



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Jaqueline Pereira Guessi

**Funcionalização de nanopartículas de PMMA com características superparamagnéticas
para aplicação em sorodiagnóstico de COVID-19**

Florianópolis
2024

Jaqueline Pereira Guessi

**Funcionalização de nanopartículas de PMMA com características superparamagnéticas
para aplicação em sorodiagnóstico de COVID-19**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Pedro Henrique Hermes de Araújo, Dr.
Coorientador: Profa. Claudia Sayer, Dra.
Coorientador: Paulo Emilio Feuser, Dr.

Florianópolis

2024

Guessi, Jaqueline Pereira

Funcionalização de nanopartículas de PMMA com características superparamagnéticas para aplicação em sorodiagnóstico de COVID-19 / Jaqueline Pereira Guessi ; orientador, Pedro Henrique Hermes de Araújo, coorientadora, Claudia Sayer, coorientador, Paulo Emilio Feuser, 2024.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Nanopartículas superparamagnéticas. 3. Polimerização em miniemulsão. 4. COVID-19. 5. ELISA nanomagnético. I. Araújo, Pedro Henrique Hermes de. II. Sayer, Claudia. III. Feuser, Paulo Emilio. IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

Jaqueline Pereira Guessi

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Pedro Henrique Hermes de Araújo, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Profa. Ana Paula Serafini Immich Boemo, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Ricardo Andrez Machado de Ávila, Dr.
Universidade Do Extremo Sul Catarinense (UNESC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Engenharia Química pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Pedro Henrique Hermes de Araújo, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2024

Este trabalho é dedicado à minha mãe Arina Pereira Guessi (*In memoriam*) minha maior inspiração e incentivadora dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por cuidar, acalmar, consolar e orientar-me nesta jornada.

A minha querida mãe, que infelizmente não presenciará esta formação, mas é uma eterna influenciadora dos meus estudos, sonhos e conquistas. Esta conquista é para você mãe, minha florzinha de pessegueiro.

Ao meu pai, Jair, minhas irmãs, Karine e Caroline, meu sobrinho, Benício e meus padrinhos, Maria Terezinha e Dalci. Obrigada pelo apoio, conselhos e auxílio ao longo desta jornada. E aos meus doguinhos Nequinha e Dom companheiros de escrita.

Aos amigos de toda a vida, em especial, Claudia, Ana Leticia, Carolina, Jorel, Angelica, Sílvia, Thais e àqueles que conheci neste período, Vanessa, Igor, Isa Medeiros, Julia, Anne, Andres, Susan, Iara e Marieli, obrigada por toda a ajuda, conselhos e apoio que sempre recebi, e pelas risadas que tornaram está caminhada mais divertida e leve. Amo vocês.

As minhas amigas, Silvia, Heloisa, Fernanda e Jaqueline. Obrigada por toda ajuda, risadas, parceria de receitas, filmes, praia, faxinas... A caminhada se tornou mais especial com vocês meninas. Obrigada por tanto! Que saudades! Taurinas do 803 + a ascendente + inferno astral.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo, minha coorientadora Profa. Dra. Claudia Sayer e ao meu coorientador Dr. Paulo Emilio Feuser pela disposição e esclarecimento dos fenômenos envolvidos.

Agradeço aos laboratórios LINDEN (UFSC), LAPP (UNESC) e especialmente ao LCP (UFSC) e ao FISIOPAT (UNESC) pela infraestrutura e auxílio técnico no desenvolvimento desta dissertação. Aos membros do grupo Miniemulsão (UFSC), em especial Arthur, Isa, Juju, Jeovandro e Felipe e aos membros do Biotech (UNESC), em especial, Rahisa, Jhonatan e Gabriel.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química e à Universidade Federal de Santa Catarina.

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço a disponibilidade da banca examinadora, a professora Dra. Ana Paula Serafini Immich Boemo e a professor Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila em avaliar meu trabalho. Muito obrigada pelo tempo e atenção neste processo de avaliação, indispensável para aperfeiçoar nosso trabalho.

Enfim, muito obrigada a todos que de alguma forma tornaram a realização deste trabalho possível.

“Lembre-se de Deus em tudo o que fizer de todo o coração
e Ele lhe mostrará o caminho certo”.
(Provérbios 3:6)

RESUMO

A pandemia global de COVID-19 causada pelo novo SARS-CoV-2 e a rápida disseminação da doença criou uma emergência de saúde pública global, exigindo estratégias para conter a disseminação do vírus. O desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico tornou-se necessário, a fim de restringir a disseminação do vírus por meio da identificação e o isolamento de indivíduos contaminados. Neste contexto, a nanotecnologia tem se destacado no desenvolvimento e aperfeiçoamento de testes de diagnósticos disponíveis, em razão das propriedades físico-químicas que estes nanomateriais apresentam. Nanomateriais, como as nanopartículas superparamagnéticas tem atraído significativa atenção da área biomédica em função da sua capacidade de melhorar o desempenho de imunossaios, como o teste de Imunoabsorção enzimática (ELISA). Visando diminuir os problemas atuais relacionados a testes de diagnósticos como a baixa sensibilidade e especificidade, neste estudo foi desenvolvida uma plataforma de teste sorológico. Diante disso, nanopartículas superparamagnéticas de magnetita (SPIONs) foram encapsuladas *in situ* por polimerização em miniemulsão direta em nanopartículas de poli (metacrilato de metila). Posteriormente, dois peptídeos mimetizantes de epítomos da proteína *spike* (S) e nucleocapsídeo (N) do SARS-CoV-2 foram conjugados via adsorção química e física às nanopartículas poliméricas superparamagnéticas. As nanopartículas produzidas foram aplicadas como suporte em ELISA nanomagnético indireto. A caracterização das nanopartículas foi realizada por meio de análises de morfologia, diâmetro médio, decomposição térmica e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier. As nanopartículas superparamagnéticas encapsuladas apresentaram dispersões poliméricas estáveis com diâmetro médio de 110 nm. No processo de funcionalização por ligação covalente para os peptídeos p2pS e p3pN não ocorreram alterações significativas de diâmetro e potencial zeta. Diferentemente, do processo por adsorção física, em que se observou um aumento no diâmetro médio das partículas e uma mudança no potencial zeta. Para as nanopartículas funcionalizadas por adsorção física observou-se menor estabilidade quando comparadas ao processo por funcionalização via ligação covalente. No ensaio ELISA nanomagnético as nanopartículas funcionalizadas com os peptídeos apresentaram uma sensibilidade e especificidade que se situaram abaixo de 90%, enquanto a acurácia, foi inferior a 0,8. Esses resultados fornecem informações para futuras pesquisas e aprimoramentos no desenvolvimento de testes de diagnóstico de alta performance.

Palavras-chave: nanopartículas superparamagnéticas; polimerização em miniemulsão; peptídeo; COVID-19; ELISA nanomagnético

ABSTRACT

The global COVID-19 pandemic caused by the novel SARS-CoV-2 and the rapid spread of the disease have created a global public health emergency, requiring strategies to contain the virus spread. The development of diagnostic tools has become necessary in order to restrict the virus spread through the identification and isolation of contaminated individuals. In this context, nanotechnology has emerged in the development and improvement of available diagnostic tests due to the physicochemical properties that these nanomaterials exhibit. Nanomaterials, such as superparamagnetic nanoparticles, have attracted significant attention in the biomedical field due to their ability to enhance the performance of immunoassays, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Aimed at mitigating current issues related to diagnostic tests such as low sensitivity and specificity, a serological test platform was developed in this study. In this regard, superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) were in situ encapsulated by direct miniemulsion polymerization into poly(methyl methacrylate) nanoparticles. Subsequently, two mimetic peptides of spike (S) and nucleocapsid (N) protein epitopes of SARS-CoV-2 were conjugated via chemical and physical adsorption to the superparamagnetic polymeric nanoparticles. The produced nanoparticles were applied as a support in an indirect nanomagnetic ELISA. Characterization of the nanoparticles was conducted through analyses of morphology, average diameter, thermal decomposition, and Fourier-transform infrared spectroscopy. The encapsulated superparamagnetic nanoparticles exhibited stable polymeric dispersions with an average diameter of 110 nm. In the covalent bonding functionalization process for peptides p2pS and p3pN, no significant changes in diameter and zeta potential occurred. In contrast to the process by physical adsorption, where an increase in the average particle diameter and a change in zeta potential were observed. For nanoparticles functionalized by physical adsorption, lower stability was observed compared to the covalent bonding functionalization process. In the nanomagnetic ELISA assay, nanoparticles functionalized with peptides exhibited sensitivity and specificity below 90%, while accuracy was below 0.8. These results provide insights for future research and enhancements in the development of high-performance diagnostic tests.

