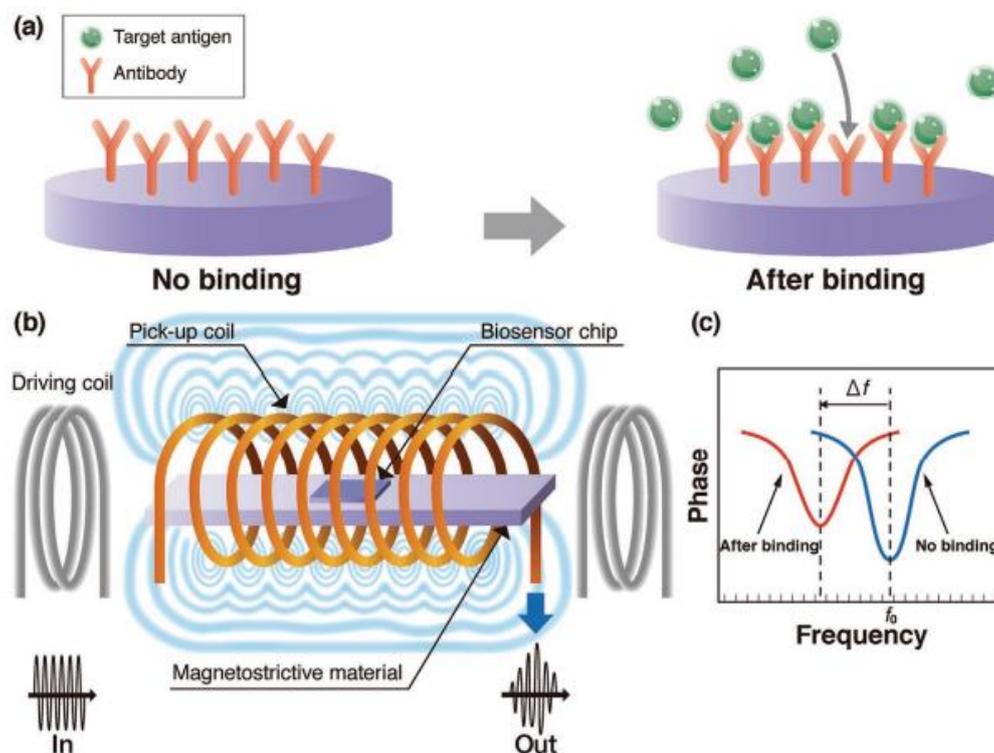


Figura 2. Funcionamento do biossensor em (a) interação biológica na superfície (b) sistema de detecção e (c) gráfico do espectro de frequência antes e após a interação (20).

A medição da frequência de ressonância em sensores magnetoelásticos é comumente conduzida por meio de uma bobina eletromagnética conectada a um analisador de rede. A função da bobina é detectar a frequência de ressonância do sensor. Posteriormente, o analisador de rede converte o sinal proveniente da bobina em um pico no espectro de frequência, correspondendo precisamente ao valor da frequência de ressonância do sensor (33,34). O sistema de medição será discutido em detalhes no Capítulo 3.

Os sensores magnetoelásticos podem ser utilizados para uma ampla variedade de aplicações, como por exemplo: monitoramento de temperatura,

umidade, pressão, taxa de fluxo, medidas de viscosidade e densidade de líquidos, pH e detecção química de gases (33,34). Por esse motivo, é fundamental ter controle sobre fatores que influenciam na resposta desses sensores quando utilizados para detecção de patógenos para que apenas o incremento de massa causado pelas interações biológicas seja detectado.

1.2.2 Influência de fatores extrínsecos na resposta dos biossensores

Dado que os biossensores magnetoelásticos operam com base em medições de massa, um parâmetro importante para avaliar sua eficácia é a sensibilidade de massa (S_m). A S_m é definida como a variação da frequência de ressonância por unidade de massa aplicada e pode ser estimada, considerando uma relação comprimento/largura de 5, através da Equação 3 (que é derivada das Equações 1 e 2) (36–39) na qual L é comprimento do sensor e t é a espessura.

$$S_m = \frac{5}{2\rho L^3 t} \sqrt{\frac{E}{\rho(1-\nu)}} \quad (3)$$

A relação comprimento/largura de 5 é essencial, pois o sensor deve possuir comprimento adequado para permitir que seu primeiro modo de vibração se assemelhe a uma vibração longitudinal pura, conseqüentemente, o comprimento da fita tem que ser maior que as dimensões transversais. Além disso, a largura precisa ser suficientemente ampla para proporcionar uma área de superfície que facilite as interações biológicas (34,40).

Saiz et al. (27) resumiram três parâmetros críticos para melhorar o desempenho dos sensores magnetoelásticos: (I) sensibilidade e limite mínimo de detecção, (II) fator de qualidade de ressonância e (III) resistência à corrosão. Numerosos estudos exploraram maneiras de aumentar a sensibilidade, com foco principalmente na redução do tamanho do sensor (41), na alteração da geometria (42) e na otimização do posicionamento da massa (43,44). No entanto, interferências externas podem impactar significativamente a resposta de ressonância dos biossensores e reduzir a sensibilidade. Fatores como

flutuações de temperatura causadas pelo ambiente, sistema ou mesmo as soluções utilizadas para análise, campo magnético polarizado aplicado (DC bias) e processos de corrosão podem introduzir efeitos indesejáveis. O controle eficaz dessas interferências é vital para medições estáveis e precisas, garantindo que os fatores externos não mascarem a mudança de frequência de ressonância resultante das interações biológicas esperada nos biossensores.

A relevância de evitar processos corrosivos reside no aumento de massa decorrente da formação de óxidos na superfície do sensor. Os sensores magnetoelásticos, detectam variações de massa, mas não são capazes de distinguir eventos corrosivos de interações biológicas em suas respostas de variação de frequência, ou seja, combinam os dois processos de aumento de massa em uma única resposta. Dessa forma, um evento pode mascarar o outro e comprometer a precisão e confiabilidade da detecção. Embora muitos estudos tenham empregado camadas protetoras de cromo (Cr) e ouro (Au) na superfície do sensor (45,46), juntamente com tratamentos térmicos subsequentes para melhorar a adesão entre as camadas de Cr e Au e a fita magnetoelástica (47–49), observou-se que essa abordagem pode não ser plenamente eficaz quando os sensores são expostos a meios corrosivos durante períodos prolongados. Por isso, é extremamente necessário explorar alternativas para aumentar a resistência a corrosão desses sensores.

Além de conferir resistência à corrosão o ouro tem também a função de promover biocompatibilidade ao sensor já que a liga magnetoelástica não tem essa propriedade. A partir do ouro são construídas as camadas biológicas de funcionalização para que o biossensor seja utilizado como uma ferramenta de detecção de patógenos.

1.2.3 Funcionalização da superfície do biossensor

A funcionalização da superfície é um passo crucial no processo de fabricação do biossensor pois é a base para uma detecção eficaz do analito. Para isso, diversas camadas biológicas são construídas na superfície do sensor com o objetivo de imobilizar os agentes de bioreconhecimento. Estes agentes, que podem incluir anticorpos, fagos, proteínas, entre outros, conferem especificidade ao biossensor. A especificidade é a habilidade do biossensor em

distinguir entre analitos biológicos que constituem o alvo da detecção, e os demais elementos presentes da amostra (50).

Os biossensores empregados neste estudo foram funcionalizados seguindo o mesmo princípio adotado em testes rápidos de imunocromatografia de fluxo lateral e em ensaios imunoenzimáticos de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). A principal diferença entre esses testes está no princípio de detecção, enquanto os biossensores magnetoelásticos detectam variações de massa, os testes de fluxo lateral e ELISA detectam alterações colorimétricas. Porém, ambos os testes se baseiam em reações antígeno/anticorpo para a identificar o analito alvo.

A funcionalização, portanto, nada mais é do que uma série de etapas que tem como principal objetivo imobilizar o anticorpo na superfície do sensor. Uma das principais estratégias para isso é a utilização de monocamadas auto-organizáveis, do inglês *self assembled monolayers* (SAM). Essa forma de funcionalização pode ser dividida essencialmente em 3 etapas principais: **(I)** formação da SAM, **(II)** imobilização do anticorpo e **(III)** bloqueio da superfície.

(I) Formação da *Self Assembled Monolayers*

As SAM são formadas por moléculas orgânicas que, quando dispostas sobre superfícies específicas, originam um material nanoestruturado de maneira ordenada, sem a necessidade de intervenção externa. Normalmente, a espessura de uma SAM varia entre 1 e 3 nanômetros. Através dessas camadas, é possível modificar propriedades superficiais, tais como a molhabilidade, fricção, lubrificação, adsorção de proteínas e adesão de bactérias (51,52). Na área de biossensores, o interesse principal nessas moléculas é devido a capacidade de conferir funcionalidade química a superfície de ouro, possibilitando a conexão de sistemas biológicos complexos ao sensor (53).

A composição estrutural típica de uma molécula de SAM inclui, em uma de suas extremidades, um grupo tiol (-SH), enquanto a outra extremidade é caracterizada pela presença de um grupo funcional (geralmente -COOH ou -NH₂). Entretanto, existem outras configurações para as moléculas da SAM que englobam três tipos principais: alcanotióis (R-SH), dissulfetos de dialquil (RS-SR) e sulfetos de dialquil (R-S-R).

O processo de ligação dessas moléculas com a superfície do sensor ocorre devido à forte adsorção preferencial do grupo tiol ao ouro planar Au(111). Os tióis são adsorvidos à temperatura ambiente e formam uma forte ligação tiolato-metal ($\text{Au-S-(CH}_2)_n\text{X}$). Essa ligação ocorre após a dissociação entre S-H, que acontece espontaneamente em superfícies metálicas limpas. O átomo de H, liberado por esta reação, pode ser adsorvido ou eliminado da superfície metálica, na forma de H_2 , dependendo da interação do átomo de H com a superfície (52). Por fim, o resultado é uma monocamada bem estruturada com o grupo funcional apontando para fora da superfície (54).

As evidências atualmente disponíveis acerca da formação da SAM a partir de tióis (R-SH) e seus análogos dissulfetos (RS-SR) em superfícies de ouro, sugerem que ambos originam monocamadas com estruturas semelhantes. Contudo, os tióis apresentam maior solubilidade em comparação aos dissulfetos, tornando-os preferenciais para aplicações práticas. Adicionalmente, observou-se que a cinética de adsorção dos dissulfetos é mais lenta quando comparada à dos tióis correspondentes (47–49).

O protocolo mais empregado para a preparação da SAM em superfícies de ouro envolve a imersão do substrato em uma solução de tióis por um período de 18 a 24 horas a temperatura ambiente. A adsorção inicial ocorre nos primeiros segundos, seguida por uma fase de organização que continua por aproximadamente 15 horas, para a formação completa da monocamada. O objetivo dessa etapa mais longa é maximizar a densidade das moléculas e minimizar os defeitos. Diversos fatores experimentais podem influenciar a estrutura da monocamada, incluindo a pureza do solvente, temperatura de processamento, concentração da solução, tempo de imersão, pureza dos tióis, concentração de oxigênio em solução e limpeza do substrato. Propriedades reprodutíveis da SAM são alcançadas quando formadas em substratos imersos em soluções de tióis dentro da primeira hora de preparação e limpos em condições fortemente oxidantes (53).

A limpeza da superfície é uma etapa importante para que a funcionalização seja efetiva. Na literatura, diversos trabalhos apresentam como forma de limpeza a utilização de uma sequência de solventes como acetona, etanol, isopropanol e água ultrapura (46,47,55). Além disso, alguns estudos ressaltam a eficácia da limpeza de superfícies de ouro por meio do uso de

plasma de oxigênio (53). Após a ancoragem da SAM no substrato, é necessário prepará-la para a ligação com o anticorpo. A ligação ocorre entre o grupo funcional da SAM com o fragmento F_c da molécula do anticorpo.

(II) Imobilização do anticorpo

Os anticorpos são amplamente utilizados como bioreceptores devido à sua alta especificidade, isto é, à sua habilidade de combinação apenas com um antígeno específico (56). Por esse motivo, são a escolha preferencial para a utilização em biossensores para diagnóstico de sistemas a base de proteínas. Os anticorpos humanos são glicoproteínas, da classe das globulinas, também conhecidas como imunoglobulinas humanas (Ig). São divididas em 5 classes: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, sendo os IgG os mais abundantes. São produzidos pelos linfócitos-B e possuem como principal função garantir a defesa do organismo através do sistema imunológico. Os anticorpos possuem duas regiões principais de ligação (Figura 3): (I) fragmento de ligação ao antígeno (F_{ab}), que é a região do anticorpo responsável pela interação com o antígeno, ou seja, é a parte responsável pelo bioreconhecimento devido à sua alta especificidade, e (II) fragmento cristalizável (F_c) corresponde a região do anticorpo capaz de formar ligações com vários tipos de estruturas como grupamentos amina, carboxil e sulfidril (17).

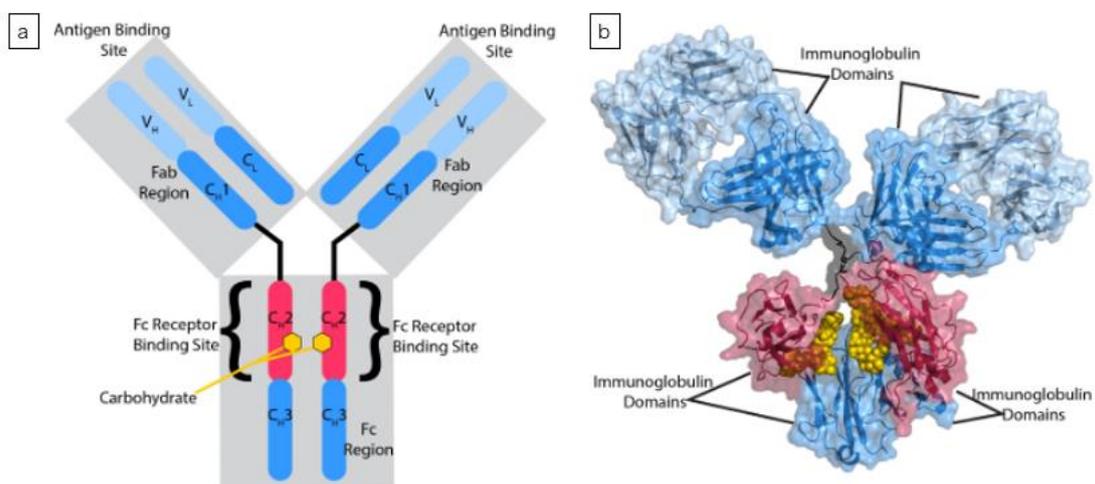


Figura 3. Estrutura típica de um anticorpo IgG, em (a) estrutura de ligações e (b) cristalina (57).

As amins primárias (-NH₂) são o alvo mais comum para a conjugação dos anticorpos com outros componentes biológicos. As amins estão abundantemente distribuídas por todo o anticorpo e são facilmente modificáveis, devido à sua reatividade e à sua localização superficial na estrutura do anticorpo (56). Em uma situação ideal, as amins da região F_c do anticorpo, devem se ligar ao grupo funcional ácido carboxílico da SAM. Dessa forma, o anticorpo fica orientado para fora da superfície com o terminal F_{ab} disponível para fazer a captura do antígeno. Entretanto, a orientação correta do anticorpo requer uma série de cuidados e, nem sempre, é obtida. Uma orientação bem definida pode evitar resultados falsos negativos e diminuir o LOD. Existem estratégias para garantir a orientação correta do anticorpo como, por exemplo, a utilização de proteína A/G ou da interação biotina/estreptavidina (58).

(III) Bloqueio da superfície

A etapa final da funcionalização de um biossensor consiste no bloqueio da superfície, que garante a eficácia de detecção. Um bloqueio efetivo desempenha um papel significativo ao evitar ligações inespecíficas, as quais podem impactar negativamente a sensibilidade do biossensor. Em condições ideais, o alvo de detecção deve interagir exclusivamente com os sítios de ligação específicos. Contudo, na prática, é bastante comum a ocorrência de ligações inespecíficas, onde o alvo se liga a regiões indesejadas. Portanto, a otimização das condições de bloqueio é essencial para aprimorar a sensibilidade de detecção dos biossensores magnetoelásticos. Entre os principais tipos de bloqueio utilizados para este fim estão a etanolamina (59,60), a glicina (61) e proteína albumina sérica bovina (BSA) (62,63) reconhecidos por suas propriedades de bloqueio e sua capacidade de minimizar a adsorção não específica de proteínas.

A Figura 4 representa graficamente um resumo das três etapas fundamentais do processo de funcionalização do sensor para transformá-lo em um biossensor pronto para ser empregado na detecção de patógenos e no diagnóstico.

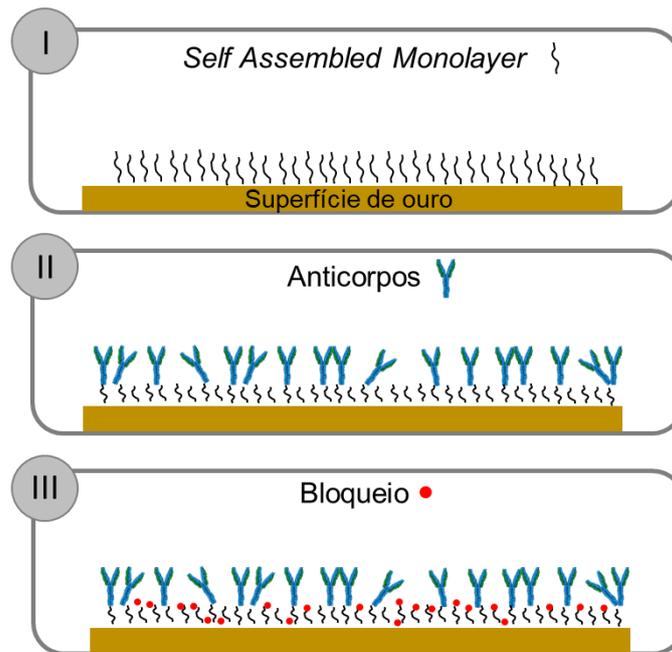


Figura 4. Representação esquemática das três principais etapas da funcionalização: (I) SAM, (II) imobilização dos anticorpos e (III) bloqueio da superfície.

1.2.4 Amplificação da resposta com nanopartículas de ouro

Em biossensores magnetoelásticos aplicados para diagnóstico de doenças virais, é imprescindível a utilização de nanopartículas. Sua função principal é proporcionar aumento de massa, já que as partículas virais são muito leves e, sozinhas, não oferecem o incremento de massa necessário para detecção. Para ilustrar, a massa de uma bactéria *E. coli* é de 7×10^{-16} kg enquanto de um vírus é de aproximadamente 10^{-20} kg. Quanto ao tamanho, uma bactéria mede, em média 2 μm , enquanto o tamanho dos vírus podem variar de 20 a 200 nm. A partícula viral do Sars-CoV-2 apresenta 100 nm de diâmetro (64). Entre as nanopartículas utilizadas nas áreas biológica e médica, as de ouro (AuNPs) se destacam devido à sua facilidade de síntese e funcionalização, alta estabilidade, biocompatibilidade e inércia química (65,66).

Dessa forma, elementos de bioreconhecimento (anticorpos) são imobilizados na superfície das AuNPs, formando uma interface altamente específica para a captura do vírus alvo. Essa estratégia permite que as nanopartículas atuem como agentes de captura, interagindo seletivamente com o vírus, e posteriormente, se ligando à superfície do sensor funcionalizado. Esse processo é fundamental para facilitar a detecção precisa e eficaz do patógeno. A Figura 5 resume essas etapas.

Para a conjugação dos anticorpos na superfície das AuNPs, são empregados principalmente dois processos: a adsorção física e a ligação química. A conjugação por meio da adsorção física ocorrem devido às forças eletrostáticas e às ligações secundárias de hidrogênio e van der Waals que surgem entre os grupos funcionais dos anticorpos e a superfície das AuNPs. Este método de conjugação é caracterizado pela sua simplicidade e praticidade, pois não requer modificações químicas nem nos anticorpos nem nas AuNPs. A grande desvantagem desse método é a orientação aleatória do anticorpo que reduz a capacidade de ligação ao antígeno (65).

Por outro lado, a conjugação por adsorção química apresenta a desvantagem de ser um procedimento trabalhoso, que envolve múltiplas etapas complexas, como a modificação química tanto do anticorpo quanto das AuNPs. Contudo, a grande vantagem desse método reside na otimização da orientação dos anticorpos, resultando em um aumento significativo da capacidade de ligação ao antígeno (65,67).

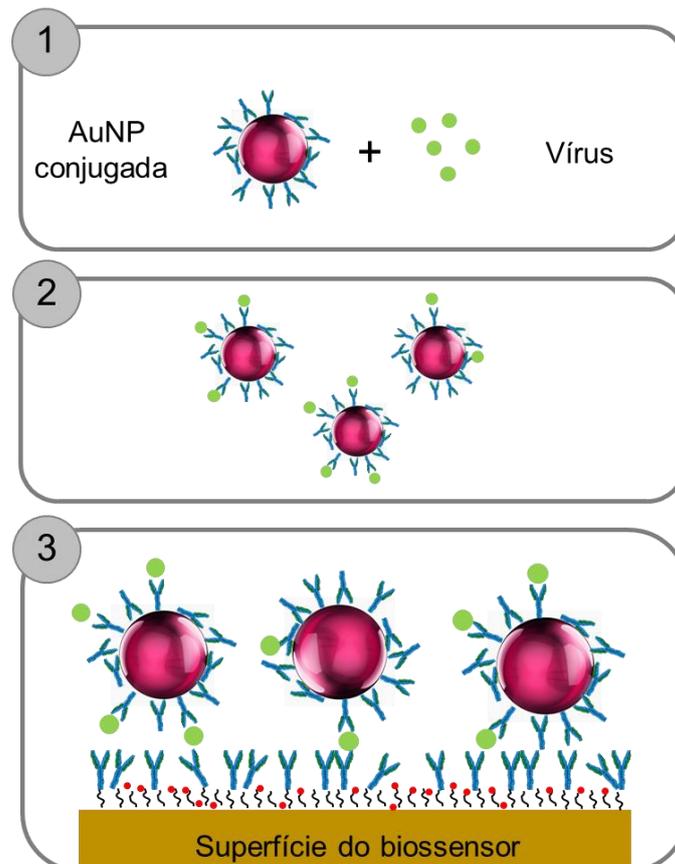


Figura 5. Representação esquemática das três principais etapas para o diagnóstico. 1) partículas virais são apresentadas às AuNPs, 2) AuNPs capturam as partículas virais e 3) se ligam à superfície do biossensor.

No entanto, para biossensores utilizados para detecção de partículas virais, simplesmente utilizar as AuNPs não é o suficiente para maximizar o sinal de resposta e a sensibilidade de massa. Um aspecto importante a ser considerado, especialmente em biossensores que se baseiam na propagação de ondas acústicas, é o posicionamento da massa na superfície do sensor, ou seja, as áreas específicas onde as nanopartículas serão ligadas.

1.2.5 Influência do posicionamento de massa na sensibilidade dos biossensores

O posicionamento da massa na superfície do sensor também desempenha um papel crucial na sua sensibilidade (43). Segundo S. Li e Z.-Y. Cheng (37), embora avanços significativos foram obtidos no desenvolvimento de biossensores magnetoelásticos, permanece a preocupação constante sobre o impacto da localização da massa na sensibilidade desses sensores. Este efeito é particularmente significativo na detecção de bactérias/vírus, uma vez que, nesses casos, a carga de massa é inevitavelmente distribuída de maneira não uniforme sobre a superfície do biossensor.

Sabe-se que a variação na frequência de ressonância difere quando uma quantidade fixa de massa está localizada de maneira concentrada em um ponto específico na superfície do sensor, em comparação com uma distribuição uniforme. A principal razão para esse fenômeno está associada à diminuição na velocidade da onda acústica que se propaga no sensor. A presença de massa concentrada cria uma obstrução para a onda, o que gera alterações em suas propriedades de propagação (37,68).

Outro aspecto de significativa importância reside no processo de propagação da onda acústica no interior do material magnetoelástico. Nesse processo, fenômenos como a reflexão da onda nas extremidades livres do sensor desencadeiam a anulação da onda em determinadas regiões do sensor (que variam de acordo com a ordem do modo de vibração), especialmente para o modo fundamental de ressonância, resultando na formação de regiões com pontos nodais (68). Em outras palavras, esses pontos nodais resultam de interferências destrutivas entre as ondas acústicas incidentes e refletidas. Nessas regiões, a amplitude de oscilação é mínima e, portanto, qualquer massa

carregada nesses pontos não afetará a frequência de ressonância do sensor (37). Dessa forma, a existência de pontos nodais diminuiu a sensibilidade de massa e a confiabilidade desses sensores (36).

Zhang et al. (39), realizaram um estudo teórico sobre a sensibilidade de massa de biossensores magnetoelásticos com carregamento de massa concentrado em diferentes regiões do sensor. Eles avaliaram esse efeito para os quatro primeiros modos de ressonância. Para o estudo, os autores consideraram um sensor com dimensões de $1 \times 0.2 \times 0.015$ mm e utilizam uma série de equações e o software MATLAB para realizar os cálculos. A Figura 6a apresenta a sensibilidade de massa em função da posição do carregamento de massa sob os diferentes modos de ressonância. Os autores ajustaram aos dados a equação $S_m = A \cos 2t$ (linhas pontilhadas), na qual A é uma constante e concluíram que a sensibilidade da massa é função de apenas um parâmetro independente t e é linearmente proporcional a $\cos 2t$. Similarmente, verificaram que o deslocamento do sensor, causado pela vibração, (u^2) em função do carregamento de massa (x_c) (Figura 6b) mostra a mesma tendência de variação que a da curva na Figura 6a para o modo de ressonância de mesma ordem. Em outras palavras, S_m é linearmente proporcional a u^2 no ponto onde a massa é carregada e, portanto, diferentes posições de carregamento de massa resultam diferente sensibilidade. Além disso, também observaram que a S_m foi sempre igual a zero, independentemente da quantidade de massa, quando essa foi carregada em um ponto nodal.

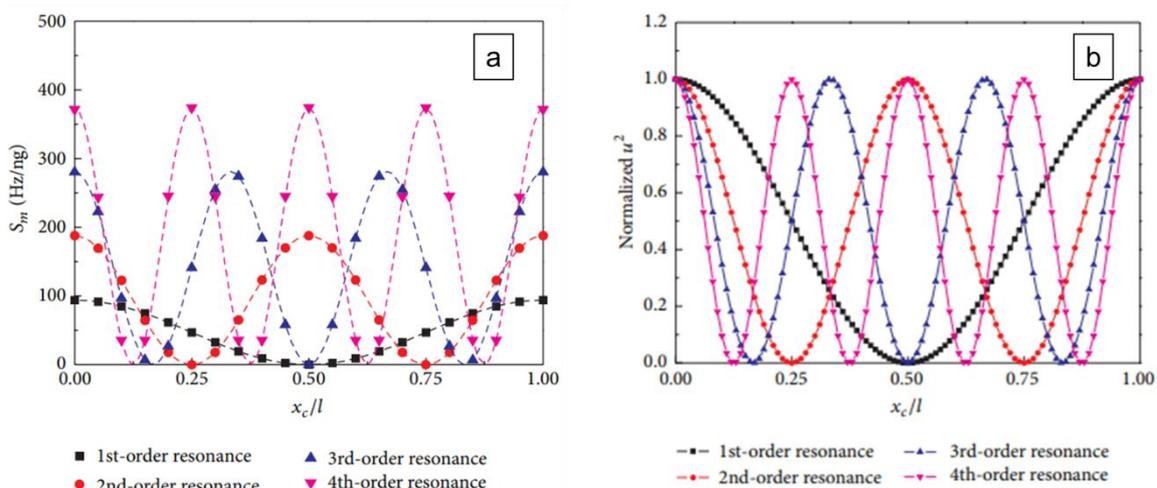


Figura 6. (a) S_m em função do posicionamento de massa e (b) deslocamento em função do posicionamento de massa (39).

Quando se trata dos biossensores magnetoelásticos empregados na área da saúde, como na identificação de patógenos ou no diagnóstico médico, a presença da massa sobre um ponto nodal pode resultar em uma variação insignificante na frequência de ressonância. Isso, por sua vez, pode levar a resultados falsos negativos e comprometer a precisão da detecção, afetando a confiabilidade do biossensor em aplicações de críticas para a saúde (39). Dessa forma, é de extrema importância avaliar estratégias de funcionalização controlada da superfície desses sensores, a fim de evitar que a massa se deposite sobre os pontos nodais.

1.2.6 Aplicações

Desde o surgimento dos primeiros estudos com sensores magnetoelásticos para bioaplicações, por volta do ano 2000, sem dúvida o tema mais explorado foi a sua utilização para detecção de bactérias, tais como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Grande parte dos estudos sobre *Salmonella typhimurium* pertencem ao grupo do Professor Bryan A. Chin (*Auburn University*, USA). Nos trabalhos publicados entre 2007 e 2017, foi avaliada principalmente a utilização dos biossensores magnetoelásticos para detecção da bactéria na indústria alimentícia como, por exemplo, em ovos, tomate e espinafre. Além disso, por se tratar de detecção de bactéria, os trabalhos também apresentam informações importantes sobre a funcionalização da superfície do sensor com bacteriófagos que, nesse caso, são os elementos de bioreconhecimento (45,69–77). Além da *Salmonella*, o grupo também estudou a detecção da bactéria *Bacillus anthracis* em líquidos (40,78).

Nos estudos sobre *Escherichia coli*, predominantemente do grupo de pesquisa do Professor Craig A. Grimes (*University Park*, USA), foram explorados um sistema portátil de medição para os biossensores magnetoelásticos e o uso de nanopartículas magnéticas para amplificar o sinal de resposta (79,80).

Em relação a detecção de *Staphylococcus aureus*, Hiremath et al. (81) obtiveram um biossensor magnetoelástico com um limite de detecção de 3,0 log cfu/mL, que foi aproximadamente 2 log menor que o do método de ressonância plasmônica de superfície. Menti et al. (82), avaliaram a influência de diferentes

estratégias para imobilização dos anticorpos, específicos para *Staphylococcus aureus* na superfície do biossensor.

Estudos mais recentes, publicados entre 2018 e 2021, utilizaram biossensores magnetoelásticos para detectar antígeno carcinoembrionário (46), albumina sérica humana (55) e lisozimas (35). A Tabela 4 apresenta o limite de detecção de alguns dos estudos citados. No entanto, é importante destacar que o limite de detecção dos biossensores magnetoelásticos é influenciado por diversos parâmetros e, por isso, a comparação direta entre eles não é algo trivial. Resumidamente, os principais parâmetros que influenciam o LOD dos biossensores magnetoelásticos incluem (21):

- Sensitividade: capacidade do sensor em detectar pequenas alterações na concentração do alvo. Sensores de maior sensibilidade detectam concentrações mais baixas do alvo.
- Seletividade: habilidade do sensor em distinguir entre o alvo de detecção e demais substâncias presentes na amostra. Quanto maior for a sensibilidade do sensor, menor será o limite de detecção.
- Relação sinal-ruído: A relação entre o sinal produzido pelo alvo e o ruído de fundo. Uma relação sinal-ruído mais alta permite a detecção de concentrações mais baixas do alvo.
- Estabilidade: Capacidade do sensor em manter seu desempenho ao longo do tempo. Sensores estáveis são mais confiáveis na detecção consistente de baixas concentrações do alvo.
- Propriedades superficiais: A área superficial e a funcionalização da superfície podem afetar a adsorção e ligação dos analitos, influenciando o limite de detecção.
- Efeitos de matriz: A presença de matrizes complexas, como fluidos biológicos ou amostras ambientais, pode interferir na capacidade do sensor de detectar analitos e influenciar no limite de detecção.
- Instrumentação: O design e as características da instrumentação usada para medir a resposta do sensor podem impactar o limite de detecção. Fatores como resolução, faixa dinâmica e calibração do instrumento podem afetar a sensibilidade e relação sinal-ruído.

- Preparação das amostras: O método utilizado para preparar a amostra para análise também pode influenciar o limite de detecção.

Tabela 4. Limite de detecção de biossensores magnetoelásticos para diversos patógenos (20)

Alvo	LOD
<i>S. typhimurium</i>	5 x 10 ³ CFU/mL
<i>B. anthracis</i> em água	10 ⁵ CFU/mL
<i>E. coli</i> em água	10 ⁵ CFU/mL
<i>B. anthracis</i> em água	10 ⁴ esporos/mL
Patógenos em água	100 CFU/mL
Octacloroestireno	2,8 x 10 ⁻⁹ M
Albumina sérica humana	0,039 µg/mL
Antígeno carcinoembrionário	1 pg/mL

Em relação a aplicação de biossensores magnetoelásticos para a detecção de vírus, a literatura é bastante limitada, com apenas dois estudos identificados até o momento, que são atribuídos ao mesmo grupo de pesquisa e abordam a detecção do vírus da febre suína clássica. O primeiro estudo, publicado em 2016, avaliou especificamente partículas virais do CSFV. O biossensor apresentou limite de detecção de 0,6 µg/mL (83). No estudo subsequente, publicado no ano seguinte, os pesquisadores exploraram a detecção de anticorpos E2 do CSFV, empregando uma técnica de precipitação biocatalítica para amplificar a mudança de massa na reação de ligação específica antígeno-anticorpo. Utilizando esse protocolo, foi alcançado um limite de detecção de 2,466 ng/mL (47).

Em 2022, Kurita et al. (84) publicaram um estudo sobre a detecção de partículas semelhantes a vírus utilizando a energia de vibração magnetoestrictiva para um sistema “*self-powered*”, ou seja, que gera sua própria energia para funcionar. O sensor utilizado para esse estudo foi na forma de um cantiléver no qual uma das extremidades do sensor fica restrita de movimentação. O material do sensor foi uma liga de Fe-Co/Ni revestida com Au. Em 2023 esse mesmo grupo de pesquisa publicou um artigo utilizando o mesmo sistema sem bateria para detecção de coronavírus humano 229E (85). Os autores demonstram a capacidade de detectar vírus utilizando micropartículas

de sílica de diâmetro de 1000 nm. Contudo, o tamanho médio dos vírus mais comuns está na faixa entre 20 e 400 nm (84).

Diante do exposto, observa-se que a literatura contém uma ampla gama de estudos sobre biossensores magnetoelásticos voltados para a detecção de bactérias, enquanto são escassos os trabalhos que exploram o uso desses biossensores na detecção de vírus. Vários motivos podem explicar essa disparidade, destacando-se, ao longo desta revisão, a influência de fatores extrínsecos e a importância do posicionamento da massa na sensibilidade dos sensores, além da notável diferença de tamanho e massa entre vírus e bactérias.

Além disso, apesar dos esforços consideráveis da comunidade científica para desenvolver biossensores magnetoelásticos destinados a aplicações em áreas relacionadas à saúde, ainda não se encontra no mercado um dispositivo comercial para este fim. Apesar de esses biossensores oferecerem uma série de benefícios, incluindo a alta sensibilidade, resposta rápida e monitoramento *wireless*, as suas limitações, principalmente em relação a reprodutibilidade de resposta limitam o uso desses biossensores para sua disponibilização para uso comercial.

No entanto, o futuro da medicina e dos sistemas de saúde pública exigirá cada vez mais dispositivos que possam oferecer monitoramento contínuo de pacientes e se integrem diretamente aos sistemas de atendimento, como hospitais ou consultórios médicos, por meio de dispositivos móveis, por exemplo (Figura 7a).

Além disso, será crucial avançar no desenvolvimento de dispositivos capazes de realizar monitoramento contínuo de ambientes, especialmente em espaços públicos, visando alertar sobre o risco de determinadas doenças, como exemplificado na Figura 7b (20,86). Em ambos os cenários, os biossensores magnetoelásticos se destacam devido à sua capacidade de operação sem fio, proporcionando uma solução prática e de fácil implementação. No entanto, é importante reconhecer que ainda há um longo caminho a percorrer até que essas soluções sejam amplamente adotadas e integradas em sistemas de monitoramento de saúde pública em larga escala. A pesquisa e o desenvolvimento contínuos são essenciais para aprimorar a eficiência, a confiabilidade e a acessibilidade desses dispositivos, garantindo sua viabilidade e eficácia em diversas aplicações de detecção e monitoramento.

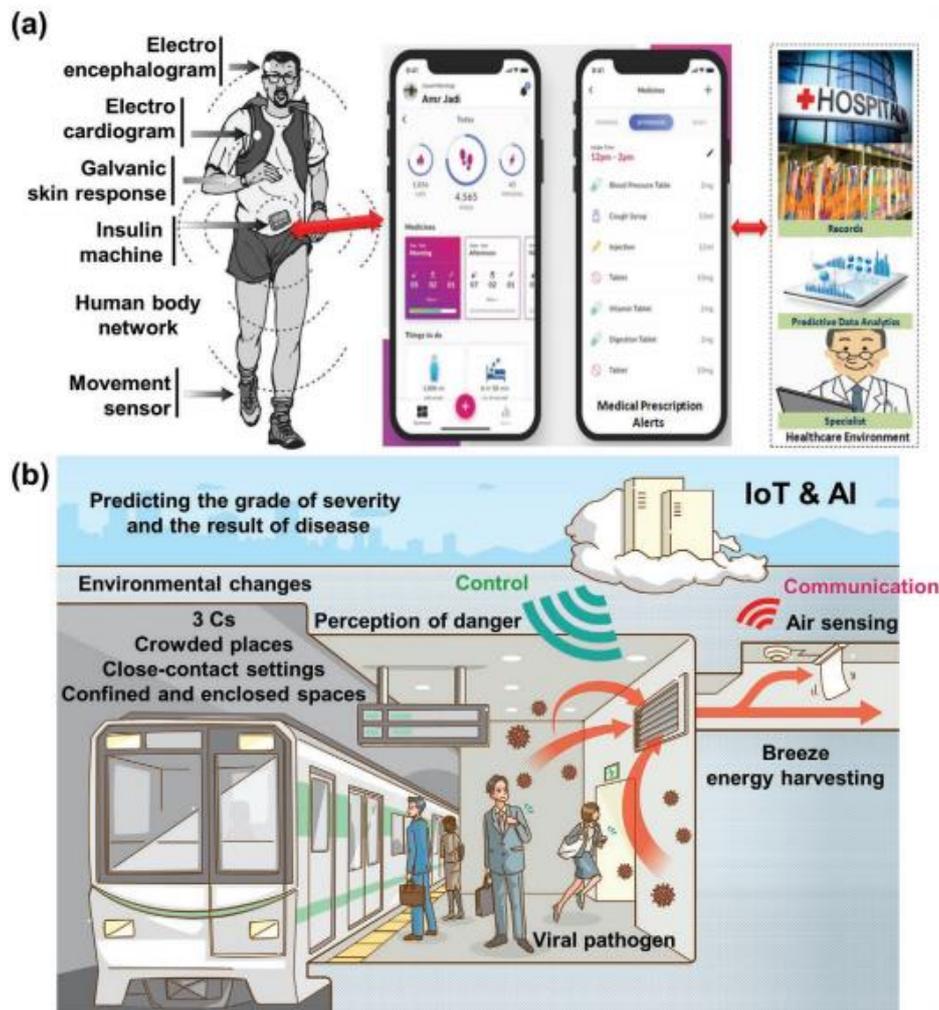


Figura 7. (a) Sistema de saúde de monitoramento remoto e (b) controle de patógenos em ambientes públicos (20,86).

Capítulo 2

Objetivos

Geral

Desenvolver um biossensor magnetoelástico para detecção de Sars-CoV-2.

Específicos

- Avaliar os fatores extrínsecos que influenciam na sensibilidade dos sensores magnetoelásticos
- Funcionalizar a superfície do sensor para torná-lo específico para detectar proteína recombinante de Sars-CoV-2
- Avaliar alternativas para melhorar a sensibilidade de massa do biossensor

Influência de fatores extrínsecos

Conforme discutido no referencial teórico, fatores extrínsecos, como temperatura, corrente de polarização e processos de corrosão, impactam na sensibilidade dos sensores magnetoelásticos. Este capítulo se dedica de forma específica a explorar este tema, oferecendo uma introdução concisa sobre os detalhes do sistema de medição e o processo de revestimento dos sensores. Em seguida, são apresentadas as medidas exploradas e adotadas para minimizar esses fatores. Os principais resultados obtidos nesta etapa do estudo foram publicados no artigo *“Role of extrinsic factors on magnetoelastic resonance biosensors sensitivity”* (87).

3.1 Introdução

(I) Sistema de medição

Um dos sistemas mais utilizados para medir a frequência de ressonância dos sensores magnetoelásticos consiste em um conjunto de bobinas eletromagnéticas concêntricas conectadas em um analisador de rede e em uma fonte de corrente (Figura 8) (33,34). Nessa configuração, a bobina interna, conectada ao analisador de rede, é responsável por gerar um campo magnético alternado (AC) e capturar o sinal de resposta do sensor. A bobina externa, por sua vez, é conectada a uma fonte de corrente bias e fornece um campo magnético de polarização estático (DC) em uma frequência específica. Sua função é amplificar a ressonância do sensor e, conseqüentemente, o sinal de resposta. Nessa configuração, as medidas são realizadas no domínio de frequência (33,34).

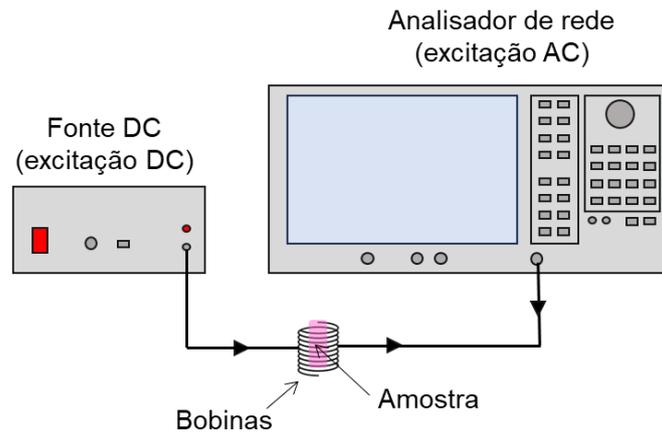


Figura 8. Configuração do sistema de medição dos sensores para este trabalho [adaptado de (88)]

A bobina AC capta o sinal de resposta do sensor pela medição do coeficiente de reflexão, também denominado de parâmetro S_{11} . Esse parâmetro é a quantidade que descreve quanto de uma onda é refletida por uma descontinuidade de impedância no canal de transmissão, e pode ser definido como a razão entre a amplitude da onda refletida e a onda incidente. A Equação 4 apresenta essa relação na qual V_r é a amplitude da onda refletida e V_i da onda incidente.

$$S_{11} = \frac{V_r}{V_i} \quad (4)$$

Fundamentalmente, o analisador de rede gera um sinal de tensão variado no tempo e envia para a bobina de detecção. Em seguida, o sinal refletido da bobina é medido e comparado com o sinal incidente para determinar a impedância da bobina e, assim, a magnitude e a fase dos sinais registrados pela bobina (88). Em outras palavras, o sinal refletido do material magnetoelástico sem ressonância é basicamente igual ao sinal de entrada, ou seja, o valor de S_{11} é igual a 1. Quando o material magnetoelástico entra em ressonância, a permeabilidade magnética do material muda drasticamente fazendo com que o fluxo magnético na bobina também mude e um sinal de perturbação é gerado na bobina. Como consequência, ocorre o cancelando de parte do sinal refletido, que faz com que o valor do parâmetro S_{11} seja diferente de 1. Como resultado, a ressonância do sensor causa um vale descendente no espectro de frequência

de S11. O valor frequência correspondente ao ponto mínimo é a frequência de ressonância do sensor (35).

O coeficiente de reflexão S11 é comumente utilizado para monitorar a frequência de ressonância dos biossensores magnetoelásticos. Skinner et al. (88), investigaram como a geometria do sensor influencia seu espectro de ressonância, incluindo o formato, o tamanho e a proporção do sensor, Huang et al. (35) mostraram a detecção de lisozimas em urina humana, Campanile et al. (89) avaliaram a utilização de nanopartículas magnéticas para amplificar o sinal de resposta de biossensor magnetoelástico, Guo et al. (49) detectaram íons de metais pesados e Horikawa et al. (78) mostraram a detecção de bactérias patogênicas de baixa concentração em líquidos. Em todos os trabalhos citados, a medição da frequência de ressonância dos biossensores foi feita pelo parâmetro S11.

(II) Otimização dos sensores – Corrosão

Conforme mencionado no referencial teórico, um dos parâmetros fundamentais, citado por Saiz et al. (27) para melhorar o desempenho dos sensores magnetoelásticos é a resistência à corrosão. O processo de corrosão é a deterioração gradual e indesejada de um material, devido às reações químicas com o ambiente ao seu redor. A maioria dos materiais em contato com o meio ambiente forma um sistema termodinamicamente instável. Com exceção dos metais nobres, como ouro e platina, todos os demais metais reagem com o ambiente externo e transformam-se em óxidos, hidróxidos ou outras formas semelhantes (90,91).

Entre os fatores que influenciam o processo de corrosão estão a natureza do material, a configuração do ambiente (presença de umidade, oxigênio, produtos químicos corrosivos), a temperatura e a presença de tensões mecânicas (91). Portanto, a prevenção da corrosão geralmente envolve o uso de revestimentos protetores, modificação da atmosfera ao redor do material, controle de temperatura e umidade e o uso de materiais resistentes à corrosão. Para biossensores magnetoelásticos, a adaptação do ambiente em que são empregados é restrita, já que frequentemente são utilizados em amostras biológicas líquidas contendo naturalmente sais. Assim, a estratégia viável para

esses sensores é a modificação da sua superfície para aumentar a resistência à corrosão.

Uma abordagem comum para a modificação superficial dos sensores é a aplicação de revestimentos de Cr e Au como camadas protetoras (43,44). A técnica mais utilizada para a aplicação dos revestimentos é o *magnetron sputtering*, um método de deposição física de vapor (PVD). O *magnetron sputtering* consiste na deposição de filmes finos e utiliza plasma de alta energia para depositar material em um substrato. Durante o processo, um alvo, do material do revestimento, é bombardeado por íons presentes no plasma, resultando na ejeção de átomos do alvo. Em seguida, esses átomos se depositam sobre o substrato adjacente, ou seja, a superfície a ser revestida, formando um filme fino. Esse processo resulta em uma deposição rápida e uniforme, com controle preciso da espessura e das propriedades do filme. Em geral, as camadas do revestimento apresentam espessuras na ordem de nanômetros (92). A Tabela 5 apresenta valores utilizados para as camadas protetoras de cromo, titânio e ouro, depositadas em sensores magnetoelásticos.

Tabela 5. Espessura de camadas protetoras de Ti, Cr e Au em biossensores magnetoelásticos

Condição superficial	Ti (nm)	Cr (nm)	Au (nm)	Ref.
Polido	-	*	*	(82)
Polido	-	128	117	(93)
Não polido	-	100	100	(83)
Não polido	-	100	40	(46)
Não polido	30	-	100	(89)
Não polido	-	90	150	(76)
Não polido	-	100	100	(47)
Não polido	-	100	100	(49)

A Tabela 5 também traz informações sobre o polimento dos sensores. Devido ao processo de fabricação, a fita magnetoelástica apresenta rugosidade diferente em cada um dos lados. Realizar o polimento da superfície dos sensores, em vista de uniformizar a rugosidade, tem como principal vantagem o aumento na sensibilidade de massa, devido a redução da espessura pelo

processo de polimento. Conforme Equação 3, a S_m é inversamente proporcional à espessura do sensor (40,93). No entanto, o processo de polimento é extremamente trabalhoso e pode ter desvantagens em relação à adesão das camadas protetoras do Cr e Au com a fita magnetoelástica.

Além da aplicação das camadas protetoras, é frequente a utilização de tratamentos térmicos (TT) após as deposições, visando melhorar a aderência entre as camadas e uniformizar a superfície do ouro. Em alguns estudos, menciona-se a aplicação de TT antes do revestimento para aliviar as tensões mecânicas decorrentes do processo de fabricação, corte ou polimento dos sensores (48).

3.2 Experimental

O sistema de medição dos sensores magnetoelásticos foi composto por um conjunto de bobinas eletromagnéticas (AC e DC) conectadas a um analisador de rede (Keysight, E5061B) e a uma fonte de corrente DC. As bobinas foram projetadas e caracterizadas pelo Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas e apresentaram as seguintes configurações:

- Bobina AC – Fio 32 AWG, 72 espiras, indutância 12 μH e resistência de 824 $\text{m}\Omega$.
- Bobina DC – Fio 34 AWG, 450 espiras, indutância 931 μH e resistência de 10,7 Ω .

Os sensores magnetoelásticos utilizados neste trabalho foram produzidos a partir da liga metálica amorfa METGLAS 2628MB. O material foi fornecido no formato de fita. Os sensores foram cortados com serra (DISCO *Fully Automatic Dicing Saw* DFD6341) nas dimensões de 5 mm x 1 mm x 0,028 mm. Os parâmetros utilizados foram: rotação 40.000 rpm, velocidade de corte 10 mm/s e fluxo de água no ponto de corte de 1,2 L/min.

Para o conjunto de bobinas e as dimensões dos sensores utilizados neste trabalho, foi verificado que o valor ideal de corrente de polarização na bobina DC, ou seja, que proporcionou um sinal com maior amplitude de resposta, foi de 60 mA. Portanto, esse valor foi utilizado para os testes experimentais.

3.2.1 Avaliação do efeito da temperatura

Conforme detalhado na revisão teórica, os sensores magnetoelásticos são sensíveis às mudanças de temperatura e, por isso, exigem estabilidade térmica durante os testes. Além do controle ambiental, é preciso gerenciar o aquecimento interno das bobinas, causado pela corrente bias na bobina DC. Para investigar o impacto da variação de temperatura na frequência de ressonância dos sensores, registrou-se o sinal de resposta de um sensor ao longo de 20 minutos, com medições de temperatura a cada 4 minutos. Um termopar tipo K foi inserido no tubo que continha o sensor e o líquido circundante para monitorar a temperatura. Os experimentos foram conduzidos em tampão fosfato-salino (PBS), uma solução salina tamponada padrão, frequentemente usada em testes biológicos. Dois tipos de suportes para as bobinas foram testados: um polimérico e outro de alumínio, com o propósito de determinar o método mais eficaz para dissipar o calor do sistema e garantir que o sensor não seja afetado por flutuações térmicas.

3.2.2 Avaliação da corrente de polarização

Cada configuração de sistema (bobinas eletromagnéticas e sensor) possui um ponto ideal de operação, caracterizado por um valor de corrente bias específico que maximiza o sinal de resposta do sensor. No entanto, ao longo de inúmeros testes foi observado que mesmo pequenas variações no valor de corrente bias impactavam significativamente na resposta de ressonância dos sensores. Por esse motivo, o fenômeno observado foi investigado com mais detalhes. Para isso, registrou-se o sinal de frequência de ressonância de um sensor na faixa de 59 a 64 mA de corrente de polarização. O teste foi realizado em meio líquido de PBS.

3.2.3. Otimização da superfície dos sensores em relação à resistência a corrosão – Tratamentos térmicos

A necessidade de otimização da superfície dos sensores emergiu no estágio inicial da pesquisa, quando foram identificados problemas que incluíram

a corrosão evidenciada em sensores funcionalizados com cistamina, um tipo de SAM (Figura 9), bem como uma significativa variabilidade nos sinais de resposta dos sensores em relação a de frequência de ressonância e a amplitude do sinal.

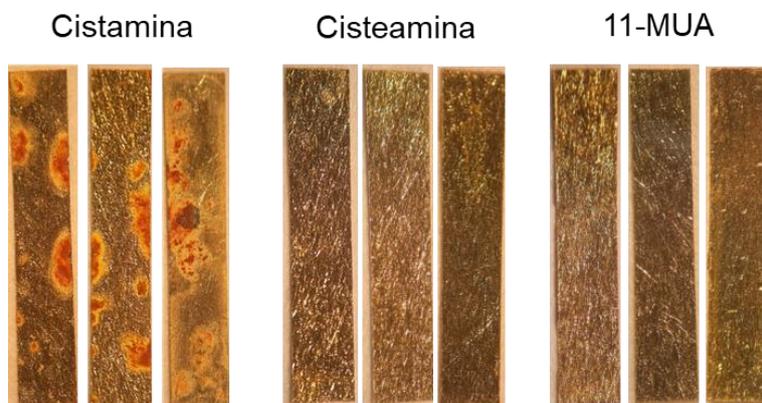


Figura 9. Superfície dos sensores após 12 h de contato com as soluções de SAM na concentração de 5 mM (comprimento do sensor 5 mm)

Para mitigar esses desafios, algumas abordagens foram consideradas. Uma delas foi a aplicação de tratamentos térmicos (TT) após a deposição das camadas de Cr e Au, conforme recomendado pela literatura, visando melhorar a adesão entre as camadas e a fita magnetoelástica. No entanto, exploraram-se também outras opções de TT, tanto antes quanto antes e após a deposição das camadas protetoras. O TT prévio à deposição teve como objetivo reduzir as tensões decorrentes do processamento e corte, além de promover a homogeneização da microestrutura da liga. No total, foram testadas quatro condições de TT com 30 sensores de cada grupo. A quantidade de 30 sensores foi considerada suficiente para obter uma amostragem estatística significativa dos resultados. A Tabela 6 apresenta as condições dos grupos avaliados.

Tabela 6. Tratamentos térmicos realizados nos sensores	
Grupo	Condição
G1	Sem TT
G2	TT antes do revestimento
G3	TT depois do revestimento
G4	TT antes e depois do revestimento

O TT aplicado foi realizado sempre nas mesmas condições. Os parâmetros utilizados foram: temperatura de 235 °C com patamar de 2 horas (48), em vácuo (2×10^{-2} mbar). A rampa de aquecimento foi de 10 °C/min e o resfriamento foi realizado no interior do forno.

Todos os sensores foram recobertos com uma camada de Cr de 40 nm e uma camada de Au de 60 nm pelo processo de *magnetron sputtering*. Para determinar o tempo de deposição e a espessura das camadas, utilizou-se o *software* de simulação disponível no site da Gencoa (94). Esse *software* realiza uma estimativa da taxa de deposição por meio de cálculos que consideram a energia de cada material, valores de transferência de momento e condições de processamento. Anterior às deposições foi realizada limpeza superficial com *etching* de plasma de argônio. Os parâmetros de deposição utilizados foram: distância entre o alvo e o substrato igual a 6 cm, as deposições foram realizadas com fonte DC, as potências e os tempos utilizadas foram de 100 e 30 W e de 180 e 90 segundos para o Cr e Au respectivamente. Os revestimentos e TT foram realizados no Laboratório de Engenharia de Superfícies e Tratamentos Térmicos (LESTT I).

A espessura dos revestimentos foi avaliada por Espectroscopia de Fluorescência de Raios X por Dispersão em Energia (EDX) (EDX7000, Shimadzu) e comparada com os valores teóricos calculados (95–97). As análises foram realizadas com colimador de 1 mm em vácuo. A rugosidade dos lados liso e rugoso da fita magnetoelástica foi avaliada pela técnica de perfilometria.

Para avaliar a resistência à corrosão em relação aos TT aplicados, três sensores de cada grupo foram expostos a três tipos de meio: água ultrapura (pH 5,0), PBS (pH 7,4) e etanol PA. Esses meios foram selecionados por serem os utilizados durante a funcionalização da superfície dos sensores. A frequência de ressonância dos sensores foi medida no início e ao final do ensaio de corrosão. O tempo de ensaio foi de 48 horas. Após o período de ensaio, ambos os lados dos sensores foram examinados, ou seja, as superfícies lisa e rugosa, utilizando um microscópio óptico (Stemi DV4, Zeiss). Além disso, imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV/FEG) da superfície dos sensores foram obtidas para complementar a análise. As imagens foram obtidas no modo de elétrons secundários (SE) com uma tensão de aceleração de 15 kV em um MEV/FEG MIRA3 da Tescan.

3.2.5. Otimização da superfície dos sensores em relação à resistência a corrosão – Proteção catódica

Com base nos resultados dos ensaios anteriores, constatou-se que os sensores expostos à água ultrapura exibiram corrosão significativa. Portanto, a proteção catódica foi avaliada como uma alternativa para reduzir processos corrosivos nesse meio. Para implementar a proteção catódica, um pequeno pedaço de folha de magnésio, medindo aproximadamente 1 mm^2 , foi cortado e cuidadosamente posicionado dentro de um tubo *Eppendorf* de 0,2 ml ao lado do sensor em água, garantindo o contato direto entre a folha de magnésio e o sensor. Ao final do teste, a folha de magnésio foi retirada do *Eppendorf* e descartada adequadamente. Os efeitos da corrosão nas superfícies dos sensores foram avaliados utilizando microscopia óptica e MEV/FEG com espectroscopia de energia dispersiva (EDS). A frequência de ressonância dos sensores foi medida no início e ao final do ensaio de corrosão.

3.3 Resultados e discussão

Como os sensores magnetoelásticos respondem às variações de temperatura (29,98,99), é crucial mantê-la constante durante a medição para garantir que qualquer mudança de frequência observada seja exclusivamente devida ao aumento da massa na superfície do biossensor e não influenciada pelas flutuações de temperatura. Jain et al. (29) demonstraram uma diminuição linear na frequência de ressonância com a temperatura para sensores magnetoelásticos medidos em atmosfera ambiente. Porém, apesar de controlar a temperatura externa, o auto aquecimento das bobinas do sistema pode introduzir variações significativas de temperatura do sistema de medição. Este efeito é ilustrado na Figura 10, que apresenta a variação de temperatura (ΔT) medida no interior das bobinas para configurações utilizando suportes de alumínio e polimérico e o deslocamento de frequência do sensor em cada condição. Em ambas as configurações a temperatura aumenta devido ao auto aquecimento do sistema.

Foi observado que o suporte de alumínio atua como dissipador de calor, ajudando a atenuar as oscilações de temperatura; mesmo assim, foram

necessários alguns minutos para a temperatura se estabilizar. Além disso, foi verificada uma mudança de frequência dependente da temperatura no comportamento do sensor. Durante o teste, notou-se uma variação de frequência de -15 Hz ao utilizar o suporte de alumínio, em contraste com a mudança de -65 Hz com o suporte polimérico. Além disso, no suporte de alumínio, a frequência do sensor demonstrou estabilidade com mudanças de temperatura, atingindo estado estacionário após aproximadamente 5 min. As variações de temperatura representam um desafio que precisa ser enfrentado para alcançar a precisão necessária para medições de biossensores para fins de diagnóstico.

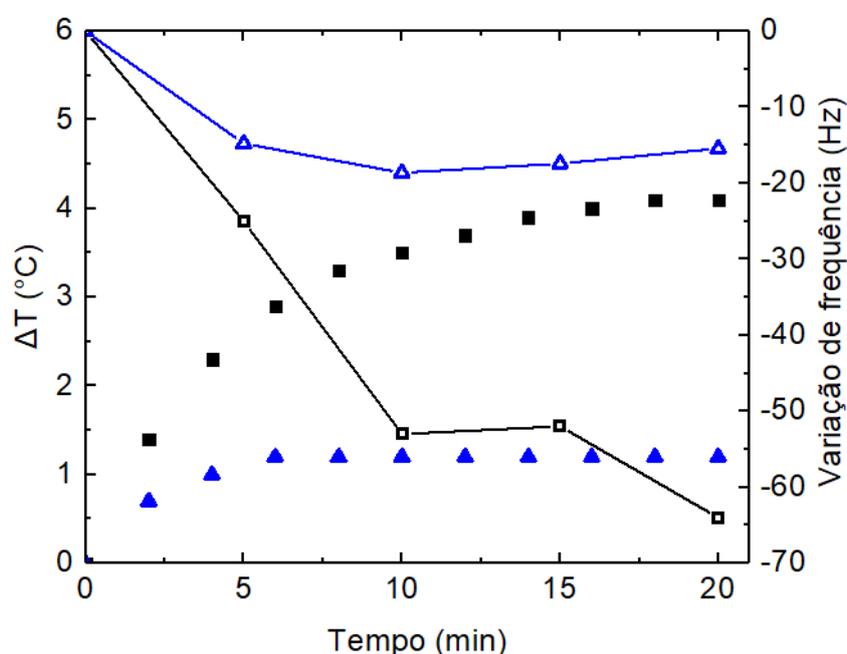


Figura 10. Variação de temperatura ΔT devido ao auto aquecimento das bobinas do sistema no suporte polimérico (quadrados sólidos pretos) e no suporte de alumínio (triângulos sólidos azuis). Os quadrados abertos conectados pela linha.

É bem conhecido que o campo magnético de polarização DC tem impacto significativo na frequência de ressonância, intensidade e qualidade do sinal dos sensores magnetoelásticos (100). Esse efeito foi observado mesmo para pequenas variações no campo, conforme mostrado na Figura 11 (b) pela mudança de frequência de ressonância do sensor (Δf) em resposta à corrente aplicada à bobina DC, que produz um campo magnético de cerca de 30 mT A^{-1} . O teste foi realizado em um sensor grupo G4, com aproximadamente 60 mA (1,8 mT) de corrente de polarização. Esse valor, e a faixa de análise, foram escolhidos pois resultaram na maior amplitude para o sinal de resposta.

Para o sensor testado, uma variação de frequência de cerca de 84 Hz foi observada para uma mudança de 1% na corrente de polarização (equivalente a 140 Hz mA⁻¹ em torno de 60 mA). Em comparação, conforme estimado pela Equação 2, uma alteração na massa superficial de 1 µg no mesmo sensor resultaria em uma variação de frequência de 200 Hz. Estas observações indicam que para alcançar a resolução necessária para aplicações biológicas (variações de massa de ng), a estabilidade do campo de polarização DC deve ser da ordem de 0,01% (menos de 1 Hz no desvio de frequência).