Keywords: superparamagnetic nanoparticles; miniemulsion polymerization; peptide; COVID-19; magnetic ELISA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Teste diagnóstico in vitro para COVID-19 por janela de detecção	20
Figura 2 – ELISA indireto para detecção de anticorpos humanos contra antígenos SARS-CoV-2	23
Figura 3 – Curvas características de análise (ROC).....	25
Figura 4 – Comportamento dos momentos magnéticos para cinco tipos diferentes de materiais na ausência ou presença de um campo magnético externo	28
Figura 5 – Curva de magnetização característica de diferentes materiais.....	29
Figura 6 – Processo de polimerização em miniemulsão para encapsulação de compostos insolúveis.....	32
Figura 7 – Principais mecanismos utilizados para imobilizações de biomoléculas em substratos poliméricos	33
Figura 8 - Sistema de sonicação utilizado	40
Figura 9 – Imagens de TEM das nanopartículas SPIONs-PMMA.....	50
Figura 10 – Análise termogravimétrica das nanopartículas SPIONs-PMMA.....	52
Figura 11 – Espectros de FTIR obtidos para as nanopartículas SPIONs-PMMA.....	53
Figura 12 – Comparativo entre os testes por ligação covalente (A) e adsorção física (B).....	62
Figura 13– Conjugados por adsorção física de SPIONs-PMMA-p3pN como antígeno para sorodiagnóstico por ELISA nanomagnético para COVID-19 e respectivas curvas ROC.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados epidemiológicos de COVID-19 no Brasil no período de março de 2020 a dezembro de 2023. Número de casos e óbitos por ano	15
Tabela 2 – Composição do meio reacional para o preparo das nanopartículas SPIONs-PMMA com lecitina.....	41
Tabela 3 – Composição do meio reacional para o preparo das nanopartículas SPIONs-PMMA com SDS.....	41
Tabela 4 – Sequência peptídica e propriedades físico-químicas do peptídeo p2pS e p3pN	48
Tabela 5 – Resultados do cálculo de peso molecular da massa monoisotópica e padrão de fragmentação para os dois peptídeos analisados	48
Tabela 6 – Diâmetro médio em intensidade (Dp), polidispersidade (PDI) e potencial zeta das SPIONs-PMMA	51
Tabela 7– Diâmetro médio em intensidade (Dp), polidispersidade (PDI) e potencial zeta das SPIONs-PMMA-PEPTÍDEOS funcionalizadas por ligação covalente.....	55
Tabela 8 – Diâmetro médio em intensidade (Dp), polidispersidade (PDI) e potencial zeta das SPIONs-PMMA-p2pS funcionalizadas por adsorção física.....	56
Tabela 9 – Diâmetro médio em intensidade (Dp), polidispersidade (PDI) e potencial zeta das SPIONs-PMMA-p3pN funcionalizadas por adsorção física.....	56
Tabela 10 – Parâmetros de análise ROC de detecção específica de ELISA usando peptídeo nanomagnético p3pN em diferentes concentrações.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AO – Ácido oleico

AUC – Área sobre a curva (do inglês: Area Under the Curve)

BSA – Albumina de soro bovino (do inglês: Bovine Serum Albumin Protein)

CI – Intervalos de confiança

CLIA – Imunoensaio quimioluminescente

CoVs – Coronavírus

COVID19 – Doença do coronavírus 2019 (do inglês: Coronavirus disease 2019)

DCM – Diclorometano

DIC – N, N -diisopropilcarbamida

DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz

DMF – Dimetilformamida

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

FMOC – (do inglês: 9-Fluorenyl Methoxycarbonyl)

FTIR - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

H – Campo magnético

Hr – Campo coercivo

Ig – Imunoglobulina

LOD – Limites de detecção

MERSCoV – (do inglês: Middle East Respiratory Syndrome coronavirus)

Mr – Magnetização remanente

Ms – Magnetização de saturação

OPD – O-fenilenodiamina

OXYMA – etil 2-ciano-2- (hidroxiimino) acetato (do inglês: ethyl 2- cyano-2- (hydroxyimino)acetate)

MNPs – Nanopartículas magnéticas

PMMA – Poli(metacrilato de metila)

PBS – Tampão fosfato - salino

RDTs – Testes de detecção rápida

RNA – Ácido ribonucleico

ROC – Curva de Operação do Receptor (do inglês: Receiver Operator Curves)

RT-qPCR – Reação de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase

SARSCoV – Coronavírus da síndrome aguda respiratória grave (do inglês: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus)

SARSCoV-2 – Coronavírus da síndrome aguda respiratória grave 2 (do inglês: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2)

Se – Sensibilidade

Sp –Especificidade

SPIONs – Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro

SPMNP's – Nanopartículas superparamagnéticas

SPIONs-PMMA – Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro encapsuladas em poli (metacrilato de metila)

SPIONs-PMMA-p2pS – Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro encapsuladas em poli (metacrilato de metila) funcionalizadas com o peptídeo p2pS

SPIONs-PMMA-p3pN – Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro encapsuladas em poli (metacrilato de metila) funcionalizadas com o peptídeo p3pN

SRAG – Síndrome respiratória aguda grave

TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão

TFA – Ácido trifluoracético

TGA – Termogravimetria

OMS – Organização mundial da saúde (do inglês: World Health Organization)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 Fundamentação Teórica	19
3.1 DOENÇAS EMERGENTES: ÊNFASE SOBRE O SARS-COV-2.....	19
3.2 DIAGNÓSTICO <i>IN VITRO</i> PARA COVID-19.....	19
3.2.1 Método de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)	22
3.3 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	25
3.3.1 Partículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs)	25
3.3.2 Propriedades magnéticas	27
3.3.3 Estabilidade Coloidal	30
3.3.4 Encapsulação de magnetita via polimerização em miniemulsão	31
3.4 FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS	33
3.5 NANOTECNOLOGIA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIOS ELISA.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 MATERIAIS	37
4.2 MÉTODOS.....	38
4.2.1 Síntese de peptídeos	38
4.2.2 Síntese das Nanopartículas Magnéticas Estabilizadas com AO	39
4.2.3 Encapsulação <i>in situ</i> das SPIONs em Nanopartículas de PMMA Via Polimerização em Miniemulsão	39
4.2.4 Funcionalização de Nanopartículas de SPIONs-PMMA com os peptídeos p2pS e p3pN	41
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	43
4.3.1 Diâmetro de Partícula e Potencial Zeta	43
4.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	43
4.3.3 Termogravimetria (TGA)	44