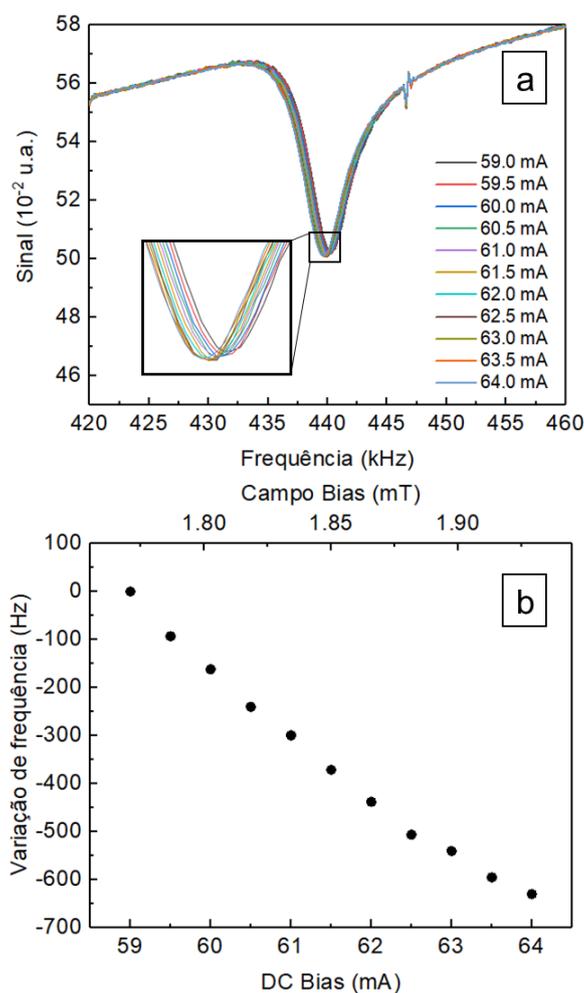


Figura 11. (a) Espectro de frequência de ressonância para um sensor em líquido em diferentes correntes de polarização (b) cálculo da mudança de frequência em função da corrente

A resposta dos sensores magnetoelásticos, em relação a frequência de ressonância e a amplitude do sinal, dos grupos de sensores preparados com os diferentes tratamentos térmicos é apresentada na Figura 12, onde os símbolos representam os valores médios, e as barras de erro indicam o desvio padrão

entre as medições obtidas a partir de conjuntos de 30 sensores de cada grupo. As medições foram realizadas com uma corrente constante de 60 mA na bobina de campo DC. A partir dos resultados obtidos verificou-se que o tratamento térmico reduziu as dispersões da frequência de ressonância e da amplitude do sinal, evidenciadas na comparação dos resultados do G1 com os demais sensores. Este efeito é provavelmente atribuído às tensões locais geradas nas amostras durante a fabricação e corte (44,48,101), que passam por um processo de relaxamento durante o tratamento térmico.

Como esperado, as mudanças na frequência de ressonância devido ao tratamento térmico são relativamente pequenas, uma vez que dependem principalmente da geometria do sensor. No entanto, alguns efeitos perceptíveis ainda foram detectados. Entre os grupos, o grupo G1 exibiu a menor frequência de ressonância, o que pode ser atribuído à maior anisotropia magnética do material Metglas não tratado (32), resultando em um estado magnético distinto em comparação aos outros grupos. Além disso, espera-se que o tratamento térmico aplicado após a deposição dos filmes reduza a rigidez dos revestimentos, levando a uma diminuição no módulo de elasticidade efetivo E . Este efeito foi confirmado pela ligeira redução na frequência de ressonância quando o tratamento térmico foi realizado após (G3 e G4) o processo de revestimento.

Em relação ao sinal/ruído, a aplicação do tratamento térmico após o revestimento (grupos G3 e G4) resultou em sinais mais intensos. Este comportamento se deve à redução de tensões tanto no material Metglas quanto nos revestimentos superficiais, levando conseqüentemente a uma diminuição do amortecimento magnético e mecânico. A aplicação de tratamento térmico antes e depois do revestimento reduziu significativamente a dispersão dos resultados e melhorou a amplitude dos sinais, o que é crucial na produção de biossensores magnetoelásticos, pois uma resposta mais homogênea leva a uma melhor reprodutibilidade dos resultados. A sensibilidade ($\Delta f/\Delta m$) é governada principalmente pela geometria da amostra, portanto nenhuma melhoria é esperada devido aos tratamentos térmicos.

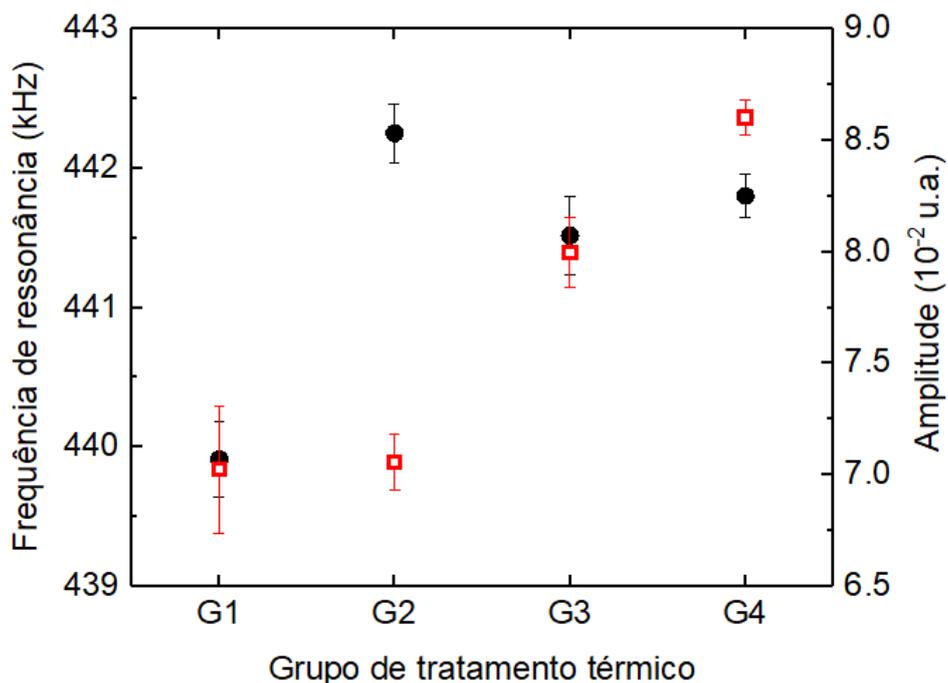


Figura 12. Frequência de ressonância (círculos sólidos pretos) e amplitude do sinal (quadrados abertos vermelhos) em relação ao tratamento térmico de quatro grupos de sensores. Os símbolos indicam os valores médios, enquanto as barras de erro correspondem ao desvio padrão entre medições de 30 sensores.

Em relação aos revestimentos, a camada depositada de Cr apresentou espessura de 36 ± 2 nm no lado rugoso e 30 ± 2 nm no lado liso. De forma similar, a camada depositada de Au apresentou espessura de 54 ± 3 nm no lado rugoso e 46 ± 2 nm no lado liso. Já os resultados de perfilometria da fita magnetoelástica apontaram um valor de rugosidade média (R_a) de 40 ± 4 nm para o lado liso e de aproximadamente 230 ± 13 nm para o lado rugoso.

O processo de corrosão envolve a formação de óxidos, levando a um aumento indesejado de massa na superfície do sensor. Este fenômeno representa um desafio para os biossensores, pois o aumento de massa resultante da formação de óxidos pode mascarar os efeitos das interações biológicas. A resistência à corrosão em função dos tratamentos térmicos aplicados foi avaliada em três meios: etanol, PBS e água ultrapura. Os resultados demonstraram a estabilidade dos sensores dos quatro grupos quando em contato com etanol, conforme mostrado na Figura 13. O etanol é um solvente não corrosivo e não representa risco para as camadas de Cr e Au do sensor.

Em PBS, todos os quatro grupos de sensores demonstraram a formação de depósitos de sal em suas superfícies. A análise de SEM/EDS, apresentada

na Figura 14, revelou a presença de cloro, sódio e fósforo, confirmando a precipitação de sal da composição do tampão PBS. No entanto, não foi observada corrosão da liga metálica da fita magnetoelástica dentro da escala avaliada.

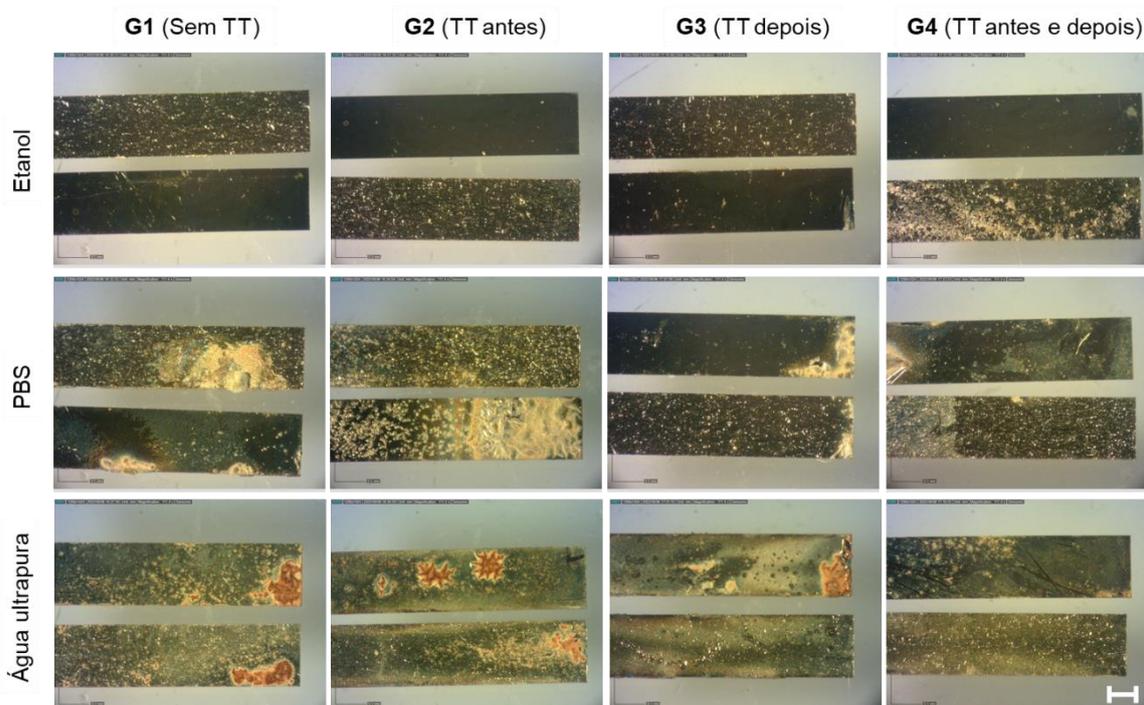


Figura 13. Superfície do sensor após teste de resistência à corrosão em água ultrapura, PBS e etanol em função do tratamento térmico aplicado. Cada imagem corresponde a dois sensores diferentes mostrando superfícies rugosa e lisas (barra de escala: 0,5 mm).

Em contraste, todos os quatro grupos exibiram corrosão quando expostos a água ultrapura. As modificações alaranjadas observadas na superfície dos sensores apresentam características típicas de corrosão do ferro, que sofre conversão em óxido de ferro III hidratado, $\text{Fe}(\text{OH})_3$, na presença de água (102). A liga magnetoelástica contém aproximadamente 40% em massa de ferro. A corrosão do ferro desprotegido na presença de água é um processo eletroquímico inevitável que envolve duas reações: oxidação no ânodo e redução no cátodo. A presença de óxido de ferro foi confirmada através da análise EDS, conforme mostrado na Figura 14. Esta forma de corrosão é comumente conhecida como pite e é um mecanismo de degradação predominante para revestimentos de película fina, representando um desafio significativo para metais expostos a ambientes corrosivos (103). Além disso, foram observados defeitos no revestimento, como trincas e pequenas

imperfeições, que são pontos críticos para o início do processo de corrosão (Figura 15).

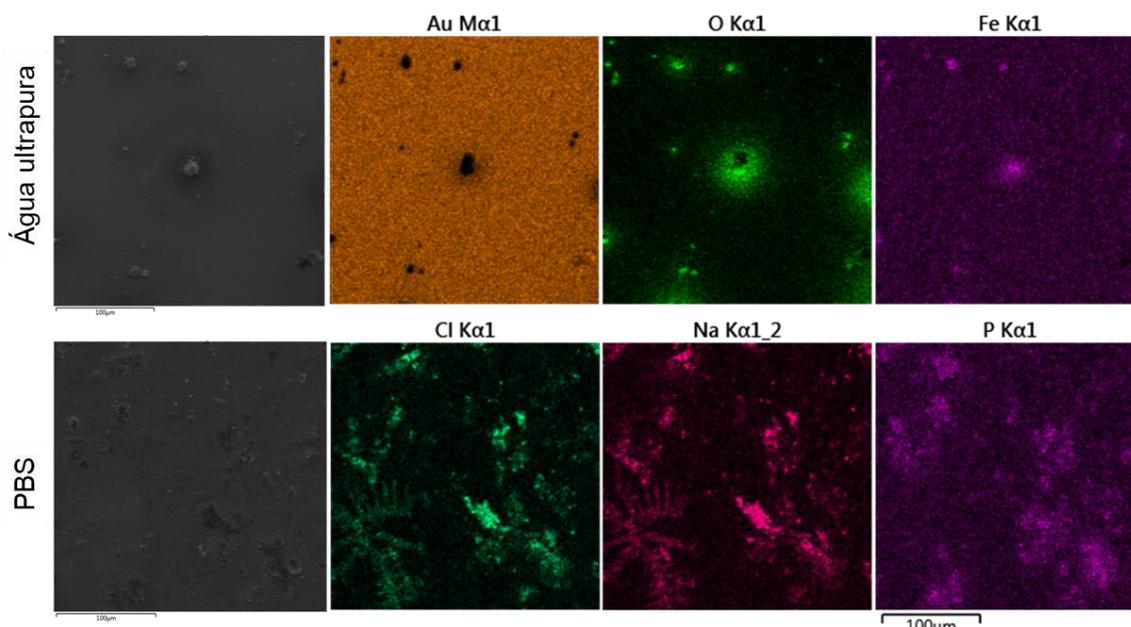


Figura 14. Imagens MEV/EDS da superfície do sensor após teste de corrosão em água ultrapura (corrosão do ferro) e PBS (cristalização de sal) para sensores com tratamento térmico antes e depois do revestimento (G4).

Os grupos G1 e G2 demonstraram corrosão mais pronunciada que G3 e G4. Este resultado indicou que o tratamento térmico realizado após o revestimento melhorou a adesão entre as camadas de Cr e Au e a fita magnetoelástica, reduzindo assim a corrosão. Além disso, a superfície lisa dos sensores apresentou corrosão mais severa do que a superfície rugosa, provavelmente porque o aumento da rugosidade facilitou melhor adesão das camadas de revestimento.

A frequência de ressonância dos sensores foi medida tanto no início quanto no final do teste de corrosão. A Tabela 7 resume os resultados obtidos. Em PBS, os sensores exibiram uma variação na frequência de ressonância de aproximadamente -1500 Hz, atribuído ao aumento da massa superficial causado pela formação de sais provenientes da própria solução.

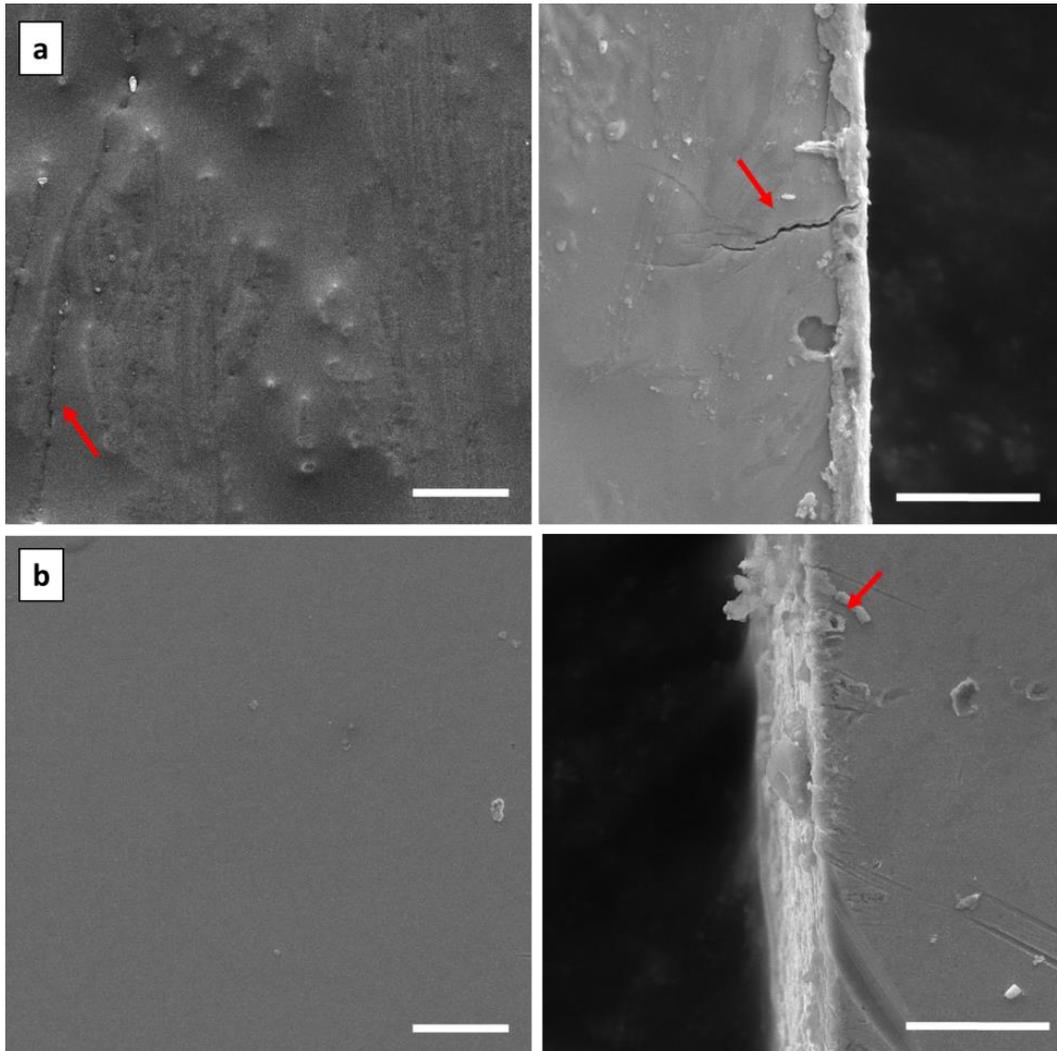


Figura 15. Imagens de MEV da superfície recoberta com Cr e Au. (a) lado rugoso e (b) lado liso. As setas vermelhas indicam as imperfeições no revestimento. As barras de escala correspondem a 5 μm (magnificação de 10 e 15 kx)

Em água ultrapura, foram observadas alterações significativas na frequência de ressonância para os grupos G1 e G2, que não foram submetidos a tratamento térmico após o revestimento. Esses grupos demonstraram variações notáveis de frequência de -1444 Hz e -1750 Hz, respectivamente, atribuídas à formação de produtos de corrosão de ferro nas superfícies do sensor, levando a um aumento na massa. Em contraste, os sensores dos grupos que foram submetidos a tratamento térmico após o revestimento exibiram variação de frequência de aproximadamente -900 Hz, indicando que ocorreu corrosão, mas apenas alguns pontos foram observados. Os resultados sugerem que o tratamento térmico impactou positivamente na adesão das camadas de Cr e Au com o substrato magnetoelástico, reduzindo consideravelmente o processo de corrosão (48).

Tabela 7. Mudança de frequência dos sensores após teste de resistência à corrosão em água ultrapura e PBS em função do tratamento térmico aplicado. Nenhuma mudança de frequência foi observada no sensor imerso em etanol.

Variação de frequência (Hz)		
Grupo	Água ultrapura	PBS
G1	-1444	-1675
G2	-1750	-2378
G3	-923	-1346
G4	-871	-410

Em ambas as circunstâncias, a corrosão do ferro e a formação de sais a partir da solução de PBS, podem ocasionar um aumento de massa na superfície do sensor, resultando em alterações na frequência de ressonância. Portanto, é importante minimizar esses fenômenos para atingir a sensibilidade necessária para detectar patógenos com massas extremamente baixas, como a dos vírus. Uma abordagem alternativa é empregar soluções isentas de sal ou com teor reduzido de sal durante os processos de funcionalização e medição desses biossensores. Nos casos em que são necessárias soluções contendo sal, recomenda-se realizar uma etapa final para lavar quaisquer sais residuais com água ultrapura para evitar a cristalização durante a operação do biossensor.

Para os casos nos quais não é possível alterar as condições do meio de análise, a proteção catódica pode ser uma alternativa interessante. A corrosão do sensor é causada principalmente por reações galvânicas devido à presença de metais diferentes nas camadas protetoras do sensor. Neste caso particular, prevê-se que o metal Fe sofra corrosão quando entrar em contato com um metal mais nobre, como Cr ou Au, na presença de um eletrólito (104–106). A corrosão galvânica pode ser evitada usando um ânodo de sacrifício. Em nossos experimentos, a eficácia da incorporação de uma placa de magnésio na minimização do processo corrosivo ficou evidente pela ausência de pontos de corrosão no sensor (Figura 16). Além disso, a diferença nos valores de frequência de ressonância entre as medições do sensor antes e depois de 24 horas em contato com a água foi de -87 Hz, indicando formação insignificante de óxidos de ferro na superfície do sensor. Este efeito também é ilustrado na Figura 16. Assim, a utilização de um ânodo de sacrifício provou ser uma alternativa

simples e prática para resolver o problema da corrosão do sensor em água ultrapura.

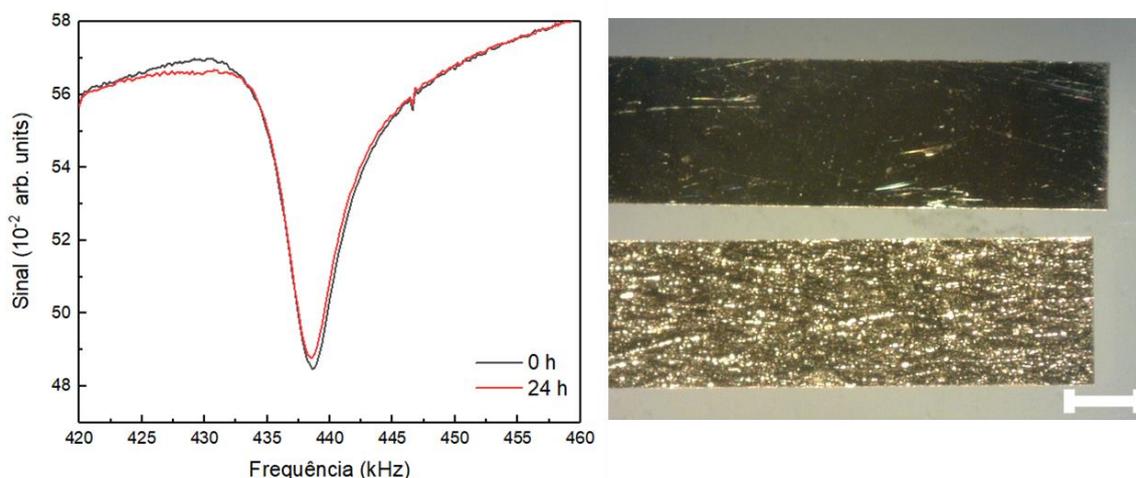


Figura 16. Espectro de frequência de ressonância antes e depois de 24 h, e imagem da superfície do sensor com tratamento térmico antes e depois do revestimento após teste de resistência à corrosão em água ultrapura utilizando proteção catódica (barra de escala: 0,5 mm).

Os sensores utilizados para detecção de vírus são altamente sensíveis, mesmo a pequenas alterações na massa. Conseqüentemente, mesmo uma curta exposição a processos corrosivos pode resultar em variações de frequência que excedem os níveis de tolerância aceitáveis. Portanto, para manter a sua eficácia, torna-se crucial implementar a proteção catódica para estes sensores. Esta medida de proteção não se limita a aplicações nas áreas biológicas e de saúde, mas se estende a qualquer situação em que a prevenção da corrosão seja necessária. Os sensores magnetoelásticos podem manter sua precisão e confiabilidade empregando proteção catódica, garantindo detecção precisa em vários setores e indústrias.

3.4 Conclusões

Esta etapa do trabalho demonstrou o efeito de fatores extrínsecos sobre a resposta de sensores de magnetoelásticos para aplicações em diagnóstico. A influência da temperatura de operação, campo magnético aplicado, tratamentos térmicos e ambiente corrosivo foram estudados. Um suporte de alumínio foi empregado como dissipador de calor para evitar variações de frequência

provenientes do auto aquecimento do sistema. O campo magnético de polarização influencia significativamente na frequência de ressonância dos sensores. Para atingir a resolução desejada, necessária para aplicações biológicas, é essencial manter a estabilidade do campo de polarização em um nível de aproximadamente 0,01%. Notavelmente, a aplicação de tratamento térmico antes e depois do processo de revestimento resultou numa redução tanto na frequência de ressonância como nas dispersões de amplitude do sinal. Esta melhoria na homogeneidade desempenha um papel crucial na produção de biossensores magnetoelásticos, levando a uma maior reprodutibilidade dos resultados. Além disso, embora o tratamento térmico tenha melhorado a resistência à corrosão dos sensores em água ultrapura, não eliminou totalmente o problema. Portanto, a proteção catódica foi avaliada e demonstrada como uma alternativa simples e viável para reduzir a corrosão do sensor em água ultrapura. O estudo apresentado oferece contribuições para pesquisadores e engenheiros no aprimoramento do design de biossensores, no desenvolvimento de instrumentação adequada e na implementação de protocolos de medição eficazes. Esses avanços são fundamentais para aumentar o desempenho, a precisão e a confiabilidade dos biossensores magnetoelásticos, especialmente em aplicações críticas como a detecção de vírus.

Funcionalização da superfície e diagnóstico

A funcionalização da superfície do sensor constitui uma etapa importante na fabricação de biossensores, influenciando diretamente sua eficácia e precisão. Este capítulo se dedica a explorar detalhadamente esse tema, fornecendo uma introdução que destaca os principais aspectos de cada uma das etapas da funcionalização, além de abordar a utilização de nanopartículas de ouro para amplificar o sinal de resposta dos biossensores. Em seguida, são discutidas as estratégias específicas adotadas para a funcionalização, juntamente com as técnicas de caracterização empregadas neste estudo. Por fim, são apresentados os resultados obtidos, acompanhados das limitações encontradas no uso desses biossensores para o diagnóstico médico.

4.1 Introdução

4.1.1 Funcionalização da superfície

(I) Formação da *Self Assembled Monolayer*

Anterior a formação da SAM, a limpeza da superfície de visa garantir a eficácia da funcionalização. É bem conhecido que os tióis são adsorvidos à temperatura ambiente formando uma forte ligação tiolato-metal após a dissociação da ligação S-H, que ocorre espontaneamente em todas as superfícies metálicas limpas (52). As SAM têm propriedades reproduzíveis quando formadas em substratos limpos com produtos químicos fortemente oxidantes, como por exemplo, solução piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$) ou plasmas de oxigênio (107). Segundo a literatura (108), uma superfície de ouro limpa é hidrofílica. A Tabela 8 apresenta protocolos comuns de limpeza empregados em superfícies de ouro antes da biofuncionalização.

Tabela 8. Comparação entre processos de limpeza da superfície de ouro

Protocolo de limpeza	Ref.
Solução 1:1 de etanol e metanol, em ultrassom	(82)
Plasma de oxigênio	(46)
Etanol e água ultrapura	(89)
Acetona, isopropanol, água deionizada e etanol, 10' cada, em ultrassom	(47)
Isopropanol, água deionizada, ozônio-UV por 5'	(109)

Após a limpeza, ocorre a aplicação da SAM sobre a superfície limpa do ouro. A Tabela 9 apresenta uma comparação entre estudos que utilizaram as SAM para a funcionalização da superfície de biossensores magnetoelásticos, eletroquímicos e sensores de ressonância plasmônica de superfície (SPR), em relação ao tipo de SAM, à concentração utilizada e o tempo de aplicação.

Tabela 9. Comparação entre as SAM utilizadas em biossensores

Sensor	SAM	Conc. (mM)	T (h)	Ref.
Magnetoelástico	Cisteamina	40	12	(55)
Magnetoelástico	Ácido 6-mercaptoundecanóico	10	24	(49)
Magnetoelástico	Ácido 11-mercaptoundecanoico	10	12	(47)
Magnetoelástico	Cistamina	20	24	(110)
Magnetoelástico	Cistamina	20	12	(82)
Magnetoelástico	Cisteamina	40	12	(46)
Eletroquímico	Ácido 11-mercaptoundecanoico	5	20	(63)
Eletroquímico	Monotiól-alcano-PEG	1	48	(111)
SPR	Ácido 11-mercaptoundecanoico	20	12	(59)
SPR	Ácido 11-mercaptoundecanoico	10	18	(112)
SPR	Ácido 11-mercaptoundecanoico	10	48	(60)
SPR	Ácido 11-mercaptoundecanoico	1	12	(113)

Após uma detalhada pesquisa na literatura, optou-se pela utilização da SAM de ácido 11-mercaptoundecanoico (11-MUA) para a funcionalização do biossensor. A Figura 17 apresenta a estrutura química dessa molécula, a qual é constituída por uma cadeia carbônica contendo 11 átomos de carbono, um grupo

tiol em uma das extremidades (SH) e um grupo ácido carboxílico (COOH) na outra.

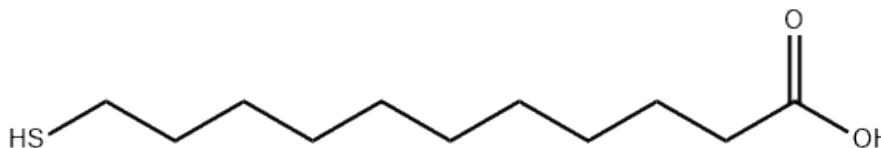


Figura 17. Estrutura química da molécula de 11-MUA

Uma sub etapa da funcionalização dos biossensores consiste na ativação dos terminais COOH da molécula de 11-MUA para promover a ligação entre a molécula e os anticorpos. Uma estratégia para isso é por meio da química entre os reagentes 1-Etil-3-(3dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS). Resumidamente, uma reação típica de EDC/NHS, muitas vezes denominada “ativação da superfície”, consiste em preparar uma camada superficial terminada em éster succinimidílico (-COOSuc) para reagir com um ligante amino do elemento de bioreconhecimento e formar ligações peptídicas covalentes fortes.

A reação envolve a adição do grupo OH do ácido carboxílico através de uma das ligações duplas do reagente EDC, formando um aduto de O-acilureia (Reação 1, Figura 18). Então, com a adição do NHS, a O-acilureia de superfície pode ser transformada de acordo com três caminhos competitivos, representados pelas reações 2, 3 e 4 da Figura 18. Na reação 2, é produzido o produto éster succinimidílico com a liberação da ureia correspondente ao reagente carbodiimida inicial. Na reação 3, um produto anidrido é produzido e enxertado na superfície, com liberação de ureia. Na reação 4, um rearranjo através de uma transferência intramolecular de acila pode produzir uma molécula terminada em N-acilureia. O NHS é usado precisamente para competir eficientemente com a última reação, a fim de fornecer um intermediário mais estável destinado a reagir com uma amina primária para formar uma ligação amida para produzir o desejado acoplamento peptídico. Segundo a literatura, a ativação da superfície por meio da química EDC/NHS é efetiva. No entanto, as respectivas concentrações de EDC e NHS devem ser cuidadosamente escolhidas para produzir uma modificação completa e evitar a formação de subprodutos superficiais indesejados (114,115).

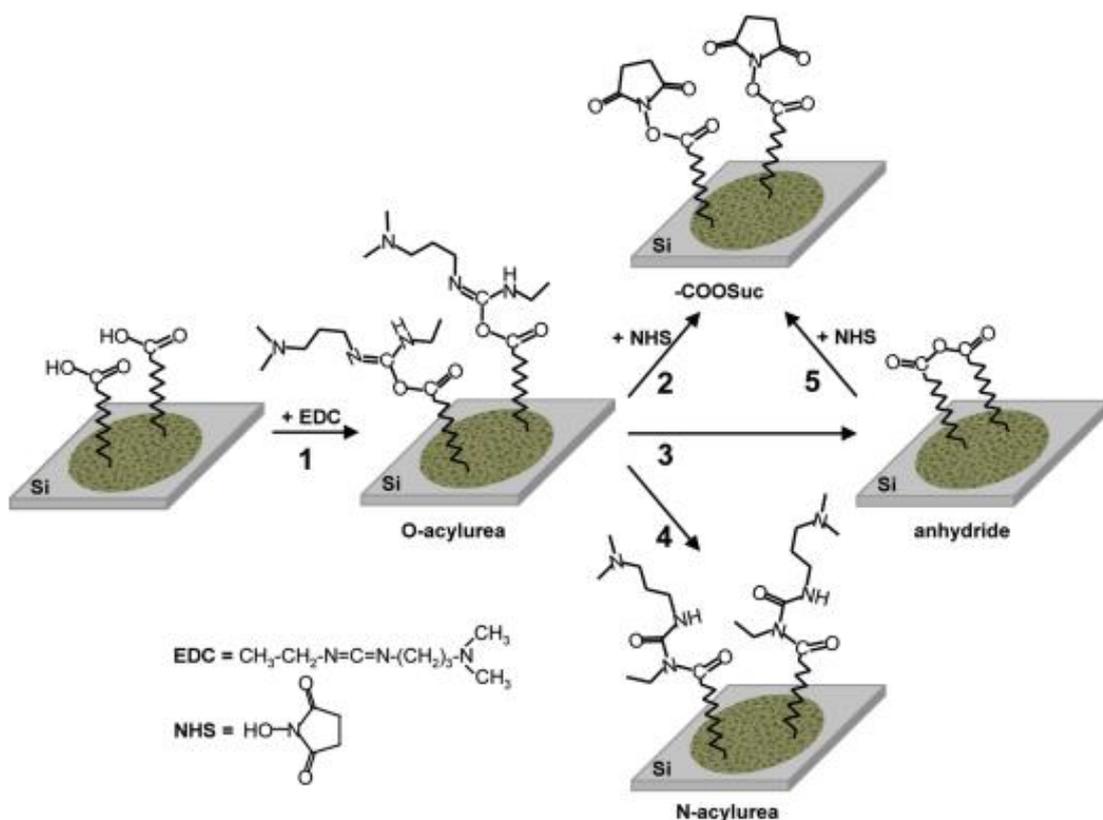


Figura 18. Representação das reações que ocorrem durante a ativação da superfície com a química EDC/NHS (115).

A Tabela 10 apresenta uma comparação entre as concentrações de 11-MUA e as respectivas concentrações de EDC/NHS, bem como o solvente e os tempos de reação utilizados na funcionalização de biossensores. Após a ativação por EDC/NHS a molécula de 11-MUA está pronta para ligar o anticorpo na superfície.

Tabela 10. Comparação entre as estratégias de ativação do 11-MUA com EDC/NHS

11-MUA (mM)	Reagentes (mM)	Solvente	Tempo	Ref.
10	40 EDC/10 NHS	Água destilada	1 h	(47)
20	400 EDC/100 NHS	-	15 min	(59)
10	200 EDC/50 NHSS	Água destilada	2 h	(112)
10	75 EDC/40 NHS	Água destilada	1 h	(60)
1	400 EDC/100 NHS	Água destilada	5 min	(113)

(II) Imobilização dos anticorpos

A etapa de imobilização dos anticorpos é crucial na funcionalização, uma vez que essas biomoléculas atuam como os receptores biológicos responsáveis pela captura do analito. Durante este processo, os grupos amina (NH_2), distribuídos ao longo da superfície dos anticorpos, devem ser efetivamente ligados ao éster succinimidílico, produzido na molécula de 11-MUA pela ativação por EDC/NHS.

A Figura 19 apresenta a estrutura química de um anticorpo IgG com os grupos funcionais disponíveis para modificação. Entre eles se encontram as aminas primárias ($-\text{NH}_2$), que ocorrem em resíduos de lisina e no terminal N de cada cadeia polipeptídica, elas são numerosas e distribuídas por todo o anticorpo; os grupos sulfidríla ($-\text{SH}$), que ocorrem como ligações dissulfeto, estabilizam a estrutura da molécula inteira; os carboidratos que ocorrem principalmente na região Fc dos anticorpos; e os grupo ácido carboxílico estão presentes no final das regiões contantes (58,116).

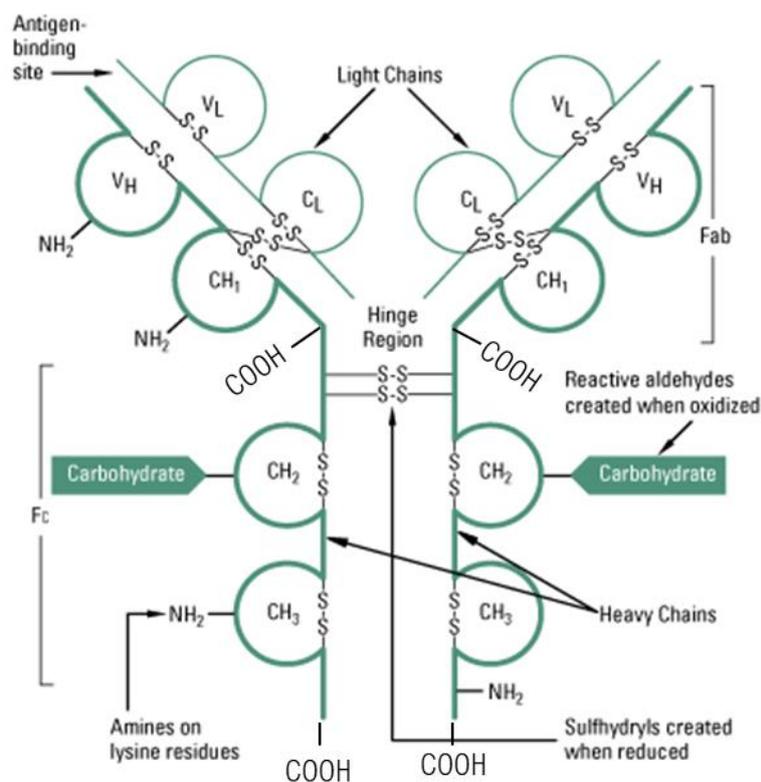


Figura 19. Estrutura química de um anticorpo IgG com os grupos funcionais presentes na superfície (adaptado de (116))

A Tabela 11 compara diversos parâmetros, incluindo concentração dos anticorpos, tempo e temperatura de incubação, entre estudos que empregaram sensores magnetoelásticos, similares em dimensões aos utilizados neste trabalho, e que foram funcionalizados com anticorpos.

Tabela 11. Comparação entre parâmetros utilizados para a imobilização dos anticorpos em biossensores magnetoelásticos

Dimensões do sensor (mm)	Concentração (µg/mL)	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Ref.
5 x 1	50	1	37	(47)
5 x 1	25	1	37	(35)
5 x 1	25	1	37	(55)
6 x 1	50	1	37	(46)

(III) Bloqueio da superfície

Na etapa final de bloqueio, é essencial assegurar que os sítios do 11-MUA que não se ligaram aos anticorpos, assim como quaisquer regiões da superfície de ouro expostas, sejam bloqueadas. Isso evita a ocorrência de ligações inespecíficas, as quais podem comprometer significativamente a sensibilidade e a especificidade dos biossensores.

Shen et al. (117), conduziram uma análise comparativa da eficácia de três tipos diferentes de bloqueio em biossensores magnetoelásticos: BSA, leite e caseína. Os resultados indicaram que as diferenças nas propriedades de cada bloqueio são atribuídas às características físicas e elétricas de cada molécula, e o BSA foi considerado o bloqueador mais eficaz. Além disso, os pesquisadores investigaram uma faixa de concentração entre 0,3 e 5 mg/ml e concluíram que a concentração ótima, ou seja, mais eficaz para o BSA foi de 1 mg/ml.

Em alguns estudos com biossensores magnetoelásticos com as dimensões utilizadas neste trabalho, 5 x 1 x 0,028 (mm), o bloqueio da superfície foi realizado com BSA na concentração de 1%. O tempo de incubação utilizado variou entre 20 minutos e 1 hora (35,46,47,55,83).

4.1.2 Amplificação do sinal de resposta com AuNPs

A variedade de métodos para a conjugação de anticorpos em nanopartículas é ilustrada na Figura 20. Enquanto a rota (A) representa o método de adsorção física, considerado o mais simples, as rotas (B), (C) e (D) apresentam técnicas de conjugação por adsorção química, que envolvem modificações superficiais tanto das AuNPs quanto dos anticorpos. É essencial que um método de bioconjugação eficaz mantenha a estabilidade coloidal das nanopartículas, garantindo ao mesmo tempo a capacidade dos bioconjugados de reconhecer o antígeno (65). As condições de preparação, como concentração de anticorpo, concentração de reagentes de ativação, composição do tampão de imobilização (molaridade, teor de sal) e tempo de reação, têm efeito potencialmente significativo no desempenho de AuNPs revestidas com anticorpo (118). Byzova et al. (67), estudaram qual a concentração ideal de anticorpos para uma funcionalização eficiente de AuNPs de aproximadamente 25 nm de diâmetro. Os autores concluíram que na imobilização por adsorção física, a concentração ideal de anticorpos deve ser escolhida para cada caso individual, e nem sempre coincide com a alta concentração determinada com base na curva de floculação.

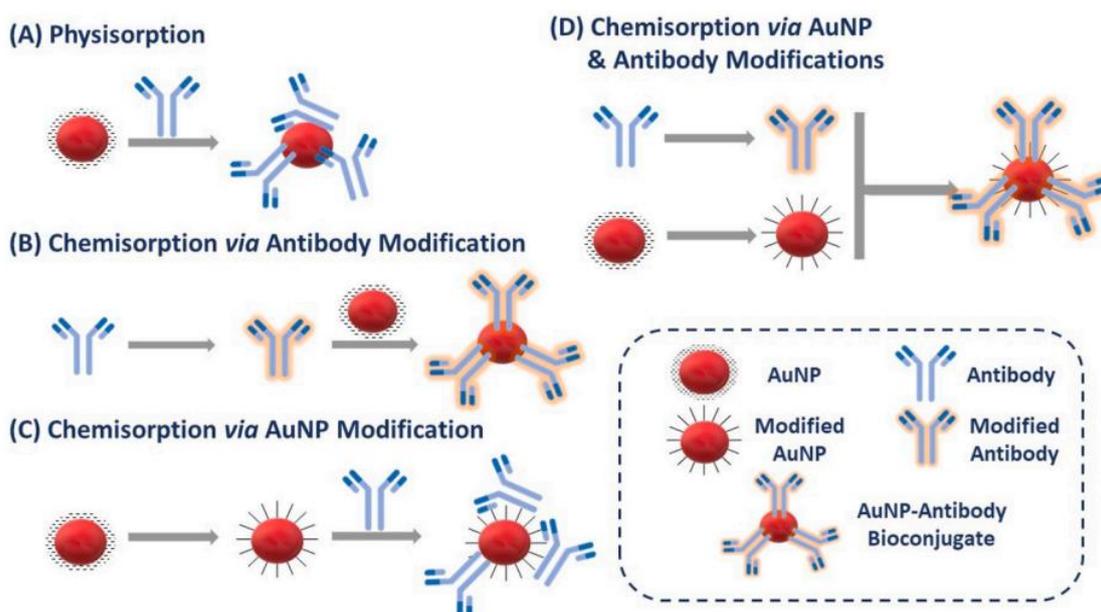


Figura 20. Métodos de conjugação de anticorpos em AuNPs (65)

Em relação à aplicação de nanopartículas em biossensores magnetoelásticos, Guo et al. (119), empregaram AuNPs para amplificar o sinal de resposta dos biossensores destinados à detecção de β -talassemia. Essas AuNPs, com um diâmetro de 20 nm, foram conjugadas com moléculas de sDNA tiolado. Já no estudo de Campanile et al. (89), foram exploradas nanopartículas de ouro e nanopartículas de ouro revestidas com Fe_3O_4 para amplificar a resposta do biossensor. O objetivo era determinar se, para a mesma massa das nanopartículas, a ação magnética resultaria em uma melhoria na sensibilidade do biossensor. A funcionalização foi realizada utilizando a técnica de imobilização fotoquímica para ambos os tipos de nanopartículas. Lin et al. (80), também empregaram nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 , porém modificadas com quitosana para amplificar o sinal de resposta de biossensores voltados à detecção de *E. coli*. Em todos os estudos mencionados, foi constatado que as nanopartículas contribuíram para aumentar a sensibilidade dos biossensores.

Além de serem empregadas em biossensores magnetoelásticos, é fundamental destacar que as AuNPs são amplamente utilizadas em diversas aplicações médicas. Isso inclui biossensores de SPR, testes rápidos de fluxo lateral, bem como em terapias para câncer e doenças neurodegenerativas. (120). Essas são apenas algumas das principais aplicações das nanopartículas de ouro na área da saúde, e seu potencial continua a ser explorado em uma variedade de outras áreas, incluindo regeneração tecidual, terapia genética e entrega de vacinas.

4.2 Experimental

4.2.1 Limpeza da superfície

A Tabela 12 lista os três métodos de limpeza superficial avaliados neste trabalho. A efetividade dos processos foi verificada pelo ensaio de ângulo de contato com a água (SEO, Phoenix). O ensaio foi realizado logo após os processos de limpeza. Para isso, uma gota de água destilada (15 μl) foi gotejada sobre a superfície do sensor. Ambos os lados do sensor foram avaliados, ou seja, o lado liso e o rugoso. O resultado do valor do ângulo de contato corresponde à média de 10 medidas. Além disso, para as amostras limpas com plasma de O_2 e

N₂, foi avaliado o tempo de duração da limpeza, por meio de medidas de ângulo de contato realizadas 24 horas após a limpeza.

Tabela 12. Métodos de limpeza superficial avaliados

Método	Condição
Acetona/Isopropanol	10 minutos cada em ultrassom
Plasma O ₂	10 minutos, vácuo de 1 mbar e potência de 45 W
Plasma N ₂	10 minutos, vácuo de 1 mbar e potência de 45 W

4.2.2 Formação da Self Assembled Monolayer

A superfície de ouro dos sensores utilizados neste estudo foi funcionalizada com a SAM de 11-MUA (95% de pureza, peso molecular 218,36 g/mol, COD 450561-5G) fornecida pela Sigma Aldrich. Uma solução com uma concentração de 50 mM foi preparada utilizando etanol PA como solvente. Os sensores, previamente limpos utilizando os três métodos mencionados, foram imersos na solução de 11-MUA por um período de 18 horas. Em seguida, duas condições foram avaliadas: na primeira, os sensores não foram lavados após a incubação com 11-MUA; na segunda, os sensores foram submetidos a cinco lavagens com etanol PA para remover as moléculas não ligadas. A formação da SAM sobre a superfície dos sensores foi avaliada por Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR).

A técnica de FTIR estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria. É uma ferramenta analítica utilizada para avaliar a composição química de materiais com base na absorção de radiação infravermelha. Funciona medindo a intensidade das vibrações moleculares de uma amostra em diferentes comprimentos de onda da região do infravermelho. Essas vibrações são características de grupos funcionais específicos e apresentam valores quantizados de energia. Durante a análise, a luz infravermelha atravessa a amostra e é detectada após a absorção por grupos moleculares específicos. Dessa forma, é possível fazer a identificação de compostos orgânicos e inorgânicos, bem como a análise de estruturas moleculares. O resultado é fornecido em um espectro que relaciona o comprimento de onda com a

intensidade do sinal medido. A técnica de ATR funciona medindo a absorção de radiação infravermelha por uma amostra em contato direto com um cristal de alto índice de refração, como o germânio ou o diamante, através do fenômeno de reflexão total atenuada. Durante a análise, a luz infravermelha penetra na amostra apenas superficialmente, com profundidades de penetração típicas na faixa de alguns micrômetros a alguns nanômetros, dependendo do ângulo de incidência e do índice de refração do material, interagindo com a camada adjacente à interface com o cristal. Isso permite a análise de amostras em estado sólido ou líquido, sem a necessidade de preparação especial. A partir dessa técnica é possível obter informações sobre a estrutura química, ligações moleculares e grupos funcionais presentes na amostra (121). Enquanto a técnica de FTIR convencional analisa a amostra como um todo, a técnica de ATR-FTIR foca na interface entre a amostra e o cristal, proporcionando uma análise mais específica da superfície. Por essa razão, a técnica de ATR foi escolhida para a caracterização da superfície dos biossensores deste trabalho.

Os sensores foram avaliados em um equipamento Spectrum 400, PerkinElmer na faixa de 450 a 4000 cm^{-1} , com 128 varreduras, no modo de transmitância e com resolução de 4 cm^{-1} . Para um bom resultado é necessário um contato íntimo entre a superfície da amostra com o cristal, portanto, quanto menor for a rugosidade da superfície, melhor será o resultado. Dessa forma, apenas o lado liso dos sensores foi avaliado.

4.2.3 Imobilização dos anticorpos

Os grupos terminais de ácido carboxílico do 11-MUA foram ativados através da química EDC/NHS. As concentrações escolhidas de EDC/NHS foram 200/50 mM, respectivamente, e a mistura foi preparada na proporção de 1:1. Água ultrapura (pH 5,0) foi utilizada como solvente. Os sensores contendo 11-MUA (tanto os lavados quanto os não lavados) foram imersos na solução de EDC/NHS por 30 minutos, seguidos por duas lavagens com água ultrapura.

Posteriormente, os sensores foram expostos a uma solução 25 $\mu\text{g/ml}$ de anticorpos (FAPON anti-639 – Figura A2 (a)) específicos para a proteína recombinante do Sars-CoV-2. O tempo de incubação foi de 1 hora, na temperatura de 37°C. Em seguida, os sensores foram lavados 3 vezes com

solução de PBS. A eficácia da imobilização dos anticorpos foi avaliada por ATR-FTIR, mantendo-se as mesmas condições de ensaio utilizadas para o 11-MUA.

4.2.4 Bloqueio da superfície

Por fim, a superfície dos sensores foram bloqueadas pelo período de 1 hora, na temperatura de 21 °C com 1% de BSA diluído em solução de PBS. Ao término desse procedimento, os sensores foram lavados três vezes com PBS e três vezes com água destilada, antes de serem secos com fluxo de N₂.

4.2.5 Diagnóstico

Com os biossensores funcionalizados, foram realizadas medidas de frequência de ressonância para biossensores de teste (exposto ao antígeno) e de controle (não expostos ao antígeno). Para isso, foi utilizado o sistema de medição otimizado descrito no Capítulo 3. Os valores de frequência de ressonância dos biossensores foram registrados a cada 5 minutos, durante um período total de 30 minutos. Além disso, um grupo de biossensores de testes e controles foi mantido em contato com as amostras por 24 horas. Para esse grupo, a frequência de ressonância foi medida no início e ao término do ensaio. A partir dessas medidas foi possível construir um gráfico que relaciona a variação na frequência em função do tempo de exposição dos biossensores às soluções com e sem antígeno.

Tanto para medir os biossensores de teste quanto os de controle, foi essencial empregar as nanopartículas de ouro para amplificar o sinal de resposta. Para isso, AuNPs foram previamente funcionalizadas tornando-as aptas a capturar o antígeno e, em seguida, ligar-se à superfície do biossensor. A funcionalização foi realizada em AuNPs fornecidas pela Sigma Aldrich, com diâmetro de 40 nm estabilizadas em solução de citrato (COD 753637). O processo de conjugação dos anticorpos foi realizado por adsorção física e envolveu várias etapas. Primeiro, as nanopartículas de ouro foram lavadas por centrifugação com uma força centrífuga relativa (rcf) de 1400 por 20 minutos para remover a solução de citrato. Em seguida, o anticorpo policlonal para Sars-CoV-2 (FAPON anti-554 – Figura A2 (b)) foi incubado com as AuNPs por 1 hora

a 21°C. Após a incubação, as nanopartículas foram novamente centrifugadas e lavadas com solução de PBS para remover os anticorpos não ligados. As AuNPs foram então suspensas em solução de 1% de BSA e mantidas a 21°C por 1 hora para bloquear superfícies e moléculas não ligantes. Finalmente, uma última lavagem, por centrifugação, com solução de PBS, foi realizada e as AuNPs foram ressuspensas em solução de PBS.

Para a realização do diagnóstico, biossensores de teste, ou seja, os controles positivos, foram expostos a uma solução contendo o antígeno e AuNPs funcionalizadas. Para os de testes, o antígeno utilizado foi uma proteína recombinante do Sars-CoV-2 (FAPON 516 – Figura A2 (c)) na concentração de 1000 ng/ml. A solução foi preparada em PBS com RIPA. O RIPA consiste em uma mistura de detergentes que facilita as cinéticas de ligação antígeno/anticorpo. Por sua vez, os biossensores de controle, ou seja, os controles negativos, foram expostos apenas a uma solução de PBS e RIPA com AuNPs funcionalizadas. O volume de amostra utilizado foi de 60 µL para cada biossensor dos quais 57 µL eram amostra e 3 µL AuNPs na concentração de $\sim 1,44 \times 10^9$ nanopartículas/mL.

Por fim, a superfície dos biossensores de teste e controle após as medidas de 30 minutos e 24 horas foi avaliada por MEV/FEG e Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDS). As imagens foram obtidas no modo SE com uma tensão de aceleração de 15 kV.

4.3 Resultados e discussão

Devido à sua importância no processo de funcionalização, três processos de limpeza da superfície de ouro foram avaliados. A Figura 21 apresenta os resultados das medidas de ângulo de contato para cada um dos processos de limpeza em ambas as superfícies do biossensor, lisa e rugosa. Os resultados do ângulo de contato da água com as superfícies sem limpeza foram de 66° para o lado liso e 48° para o rugoso. Este comportamento pode estar associado aos modelos de molhabilidade das superfícies. Superfícies mais rugosas tendem a ter um ângulo de contato menor com a água. Isso porque a rugosidade cria mais locais para a água penetrar, reduzindo a capacidade da água de formar uma gota compacta e, conseqüentemente, diminuindo o ângulo de contato. Esta teoria é

explicada teoricamente pelo modelo de Wenzel. Em contraste, superfícies mais lisas tendem a ter um ângulo de contato maior, já que a água tem uma menor área de contato e forma uma gota mais compacta. Para este caso, o modelo de Cassie-Baxter explica que a gota não penetra nas cavidades diminuindo o contato direto com a superfície (122).

Em relação as superfícies limpas com acetona e isopropanol, as medidas revelaram maior ângulo de contato com a água, ou seja, a superfície apresentou um caráter mais hidrofóbico, tanto para a superfície lisa (70°) quanto para a rugosa (73°), inclusive, o ângulo de contato foi maior do que para as superfícies sem limpeza. Esses resultados indicam que a limpeza pode ter removido parcialmente as sujidades da superfície de ouro e modificado o seu comportamento em relação ao ângulo de contato com a água. A partir deste resultado não é possível afirmar que a superfície está completamente limpa, porém pode-se dizer que essa limpeza causou modificações superficiais.

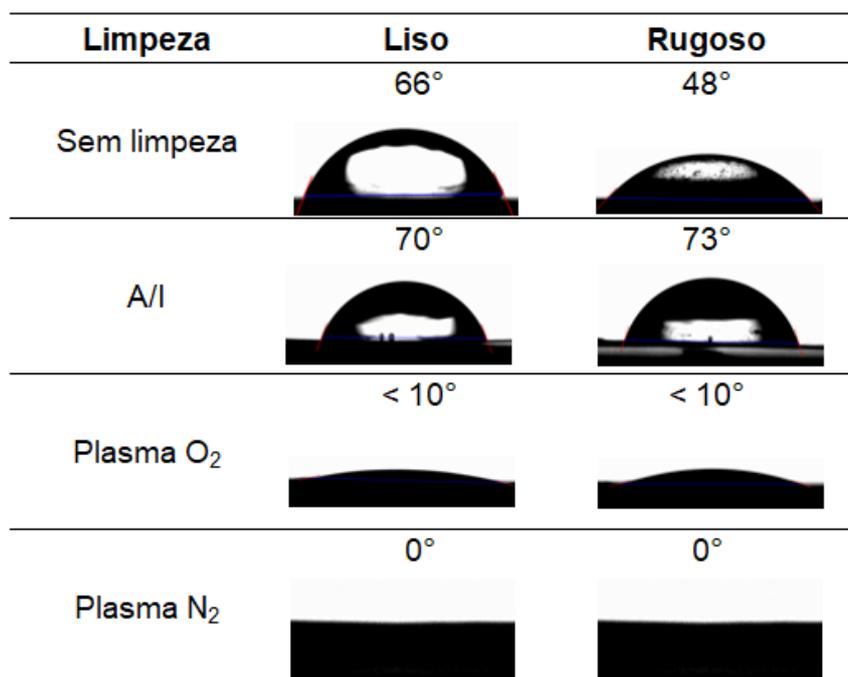


Figura 21. Ângulo de contato da água em função do tipo de limpeza superficial realizado

Por outro lado, os sensores limpos com plasma, tanto de O₂ quanto N₂, apresentaram ângulos de contato muito baixos, ou seja, as superfícies em ambos os lados apresentaram caráter totalmente hidrofílico com ângulos de contato próximos a zero. Conforme descrito na literatura, um ângulo de contato

próximo a zero em uma superfície de ouro indica que ela está limpa (108). Entretanto, após 24 horas da limpeza, observou-se que as superfícies perdem o caráter hidrofílico, ou seja, o ângulo de contato com a água aumentou (Figura 22). Esse comportamento pode ter relação com a formação óxidos ou mesmo pela adsorção de contaminantes na superfície (123).

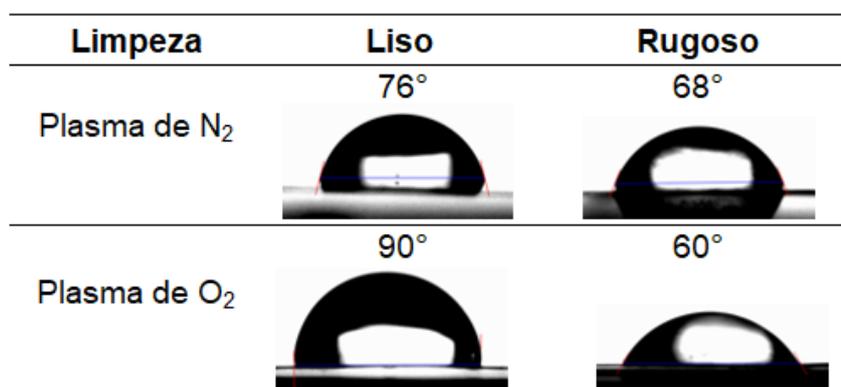


Figura 22. Ângulo de contato da água após 24 horas para as superfícies limpas com plasma

Entre os métodos de limpeza investigados, o processo envolvendo acetona e isopropanol emerge como o mais simples, quando comparado às tecnologias que requerem o uso de plasma. Este último demanda equipamentos especializados e protocolos mais complexos. Embora o ensaio de ângulo de contato tenha fornecido indicações sobre as alterações superficiais decorrentes de cada tipo de limpeza, a avaliação final da eficácia desses métodos é determinada pela capacidade de imobilização das moléculas biológicas na superfície do biossensor. Assim, os sensores submetidos aos três tipos de limpeza foram expostos à solução de 11-MUA e, posteriormente, avaliados por ATR-FTIR. A Figura 23 apresenta o espectro de infravermelho característico do 11-MUA, no qual são observadas bandas de absorção nos comprimentos de onda de 2915 e 2848 cm^{-1} referentes ao estiramento assimétrico dos grupos $-\text{CH}_2$ presentes na molécula, e uma banda em aproximadamente 1690 cm^{-1} que se refere ao estiramento do grupo cetona, $\text{C}=\text{O}$. Além disso, existe uma banda de absorção muito discreta em aproximadamente 2500 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação $\text{S}-\text{H}$ (124).

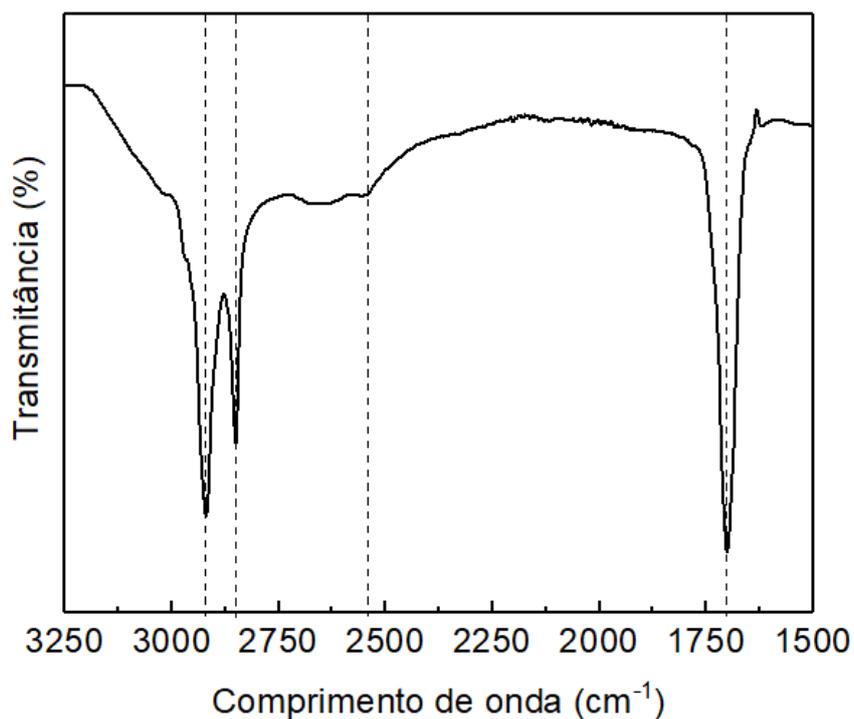


Figura 23. Espectro infravermelho do 11-MUA

Os espectros de infravermelho apresentados na Figura 24 foram obtidos a partir da superfície dos sensores, após incubação com o 11-MUA, considerando os diferentes processos de limpeza aplicados.