4.3.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)	44
4.4 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA)	44
4.4.1 Amostras de soros humanos	44
4.4.2 ELISA nanomagnético	45
4.4.3 Análises estatísticas	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS	47
5.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS SPIONs-PMMA	49
5.2.1 Nanopartículas superparamagnéticas encapsuladas em PMMA (SPIONs-PMMA)	49
5.2.1.1 <i>Morfologia e tamanho</i>	49
5.2.1.2 <i>Potencial Zeta</i>	51
5.2.1.3 <i>Análise termogravimétrica</i>	51
5.2.1.4 <i>Estrutura Química (FTIR)</i>	52
5.3 FUNCIONALIZAÇÃO DAS SPIONs-PMMA-PEPTÍDEOS	53
5.4 ELISA NANOMAGNÉTICO	60
6 CONCLUSÃO	66
6.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	67
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, houve um fluxo constante de novos patógenos, incluindo aqueles presentes em animais ou vetores, que se disseminam pela população humana, causando doenças infecciosas emergentes (Wibowo *et al.*, 2021). Um exemplo é a pandemia da doença do novo coronavírus (COVID-19) que surgiu na cidade de Wuhan, na China, em dezembro de 2019 apresentando uma ameaça à saúde e à economia global (Brodeur *et al.*, 2021). Estima-se que até o momento da escrita desta dissertação (dezembro de 2023), mais de 772.838.745 pessoas já foram infectadas e 6.948.764 pessoas vieram a óbito em decorrência da doença e suas complicações no mundo (Who, 2022). No Brasil, até o dia 16 de dezembro de 2023, apesar de subnotificado, tem-se a confirmação de 38.160.672 casos, sendo 708.373 fatais e esses dados aumentaram rapidamente entre 2020 e 2022 (Tabela 1).

Tabela 1 – Dados epidemiológicos de COVID-19 no Brasil no período de março de 2020 a dezembro de 2023. Número de casos e óbitos por ano

Ano	Casos	Óbitos
2020	7.716.405	195.725
2021	14.573.707	423.349
2022	14.041.169	74.779
2023	1.829.391	14.520

Fonte: Brasil, 2023. Painel Nacional: COVID-19. Secretarias Estaduais de Saúde. Dados até 19/12/2023.
Disponível em: < <https://www.conass.org.br/painelconasscovid19/> >

Uma das principais estratégias de linha de frente para detectar pessoas infectadas e conter a disseminação de vírus são os testes de diagnóstico (Lai; Lam, 2021). Identificar pacientes infectados, infectados assintomáticos e levemente sintomáticos torna-se primordial em meio a uma pandemia, principalmente para mitigar a carga sobre sistemas de saúde (Vandenberg *et al.*, 2021).

Atualmente, os testes de COVID-19 disponíveis comercialmente enquadram-se principalmente em duas categorias: Testes moleculares para detecção de RNA viral que utiliza técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e ensaios sorológicos que detectam anticorpos produzidos por indivíduos infectados (Carter *et al.*, 2020). Os ensaios baseados na reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa são considerados o padrão ouro para o diagnóstico de COVID-19 (Tang *et al.*, 2020). No entanto, esta estratégia de diagnóstico é limitada por restrições logísticas, como baixa disponibilidade de laboratórios

equipados, equipe treinada, reagentes, swabs usados nas coletas de secreção e o curto período de altos níveis de excreção viral nas secreções respiratórias (Arevalo-Rodriguez *et al.*, 2020; Al-Jighefee *et al.*, 2021). O RT-PCR é bastante desafiador em ambientes com recursos limitados, além da execução do ensaio ser relativamente demorada e altamente dependente da fase pré-analítica (Cota *et al.*, 2020). Desta forma, inúmeros testes sorológicos, baseados na detecção de antígenos ou anticorpos estão sendo desenvolvidos (Domenico *et al.*, 2021). A sorologia pode ser realizada em laboratórios clínicos básicos ou em ambientes comunitários, permitindo uma aplicação mais ampla, vantagens que estão estimulando governos de diversos países a adquirir e utilizar testes sorológicos em larga escala durante uma pandemia (Cota *et al.*, 2020). O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), por exemplo, é um ensaio sorológico que tem a capacidade de testar várias amostras e é adaptável à automação para aumentar o rendimento, no entanto, varia em sensibilidade (Carter *et al.*, 2020). Uma maior disponibilidade de ferramentas laboratoriais precisas para o COVID-19 é primordial para a identificação de casos e a otimização de medidas de controle da infecção, como já foi demonstrado por epidemias anteriores causadas por outros vírus (Gostin, 2018; Arevalo-Rodriguez *et al.*, 2020; Sharfstein, Becker e Mello, 2020).

Neste contexto, o uso de nanomateriais durante a pandemia de COVID-19 atraiu uma significativa atenção na área biomédica, principalmente por apresentarem características físico-químicas que podem melhorar o desempenho dos testes de diagnóstico (León-Janampa *et al.*, 2022; Scussel *et al.*, 2022). Dentre os nanomateriais promissores para o uso, as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) merecem destaque. As SPIONs apresentam uma alta capacidade de separação rápida a partir de um campo magnético externo, característica que auxilia na sensibilidade e diminuição do tempo de diagnóstico (Ortega; Pérez-Rodríguez; Reguera, 2017; Urusov *et al.*, 2017; Feuser *et al.*, 2021). Todavia, a encapsulação de nanopartículas superparamagnéticas em matrizes poliméricas ocasiona benefícios importantes que podem trazer outras funcionalidades a estes nanomateriais, como proteção superficial contra a oxidação e agregação de partículas, melhora nas propriedades de estabilidade coloidal e interfacial aumentando a especificidade para o reconhecimento de biomoléculas (Pichot, 2004; Thanh; Green, 2010; D. Howes, Rana; Stevens, 2014). A técnica de polimerização em miniemulsão (*in situ*) possibilita a incorporação de nanopartículas superparamagnéticas em apenas uma única etapa da reação, além de proporcionar a funcionalização da nanopartícula polimérica, favorecendo imobilização de biomoléculas tanto por formação de ligações covalentes ou por adsorção física (Landfester; Weiss, 2010; Crespy; Landfester, 2010; Campos, Feuser *et al.*, 2015, Ferraz; Pinto, 2016).

Em trabalhos recentes, (Feuser *et al.*, 2021) produziram nanopartículas de PMMA superparamagnéticas conjugadas a albumina de soro bovino (BSA), com o objetivo de aplicar as nanopartículas em teste ELISA. Scussel *et al.*, (2022) desenvolveram um teste ELISA magnético para COVID-19, onde funcionalizaram nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro com peptídeos. Estes dois estudos contribuíram significativamente para o desenvolvimento das metodologias adotadas neste trabalho, permitindo a continuidade do estudo para o desenvolvimento de uma plataforma para testes sorológicos rápidos e ultrasensível.

A principal motivação deste trabalho foi desenvolver um teste ELISA nanomagnético a partir da conjugação de peptídeos conformacionais a nanopartículas superparamagnéticas de poli(metacrilato de metila) para a detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2. Estes peptídeos foram desenvolvidos no estudo de (Scussel *et al.*, 2022), que através de ferramentas de bioinformática identificaram epítomos específicos de proteínas alvo imunogênicas, S e N, do SARS-CoV-2 para a predição epítomos conformacionais sintetizando quimicamente peptídeos análogos destas regiões.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo visa contribuir para o desenvolvimento de um teste sorológico ELISA nanomagnético que se baseia na conjugação de peptídeos a nanopartículas de magnetita revestidas com poli(metacrilato de metila), com o intuito de diagnosticar a COVID-19.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Realizar a síntese química pela técnica FMOC de dois peptídeos mimetizadores dos epítomos da proteína S e N de SARS-COV-2;
- Realizar a encapsulação de nanopartículas de magnetita via polimerização de metacrilato de metila (MMA) em miniemulsão direta. Caracterizar as nanopartículas obtidas;
- Proceder à conjugação dos peptídeos às nanopartículas superparamagnéticas de PMMA via adsorção química e física. Caracterizar as nanopartículas obtidas;
- Avaliar por ELISA nanomagnético, as nanopartículas conjugadas aos peptídeos com soros positivos de pacientes com COVID-19, confirmados por RT-PCR e com soro negativo, a fim de avaliar o seu uso em um diagnóstico de elevada performance.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 DOENÇAS EMERGENTES: ÊNFASE SOBRE O SARS-COV-2

Nas últimas duas décadas, vírus, como agentes etiológicos de infecções respiratórias, causaram mortalidades em todo o mundo e grandes problemas de saúde pública (Dhawan *et al.*, 2020). Muitos vírus são capazes de promover um amplo espectro de doenças pulmonares, incluindo a forma mais grave de infecção respiratória, a síndrome respiratória aguda grave (SRAG) (Gralinski e Baric, 2015). Seis vírus foram associados ao grande número de mortes relacionadas a SRAG em todo o mundo, incluindo os vírus influenza H1N1 2009, influenza aviário H5N1 e H7N9, os coronavírus SARS-CoV com surto entre 2002 e 2003, MERS-CoV com surto em 2012 e 2015 e mais recentemente o SARS-CoV-2 (Gralinski e Baric, 2015; Kolifarhood *et al.*, 2020).

No final de 2019, o vírus SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19, surgiu na cidade de Wuhan, na China, causando um surto de pneumonia viral incomum. Com alta transmissibilidade, essa doença se espalhou rapidamente pelo mundo e foi declarada uma pandemia pela organização mundial da saúde (OMS) em 11 de março de 2020 (Wu; Leung; Leung, 2020; Hu *et al.*, 2022; Who, 2022).

O uso de abordagens colaborativas, envolvendo diagnóstico preciso, epidemiologia, vigilância e profilaxia, são fundamentais em estágios iniciais de surtos virais, principalmente quando não há medicamentos ou vacina disponível (Pokhrel; Hu; Mao, 2020; Rai *et al.*, 2021). Com o aumento da incidência de casos, a obtenção de plataformas de diagnósticos rápidas em larga escala é uma forma eficaz de conter a propagação e gerenciar indivíduos contaminados (Weissleder *et al.*, 2020a; Zhu *et al.*, 2020; Vandenberg *et al.*, 2021).

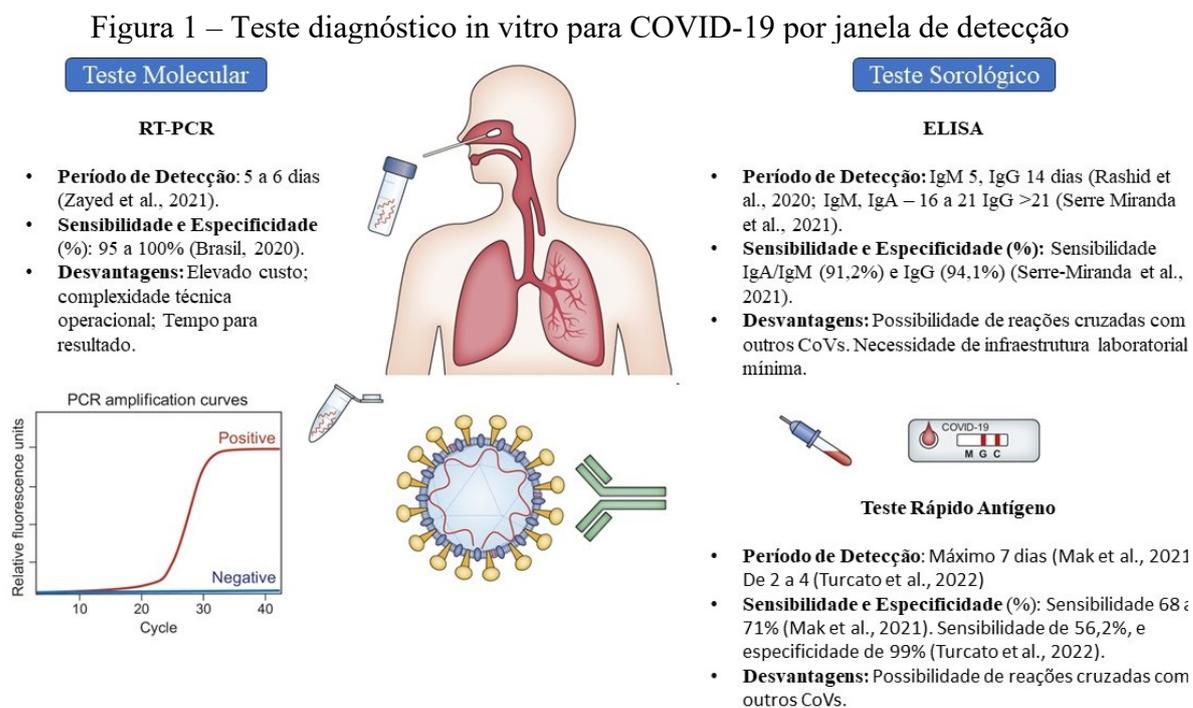
3.2 DIAGNÓSTICO *IN VITRO* PARA COVID-19

Durante uma pandemia, há múltiplas prioridades clínicas concomitantes, como compreender a fisiopatologia da doença, agilizar e otimizar o atendimento ao paciente infectado e principalmente prevenir futuras infecções. A detecção e caracterização do agente etiológico no hospedeiro é fundamental na epidemiologia e na contenção de surtos como o da COVID-19 (Vandenberg *et al.*, 2021; Weissleder *et al.*, 2020b).

O período médio de incubação do SARS-CoV-2 é de aproximadamente 5 dias (variando de 2 a 14 dias), e as pessoas que desenvolvem sintomas o fazem em aproximadamente

12 dias após a infecção (variando de 8 a 16 dias). Uma parte considerável da transmissão do vírus pode ocorrer antes que os indivíduos infectados desenvolvam sintomas (pré-sintomáticos). Uma fração dos indivíduos infectados nunca desenvolve sintomas (assintomáticos), mas podem contribuir substancialmente para a transmissão da doença (He *et al.*, 2020; Lauer *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020). Em um estudo verificou-se que cerca de 50 a 75% dos indivíduos com resultados positivos de RT-PCR permanecem assintomáticos ou levemente sintomáticos, e cerca de 10% de todos os pacientes sintomáticos, apresentaram dispneia, pneumonia intersticial grave e disfunção de múltiplos órgãos (Pascarella *et al.*, 2020)

Os testes para o COVID-19 podem ser agrupados em testes moleculares, sorológicos e testes auxiliares, os quais desempenham funções distintas (Asselah *et al.*, 2021). A Figura 1 ilustra os principais testes diagnósticos *in vitro* para COVID-19.



Fonte: Adaptado de (Asselah *et al.*, 2021; Scussel *et al.*, 2022)

Dentre os testes disponíveis para a detecção de SARS-CoV-2 o método baseado na detecção de transcriptase reversa na cadeia da polimerase (RT-PCR) é o método padrão ouro recomendado (Tang *et al.*, 2020). Este método se caracteriza por apresentar uma detecção rápida, alta sensibilidade e especificidade (Shen *et al.*, 2020). Embora os testes moleculares sejam o padrão-ouro e muito específicos na detecção precoce da COVID-19, seu alcance para um diagnóstico em larga escala é restrito principalmente devido ao seu custo, viabilidade e rapidez (Ejazi; Ghosh; Ali, 2021). Este método de diagnóstico requer o uso de equipamentos e

reagentes sofisticados, além de uma complexidade técnica, com laboratórios equipados com ferramentas e instrumentos especializados, bem como altos níveis de biossegurança. Portanto, é um desafio o uso de kits RT-PCR para vigilância rápida ou triagem de nações em eventuais pandemias (Asselah *et al.*, 2021; Ejazi; Ghosh; Ali, 2021; Yüce, Filiztekin e Özkaya, 2021). Outro fator é a demora dos resultados, embora a análise seja relativamente rápida, alguns resultados podem demorar de 4-6 horas ou até alguns dias para ficarem prontos, devido a questões de transporte da amostra e as etapas pré-analíticas realizadas em laboratórios centrais restringindo a acessibilidade e rapidez de resultados em áreas remotas (Vandenberg *et al.*, 2021).