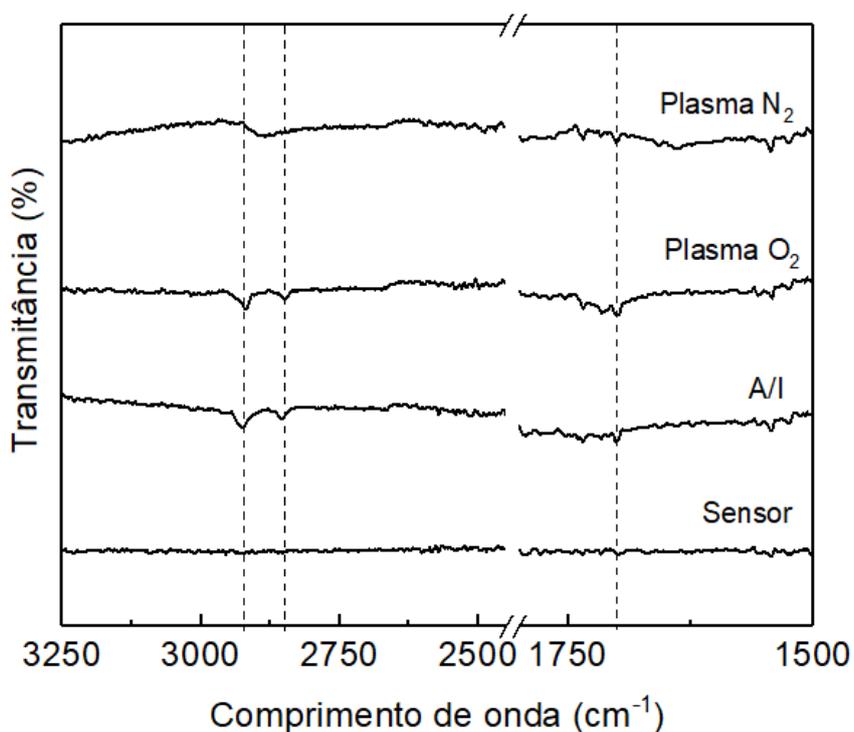


Figura 24. Espectro da superfície lisa dos biossensores com 11-MUA na superfície em função de cada tipo de limpeza

Os resultados revelaram a presença das bandas características do 11-MUA, principalmente em 2915 e 2848 cm^{-1} , nos sensores limpos com acetona e isopropanol e plasma de O_2 . Para os sensores limpos com plasma de N_2 , essas bandas não foram identificadas, impossibilitando a confirmação da presença do 11-MUA na superfície.

Devido à simplicidade da limpeza com acetona e isopropanol, em comparação com as técnicas de plasma, optou-se por utilizar essa abordagem para a funcionalização dos biossensores. Dois grupos de sensores foram expostos à solução de 11-MUA por 18 horas após a limpeza. Em seguida, a solução de 11-MUA foi removida dos sensores. Um grupo de sensores não foi submetido à lavagem após a aplicação do 11-MUA, enquanto o outro foi lavado cinco vezes com etanol PA. A partir do espectro de infravermelho obtido para os sensores não lavados (Figura 25a) observou-se a presença das bandas características do 11-MUA, inclusive a banda no comprimento de onda próximo a 2500 cm^{-1} que indica a presença do grupo SH. Já para os sensores lavados (Figura 25b), além da intensidade das bandas mais baixa em relação aos não lavados, a banda em 2500 cm^{-1} não foi claramente identificada. Na espectroscopia de infravermelho, a ausência de um grupo característico, como a banda SH, por exemplo, pode ser interpretada como evidência da ligação à superfície através dessa funcionalidade específica. Portanto, a ausência da banda em 2500 cm^{-1} indica que o 11-MUA está ligado ao ouro por meio do grupo tiol (124). Por outro lado, a presença desta banda nos sensores não lavados sugere que o 11-MUA está em excesso na superfície.

Não foi possível obter valores quantitativos sobre a adsorção da molécula de 11-MUA a partir dos espectros de ATR-FTIR. Isso se deve ao tamanho reduzido das moléculas de 11-MUA, que formam uma monocamada de apenas 3 nm na superfície do sensor (107). Além disso, a irregularidade da superfície do sensor compromete a resolução do ensaio, tornando a quantificação ainda mais desafiadora. Mesmo o lado mais liso do sensor apresenta uma rugosidade média de 40 nm, um valor significativamente maior do que o da monocamada. No entanto, o principal objetivo do ensaio foi confirmar a presença do 11-MUA na superfície do sensor em condições reais de aplicação.

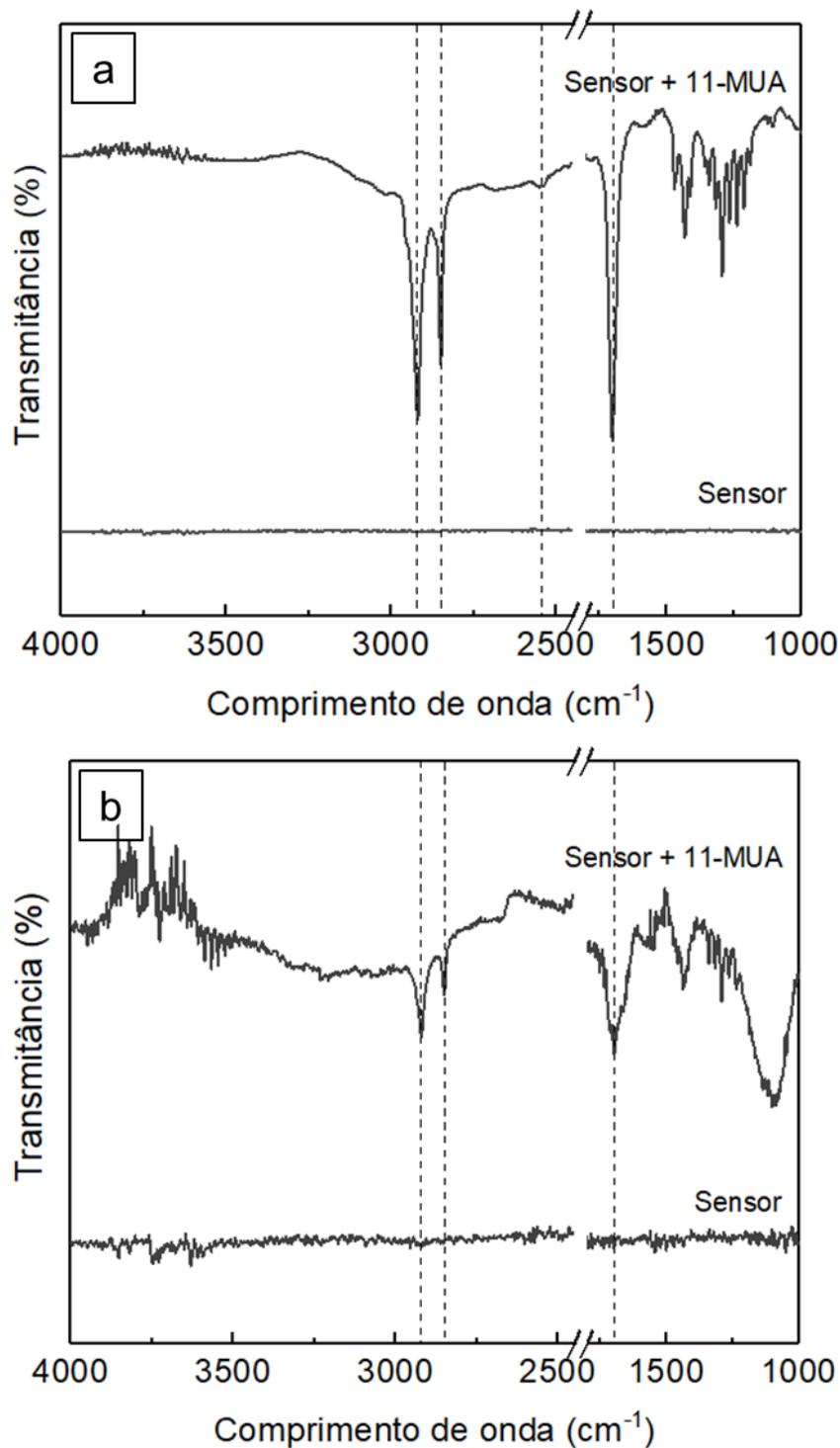


Figura 25. Espectro de infravermelho de um sensor com 11-MUA (a) sem lavagem e (b) com cinco lavagens subsequentes

Após a formação da monocamada de 11-MUA, a próxima etapa na funcionalização do biossensor foi a imobilização dos anticorpos na superfície. A eficácia desse processo também foi avaliada por meio da técnica de ATR-FTIR, tanto para os sensores que passaram pelo processo de lavagem do 11-MUA

(Figura 26a), quanto para aqueles que não foram submetidos a essa etapa (Figura 26b).

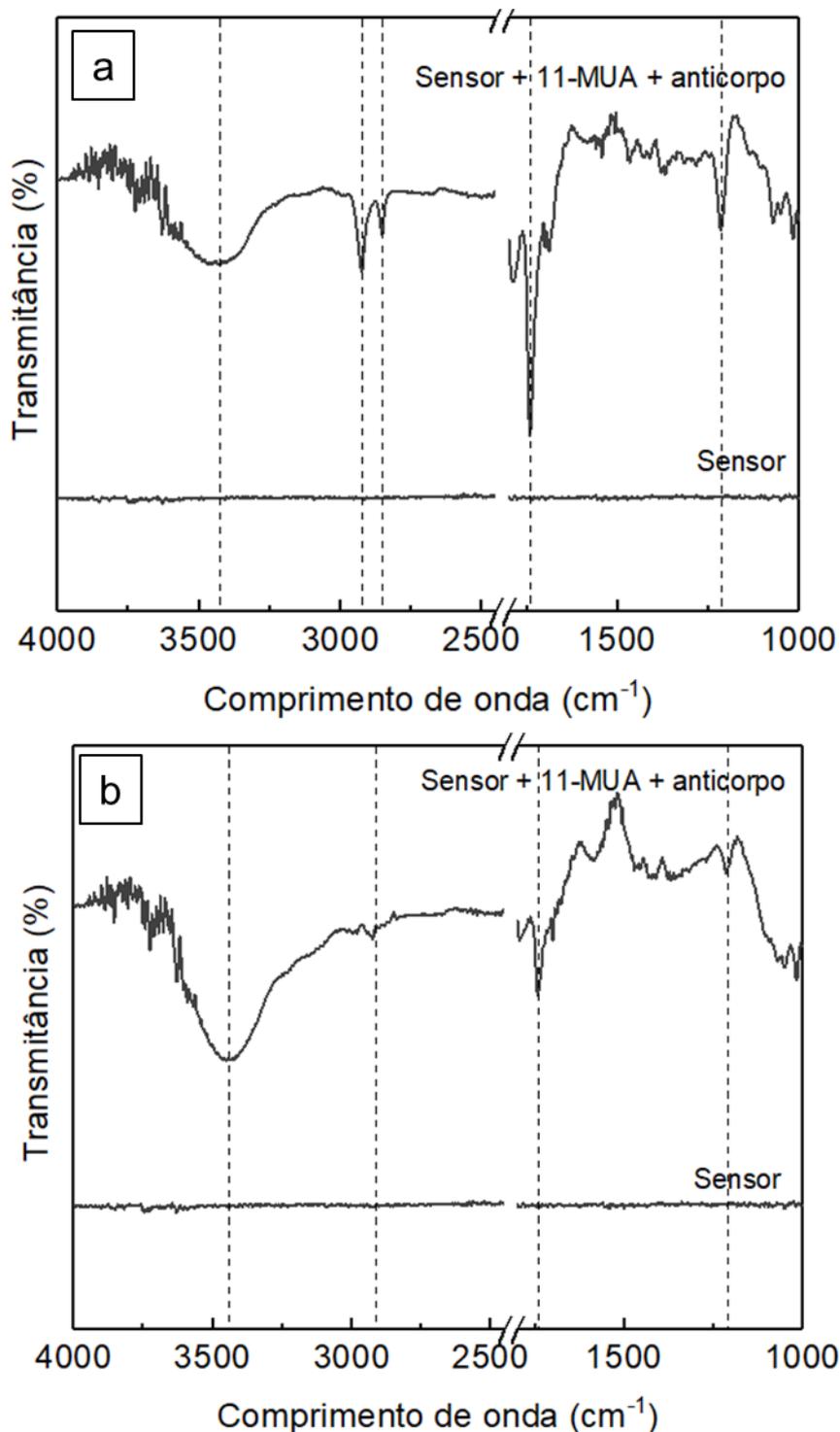


Figura 26. Espectro de infravermelho de um sensor com 11-MUA e anticorpos (a) sem lavagem e (b) com cinco lavagens subsequentes

Para ambos os casos, foi identificada uma banda alargada próxima ao comprimento de onda de 3400 cm⁻¹. De acordo com a literatura (59,125), essa

banda pode ser atribuída ao estiramento do grupo hidroxila, -OH, presente na estrutura dos anticorpos IgG (Figura 19). As bandas observadas em 2915 e 2848 cm^{-1} estão relacionadas às vibrações de estiramento das ligações -CH₂, presentes tanto na molécula de 11-MUA como nos anticorpos. Já a banda identificada em 1700 cm^{-1} corresponde, quase inteiramente, aos modos de vibração de alongamento de C=O a partir de ligações peptídicas. Por fim, a banda observada em 1215 cm^{-1} corresponde a vibração de amidas III presentes no anticorpo (126).

Em relação aos protocolos de lavagem, observou-se que o grupo de sensores não lavados exibiu bandas mais intensas nos comprimentos de onda de 2915 e 2848 cm^{-1} , sugerindo um possível excesso desta molécula na superfície do sensor. Em contrapartida, para o grupo de sensores que passou pela lavagem após a aplicação do 11-MUA, a banda em 3400 cm^{-1} apresentou maior intensidade em comparação com o grupo de sensores não lavados. Embora a análise de ATR-FTIR, da forma como foi utilizada para esta avaliação, não forneça um resultado quantitativo, essa observação sugere uma maior quantidade de anticorpos na superfície desses sensores.

Após a funcionalização do biossensor, foram conduzidas leituras de frequência de ressonância ao longo do tempo para os biossensores de teste e de controle. O gráfico da Figura 27 apresenta os resultados obtidos. Conforme esperado, os biossensores de controle, que não foram expostos à proteína recombinante do Sars-CoV-2, apresentaram uma variação de frequência de ressonância de -40 Hz ao longo do período de medição de 30 minutos. Em contraste, os biossensores de teste, que foram expostos à solução contendo a proteína recombinante, exibiram uma variação de frequência de ressonância de -160 Hz durante o mesmo intervalo de medição.

Esses resultados indicam que, para os biossensores de teste, houve a captura da proteína recombinante pelas AuNPs funcionalizadas, as quais, por sua vez, se ligaram aos anticorpos presentes na superfície do biossensor. Essa sequência de eventos resultou em um aumento de massa na superfície do biossensor e, conseqüentemente, na redução de sua frequência de ressonância. A pequena variação na frequência de ressonância observada nos biossensores de controle pode ser atribuída a adsorção física que possivelmente ocorreu em

regiões da superfície do biossensor onde o bloqueio não foi totalmente eficaz, bem como a fatores do próprio sistema de medição.

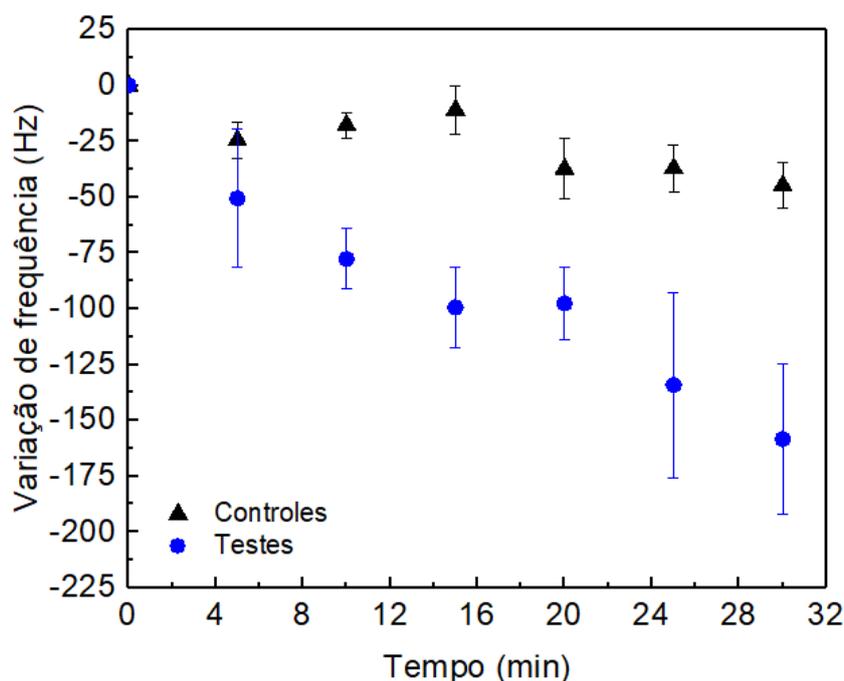


Figura 27. Variação de frequência de ressonância em função do tempo para biossensores de teste (azul) e controle (preto)

A partir das Equações 1 e 2 e dos resultados de variação de frequência de ressonância apresentados, foi obtida uma sensibilidade de massa para esses biossensores igual a $196 \text{ Hz}/\mu\text{g}$. Huang et al. (35) construíram um biossensor magnetoelástico para detecção de lisozimas e obtiveram uma sensibilidade de massa de $138 \text{ Hz}/\mu\text{g mL}^{-1}$. No trabalho de Sang et al. (55), o biossensor desenvolvido para detecção de albumina sérica humana apresentou sensibilidade de $8,70 \text{ Hz}/\mu\text{g mL}^{-1}$ e Guo et al. (47), desenvolveram um biossensor para detecção de anticorpos da febre suína e obtiveram sensibilidade de $56,2 \text{ Hz}/\mu\text{g mL}^{-1}$.

As imagens de MEV/FEG confirmaram a presença das AuNPs na superfície dos biossensores. Inicialmente, o diâmetro das estruturas esféricas observadas foi avaliado. A Figura 28 apresenta AuNPs sobre o biossensor, que apresentaram diâmetro médio de 45 nm, em conformidade com o tamanho esperado de 40 nm.

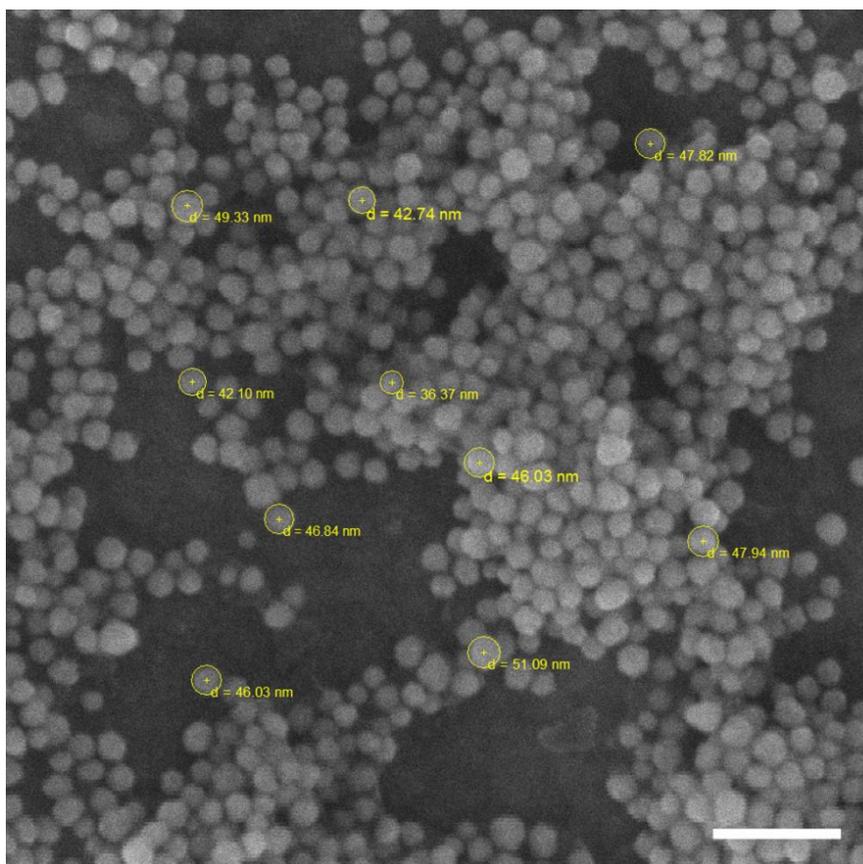


Figura 28. Imagem de MEV/FEG da superfície do biossensor de teste para confirmar o tamanho das AuNPs. As medidas de diâmetro foram realizadas com o software de microscópio MIRA MEV/FEG da Tescan. A barra de escala da imagem corresponde a 200 nm

As imagens obtidas dos biossensores de teste e de controle logo após a conclusão do ensaio revelaram diferenças significativas. Enquanto o biossensor de controle (Figura 29a) exibiu apenas algumas AuNPs na superfície, o biossensor de teste (Figura 29b) apresentou uma quantidade visivelmente maior delas, cobrindo toda a superfície. Nas imagens ampliadas, na parte superior, foi possível confirmar a estrutura esférica das AuNPs. Além disso, nas imagens com ampliação menor, na parte inferior, observou-se que as AuNPs estavam presentes sobre toda a superfície.

Apesar dos esforços dedicados à remoção do sal através de múltiplas lavagens com água, sua completa eliminação da superfície do biossensor para as análises de microscopia não foi alcançada. Esta persistência do sal pode ser observada através das estruturas mais claras e com forma cúbica nas imagens microscópicas, indicando sua presença residual. Essas estruturas cristalinas sugerem que o sal, possivelmente cloreto de sódio (NaCl), permaneceu aderido à superfície do biossensor mesmo após os procedimentos de lavagem.

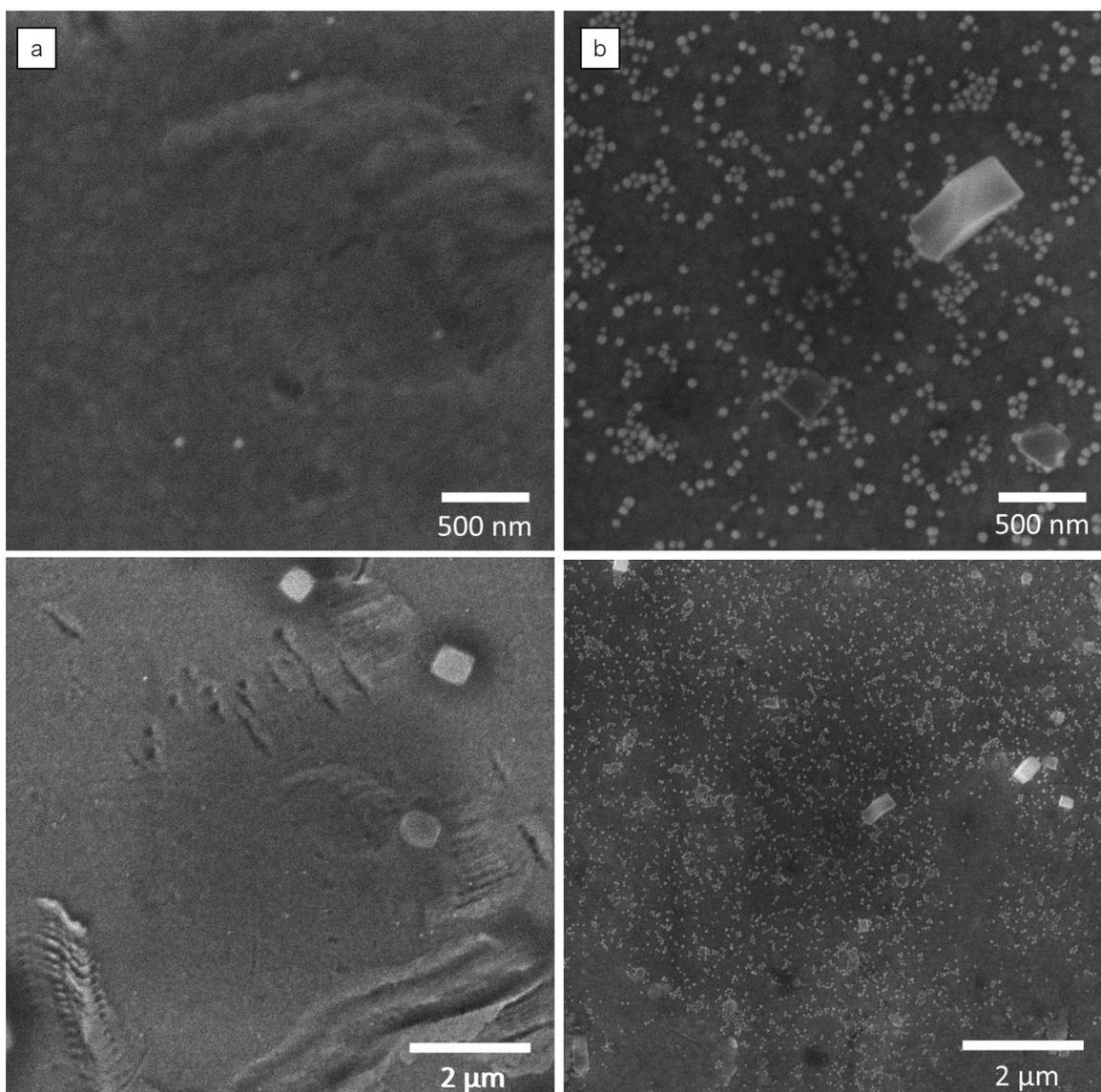


Figura 29. Imagens de MEV/FEG dos biosensores após o período de 30 minutos de análise. Em (a) biossensor de controle e (b) biossensor de teste

Conforme ilustrado na Figura 30, as estruturas observadas, juntamente com as AuNPs, revelam a presença dos elementos químicos sódio (Na) e cloro (Cl), identificados como cloreto de sódio. Este composto é proveniente do tampão PBS utilizado durante o processo de leitura dos biosensores. No entanto, sua presença não implica necessariamente que esse sal tenha se formado durante as leituras de frequência de ressonância. É mais provável que o sal tenha cristalizado durante o processo de secagem dos biosensores para a obtenção das imagens de microscopia.

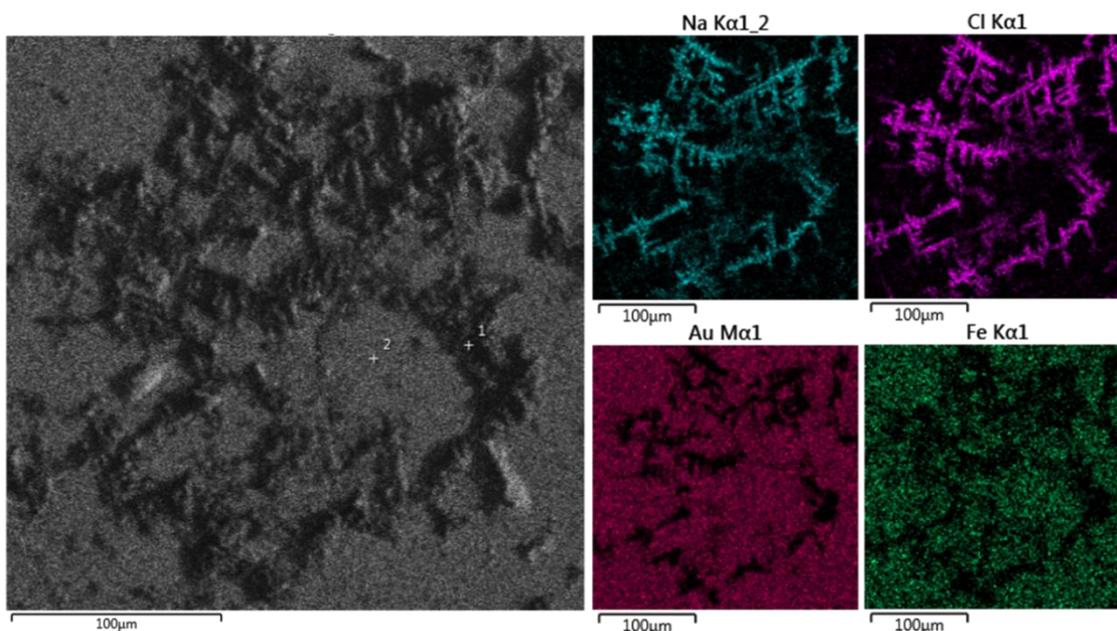


Figura 30. Imagens MEV/EDS da superfície do biossensor confirmando a presença do sal (NaCl)

De qualquer forma, é crucial destacar que a cristalização de sais, especialmente provenientes das soluções tampão, representa um desafio significativo que requer abordagens cuidadosas. Como discutido anteriormente no Capítulo 1, a formação de cristais de sais pode interferir de forma negativa nas análises e resultados experimentais, afetando a precisão e a confiabilidade dos dados obtidos. Portanto, é essencial minimizar a ocorrência e o impacto da cristalização de sais durante o processo experimental.

A variação de frequência de ressonância de -160 Hz observada nos biossensores de teste ao longo do ensaio de 30 minutos foi considerada suficiente para diagnosticar a presença da proteína recombinante do Sars-CoV-2. No entanto, outro conjunto de biossensores de teste e controle foi submetido a um período de avaliação estendido de 24 horas, a fim de investigar a resposta desses biossensores em um período mais longo. Nesse caso, a frequência de ressonância foi medida no início e ao final do ensaio, para evitar leituras imprecisas decorrentes de fatores extrínsecos, em um período elevado de teste, como variações de temperatura, por exemplo. As Figuras 31 e 32 apresentam, respectivamente, os resultados obtidos relativos à variação de frequência de ressonância e à adsorção das AuNPs sobre a superfície dos biossensores.

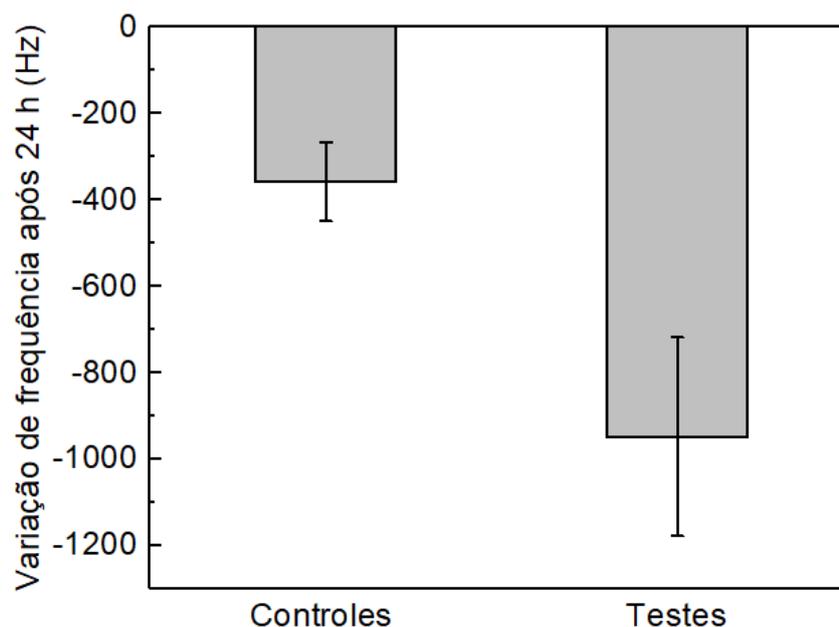


Figura 31. Variação de frequência de ressonância dos biossensores de controle e de teste após período de 24 horas de ensaio

Após 24 horas de exposição dos biossensores às soluções contendo AuNPs funcionalizadas, tanto com quanto sem antígeno, a variação da frequência de ressonância foi registrada em aproximadamente -357 Hz para os controles e -950 Hz para os testes. As imagens de microscopia corroboram esses resultados, mostrando que os biossensores de teste exibem uma quantidade significativamente maior de AuNPs em comparação com os de controle. Além disso, observou-se a formação de aglomerados de AuNPs na superfície dos biossensores de teste, bem como uma distribuição não uniforme. Esse fenômeno pode estar associado ao próprio processo de secagem, o qual pode levar à desestabilização das nanopartículas à medida que o biossensor é preparado para a análise por microscopia.