Uma questão importante a ser discutida em relação ao teste RT-PCR é que embora este tenha alta especificidade analítica, o que resulta em taxas mínimas de falsos positivos, sua sensibilidade diagnóstica ainda permanece abaixo do ideal, podendo ocorrer falsos-negativos (Tahamtan; Ardebili, 2020).

A eficiência diagnóstica do RT-PCR depende de vários fatores, como mencionados anteriormente, mas também de outras condições, como a carga viral, tipo de amostra, estágio da infecção e tempo desde o início dos sintomas, além de mutações no genoma viral (Arevalo-Rodriguez *et al.*, 2020; Elslande, *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020; Pecoraro *et al.*, 2022). Muitos estudos relataram resultados falso-negativos em pacientes com características clínicas típicas de Covid-19, mas que não foram identificados com RT-PCR, colocando em risco a identificação correta de pacientes infectados (Arevalo-Rodriguez *et al.*, 2020; Woloshin; Patel; Kesselheim, 2020; Yang *et al.*, 2020; Zou *et al.*, 2020; Drobysh *et al.*, 2021a).

Métodos de ensaio adicionais para a detecção de SARS-CoV-2 são recomendáveis principalmente quando o paciente apresenta suspeita da doença com resultado PCR negativo. Testes sorológicos como o ensaio ELISA e testes de detecção rápida (RDTs) por imunocromatografia podem ser métodos complementares e/ou substituto ao RT-PCR para o diagnóstico de COVID-19 a depender do curso clínico da infecção. Estima-se que a soroconversão para SARS-CoV-2 ocorra 7 a 14 dias após o início dos sintomas, quando a sensibilidade da PCR diminui. Esta combinação equilibra as limitações de cada teste, o RT-PCR compensa a baixa sensibilidade de ensaios sorológicos na fase aguda da doença, em que o ensaio sorológico compensa a baixa sensibilidade do RT-PCR na fase final da infecção (Elslande, *et al.*, 2020; Scussel *et al.*, 2022).

Em um estudo (Guo *et al.*, 2020), demonstraram que uma combinação do ensaio ELISA com PCR aumentou significativamente a positividade para 98,6% em comparação com o teste de PCR sozinho (51,9%).

Zhao *et al.*, (2020) demonstraram que em 7 dias o teste de RNA tem 66,7% de sensibilidade e o teste de anticorpos tem apenas 38,3%. No entanto, após 12 dias do início da doença, a detecção de anticorpos ultrapassou o teste de RNA e foi considerada mais de 90% sensível.

3.2.1 Método de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

A detecção de anticorpos contra vírus em indivíduos infectados é um dos métodos diagnósticos mais importantes na vigilância de doenças. O princípio fundamental por trás do imunodiagnóstico é a detecção de anticorpos desenvolvidos em resposta a uma infecção viral. Diferentes testes sorológicos estão disponíveis para determinar a resposta de anticorpos provocada pela infecção por SARS-CoV-2. De maneira geral, os testes de sorologia podem ser adequados e utilizados nas seguintes situações: diagnóstico de pacientes que apresentam sintomas há mais de sete dias; diagnóstico de pacientes com teste RT-PCR negativo, mas com fortes evidências epidemiológicas e clínicas que segurem infecção por COVID-19, rastreamento de contato de indivíduos contaminados, determinação de imunidade potencial e a probabilidade de proteção contra uma reinfecção e por fim, em estudos soroepidemiológicos, que visam compreender a extensão da circulação da Covid-19 (Mohit; Rostami; Vahidi, 2021; Rai *et al.*, 2021).

Os imunoenaios utilizados para o diagnóstico da COVID-19 são principalmente imunoenaios de quimioluminescência (CLIAs), ELISAs e testes de diagnóstico rápido, como imunoenaios de fluxo lateral (LFIAs). Estes métodos detectam as proteínas estruturais virais ou os anticorpos IgM e IgG soroconvertidos no sangue ou no soro. A IgM torna-se detectável no soro após alguns dias e persiste por algumas semanas após a infecção, sendo seguida por uma transição para a IgG. Portanto, a presença da IgM pode indicar uma infecção em estágio inicial, enquanto a presença da IgG pode indicar uma infecção atual ou anterior. Além disso, a IgG pode ser utilizada para sugerir a presença de imunidade pós-infecção (Ejazi *et al.*, 2021).

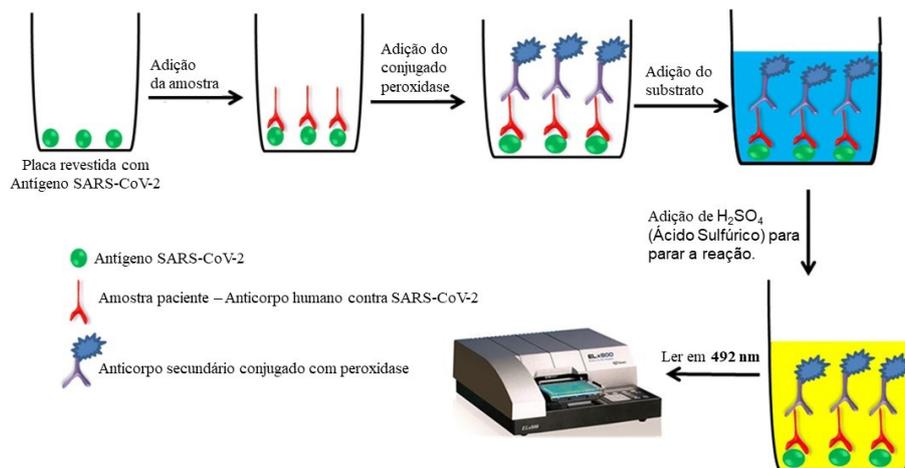
O Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) detecta e quantifica substâncias, incluindo anticorpos, antígenos, proteínas, glicoproteínas e hormônios. Para a detecção dos anticorpos do indivíduo contaminado, um antígeno de captura conhecido é imobilizado em uma microplaca e, em seguida, os anticorpos do paciente em uma amostra ligam-se ao antígeno de captura imobilizado. Após, um anticorpo de detecção marcado com enzima específico para qualquer isótipo de anticorpo (IgG, IgM, etc) forma um complexo com os anticorpos do paciente capturados. Em seguida, a interação da enzima (geralmente peroxidase de rábano) e

seu substrato causa uma alteração colorimétrica que pode ser quantificada e correlacionada com a presença e/ou concentração do anticorpo (Carter *et al.*, 2020; Mohit; Rostami; Vahidi, 2021).

No caso do SARS-CoV-2, conforme mostrado na Figura 2 os poços de uma microplaca são normalmente revestidos com uma proteína viral. Se o paciente estiver contaminado, os anticorpos antivirais nas amostras se ligarão especificamente, e o complexo anticorpo-proteína ligado pode ser detectado com um anticorpo rastreador adicional para produzir uma leitura colorimétrica. A Figura 2 ilustra uma visão geral do ensaio ELISA indireto para detecção de anticorpos humanos contra antígenos SARS-CoV-2.

A avaliação de anticorpos específicos contra SARS-CoV-2, incluindo imunoglobulina G (IgG) e M (IgM), bem como A (IgA), que são induzidas rapidamente após o início da doença, pode oferecer um diagnóstico alternativo altamente sensível.