No entanto, além disso, a presença de uma quantidade maior de AuNPs distribuídas de forma irregular sobre a superfície, com sobreposição em várias camadas e consequente concentração de massa em alguns pontos, pode justificar uma margem considerável de erro nas medições. A variabilidade na distribuição das AuNPs pode introduzir uma fonte adicional de incerteza nas medições, dificultando uma análise precisa e reproduzível dos resultados.

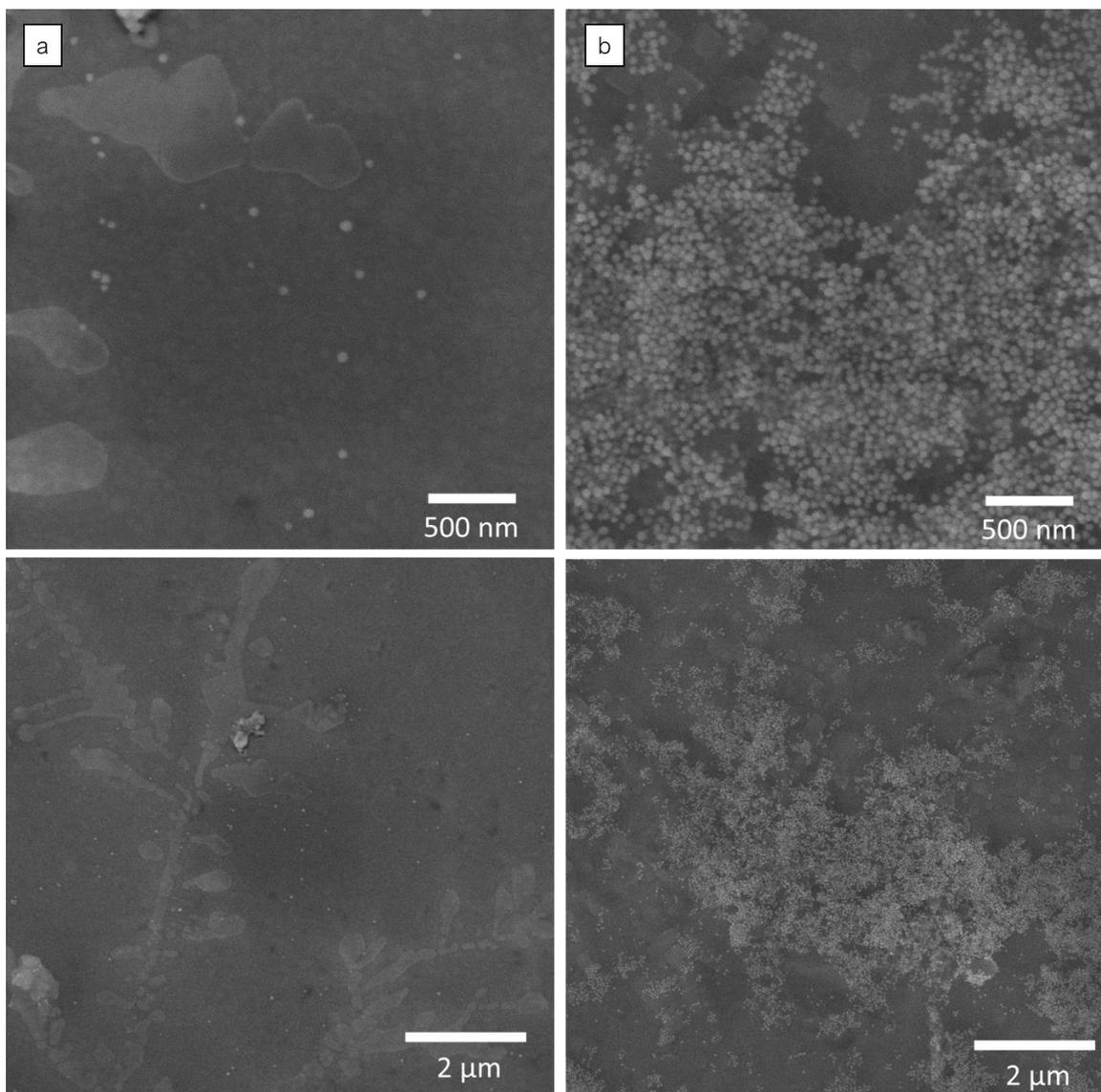


Figura 32. Imagens de MEV/FEG dos BSM após o período de 24 horas de análise. Em (a) biossensor de controle e (b) biossensor de teste

4.4 Conclusão

Esta etapa do estudo evidenciou a viabilidade do uso de biossensores magnetoelásticos na detecção da proteína recombinante do Sars-CoV-2. Foram estudados, especificamente, o processo de funcionalização da superfície do biossensor e a análise da variação da frequência de ressonância em biossensores de teste e controle, correlacionada ao aumento de massa causado pela adsorção de nanopartículas de ouro funcionalizadas.

As etapas de funcionalização foram examinadas utilizando a técnica de ATR-FTIR, que permitiu a verificação da eficácia da imobilização dos anticorpos na superfície do biossensor por meio da ligação com a *self-assembled monolayer*

de 11-MUA. Com o biossensor funcionalizado, foram conduzidas medidas de variação de frequência de ressonância ao longo do tempo para ambos os biossensores, de teste e controle, utilizando AuNPs para amplificar o sinal de resposta. Durante um ensaio de 30 minutos, observou-se uma variação na frequência de ressonância de aproximadamente -40 Hz para os biossensores de controle, e -160 Hz para os biossensores de teste, revelando uma sensibilidade de massa de cerca de 196 Hz/ μ g. A presença das AuNPs na superfície dos biossensores foi confirmada por microscopia.

Um ensaio prolongado, com duração de 24 horas, demonstrou uma variação na frequência de ressonância de aproximadamente -357 Hz para os biossensores de controle e -950 Hz para os de teste. Apesar dos resultados mais promissores, a presença de uma quantidade maior de AuNPs distribuídas de forma irregular na superfície, com concentração de massa em alguns pontos, pode ter contribuído para a baixa reprodutibilidade dos resultados, evidenciada pelo alto valor do desvio padrão observado.

Em resumo, foi possível diagnosticar a proteína recombinante do Sars-CoV-2, contudo, é necessário explorar estratégias para aprimorar a reprodutibilidade dos resultados, visando melhorar o desempenho, a precisão e a confiabilidade dos biossensores magnetoelásticos, especialmente para aplicações diagnósticas de detecção de vírus.

Influência do posicionamento de massa na sensibilidade dos biossensores magnetoelásticos

O posicionamento da massa adsorvida sobre a superfície do biossensor é um ponto chave para aumentar tanto a sensibilidade quanto a confiabilidade desses dispositivos. Este capítulo se concentra em explorar essa questão, apresentando uma breve introdução seguida de estudos teóricos e práticos que apontam alternativas para aprimorar o desempenho dos biossensores magnetoelásticos. Este capítulo foi realizado no período de doutorado sanduíche no INL.

5.1 Introdução

Apesar dos progressos recentes no desenvolvimento de biossensores de alto desempenho, que utilizam dispositivos baseados em ondas acústicas como plataforma de detecção, existe a preocupação sobre o impacto da localização do carregamento da massa na sensibilidade dos biossensores. Conforme mencionado, é bem estabelecido que a variação de frequência de ressonância causada pelo carregamento da massa é fortemente afetada pela sua localização na superfície do biossensor (37).

Portanto, controlar a localização precisa da massa na superfície do biossensor é fundamental para aumentar sua sensibilidade, especialmente quando se trata da detecção de bactérias e/ou vírus. Uma distribuição da massa não controlada sobre a superfície do biossensor, implica na redução da sensibilidade e da reprodutibilidade dos resultados, principalmente pela presença dos pontos nodais sobre os quais a massa depositada não causa variação de frequência (37,38,43).

Alguns estudos avaliaram a influência do posicionamento da massa sobre os sensores magnetoelásticos a partir de simulações numéricas utilizando o

software MATLAB. Chai et al. (38), verificaram os efeitos da distribuição do carregamento de massa na sensibilidade de um sensor magnetoelástico sob diferentes modos de ressonância. Além disso, este mesmo grupo de pesquisa, estudou os “pontos cegos” e sensibilidade de massa de um biossensor com carregamento de massa assimétrico (36).

Estudos mais recentes utilizaram a análise de elementos finitos para avaliar o padrão de vibração de sensores magnetoelásticos com geometrias diferentes da retangular, comumente utilizada. Ren et al. (127), estudaram um sensor magnetoelástico em formato de ampulheta para medições de deformação e concluíram que o sensor apresentou alta sensibilidade, estrutura de fácil fabricação e baixo custo. Saiz et al. (128), estudaram sensores com formato de losango que apresentaram aumento no desempenho em um fator de 1,53 em relação ao sensor retangular tradicional e, conseqüentemente, uma melhoria de mais de 60% no valor da sensibilidade de massa. Saiz et al. (42), também demonstraram, tanto teórica quanto experimentalmente, que a sensibilidade do carregamento de massa pode ser melhorada adaptando a geometria do sensor e a posição da massa. Os pesquisadores testaram formas triangulares e triangulares arqueadas e compararam com a tradicional retangular. Eles observaram um aumento na sensibilidade de massa de mais de 400% usando as novas geometrias. Sensitividades ainda mais altas foram obtidas fazendo revestimentos parciais na borda do sensor em vez do tradicional revestimento uniforme completo. Os dois trabalhos citados utilizaram o software COMSOL *Multiphysics* para realização das simulações computacionais.

Conforme destacado na revisão teórica, é amplamente reconhecido que o posicionamento da massa exerce influência significativa na sensibilidade dos sensores magnetoelásticos e impacta diretamente sua confiabilidade. Embora diversos estudos tenham abordado a relevância do controle do posicionamento da massa na superfície do sensor, destacando sua importância em aplicações diversas, não existem pesquisas na literatura que abordem a aplicação prática da funcionalização controlada para biossensores. Esta lacuna na pesquisa representa uma oportunidade para explorar e aprimorar as técnicas de funcionalização, visando otimizar a sensibilidade e a eficácia dos biossensores em diversas aplicações.

5.2 Experimental

5.2.1 Posicionamento da massa

Simulações teóricas da frequência de ressonância, no primeiro e no terceiro modos de vibração, e das cargas de massa foram conduzidas utilizando a análise de elementos finitos no software COMSOL *Multiphysics* (42). O objetivo dessas simulações foi determinar a frequência de ressonância, bem como o padrão característico da vibração longitudinal pura para cada amostra, analisando o efeito do posicionamento da massa na superfície do sensor. Para isso, foi realizado um estudo de frequência própria, considerando apenas ondas elásticas puras que se propagam pela geometria do sensor. As frequências próprias, também conhecidas como frequências naturais, são valores discretos nos quais um sistema tem uma propensão intrínseca para vibrar. Quando um sistema vibra em uma frequência própria específica, ele assume uma forma característica chamada de modo próprio de vibração. Uma análise de frequências próprias revela os modos de vibração, mas não fornece informações sobre a amplitude das vibrações físicas (129).

Inicialmente, foi definida a estrutura sólida 3D do sensor, assumindo que o sensor tem liberdade de movimento em todas as direções, sem restrições. Introduziram-se então os parâmetros elásticos do material magnetoelástico (Metglas 2826MB: módulo de Young de 152 GPa, densidade de 7900 kg/m³ e índice de Poisson de 0,33 (30)) e o padrão de ressonância simulado em cada modo de vibração foi obtido.

Para simular a variação da frequência em função da posição e quantidade de massa depositada, uma nova camada na superfície do sensor foi definida, considerando três posições distintas (conforme Figura 33): massa distribuída uniformemente na superfície do sensor (5 x 1 mm²); massa posicionada apenas no centro do sensor (1 x 1 mm²); e massa posicionada nas duas extremidades do sensor (2 x 1 mm²). A massa foi aplicada em apenas um lado do sensor. No primeiro ensaio ela foi aplicada na quantidade de 0,2 µg/ mm² e, no segundo, variando de 0 a 5 µg em cada posição.

Para confirmar os resultados das simulações, foi realizado um experimento com 3 grupos de 10 sensores cada. Inicialmente, os sensores foram

limpos com acetona e isopropanol, e suas frequências de ressonância foram medidas no primeiro e no terceiro modos de vibração. Em seguida, uma camada de ouro foi depositada no lado da superfície lisa dos sensores usando a técnica de *magnetron sputtering*, seguindo as três posições simuladas (uniforme, centro e extremidades). Os parâmetros de deposição foram consistentes com os mencionados na seção 3.2.3. Após as deposições, as frequências de ressonância dos sensores foram medidas novamente. A variação na frequência de ressonância foi calculada comparando os valores antes e depois das deposições. Para determinar a massa depositada, a espessura da camada de ouro foi medida por EDX (conforme descrito na seção 3.2.3) e a área de deposição por MEV/FEG. A densidade do ouro de $19,3 \text{ g/cm}^3$ foi considerada para os cálculos (130).

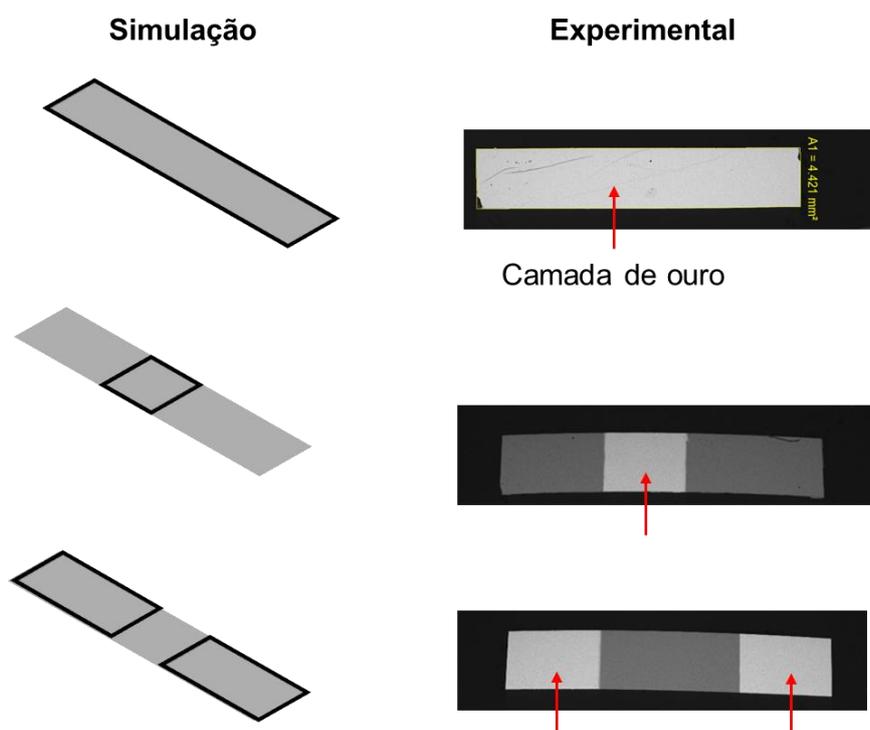


Figura 33. Imagens da simulação do posicionamento de massa na superfície do sensor (a delimitação contornada em preto exemplifica a região do sensor na qual a massa foi depositada) e imagens de MEV dos sensores utilizados para a parte experimental do trabalho

5.2.2 Funcionalização controlada

Para controlar o processo de funcionalização, foram exploradas as propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas da superfície de ouro. Inicialmente, os sensores passaram por uma etapa de limpeza com isopropanol e água, seguida

pelo uso de um limpador de ozônio ultravioleta (UV-O) para tratar apenas as áreas específicas destinadas à funcionalização. A imagem na Figura 34 ilustra um sensor que recebeu limpeza apenas nas extremidades. A característica hidrofóbica na região central do sensor restringiu a propagação da gota de água, resultando na sua retenção exclusivamente sobre a superfície hidrofílica. Durante os testes, foram avaliados volumes de 0,3 μL e 0,5 μL .

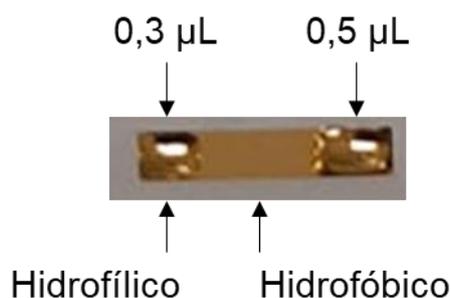


Figura 34. Sensor após o processo de limpeza com UV-O

Após a limpeza foi realizado o processo de funcionalização no qual foi utilizada a ligação entre as moléculas de biotina e estreptavidina para assegurar a ocorrência da reação biológica. A ligação entre biotina e estreptavidina é uma das interações mais fortes e específicas conhecidas na natureza. A biotina possui um grupo funcional na sua estrutura molecular que se liga fortemente a um sítio específico na estreptavidina, conhecido como sítio de ligação à biotina. Essa ligação é altamente estável e não é facilmente desfeita mesmo em condições extremas, como variações de pH ou temperatura. Por isso, para realizar a funcionalização controlada da superfície do biossensor foi utilizada uma molécula com terminação em biotina e nanopartículas de ouro funcionalizadas com estreptavidina.

O reagente Sulfo-NHS-Biotina (A39256, Thermo Scientific) utilizado na funcionalização contém uma molécula de biotina e um enxofre em sua estrutura. O enxofre se liga ao ouro presente na superfície do biossensor, enquanto a biotina permanece disponível para se ligar à estreptavidina presente nas AuNPs. As AuNPs, com um diâmetro de 40 nm e funcionalizadas com estreptavidina, foram adquiridas da Sigma Aldrich.

O protocolo de funcionalização seguiu as seguintes etapas: inicialmente, o sulfo-NHS-biotina foi diluído em 224 μL de água ultrapura para obter uma

solução 10 mM, que foi então incubada, por 1 hora, sobre as regiões pré-limpas do sensor. Para manter a umidade e evitar a secagem da gota, especialmente devido ao baixo volume de 0,5 μ L, uma câmara úmida foi empregada durante a incubação. Após essa etapa, os biossensores foram cuidadosamente lavados com solução tampão fosfato. Em seguida, a superfície dos biossensores foi bloqueada com uma solução de BSA 5% por 1 hora à temperatura ambiente, seguida de lavagens adicionais com tampão fosfato. Posteriormente, os biossensores funcionalizados foram expostos a uma solução de AuNPs. Para isso, 3 μ L de AuNPs foram diluídos em 27 μ L de tampão fosfato com tween 20 (0,05%). Os biossensores foram deixados em contato com as AuNPs por 12 horas à temperatura ambiente. Por fim, os biossensores foram lavados várias vezes com tampão fosfato e água ultrapura para remover as AuNPs que não se ligaram ao sulfo-NHS-biotina.

5.3 Resultados e discussão

Dada a influência do posicionamento da massa na sensibilidade dos biossensores (43), é fundamental compreendê-la para aprimorar o desempenho desses dispositivos. A Figura 35 ilustra o padrão característico da vibração longitudinal pura simulada para os primeiro e terceiro harmônicos. Na figura, a cor vermelha representa as regiões do sensor onde a vibração apresenta deslocamento máximo e as regiões em azul indicam onde é mínimo. Todos os pontos do sensor vibram na mesma frequência, porém com deslocamentos diferentes (38,128). A importância de compreender esses padrões está relacionada, conforme descrito na introdução desse capítulo, com os pontos cegos, nos quais a vibração é mínima e, conseqüentemente o deslocamento de frequência em resposta à variação de massa também. No primeiro harmônico, há apenas um ponto cego, enquanto no terceiro, há três. Além disso, a barra de escala à direita das imagens apresenta os valores de deslocamento, e evidencia que o deslocamento máximo é mais pronunciado para o terceiro harmônico. É importante destacar que os resultados das simulações fornecem informações sobre o deslocamento longitudinal, não sobre a amplitude da vibração.

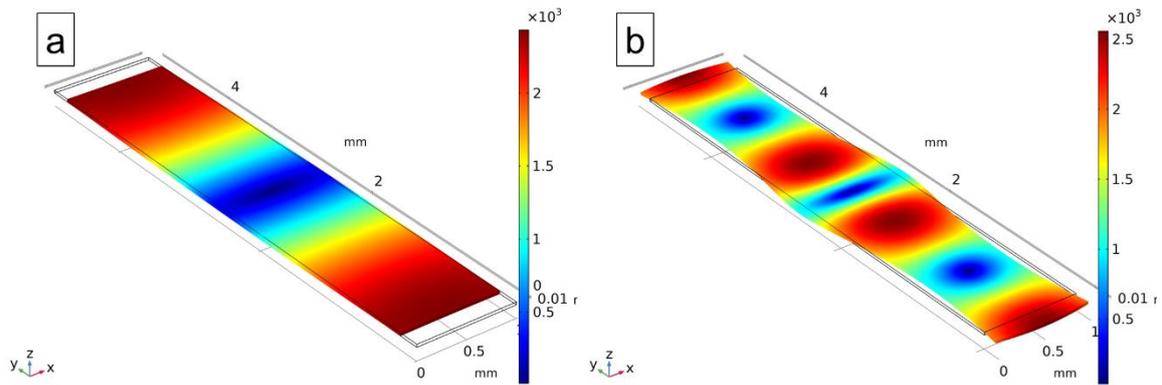


Figura 35. Imagem da superfície do sensor com o padrão característico da vibração longitudinal para (a) o primeiro harmônico e (b) terceiro harmônico

Após a simulação dos padrões de vibração, foi avaliada a influência do posicionamento da massa nas variações de frequência de ressonância. Para os dois casos, primeiro e terceiro harmônicos, as diferenças observadas entre os valores de variação de frequência de ressonância da simulação e do experimental podem estar associados com pequenas disparidades entre os parâmetros utilizados para simulação (E , ρ e ν). Os parâmetros teóricos utilizados foram obtidos na ficha técnica da fita magnetoelástica. No entanto, é importante reconhecer que, na prática, diferenças entre os valores teóricos e experimentais são inevitáveis, especialmente após a aplicação de tratamentos térmicos, os quais podem ligeiramente modificar o valor de E . Além disso, a massa depositada experimentalmente pode apresentar pequenas variações tanto em posição quanto em quantidade, nos 10 sensores de cada grupo.

A Figura 36 apresenta a comparação entre os resultados simulados (azul) e os resultados obtidos experimentalmente (cinza) com a massa posicionada nas três posições avaliadas (centro, pontas e uniforme) para os sensores medidos no primeiro harmônico. O valor de massa depositado na simulação foi de $0,2 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ que condiz com a quantidade de massa esperada para as interações biológicas. Já o valor de massa experimental depositado de ouro, mesmo sendo uma camada nanométrica de menos de 100 nm, foi de aproximadamente $2,80 \mu\text{g}/\text{mm}^2$. Isso justifica a inclusão dos dois eixos y no gráfico, que representam a variação da frequência de ressonância do sensor após a adição de massa. Esperava-se que os valores experimentais de variação de frequência fossem significativamente superiores aos simulados, devido às diferenças na quantidade

de massa depositada. No entanto, observou-se similaridade nos resultados, para todas as posições, entre os valores simulados e experimentais.

Para a massa aplicada no centro do sensor, a variação de frequência de ressonância, tanto para o resultado simulado quanto para o experimental, foi praticamente nula em comparação com a variação observada para a massa depositada uniforme ou nas pontas do sensor. Esse fenômeno pode ser atribuído ao fato de a região central do sensor ser um ponto cego (37,68). Além disso, os resultados mostraram uma variação de frequência muito similar entre a massa depositada uniformemente e somente nas pontas do sensor, mesmo com quantidade de massa diferentes, confirmando a teoria de que a massa depositada sobre um ponto nodal não causa variação de frequência de ressonância no sensor.

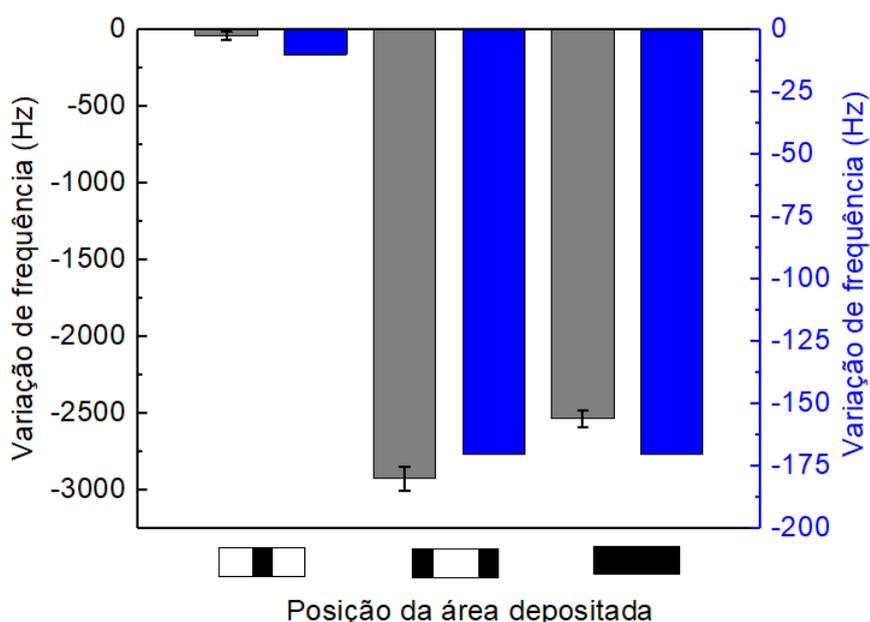


Figura 36. Variação da frequência de ressonância em função da posição da área depositada para o primeiro harmônico. Azul apresenta resultados da simulação e cinza do experimental.

De forma similar, para o terceiro harmônico a resposta em variação de frequência de ressonância como função da posição da massa depositada, entre os resultados simulados e experimentais foi a mesma. Porém, diferentemente do primeiro harmônico, o terceiro responde melhor a variação de massa quando esta é aplicada uniformemente na superfície e, em nenhuma das posições estudadas, a variação é nula, como no centro do sensor para o primeiro harmônico. Além disso, foi observado que para a mesma quantidade de massa,

a resposta de variação de frequência medida no terceiro harmônico foi maior em relação ao primeiro. Comparativamente, no primeiro harmônico a variação de frequência de ressonância para 14,25 μg de massa depositada uniformemente sobre a superfície do sensor, foi de aproximadamente -2500 Hz, enquanto para o terceiro foi de aproximadamente -7500 Hz. Isso significa que no terceiro harmônico a sensibilidade de massa é maior.

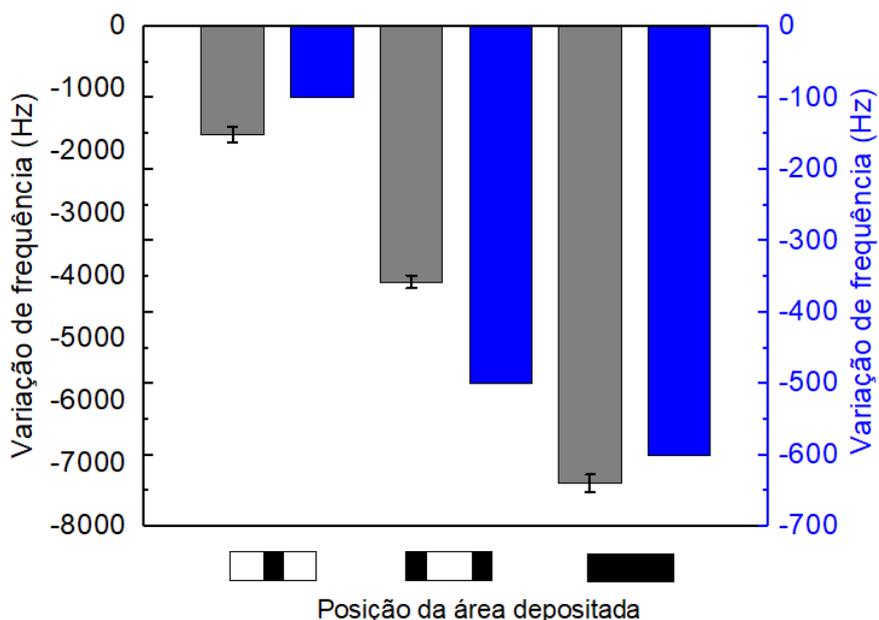


Figura 37. Variação da frequência de ressonância em função da posição da área depositada para o terceiro harmônico. Azul apresenta resultados da simulação e cinza do experimental.

Foram conduzidas simulações computacionais para investigar como a variação na quantidade de massa depositada, nas três posições distintas, afeta a frequência de ressonância dos sensores. No presente estudo, exclusivamente simulações computacionais foram empregadas para assegurar uma deposição exata e uniforme de massa nas três condições testadas: 1 μg depositado no centro, 0,5 μg em cada extremidade, e uniformemente distribuído sobre o sensor. A Figura 37 apresenta os resultados para o primeiro harmônico. Os resultados indicaram que para a massa depositada no centro do sensor a variação na frequência de ressonância foi praticamente nula para a faixa de 0 a 5 μg . Por sua vez, o sensor com massa depositada nas pontas apresentou maiores variação de frequência para toda a faixa de massa avaliada comparativamente com o sensor que teve a massa depositada uniformemente.

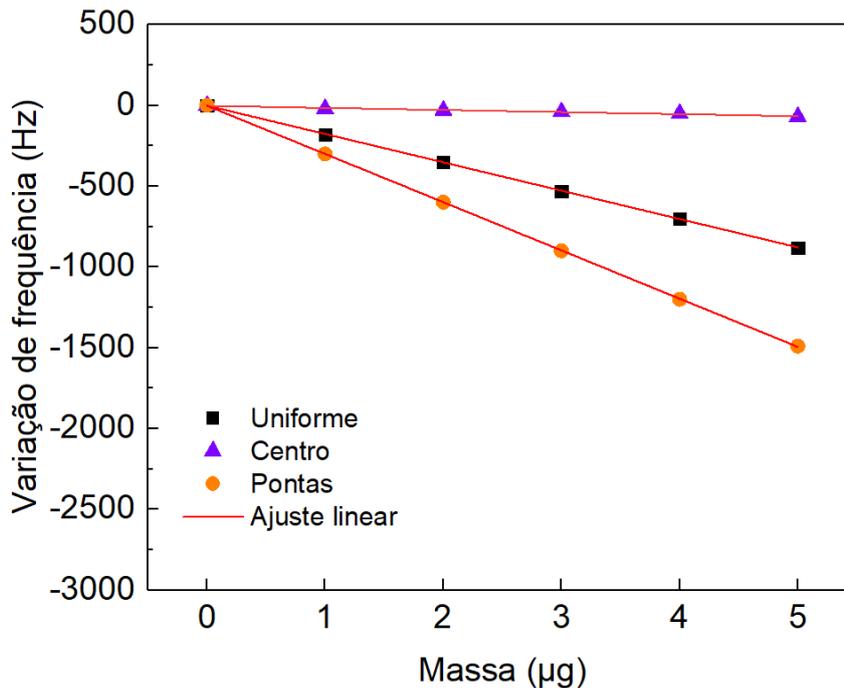


Figura 38. Variação da frequência de ressonância para o primeiro harmônico em função da posição e quantidade da massa depositada sobre os sensores

Já os resultados dos sensores no terceiro harmônico sugeriram que a maior variação na frequência de ressonância foi causada pela massa depositada uniformemente na superfície para a faixa de massa avaliada (0 a 5 µg), seguida pelas pontas do sensor e, por último, o centro do sensor. Para ambos os modos de vibração, primeiro e terceiro harmônicos, a variação na frequência de ressonância, independentemente da posição da massa, apresentam uma tendência linear com o aumento na quantidade de massa depositada. Por esse motivo, as Figuras 38 e 39 apresentam, em vermelho, o ajuste linear aos resultados. A Tabela 13 sintetiza as informações sobre os ajustes. Segundo a literatura (42,128), a sensibilidade de massa simulada pode ser obtida a partir do coeficiente angular da reta ajustada. Para o primeiro harmônico, os valores obtidos de sensibilidade, foram de $-12,85 \text{ Hz}/\mu\text{g}$, $-175,42 \text{ Hz}/\mu\text{g}$ e $-298,57 \text{ Hz}/\mu\text{g}$ para a massa depositada no centro, uniforme e nas pontas, respectivamente. Já para o terceiro harmônico, a sensibilidade de massa foi de $-300 \text{ Hz}/\mu\text{g}$, $-514,28 \text{ Hz}/\mu\text{g}$ e $-414,28 \text{ Hz}/\mu\text{g}$ para a massa depositada no centro, uniforme e nas pontas, respectivamente. A ressonância de ordem superior apresentou maior sensibilidade de massa. No entanto, quanto mais alta a ordem de ressonância, maior será a frequência aplicada o que implica no aumento das correntes parasitas e, como resultado, o sinal de ressonância é enfraquecido.

Portanto, deve existir um equilíbrio entre a sensibilidade da massa e a intensidade do sinal (38).

Li e Cheng (37), propõem, em sua pesquisa, a leitura da frequência de ressonância dos sensores em múltiplos modos de vibração simultaneamente como uma abordagem para mitigar o efeito da localização da massa. No entanto, até o momento, não foram identificados estudos na literatura que tenham aplicado essa técnica de medição em biossensores.

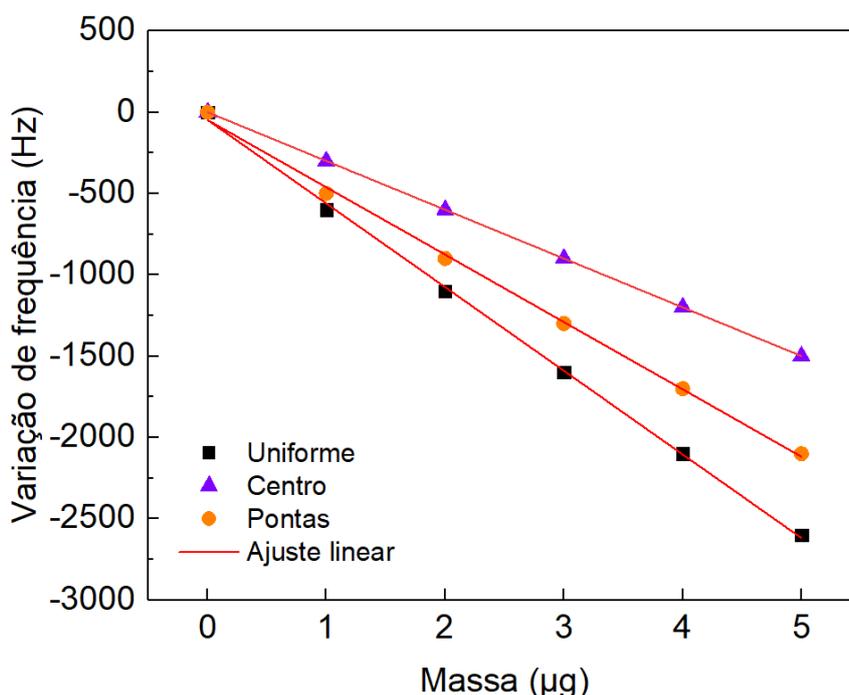


Figura 39. Variação da frequência de ressonância para o terceiro harmônico em função da posição e quantidade da massa depositada sobre os sensores

Tabela 13. Parâmetros das retas ajustas

1 harmônico			
	Uniforme	Centro	Pontas
Coefficiente linear	$-1,42 \pm 2,11$	$-2,85 \pm 2,73$	$-1,90 \pm 2,49$
Coefficiente angular	$-175,42 \pm 0,69$	$-12,85 \pm 0,90$	$-298,57 \pm 0,82$
R ²	0,999	0,975	0,999
3 harmônico			
Coefficiente linear	$-47,61 \pm 24,97$	$(4,30 \pm 5,63)10^{-11}$	$-47,61 \pm 24,97$
Coefficiente angular	$-514,28 \pm 8,24$	$-300 \pm (1,86)10^{-11}$	$-414,28 \pm 8,24$
R ²	0,998	1	0,998

Por fim, algumas observações importantes surgem da dependência entre a posição da massa e a variação de frequência de ressonância. Conforme demonstrado no capítulo anterior, foi possível diagnosticar a presença da amostra com o analito; no entanto, os resultados obtidos neste capítulo sugerem que a quantificação da amostra, ao funcionalizar toda a superfície do sensor, pode ser extremamente desafiadora. Isso ocorre porque, se houver massa da amostra concentrada sobre regiões de pontos cegos do biossensor, a quantificação não será precisa. Portanto, a funcionalização nessas regiões é desnecessária, além de representar um desperdício de reagentes de alto custo, como os biológicos (por exemplo, anticorpos).

Neste contexto, dada a notável sensibilidade de massa observada nas extremidades do sensor em ambos os modos de vibração, essas áreas foram avaliadas em detalhes. A Figura 40 ilustra a variação da frequência de ressonância conforme o comprimento da região de deposição de massa. O valor de massa depositado foi fixo de $0,8 \mu\text{g}$ ($0,4 \mu\text{g}$ em cada ponta). Para o primeiro harmônico (Figura 40a), quanto mais próximo à extremidade do sensor, maior será a sensibilidade. À medida que a área da massa depositada aumenta, em direção ao centro do sensor, a sensibilidade diminui, pois, vai ao encontro da região do ponto cego do sensor para esse modo de vibração. Para o terceiro harmônico (Figura 40b), embora tenha sido observada uma maior sensibilidade também na extremidade do sensor, é necessário evitar a região de ponto cego entre $0,8 \text{ mm}$ e $1,8 \text{ mm}$, onde a sensibilidade é reduzida. Portanto, uma situação ideal envolve encontrar uma área que combine alta sensibilidade com possibilidade de funcionalização, permitindo interações biológicas suficientes para gerar a variação de frequência necessária para diagnóstico e quantificação.

Se considerarmos a massa de AuNPs de 40 nm de diâmetro, assumindo a funcionalização em apenas uma das superfícies do sensor e considerando um ajuste perfeito das nanopartículas na superfície, ou seja, as partículas cobrem toda a superfície e não há mais do que uma camada de nanopartículas, seria preciso funcionalizar $0,8 \text{ mm}$ das pontas do sensor para obter $0,8 \mu\text{g}$ de massa. Assim, se considerarmos $1,0 \text{ mm}$ pode-se atingir uma variação de frequência de ressonância de aproximadamente -260 Hz e -500 Hz , para o primeiro e terceiro harmônico, respectivamente, valores suficientes para realizar o diagnóstico.

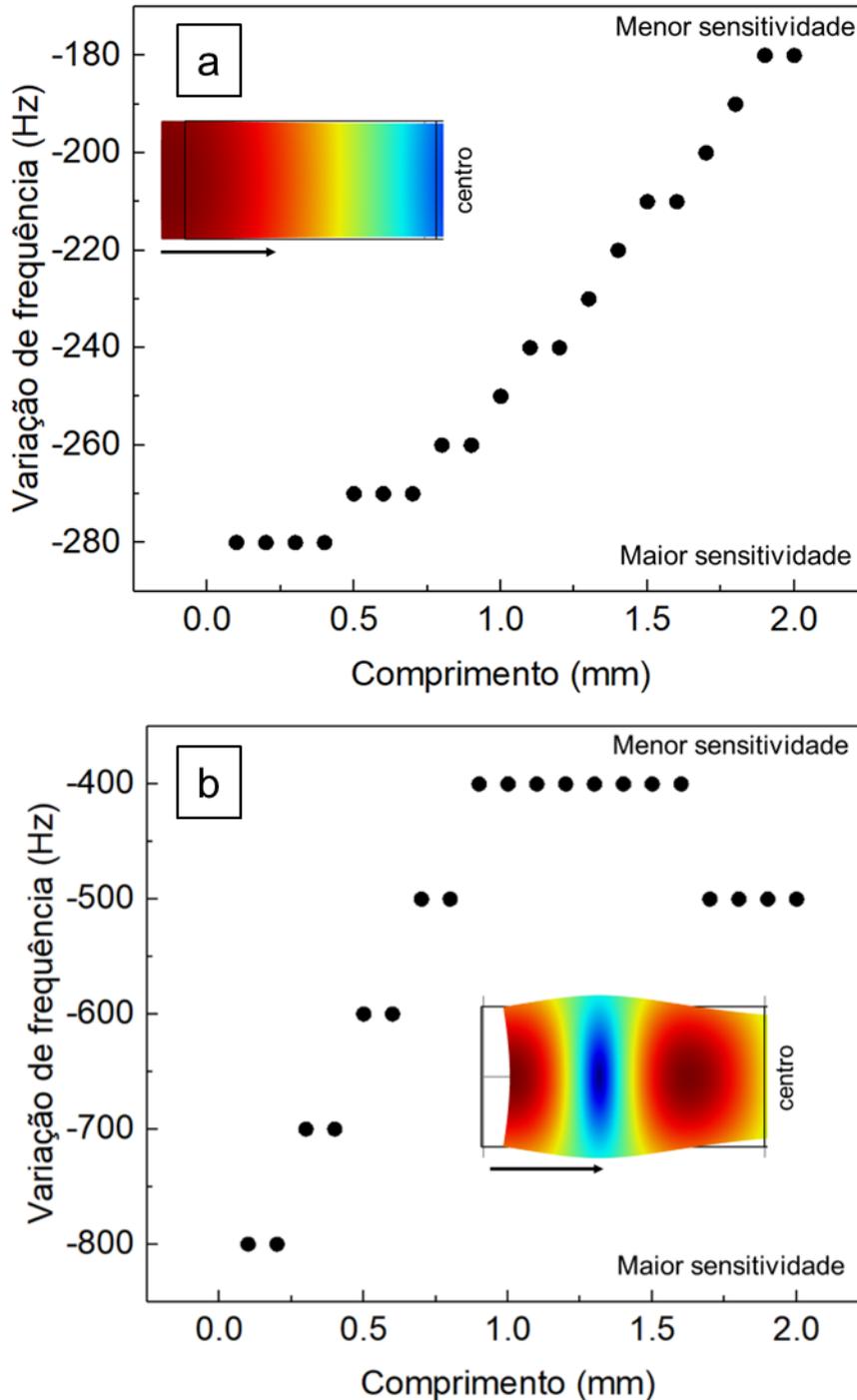


Figura 40. Avaliação da sensibilidade de massa apenas nas pontas dos biossensores para o primeiro harmônico (a) e o terceiro (b) harmônicos.

Após uma compreensão mais aprofundada das regiões de ponto cego dos sensores conforme os modos de vibração, procedeu-se com a funcionalização controlada da superfície para evitar interações biológicas nessas áreas. As Figuras 41 e 42 detalham o processo de funcionalização de acordo com os padrões de vibração do primeiro e terceiro harmônicos, respectivamente.

As Figuras 41a e 42a destacam as regiões de intensa vibração do sensor (em vermelho), as quais foram posteriormente funcionalizadas. As Figuras 41b e 42b exibem fotografias dos biossensores após a funcionalização e em contato com as AuNPs. Nesta etapa, foi observado que as AuNPs aderiram exclusivamente às regiões funcionalizadas dos biossensores. Por fim, as imagens de microscopia óptica (Figuras 41c e 42c) mostram a superfície dos biossensores secos após as lavagens, evidenciando a estabilidade da ligação entre o sulfo-NHS e as AuNPs.

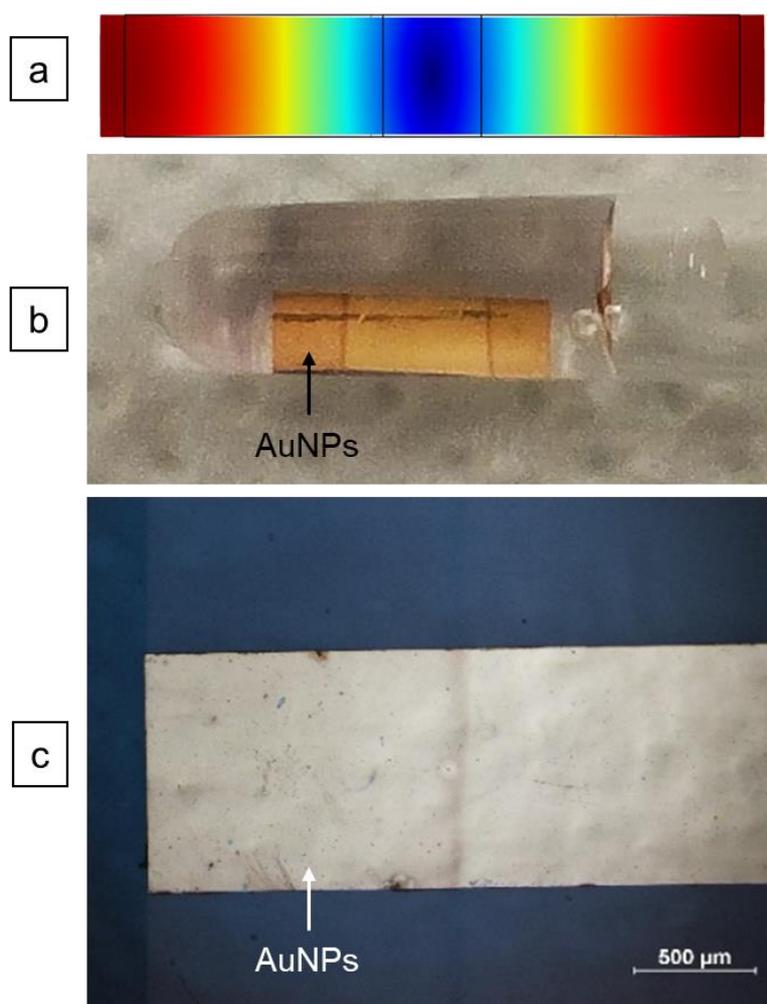


Figura 41. Funcionalização controlada da superfície para o primeiro harmônico, (a) padrão de vibração do sensor, (b) biossensor durante o processo de funcionalização e (c) imagem de microscopia óptica da superfície do biossensor após a interação com as AuNPs

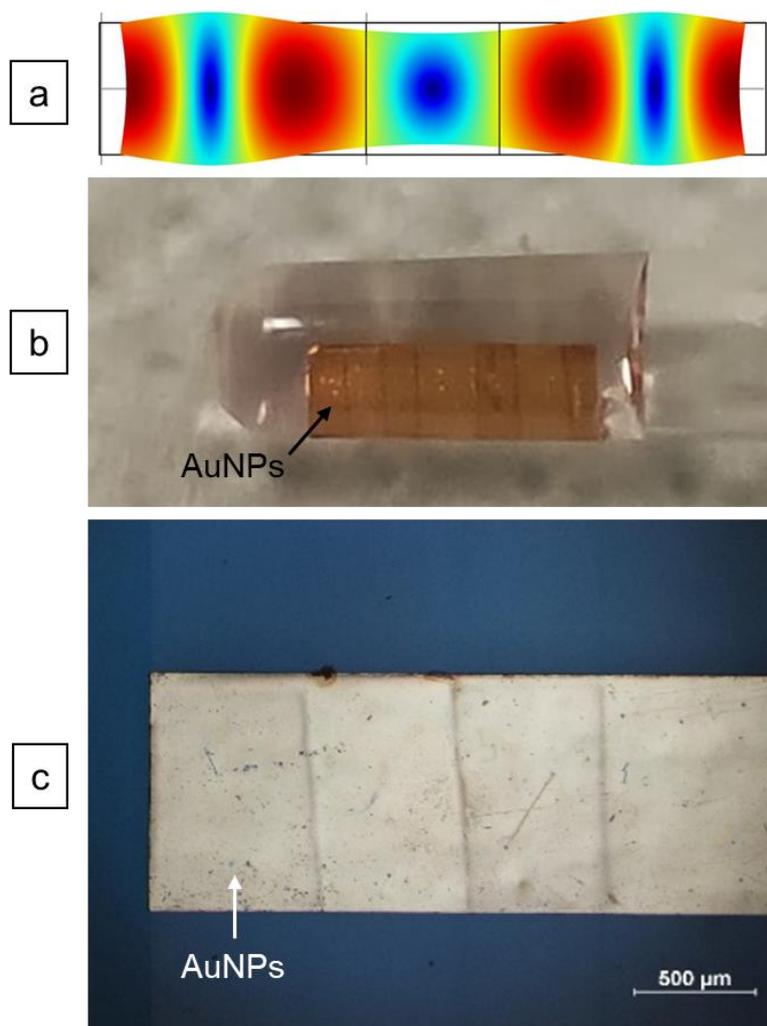


Figura 42. Funcionalização controlada da superfície para o terceiro harmônico, (a) padrão de vibração do sensor, (b) biossensor durante o processo de funcionalização e (c) imagem de microscopia óptica da superfície do biossensor após a interação com as AuNPs

Para ambas as situações apresentadas, a funcionalização não foi precisamente direcionada às regiões de vibração mais intensa, uma vez que o processo foi manual e serviu apenas para demonstrar a viabilidade da funcionalização controlada. Como próximos passos da pesquisa, é fundamental automatizar esse processo para assegurar a reprodutibilidade dos resultados.

No que se refere à economia de reagentes, constatou-se que, para funcionalizar todo o sensor (ambos os lados) e alcançar uma sensibilidade de aproximadamente $-200 \text{ Hz}/\mu\text{g}$ no primeiro harmônico, foram necessários $50 \mu\text{L}$ de solução de 11- MUA, $50 \mu\text{L}$ de anticorpos e $50 \mu\text{L}$ de bloqueio. De acordo com as simulações computacionais realizadas em conjunto com o protocolo experimental de funcionalização controlada, utilizando apenas $2 \mu\text{L}$ de cada uma das soluções citadas ($1 \mu\text{L}$ em cada extremidade) em apenas um lado do

biossensor, é possível obter uma sensibilidade de massa superior, em torno de $-325 \text{ Hz}/\mu\text{g}$.

É importante ressaltar que a variação da frequência de ressonância dos biossensores, após a funcionalização controlada, ainda não foi experimentalmente medida, representando um próximo passo crucial na continuação desta pesquisa. No entanto, os resultados experimentais da deposição de ouro em diferentes posições, em comparação com as simulações computacionais (Figuras 36 e 37), confirmam a consistência entre os resultados. Portanto, pode-se inferir que a funcionalização controlada, quando empregada na detecção de agentes biológicos, desempenha um papel fundamental para aumentar a sensibilidade de massa desses dispositivos, assim como garantir a reprodutibilidade dos resultados.

Por fim, a funcionalização controlada da superfície representa um ponto chave, porém até o momento pouco explorado, no desenvolvimento de biossensores magnetoelásticos. Vale destacar que, apesar dos avanços na área de biossensores, ainda não foram identificados estudos publicados na literatura que abordem especificamente a funcionalização controlada para este tipo particular de dispositivo. Isso destaca a importância de investigações futuras que explorem essa abordagem inovadora, visando otimizar a sensibilidade e a seletividade desses biossensores para aplicações biomédicas e diagnósticas.

5.4 Conclusão

Esta última seção do estudo mostrou o impacto do posicionamento da massa na sensibilidade dos biossensores magnetoelásticos. Simulações computacionais, foram realizadas para avaliar os modos de vibração dos sensores, bem como a resposta em variação de frequência em função da posição e quantidade de massa carregada na superfície. A partir dos resultados obtidos foi possível realizar a funcionalização controlada da superfície do biossensor com o objetivo de ampliar o sinal da resposta dos biossensores levando em consideração apenas as regiões de maior intensidade de vibração.

Simulações computacionais revelaram as regiões de maior intensidade de vibração dos sensores magnetoelásticos, para o primeiro e terceiro modos de vibração, bem como as regiões de menor vibração (pontos cegos) que não

causam variação de frequência quando existe massas depositada sobre eles, diminuindo a sensibilidade dos sensores. No primeiro harmônico foi identificada uma região de ponto cego, no centro do sensor, enquanto para o terceiro, três. Com isso, foi observado que a pontas dos sensores, para o primeiro modo de vibração, causam uma variação de frequência maior, para uma mesma quantidade de massa, quando comparado com a massa depositada uniformemente na superfície e que, quando essa mesma quantidade de massa é depositada no centro do sensor, a variação de frequência é praticamente nula.

Para o terceiro harmônico, foi identificada que a massa depositada uniformemente sobre a superfície causou a maior variação de frequência de ressonância quando comparado com as pontas e o centro do sensor, entretanto, para esse modo de vibração, em nenhuma das posições a variação foi nula. Inclusive, constatou-se que o terceiro harmônico é mais sensível que o primeiro, ou seja, promove maiores variações de frequência para uma mesma quantidade de massa.

Por fim, foi confirmada a possibilidade de realizar a funcionalização controlada da superfície dos biossensores favorecendo as regiões de maior intensidade de vibração e evitando as regiões de pontos cegos. As simulações computacionais e os testes experimentais confirmaram a importância do posicionamento de massa na sensibilidade de massa dos biossensores magnetoelásticos.

Conclusões e perspectivas

Nesta tese foi desenvolvido um biossensor magnetoelástico para detecção de Sars-CoV-2. Para isso, foram avaliados fatores extrínsecos que influenciam na sensibilidade dos sensores magnetoelásticos. Em seguida, a superfície do sensor foi funcionalizada para torná-lo específico para detecção da proteína recombinante de Sars-CoV-2. Por fim, foram avaliadas alternativas para melhorar a sensibilidade de massa do biossensor.

Um suporte de alumínio foi empregado como dissipador de calor para evitar variações de frequência provenientes do auto aquecimento do sistema, uma fonte de corrente de polarização com estabilidade do campo de 0,01% foi utilizada para eliminar os efeitos provenientes das variações de corrente, e a aplicação de tratamento térmico antes e depois do processo de revestimento, resultou em melhorias na homogeneidade de resposta dos sensores, além do aumento na resistência à corrosão.

A imobilização dos agentes de bioreconhecimento na superfície do sensor foi confirmada e a utilização de AuNPs, para amplificar o sinal de resposta, permitiu a realização da detecção da proteína recombinante do Sars-CoV-2. Os biossensores utilizados neste trabalho apresentaram uma sensibilidade de massa de 196 Hz/ μ g. Entretanto foi observada baixa reprodutibilidade dos resultados que pode estar associada com a distribuição das AuNPs de forma irregular na superfície do biossensor, com concentração de massa em alguns pontos. Por isso, alternativas para melhorar foram avaliadas.

Simulações computacionais, revelaram os modos de vibração dos sensores, bem como a resposta em variação de frequência em função da posição e quantidade de massa carregada na superfície. Foi realizada a funcionalização controlada da superfície do biossensor, levando em consideração apenas as regiões de maior intensidade de vibração e eliminando os pontos cegos, nos quais a variação de frequência de ressonância devido a massa é praticamente nula. As simulações computacionais e os testes

experimentais confirmaram a importância do posicionamento de massa na sensibilidade dos biossensores magnetoelásticos.

Em síntese, foi desenvolvido e otimizado um biossensor magnetoelástico para a detecção específica da proteína recombinante do Sars-CoV-2. Além de confirmar a eficácia da funcionalização da superfície do sensor e a amplificação do sinal por AuNPs, este trabalho destacou a importância de fatores extrínsecos, como temperatura e campo magnético, na sensibilidade do dispositivo. A adoção de estratégias como o uso de um suporte de alumínio para dissipação térmica e uma fonte de corrente de polarização estável garantiu que as variações de frequência de ressonância fossem exclusivamente associadas ao aumento de massa. As simulações computacionais permitiram a otimização da distribuição de massa na superfície do sensor, maximizando a sensibilidade e eliminando pontos cegos. Com esses avanços, o biossensor apresentou um desempenho aprimorado, com maior precisão e confiabilidade, consolidando-se como uma ferramenta promissora para aplicações diagnósticas na detecção de vírus.

Os sensores magnetoelásticos possuem uma ampla gama de aplicações, sendo particularmente atraentes na área biológica devido à sua versatilidade na capacidade de detectar diversos patógenos pela alteração apenas do agente de bioreconhecimento. A crescente demanda por novas ferramentas de diagnóstico rápido, simples de usar e acessíveis reforça ainda mais seu potencial. Apesar dos avanços significativos desenvolvidos neste trabalho, existem ainda desafios científicos e técnicos para tornar biossensores magnetoelásticos em produtos comerciais viáveis para uso como ferramentas *point-of-care*. Por exemplo, como continuação deste estudo, recomenda-se explorar a funcionalização biológica controlada da superfície dos biossensores, combinada com a análise de frequência de ressonância em um grande número de amostras de biossensores de teste e de controle, visando futuros testes em amostras clínicas.

REFERÊNCIAS

1. Harapan H, Itoh N, Yufika A, Winardi W, Keam S, Te H, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review, **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, p. 667–73, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.03.019>
2. Esakandari H, Nabi-Afjadi M, Fakkari-Afjadi J, Farahmandian N, Miresmaeili SM, Bahreini E. A comprehensive review of COVID-19 characteristics. **Biological Procedures Online**, v. 22, p. 1–10, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12575-020-00128-2>
3. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, p. 155-170, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
4. World Health Organization, [Acesso em: 16 de julho 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/>
5. Nasreen S, Chung H, He S, Brown KA, Gubbay JB, Buchan SA, et al. Effectiveness of COVID-19 vaccines against symptomatic SARS-CoV-2 infection and severe outcomes with variants of concern in Ontario. **Nature microbiology**, v. 7, p. 379-385, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-01053-0>
6. Pascarella G, Strumia A, Piliiego C, Bruno F, del Buono R, Costa F, et al. COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review, **Journal of Internal Medicine**, v. 288, p. 192-206, 2020. <https://doi.org/10.1111/joim.13091>
7. Teymouri M, Mollazadeh S, Mortazavi H, Naderi Ghale-noie Z, Keyvani V, Aghababaei F, et al. Recent advances and challenges of RT-PCR tests for the diagnosis of COVID-19. **Pathology-Research and Practice**, v. 221, p. 153443, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153443>

8. Yang W, Yan F. Patients with RT-PCR-confirmed COVID-19 and Normal Chest CT. **Radiology**, v. 295, p. E3-E3, 2020. <https://doi.org/10.1148/radiol.2020200702>
9. Carter LJ, Garner L v., Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, et al. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. **ACS Cent Sci**, v. 6, p. 591-605, 2020. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00501>
10. Valdivia A, Torres I, Latorre V, Francés-Gómez C, Ferrer J, Forqué L, et al. Suitability of two rapid lateral flow immunochromatographic assays for predicting SARS-CoV-2 neutralizing activity of sera. **Journal of Medical Virology**, v. 93, p. 2301-2306, 2021. <https://doi.org/10.1002/jmv.26697>
11. Diao B, Wen K, Zhang J, Chen J, Han C, Chen Y, et al. Accuracy of a nucleocapsid protein antigen rapid test in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, p. 289.e1-289.e4, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.09.057>
12. Centers for Disease Control and Prevention. World Health Organization. 2022 [Acesso em: 9 de julho de 2022]. Interim guidance for antigen testing for SARS-CoV-2. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/global-literature-on-novel-coronavirus-2019-ncov/resource/pt/grc-742255>
13. Mak GC, Cheng PK, Lau SS, Wong KK, Lau CS, Lam ET, et al. Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 129, p. 104500, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104500>
14. Russell SM, Alba-Patiño A, Barón E, Borges M, Gonzalez-Freire M, de La Rica R. Biosensors for Managing the COVID-19 Cytokine Storm: Challenges Ahead. **ACS Sensors**, v.5, p. 1506-1513, 2020. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c00979>
15. Choi JR. Development of Point-of-Care Biosensors for COVID-19. **Frontiers in chemistry**, v. 8, p. 517, 2020. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00517>

16. Liu D, Wang J, Wu L, Huang Y, Zhang Y, Zhu M, et al. Trends in miniaturized biosensors for point-of-care testing. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 122, p. 115701, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115701>
17. Della Ventura B, Banchelli M, Funari R, Illiano A, de Angelis M, Taroni P, et al. Biosensor surface functionalization by a simple photochemical immobilization of antibodies: Experimental characterization by mass spectrometry and surface enhanced Raman spectroscopy. **Analyst**, v. 144, p. 6871-6880, 2019. <https://doi.org/10.1039/C9AN00443B>
18. Naresh V, Lee N. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. **Sensors**, v. 21, p. 1109, 2021. <https://doi.org/10.3390/s21041109>
19. Murzin D, Mapps DJ, Levada K, Belyaev V, Omelyanchik A, Panina L, et al. Ultrasensitive magnetic field sensors for biomedical applications. **Sensors**, v. 20, p. 1569, 2020. <https://doi.org/10.3390/s20061569>
20. Narita F, Wang Z, Kurita H, Li Z, Shi Y, Jia Y, et al. A Review of Piezoelectric and Magnetostrictive Biosensor Materials for Detection of COVID-19 and Other Viruses. **Advanced Materials**, v. 33, p. 2005448. <https://doi.org/10.1002/adma.202005448>
21. Purohit B, Vernekar PR, Shetti NP, Chandra P. Biosensor nanoengineering: Design, operation, and implementation for biomolecular analysis, **Sensors International**, v.1, p. 100040, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2020.100040>
22. Li D, Yuan Z, Huang X, Li H, Guo X, Zhang H, et al. Surface Functionalization, Bioanalysis, and Applications: Progress of New Magnetoelastic Biosensors. **Advanced Engineering Materials**, v. 24, p. 2101216, 2022. <https://doi.org/10.1002/adem.202101216>

23. Cai Q, Zeng K, Ruan C, Desai TA, Grimes CA. A wireless, remote query glucose biosensor based on a pH-sensitive polymer. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 4038-4043, 2004. <https://doi.org/10.1021/ac0498516>
24. Puckett LG, Barrett G, Kouzoudis D, Grimes C, Bachas LG. Monitoring blood coagulation with magnetoelastic sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, p. 675-681, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00033-2](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00033-2)
25. Ren L, Yu K, Tan Y. Monitoring and assessing the degradation rate of magnesium-based artificial bone in vitro using a wireless magnetoelastic sensor. **Sensors**, v. 18, p. 3066, 2018. <https://doi.org/10.3390/s18093066>
26. Ren L, Yu K, Tan Y. Applications and advances of magnetoelastic sensors in biomedical engineering: A review. **Materials**, v. 12, p. 1135, 2019. <https://doi.org/10.3390/ma12071135>
27. Saiz PG, Fernández De Luis R, Lasheras A, Arriortua MI, Lopes AC. Magnetoelastic Resonance Sensors: Principles, Applications, and Perspectives. **ACS Sensors**, v. 7, p. 1248-1268, 2022. <https://doi.org/10.1021/acssensors.2c00032>
28. Tkatch VI, Limanovskii AI, Denisenko SN, Rassolov SG. The effect of the melt-spinning processing parameters on the rate of cooling. **Materials Science and Engineering: A**, v. 323, p. 91-96, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0921-5093\(01\)01346-6](https://doi.org/10.1016/S0921-5093(01)01346-6)
29. Jain MK, Schmidt S, Ong KG, Mungle C, Grimes CA. Magnetoacoustic remote query temperature and humidity sensors. **Smart Materials and Structures**, v. 9, p. 502, 2000. <https://doi.org/10.1088/0964-1726/9/4/314>
30. METGLAS, Inc, 2022 [Acesso em: 20 de outubro de 2022]. Disponível em: <https://metglas.com/magnetic-materials/>
31. Greer AL. Metallic Glasses. **Science**, v. 267, p. 1947-1953, 1995. <https://doi.org/10.1126/science.267.5206.1947>