Figura 2 – ELISA indireto para detecção de anticorpos humanos contra antígenos SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de (Rai *et al.*, 2021)

A avaliação de anticorpos específicos contra SARS-CoV-2, incluindo imunoglobulina G (IgG) e M (IgM), bem como A (IgA), que são induzidas rapidamente após o início da doença, pode oferecer um diagnóstico alternativo altamente sensível (Rai *et al.*, 2021).

Os ensaios sorológicos podem permitir a vigilância sorológica, detectar aqueles que já foram infectados, avaliar a imunidade natural adquirida e registrar a extensão da disseminação da COVID-19 (Ong *et al.*, 2021). Um ponto a ser destacado é a especificidade do ensaio ELISA. A reatividade cruzada de anticorpos com vários coronavírus precisa ser

considerada ao desenvolver um ELISA para SARS-CoV-2. Vários kits atualmente disponíveis para o diagnóstico de SARS-CoV-ELISAs revelaram reatividade cruzada com outros coronavírus sazonais, incluindo HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-229E e HCoV-HKU1, afetando a especificidade dos ensaios (Poland; Ovsyannikova; Kennedy, 2020; Shang *et al.*, 2020; Zeng *et al.*, 2020; Vogl; Leviatan; Segal, 2021).

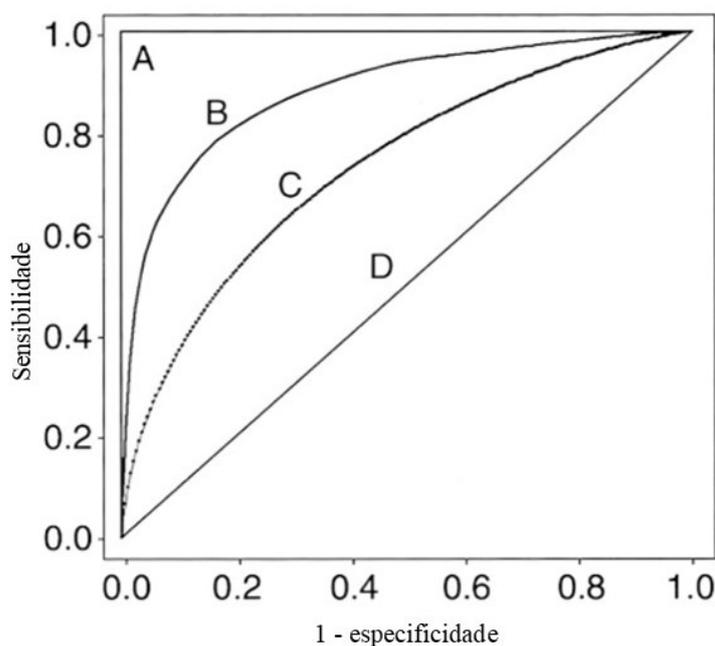
Por todo exposto, observa-se que o desenvolvimento de testes de diagnósticos de maior sensibilidade e especificidade constitui um campo de estudo de relevância mundial, já que poderá auxiliar na ampliação de ferramentas de diagnósticos.

3.2.2 Avaliação de desempenho de teste sorodiagnóstico

A avaliação de desempenho de um teste de diagnóstico é essencial para assegurar a precisão e confiabilidade dos resultados. Comumente, o método estatístico utilizado para essa avaliação é a análise da curva ROC. A curva ROC é um método analítico empregado para avaliar o desempenho de um método de classificação diagnóstica binária (positiva ou negativa) de medidas preditivas que estimam a probabilidade de uma doença em um indivíduo. A Curva ROC ilustra a relação entre sensibilidade e especificidade de um teste diagnóstico (Habibzadeh; Habibzadeh; Yadollahie, 2016; Nahm, 2021). A sensibilidade (Se) refere-se à proporção de indivíduos verdadeiramente doentes que apresentam resultados positivos no teste, sendo maior sensibilidade associada a uma menor probabilidade de falsos negativos. Já a especificidade (Sp) representa a proporção de indivíduos saudáveis que apresentam resultados negativos, indicando menor probabilidade de falsos positivos (Akobeng, 2007; Guo *et al.*, 2020).

A área sob uma curva ROC (AUC) é uma medida da acurácia de um teste diagnóstico na qual os valores da AUC indicarão o desempenho do teste. A curva ROC ideal tem uma AUC = 1,0. Para que qualquer técnica diagnóstica seja significativa, a AUC deve ser superior a 0,5 e, em geral, deve ser superior a 0,8 (Valor aceitável) (Habibzadeh, Habibzadeh e Yadollahie, Nahm, 2020). A Figura 3 ilustra 4 curvas características de análise (ROC).

Figura 3 – Curvas características de análise (ROC)



Fonte: Adaptado de (Park, Goo e Jo, 2004).

Um teste perfeito (Curva A) tem uma área sob a curva ROC de 1. A diagonal (Curva D) tem uma área sob a curva ROC de 0,5. As curvas ROC de testes com alguma capacidade de distinguir entre indivíduos com e sem doença (Curvas B e C) situam-se entre esses dois extremos. O teste B com maior área sob a curva ROC apresenta melhor desempenho quando comparado ao teste C (Park, Goo e Jo, 2004).

Em um estudo utilizando o método Elisa como sorodiagnóstico para COVID-19, a detecção de anti-SARS-CoV-2 IgA, IgG e IgM apresentou alto desempenho analítico, demonstrando alta especificidade (99,3%; $n = 1000$) e sensibilidade (92% para IgA, 96% para IgG e 98% para IgM; > 10 dias após infecção comprovada por PCR; $n = 53$) no soro (Peterhoff *et al.*, 2021).

3.3 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

3.3.1 Partículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs)

Considerando o cenário da COVID-19, a nanotecnologia vem sendo alvo de estudos principalmente pelas propriedades físico-químicas únicas dos nanomateriais, sendo utilizada em diversas áreas, como prevenção, diagnóstico e terapia (Campos *et al.*, 2020; Hasanzadeh *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2021). Por possuírem propriedades magnéticas, como à rápida separação

do meio reacional pela aplicação de um campo magnético, bem como outras propriedades intrínsecas, como a baixa toxicidade, estabilidade coloidal, capacidade de engenharia de superfície e elevada área superficial, a aplicação destes nanomateriais no desenvolvimento de ferramentas de diagnósticos é uma alternativa para aumentar a sensibilidade e especificidade dos testes disponíveis comercialmente (León-Janampa *et al.*, 2022; Wu; Jiang; Roy, 2016).

Materiais como metais puros (Fe, Co, Ni), ligas (FeCo) e óxidos (Fe_3O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) com magnetizações de alta saturação são os mais utilizados para produzir nanopartículas magnéticas. No entanto, apesar de os metais puros serem capazes de produzir magnetizações de saturação alta, eles acabam não sendo adequados para uso clínico devido à alta toxicidade e propriedades oxidativas (Wu *et al.*, 2019). Dentre as nanopartículas superparamagnéticas, nanopartículas de óxido de ferro são as mais utilizadas. Os óxidos de ferro podem apresentar oito arranjos cristalográficos distintos, sendo a magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) as mais comuns (Teja; Koh, 2009). No entanto, a magnetita, é a que tem atraído maior interesse tecnológico, devido às excelentes propriedades magnéticas, facilidade de síntese, biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixo custo (Ganapathe *et al.*, 2020; Gupta e Gupta, 2005; Lima *et al.*, 2017). A magnetita também difere dos demais óxidos de ferro por conter em sua estrutura o ferro em dois estados de oxidação Fe (II) e Fe (III). A magnetita tem uma estrutura cúbica de espinélio invertido, em um empacotamento cúbico em que os íons Fe^{2+} ocupam a metade dos campos octaédricos e os íons de Fe^{3+} são divididos uniformemente entre os campos octaédricos e tetraédricos remanescentes (Teja; Koh, 2009).