32. Li S, Horikawa S, Park MK, Chai Y, Vodyanoy VJ, Chin BA. Amorphous metallic glass biosensors. **Intermetallics**, v.30, p. 80-85, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.intermet.2012.03.030>
33. Grimes CA, Mungle CS, Zeng K, Jain MK, Dreschel WR, Paulose M, et al. Wireless Magnetoelastic Resonance Sensors: A Critical Review. **Sensors**, v.2, p. 294-313, 2002. <https://doi.org/10.3390/s20700294>
34. Grimes CA, Roy SC, Rani S, Cai Q. Theory, instrumentation and applications of magnetoelastic resonance sensors: A review. **Sensors**, v. 11, p. 2809-2844, 2011. <https://doi.org/10.3390/s110302809>
35. Huang X, Sang S, Yuan Z, Duan Q, Guo X, Zhang H, et al. Magnetoelastic Immunosensor via Antibody Immobilization for the Specific Detection of Lysozymes. **ACS Sensors**, v. 6, p. 3933-3939, 2021. <https://doi.org/10.1021/acssensors.1c00802>
36. Zhang K, Zhang K, Chai Y. Study of “blind point” and mass sensitivity of a magnetostrictive biosensor with asymmetric mass loading. **AIP Advances**, v. 4, 2014. <https://doi.org/10.1063/1.4878575>
37. Li S, Cheng ZY. Nonuniform mass detection using magnetostrictive biosensors operating under multiple harmonic resonance modes. **Journal of Applied Physics**, v. 107, 2010. <https://doi.org/10.1063/1.3431523>
38. Zhang K, Zhang L, Chai Y. Mass load distribution dependence of mass sensitivity of magnetoelastic sensors under different resonance modes. **Sensors**, v. 15, p. 20267-20278, 2015. <https://doi.org/10.3390/s150820267>
39. Zhang K, Chai Y. Numerical Study on Mass Sensitivity of Magnetoelastic Biosensors with Concentrated Mass Load under Different Resonance Modes. **Journal of Sensors**, v. 2016, p. 8341656, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8341656>

40. Shen W, Mathison LC, Petrenko VA, Chin BA. Design and characterization of a magnetoelastic sensor for the detection of biological agents. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 42, p. 015004, 2010. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/43/1/015004>
41. Sagasti A, Gutierrez J, San Sebastian M, Barandiaran JM. Magnetoelastic Resonators for Highly Specific Chemical and Biological Detection: A Critical Study. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 53, p. 1-4, 2016. <https://doi.org/10.1109/TMAG.2016.2622359>
42. G. Saiz P, Gandia D, Lasheras A, Sagasti A, Quintana I, Fdez-Gubieda ML, et al. Enhanced mass sensitivity in novel magnetoelastic resonators geometries for advanced detection systems. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 296, p. 126612, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.05.089>
43. Zhang K, Chen Z, Zhu Q, Jiang Y, Liu W, Wu P. Damping force and loading position dependence of mass sensitivity of magnetoelastic biosensors in viscous liquid. **Sensors**, v. 19, p. 67, 2018. <https://doi.org/10.3390/s19010067>
44. Skinner WS, Zhang S, Guldborg RE, Ong KG. Magnetoelastic Sensor Optimization for Improving Mass Monitoring. **Sensors**, v. 22, p. 827, 2022. <https://doi.org/10.3390/s22030827>
45. Guntupalli R, Lakshmanan RS, Hu J, Huang TS, Barbaree JM, Vodyanoy V, et al. Rapid and sensitive magnetoelastic biosensors for the detection of Salmonella typhimurium in a mixed microbial population. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, p. 112-118, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.04.001>
46. Zhang Y, Guo X, Fan L, Zhang Q, Sang S. A Novel Magnetoelastic Immunosensor for Ultrasensitively Detecting Carcinoembryonic Antigen. **Nanoscale Research Letters**, v. 13, p. 1-6, 2018. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2632-0>

47. Guo X, Sang S, Guo J, Jian A, Duan Q, Ji J, et al. A magnetoelastic biosensor based on E2 glycoprotein for wireless detection of classical swine fever virus E2 antibody. **Scientific reports**, v.7, p. 15626, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15908-2>
48. Huang S, Hu J, Wan J, Johnson ML, Shu H, Chin BA. The effect of annealing and gold deposition on the performance of magnetoelastic biosensors. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, p. 380-386, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.04.006>
49. Guo X, Sang S, Jian A, Gao S, Duan Q, Ji J, et al. A bovine serum albumin-coated magnetoelastic biosensor for the wireless detection of heavy metal ions. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 256, p. 318-324, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.040>
50. Morales MA, Halpern JM. Guide to Selecting a Biorecognition Element for Biosensors. **Bioconjugate chemistry**, v. 29, p. 3231-3239, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00592>
51. Jiang Y, Wang Z, Yu X, Shi F, Xu H, Zhang X, et al. Self-assembled monolayers of dendron thiols for electrodeposition of gold nanostructures: Toward fabrication of superhydrophobic/superhydrophilic surfaces and pH-responsive surfaces. **Langmuir**, v. 21, p. 1986-1990, 2005. <https://doi.org/10.1021/la047491b>
52. Vericat C, Vela ME, Corthey G, Pensa E, Cortés E, Fonticelli MH, et al. Self-assembled monolayers of thiolates on metals: A review article on sulfur-metal chemistry and surface structures. **RSC Advances**, v. 4, p. 27730-27754, 2014. <https://doi.org/10.1039/C4RA04659E>
53. Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology **Chemical Reviews**, v. 105, p. 1103-1170, 2005. <https://doi.org/10.1021/cr0300789>

54. Bain CD, Biebuyck HA, Whitesides GM. Comparison of Self-Assembled Monolayers on Gold: Coadsorption of Thiols and Disulfides. **Langmuir**, v. 5, p. 723-727, 1989. <https://doi.org/10.1021/la00087a027>
55. Sang S, Li Y, Guo X, Zhang B, Xue X, Zhuo K, et al. A Portable Device for Rapid Detection of Human Serum Albumin using an immunoglobulin-coating-based Magnetoelastic Biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 141, p. 111399, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111399>
56. Hermanson GT. **Bioconjugate techniques**. Academic press, 2013.
57. IgG Antibodies and Fcγ Receptors in Immunotherapy, BPS Bioscience. [Acesso em: 24 de julho de 2022]. Disponível em: <https://bpsbioscience.com/igg-antibodies-fc-gamma-receptors-immunotherapy>
58. Gao S, Guisán JM, Rocha-Martin J. Oriented immobilization of antibodies onto sensing platforms - A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1189, p. 338907, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338907>
59. Narayan T, Kumar S, Kumar S, Augustine S, Yadav BK, Malhotra BD. Protein functionalised self assembled monolayer based biosensor for colon cancer detection. **Talanta**, v. 201, p. 465-473, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.039>
60. Xu J, Chen Y. Surface plasmon resonance sensing with adjustable sensitivity based on a flexible liquid core coupling unit. **Talanta**, v. 184, p. 468-474, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.03.040>
61. Ferreira PAB, Araujo MCM, Prado CM, de Lima RA, Rodríguez BAG, Dutra RF. An ultrasensitive Cystatin C renal failure immunosensor based on a PPy/CNT electrochemical capacitor grafted on interdigitated electrode. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 189, p. 110834, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110834>

62. Nguyen HH, Yi SY, Woubit A, Kim M. A Portable Surface Plasmon Resonance Biosensor for Rapid Detection of Salmonella typhimurium. **Applied Science and Convergence Technology**, v. 25, p. 61-65, 2016. <https://doi.org/10.5757/ASCT.2016.25.3.61>
63. Ahmad A, Moore E. Electrochemical immunosensor modified with self-assembled monolayer of 11-mercaptopundecanoic acid on gold electrodes for detection of benzo[a]pyrene in water. **Analyst**, v. 137, p. 5839-5844, 2012. <https://doi.org/10.1039/C2AN35236B>
64. Laue M, Kauter A, Hoffmann T, Möller L, Michel J, Nitsche A. Morphometry of SARS-CoV and SARS-CoV-2 particles in ultrathin plastic sections of infected Vero cell cultures. **Scientific reports**, v. 11, p. 3515, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82852-7>
65. Zhang L, Mazouzi Y, Salmain M, Liedberg B, Boujday S. Antibody-Gold Nanoparticle Bioconjugates for Biosensors: Synthesis, Characterization and Selected Applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 165, p. 112370, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112370>
66. Vines JB, Yoon JH, Ryu NE, Lim DJ, Park H. Gold nanoparticles for photothermal cancer therapy. **Frontiers in chemistry**, v. 7, p. 167, 2019. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00167>
67. Byzova NA, Safenkova I V., Slutskaya ES, Zherdev A V., Dzantiev BB. Less is More: A Comparison of Antibody-Gold Nanoparticle Conjugates of Different Ratios. **Bioconjugate chemistry**, v. 28, p. 2737-2746, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00489>
68. Ramasamy M, Prorok BC. Resonance behavior of magnetostrictive sensor in biological agent detection. Em: **ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition**, 2010. p. 535-541. <https://doi.org/10.1115/IMECE2010-37162>

69. Guntupalli R, Hu J, Lakshmanan RS, Huang TS, Barbaree JM, Chin BA. A magnetoelastic resonance biosensor immobilized with polyclonal antibody for the detection of *Salmonella typhimurium*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 1474-1479, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.037>
70. Guntupalli R, Lakshmanan RS, Johnson ML, Hu J, Huang TS, Barbaree JM, et al. Magnetoelastic biosensor for the detection of *Salmonella typhimurium* in food products. **Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety**, v. 1, p. 3-10, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11694-006-9003-8>
71. Huang S, Yang H, Lakshmanan RS, Johnson ML, Wan J, Chen IH, et al. Sequential detection of *Salmonella typhimurium* and *Bacillus anthracis* spores using magnetoelastic biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 1730-1736, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.09.006>
72. Li S, Li Y, Chen H, Horikawa S, Shen W, Simonian A, et al. Direct detection of *Salmonella typhimurium* on fresh produce using phage-based magnetoelastic biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 1313-1319, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.029>
73. Chai Y, Li S, Horikawa S, Park MK, Vodyanoy V, Chin BA. Rapid and sensitive detection of salmonella typhimurium on eggshells by using wireless biosensors. **Journal of food protection**, v. 75, p. 631-636, 2012. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-339>
74. Horikawa S, Vaglenov KA, Gerken DM, Chai Y, Park MK, Li S, et al. Rapid, enhanced detection of salmonella typhimurium on fresh spinach leaves using micron-scale, phage-coated magnetoelastic biosensors. Em: **Sensing for Agriculture and Food Quality and Safety IV**. SPIE; 2012. p. 168-174. <https://doi.org/10.1117/12.920456>
75. Wang F, Horikawa S, Hu J, Wikle HC, Chen IH, Du S, et al. Detection of *Salmonella typhimurium* on spinach using phage-based magnetoelastic biosensors. **Sensors**, v. 17, p. 386, 2017. <https://doi.org/10.3390/s17020386>

76. Chin BA, Horikawa S, Liu Y, Du S, Chen IH, Crumpler MS, et al. Rapid detection of small quantities of specific bacteria using phage-based wireless biosensors. Em: **2016 10th International Conference on Sensing Technology (ICST)**. IEEE, 2016. p. 1-5. <https://doi.org/10.1109/ICSensT.2016.7796241>
77. Liu Y, Horikawa S, Chen IH, Du S, Wickle HC, Suh SJ, et al. Highly sensitive surface-scanning detector for the direct bacterial detection using magnetoelastic (ME) biosensors. Em: **Sensing for Agriculture and Food Quality and Safety IX**. SPIE, 2017. p. 17-25. <https://doi.org/10.1117/12.2262859>
78. Horikawa S, Chai Y, Wickle HC, Dai J, Hu J, Suh SJ, et al. Nature-inspired magnetoelastic biosentinels for the detection of pathogenic bacteria in stagnant liquids. Em: **Sensing for Agriculture and Food Quality and Safety VII**. SPIE, 2015. p. 37-44. <https://doi.org/10.1117/12.2087766>
79. Ruan C, Zeng K, Varghese OK, Grimes CA. Magnetoelastic Immunosensors: Amplified Mass Immunosorbent Assay for Detection of Escherichia coli O157:H7. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 6494-6498, 2003. <https://doi.org/10.1021/ac034562n>
80. Lin H, Lu Q, Ge S, Cai Q, Grimes CA. Detection of pathogen Escherichia coli O157:H7 with a wireless magnetoelastic-sensing device amplified by using chitosan-modified magnetic Fe₃O₄ nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 147, p. 343-349, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.03.011>
81. Hiremath N, Guntupalli R, Vodyanoy V, Chin BA, Park MK. Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using novel lytic phage-based magnetoelastic biosensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 210, p. 129-136, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.12.083>
82. Menti C, Beltrami M, Pozza MD, Martins ST, Henriques JAP, Santos AD, et al. Influence of antibody immobilization strategies on the analytical performance of a magneto-elastic immunosensor for Staphylococcus aureus detection. **Materials Science and Engineering: C**, v. 76, p. 1232-1239, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.107>

83. Guo X, Gao S, Sang S, Jian A, Duan Q, Ji J, et al. Detection system based on magnetoelastic sensor for classical swine fever virus. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 82, p. 127-131, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.03.067>
84. Kurita H, Fakhruddin SMB, Neyama D, Inoue KY, Tayama T, Chiba D, et al. Detection of virus-like particles using magnetostrictive vibration energy harvesting. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 345, p. 113814, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2022.113814>
85. Neyama D, Fakhruddin SM binti, Inoue KY, Kurita H, Osana S, Miyamoto N, et al. Batteryless wireless magnetostrictive Fe₃₀Co₇₀/Ni clad plate for human coronavirus 229E detection. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 349, p. 114052, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2022.114052>
86. Jadi A. Mobile health services in Saudi Arabia - Challenges and opportunities. **International Journal of Advanced Computer Science and Applications**, v. 11, 2020.
87. Lima LF de, Dutra R, González D, Sommer RL, Perottoni CA, Aguzzoli C, et al. Role of extrinsic factors on magnetoelastic resonance biosensors sensitivity. **Measurement Science and Technology**, v. 35, p. 045113, 2024. DOI <https://doi.org/10.1088/1361-6501/ad1e1d>
88. Skinner WS, Zhang S, Guldberg RE, Ong KG. Magnetoelastic Sensor Optimization for Improving Mass Monitoring. **Sensors**, v. 22, p. 827, 2022. <https://doi.org/10.3390/s22030827>
89. Campanile R, Scardapane E, Forente A, Granata C, Germano R, Di Girolamo R, et al. Core-shell magnetic nanoparticles for highly sensitive magnetoelastic immunosensor. **Nanomaterials**, v. 10, p. 1526, 2020. <https://doi.org/10.3390/nano10081526>

90. Zehra S, Mobin M, Aslam J. An overview of the corrosion chemistry. In: Environmentally Sustainable Corrosion Inhibitors: Fundamentals and Industrial Applications, 2021.
91. Callister WD, Rethwisch DG. **Materials Science and Engineering: An Introduction**. New York: John Wiley & Sons, 2007.
92. Gudmundsson JT, Lundin D. **Introduction to magnetron sputtering**. Em: High Power Impulse Magnetron Sputtering: Fundamentals, Technologies, Challenges and Applications. Elsevier, 2019.
93. Possan AL, Menti C, Beltrami M, Santos AD, Roesch-Ely M, Missell FP. Effect of surface roughness on performance of magnetoelastic biosensors for the detection of Escherichia coli. **Materials Science and Engineering: C**, v. 58, p. 541-547, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.029>
94. Gencoa Rate Calculation, Gencoa. [Acesso em: 19 de julho de 2022]. Disponível em: <https://www.gencoa.com/customers/apps/sputtercalc/index.php>
95. Giurlani W, Berretti E, Innocenti M, Lavacchi A. Measuring the thickness of metal coatings: A review of the methods. **Coatings**, v. 10, p. 1211, 2020. <https://doi.org/10.3390/coatings10121211>
96. Beckhoff B et al., **Handbook of practical X-ray fluorescence analysis**. Springer Science & Business Media, 2007.
97. Takahara H. Thickness and composition analysis of thin film samples using FP method by XRF analysis. **Rigaku J**, v. 33, p. 17-21, 2017.
98. Jain MK, Schmidt S, Grimes CA. Magneto-acoustic sensors for measurement of liquid temperature, viscosity and density. **Applied Acoustics**, v. 62, p. 1001-1011, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0003-682X\(00\)00091-8](https://doi.org/10.1016/S0003-682X(00)00091-8)

99. García-Arribas A, De Cos D, Gutiérrez J, Barandiarán JM. Selectable temperature sensitivity of the magnetoelastic resonance. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 106, p. 111-116, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0924-4247\(03\)00146-8](https://doi.org/10.1016/S0924-4247(03)00146-8)
100. Zhang K, Zhang L, Fu L, Li S, Chen H, Cheng ZY. Magnetostrictive resonators as sensors and actuators. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 200, p. 2-10, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2012.12.013>
101. Dalponte A, Bastos ES, Missell FP. Enhanced response from field-annealed magnetoelastic strain sensor. **Journal of Applied Physics**, v. 120, 2016. <https://doi.org/10.1063/1.4960687>
102. Kassim J, Baird T, Fryer JR. Electron microscope studies of iron corrosion products in water at room temperature. **Corrosion science**, v. 22, p. 147-158, 1982. [https://doi.org/10.1016/0010-938X\(82\)90075-0](https://doi.org/10.1016/0010-938X(82)90075-0)
103. Akpanyung K V., Loto RT. Pitting corrosion evaluation: A review. Em: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, 2019. p. 022088. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1378/2/022088>
104. Lee K, Sun S, Lee G, Yoon G, Kim D, Hwang J, et al. Galvanic corrosion inhibition from aspect of bonding orbital theory in Cu/Ru barrier CMP. **Scientific reports**, v. 11, p. 21214, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00689-6>
105. Yang D, Mei H, Wang L. Corrosion measurement of the atmospheric environment using galvanic cell sensors. **Sensors**, v. 19, p. 331, 2019. <https://doi.org/10.3390/s19020331>
106. Ravi Sankar A, Das S. Experimental analysis of galvanic corrosion of a thin metal film in a multilayer stack for MEMS application. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 16, p. 449-453, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.mssp.2012.08.003>

107. Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemical reviews**, v. 105, p. 1103-1170, 2005. <https://doi.org/10.1021/cr0300789>
108. Smith T. The Hydrophilic Nature of a Clean Gold Surface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 75, p. 51-55, 1980. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(80\)90348-3](https://doi.org/10.1016/0021-9797(80)90348-3)
109. Fernandes E, Sobrino T, Martins VC, Lopez-loureiro I, Campos F, Germano J, et al. Point-of-care quantification of serum cellular fibronectin levels for stratification of ischemic stroke patients. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 30, p. 102287, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102287>
110. Possan AL, Menti C, Beltrami M, Santos AD, Roesch-Ely M, Missell FP. Effect of surface roughness on performance of magnetoelastic biosensors for the detection of Escherichia coli. **Materials Science and Engineering: C**, v. 58, p. 541-547, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.029>
111. Sharma R, Deacon SE, Nowak D, George SE, Szymonik MP, Tang AAS, et al. Label-free electrochemical impedance biosensor to detect human interleukin-8 in serum with sub-pg/ml sensitivity. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 80, p. 607-613, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.02.028>
112. Sarcina L, Torsi L, Picca RA, Manoli K, Macchia E. Assessment of gold bio-functionalization for wide-interface biosensing platforms. **Sensors**, v. 20, p. 3678, 2020. <https://doi.org/10.3390/s20133678>
113. Jena SC, Shrivastava S, Saxena S, Kumar N, Maiti SK, Mishra BP, et al. Surface plasmon resonance immunosensor for label-free detection of BIRC5 biomarker in spontaneously occurring canine mammary tumours. **Scientific reports**, v. 9, p. 13485, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49998-x>
114. Tsai TC, Liu CW, Wu YC, Ondevilla NAP, Osawa M, Chang HC. In situ study of EDC/NHS immobilization on gold surface based on attenuated total reflection

surface-enhanced infrared absorption spectroscopy (ATR-SEIRAS). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 300-305, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.009>

115. Sam S, Touahir L, Salvador Andresa J, Allongue P, Chazalviel JN, Gouget-Laemmel AC, et al. Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces. **Langmuir**, v. 26, p. 809-814, 2010. <https://doi.org/10.1021/la902220a>

116. ThermoFisher Scientific. [Acesso em: 20 de janeiro de 2023]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/sg/en/home/life-science/antibodies/antibodies-learning-center/antibodies-resource-library/antibody-methods/antibody-labeling-immobilization-sites.html>

117. Shen W, Li S, Park MK, Zhang Z, Cheng Z, Petrenko VA, et al. Blocking Agent Optimization for Nonspecific Binding on Phage Based Magnetoelastic Biosensors. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 159, p. B818, 2012. <https://doi.org/10.1149/2.057210jes>

118. Špringer T, Chadtová Song X, Ermini ML, Lamačová J, Homola J. Functional gold nanoparticles for optical affinity biosensing. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 409, p. 4087-4097, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0355-1>

119. Guo X, Wang J, Zhao Y, Liu R, Zhang Q, Yuan Z, et al. A wireless magnetoelastic DNA-biosensor amplified by AuNPs for the detection of a common mutated DNA causing β -thalassaemia. **Biochemical engineering journal**, v. 156, p. 107498, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107498>

120. Oliveira JP, Prado AR, Keijok WJ, Antunes PWP, Yapuchura ER, Guimarães MCC. Impact of conjugation strategies for targeting of antibodies in gold nanoparticles for ultrasensitive detection of 17 β -estradiol. **Scientific reports**, v. 9, p. 13859, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50424-5>

121. Santos MCD, Morais CLM, Lima KMG. ATR-FTIR spectroscopy for virus identification: A powerful alternative. **Biomedical Spectroscopy and Imaging**, v. 9, p. 103-118, 2020. <https://doi.org/10.3233/BSI-200203>
122. Hejazi V, Moghadam AD, Rohatgi P, Nosonovsky M. Beyond Wenzel and Cassie-Baxter: Second-order effects on the wetting of rough surfaces. **Langmuir**, v. 30, p. 9423-9429, 2014. <https://doi.org/10.1021/la502143v>
123. Jernström F. **Self-assembled monolayers of alkanethiols: A study of surface composition, wettability, and adsorption of proteins and peptides**. 2001. Tese de Doutorado. MS thesis (Uppsala University School of Engineering, Uppsala, Sweden, 2001).
124. Ristig S, Kozlova D, Meyer-Zaika W, Epple M. An easy synthesis of autofluorescent alloyed silver-gold nanoparticles. **Journal of materials chemistry B**, v. 2, p. 7887-7895, 2014. <https://doi.org/10.1039/C4TB01010H>
125. Ozkan B, Budama-Kilinc Y, Cakir-Koc R, Mese S, Badur S. Application of an immunoglobulin Y-alkaline phosphatase bioconjugate as a diagnostic tool for influenza A virus. **Bioengineered**, v. 10, p. 33-42, 2019. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1586054>
126. Gómez-Montaña FJ, Orduña-Díaz A, Avelino-Flores MCG, Avelino-Flores F, Ramos-Collazo F, Reyes-Betanzo C, et al. Detection of Salmonella enterica on silicon substrates biofunctionalized with anti-Salmonella IgG, analyzed by FTIR spectroscopy. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 19, p. 1175-1185, 2020.
127. Ren L, Cong M, Tan Y. An hourglass-shaped wireless and passive magnetoelastic sensor with an improved frequency sensitivity for remote strain measurements. **Sensors**, v. 20, p. 359, 2020. <https://doi.org/10.3390/s20020359>
128. Saiz PG, Gutiérrez J, Arriortua MI, Lopes AC. Theoretical and Experimental Analysis of Novel Rhombus Shaped Magnetoelastic Sensors with Enhanced

Mass Sensitivity. **IEEE Sensors Journal**, v. 20, p. 13332-13340, 2020.
<https://doi.org/10.1109/JSEN.2020.3006379>

129. COMSOL, Eigenfrequency Analysis. [Acesso em: 14 de fevereiro de 2023].
Disponível em: <https://www.comsol.com/multiphysics/eigenfrequency-analysis>.

130. Siegel J, Lyutakov O, Rybka V, Kolská Z, Švorčík V. Properties of gold nanostructures sputtered on glass. **Nanoscale research letters**, v. 6, p. 1-9, 2011.
<https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-96>

ANEXO I

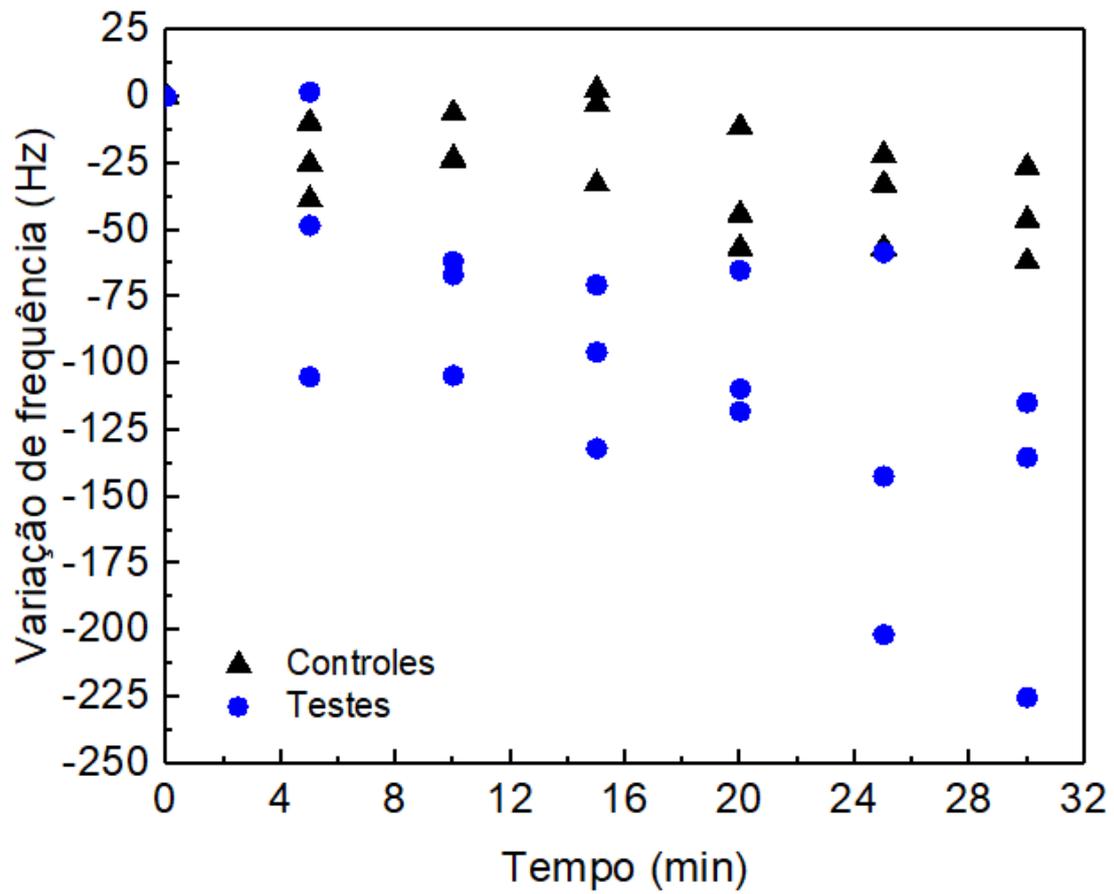


Figura A1. Biossensores de teste (azul) e controle (preto) referentes a Figura 27 plotados separadamente

ANEXO II

FAPON

文件编号: FAPON-FR-T026 版本: B.0

Certificate of Analysis

Name:	Anti COVID-19 Nucleoprotein / NP monoclonal antibody
Catalog No.:	FPZ0639
Lot No.:	20210621-1
Manufacturing Date:	20210621
Expiry Date:	20240620
Concentration:	8.5mg/ml
Source:	CHO
Format:	Clear and transparent liquid
Clone No.:	31F11
Subclass:	IgM
Immunogen:	/
molecular weight:	900kd
Buffer :	10mMPB+150mM NaCl+0.1% P300, pH7.4
Preservative:	0.1%P300
Purification method:	Column chromatography
Purity:	≥90%
Application:	Lateral flow/ELISA/CMIA
Storage:	-20°C ± 5°C

Remark:

- 1.The raw material can be stored at 2~8°C for 15 days during transportation.
- 2.Avoid repeating freeze-thaw cycles.

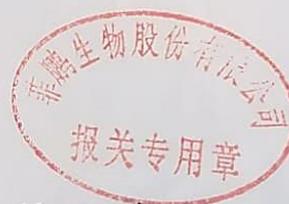

Tung Li

Leading IVD Reagent Raw Materials and One-Stop Solutions Provider

Figura A2 (a). Certificado de análise do anticorpo monoclonal FPZ0639

Certificate of Analysis

Name: Polyclonal antibody
Catalog No.: ✓ FPZ0554
Lot No.: 20200605-1
Manufacturing Date: 20200605
Expiry Date: 20230604
Concentration: 3.51mg/ml (0.59ml)
Source: Goat
Format: Clear and transparent liquid
Clone No.: /
Subclass: /
Immunogen: COVID-19 Nucleocapsid recombinant antigen
molecular weight: 150KD
Buffer : 10mMPB+150mM NaCl+0.1%P300, pH8.5
Preservative: 0.1%P300
Purification method: Column chromatography
Purity: ≥90%
Application: Lateral flow/ELISA/CMIA
Storage: (-20±5)°C
Remark:



- 1、 The raw material can be stored at 2~8°C for 15 days during transportation;
- 2、 Avoid repeating freeze-thaw cycles.

Figura A2 (b). Certificado de análise do anticorpo policlonal FPZ0554

Certificate of Analysis

Name: Recombinant antigen
 Catalog No.: ✓ FPZ0516
 Lot No.: 20200324-2
 Manufacturing Date: 20200324
 Expiry Date: 20230323
 Concentration: 2,22mg/ml (0,91ml)
 Source: E.coli
 Format: Clear and transparent liquid
 Amino acid sequence: 1-419aa
 Specific fragment: Nucleocapsid protein
 Molecular weight: 45KD
 Buffer: 10mmPB+150mmNaCl, PH7.4
 Preservative: /
 Purification method: Column chromatography
 Purity: ≥95%
 Application: Lateral flow/ELISA/CMIA
 Storage: -20±5°C
 Remark:



- 1、 The raw material can be stored at 2~8°C for 15 days during transportation;
- 2、 Avoid repeating freeze-thaw cycles.

Figura A2 (c). Certificado de análise da proteína recombinante FPZ0516