Vários métodos de síntese têm sido desenvolvidos para sintetizar SPIONs, como coprecipitação, decomposição térmica, sínteses hidrotérmicas ou solvotérmicas, sol-gel e microemulsão (Gupta; Gupta, 2005). A abordagem de síntese deve ser econômica, um processo relativamente simples, ambientalmente amigável e possuir uma alta reprodutibilidade (Ganapathe *et al.*, 2020). A escolha de um método de preparação adequado para a síntese das SPIONs possibilita partículas com bom controle de tamanho e formas bem definidas e uniformes (Liu, *et al.*, 2020). O tamanho e a forma são fatores determinantes nas propriedades magnéticas. Normalmente estas partículas apresentam morfologia esférica, mas métodos de sínteses alternativos podem gerar partículas de diversas formas e com propriedades únicas (Ansari *et al.*, 2019).

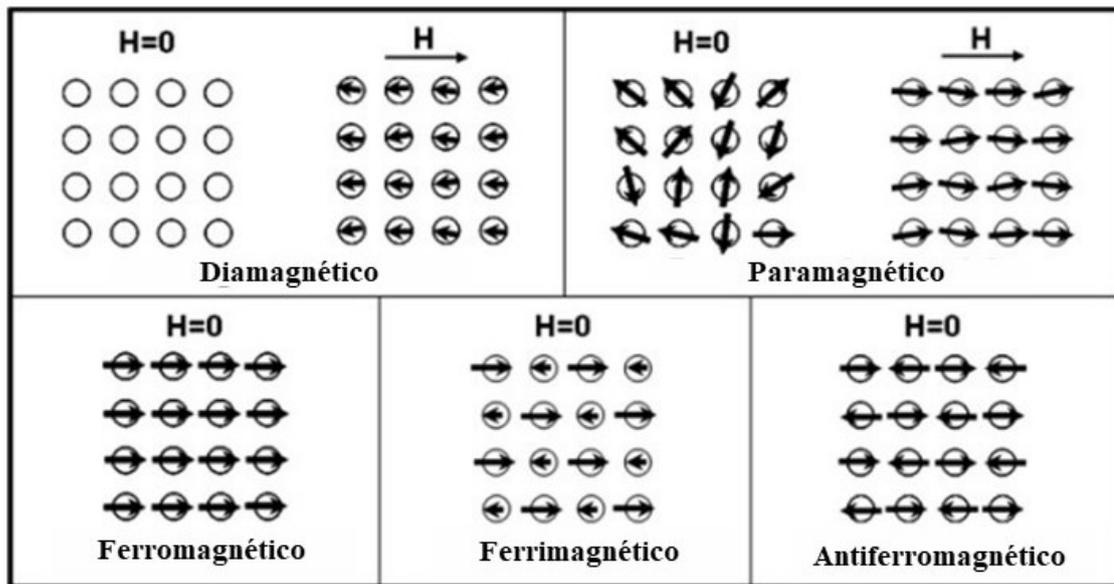
O método mais convencional para sintetizar SPIONs é a coprecipitação, devido à sua simplicidade e eficiência (Ganapathe *et al.*, 2020). Este método consiste em misturar íons férricos e ferrosos na proporção molar de 1:2 em soluções altamente básicas em temperatura ambiente ou em temperatura elevada. A morfologia e a estrutura das SPIONs dependem de

vários parâmetros experimentais como o tipo de sal empregado, proporção de íons férricos e ferrosos, temperatura de reação, valor de pH, força iônica do meio, taxa de agitação e a velocidade da adição do agente alcalino (Gupta; Gupta, 2005; Wu; He; Jiang, 2008). A desvantagem deste método de síntese em solução aquosa é o alto valor de pH do meio reacional, que deve ser ajustado em etapas de purificação, limitando a obtenção de partículas monodispersas. Há geração na síntese de efluentes com valores de pH muito básicos, requerendo tratamentos posteriores (Gupta; Gupta, 2005; Wu, He e Jiang, 2008).

3.3.2 Propriedades magnéticas

As propriedades magnéticas das nanopartículas magnéticas, como o momento magnético e a constante de anisotropia, dependem fortemente do tamanho, forma, composição e a arquitetura destas nanomateriais. O momento magnético é o produto da magnetização e do volume do núcleo magnético, que é a propriedade mais importante para aplicações relacionadas à nanomedicina (Wu *et al.*, 2019). Um momento magnético alto produz um sinal de detecção com maior sensibilidade, sendo utilizado em biossensores magnéticos e aplicações relacionadas a imagens, assim como uma força magnética maior é utilizada para manipulação magnética e aplicações relacionadas à entrega de medicamentos (Colombo *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2019). Dependendo do arranjo dos momentos magnéticos os materiais podem ser classificados em: diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos, ferrimagnéticos, antiferromagnéticos e superparamagnéticos (Kolhatkar *et al.*, 2013). A Figura 4 apresenta o comportamento dos momentos magnéticos para diferentes tipos de material.

Figura 4 – Comportamento dos momentos magnéticos para cinco tipos diferentes de materiais na ausência ou presença de um campo magnético externo



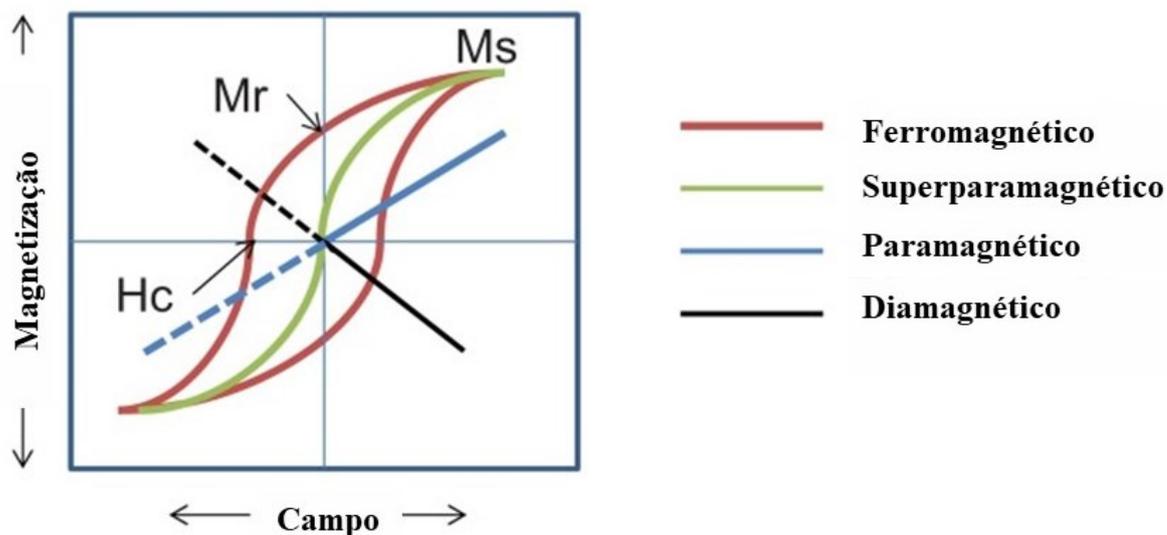
Fonte: Adaptado de (Jeong *et al.*, 2007)

As nanopartículas magnéticas normalmente são classificadas como partículas ferrimagnéticas, ferromagnéticas ou superparamagnéticas (Kolhatkar *et al.*, 2013).

Os materiais ferromagnéticos se caracterizam por apresentar momentos magnéticos permanentes, mesmo na ausência de campo aplicado. Quando desmagnetizados, estes materiais são divididos em pequenas regiões denominadas domínios, que são regiões dentro do material em que os momentos magnéticos se alinham e formam uma magnetização espontânea (Conde *et al.*, 2014). Materiais ferrimagnéticos e antiferromagnéticos apresentam um comportamento semelhante aos ferromagnéticos. No entanto, nestes materiais, na ausência de um campo magnético, os momentos magnéticos se organizam de maneira antiparalela, resultando em uma magnetização global parcialmente reduzida ou nula (Kolhatkar *et al.*, 2013).

A magnetização (M) de um material em relação ao campo magnético externo aplicado (H) constitui uma importante ferramenta para o estudo de materiais magnéticos e pode ser definida como a soma vetorial da magnetização de cada um de seus domínios por unidade de volume (Teja; Koh, 2009). A relação entre estas grandezas é apresentada como um ciclo de histerese, como demonstrado na Figura 5 em que apresenta importantes conceitos relacionados aos domínios magnéticos.

Figura 5 – Curva de magnetização característica de diferentes materiais



Fonte: Adaptado de (Kolhatkar *et al.*, 2013)

Em materiais ferromagnéticos observa-se que a magnetização pode ir de zero ao valor máximo, denominado de magnetização de saturação (M_s), que é quando a magnetização da amostra apresenta todos os seus domínios alinhados paralelamente com o campo. Quando há uma redução do campo magnético a zero, depois de alcançado a M_s , nem todos os domínios voltam para as suas orientações originais, o que resulta em um valor residual de magnetização denominado magnetização remanente ou residual (M_r). Para forçar a M a zero, é necessário aplicar um campo magnético em sentido contrário, definido como campo coercivo ou coercividade (H_c). Variando o módulo do campo, chega-se novamente à região de saturação e o ciclo é repetido no sentido inverso (Teja; Koh, 2009; Kolhatkar *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019) A presença de histerese na curva de magnetização é característica de materiais ferromagnéticos e ferrimagnéticos, visto que, conservam parte de sua magnetização, após a remoção de um campo magnético aplicado (Martins, 2017).

Em materiais superparamagnéticos não há histerese, uma vez que como todos os momentos magnéticos estão alinhados em uma mesma direção, eles não apresentam magnetização remanente. Quando comparada com materiais macroscópicos análogos a magnetização de saturação é alcançada com menores campos magnéticos, o que implica em uma maior resposta (Lima *et al.*, 2017). Estas características apresentam grande vantagens em aplicações biomédicas, visto que, ao remover o campo magnético, as partículas perdem a magnetização, eliminando problemas como o efeito de agregação, indesejável para determinadas aplicações. Além de que nanopartículas superparamagnéticas em virtude do

efetivo controle de suas propriedades magnéticas, apresentam forte resposta à aplicação de um campo magnético externo (Kolhatkar *et al.*, 2013).

A magnetita, por exemplo, apresenta propriedades ferromagnéticas em escala micrométrica e propriedades superparamagnéticas em escala nanométrica. Neste caso, devido a diminuição do tamanho do material, o número de domínios diminui até que haja um único domínio, gerando uma resposta ao campo magnético diferente (Lima *et al.*, 2017).

3.3.3 Estabilidade Coloidal

A instabilidade após longos períodos de tempo é um problema inevitável de nanopartículas magnéticas. Para reduzir sua energia de superfície, as SPIONs tendem a se aglomerar, resultando em conseqüente sedimentação. Além disso, SPIONs tem uma alta reatividade química fazendo com que sua superfície seja suscetível a oxidação na presença de oxigênio, problemas indesejáveis para diversas aplicações devido à possibilidade de perda de propriedades dependentes do tamanho como o superparamagnetismo e a redução dos valores de magnetização (Neto *et al.*, 2018; Liu, S. *et al.*, 2020). Portanto, melhorar a estabilidade e a proteção da superfície das SPIONs é essencial para sua futura aplicação, e a funcionalização de sua superfície pode ser uma alternativa.

A metodologia mais comum utilizada para evitar a agregação é o uso de surfactantes. Um exemplo clássico de molécula empregada para a redução da aglomeração durante o processo de síntese e o aumento da estabilidade de SPIONs é o ácido oleico. Comparado a outros tensoativos, o ácido oleico, possui alta afinidade com nanopartículas magnéticas devido a interações entre o grupo carboxila (parte polar) que se liga à superfície das nanopartículas (Marinca *et al.*, 2016; Neto *et al.*, 2018). O emprego de surfactantes auxilia na estabilidade das SPIONs, todavia, não resolve problemas de oxidação na superfície destes nanomateriais. A encapsulação destas nanopartículas em materiais inorgânicos (como sílica, carbono) ou em polímeros aumenta as possibilidades de aplicação destes nanomateriais, devido a uma série de vantagens como proteção das SPIONs, melhoras na estabilidade contra agregação preservando o material na faixa de superparamagnetismo, além de agregar funcionalidades para ligações com outras moléculas (Landfester; Weiss, 2010; Chiaradia *et al.*, 2015; Schoth *et al.*, 2016; Liu, *et al.*, 2020).

Várias técnicas podem ser aplicadas para a encapsulação *in situ* de SPIONs durante a síntese de polímeros, incluindo polimerização em emulsão, emulsão inversa, miniemulsão direta ou inversa. Dentre as técnicas, a polimerização em miniemulsão se mostra mais adequada

para o processo de encapsulação de magnetita (Landfester; Ramírez, 2003; Landfester; Weiss, 2010).

3.3.4 Encapsulação de magnetita via polimerização em miniemulsão

Atualmente, nanopartículas e nanocápsulas poliméricas estão sendo utilizadas em diversas aplicações tecnológicas e médicas. Neste contexto, a encapsulação de diversos materiais em partículas poliméricas tem sido bastante investigada. Para a preparação de nanopartículas a partir de monômeros polimerizados via radicais livres, a polimerização em emulsão é muito empregada. No entanto, como o processo de polimerização em emulsão é limitado por alguns fatores como a necessidade de transferência de massa entre as fases e a geração de estruturas complexas, a técnica de polimerização em miniemulsão tem sido utilizada para resolver estes problemas. (Landfester; Weiss, 2010).

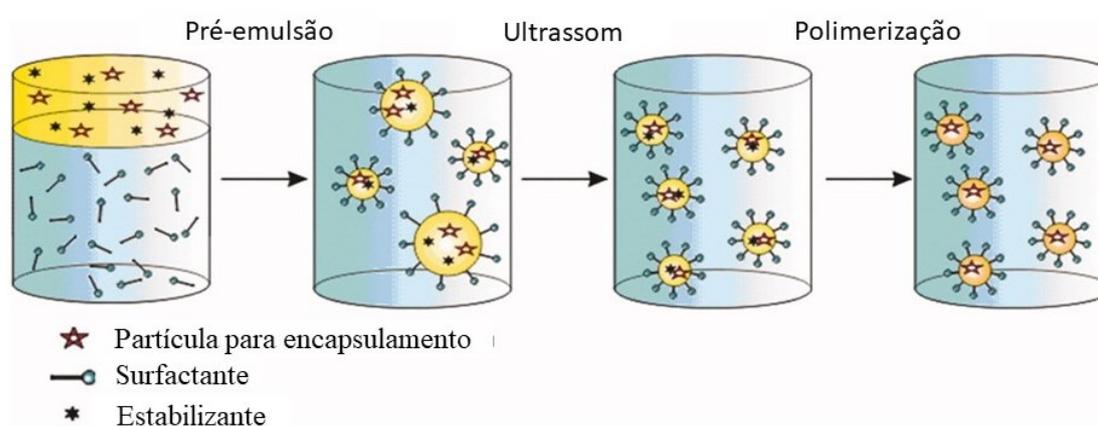
As miniemulsões são definidas como sistemas heterogêneos que consistem em gotículas estáveis dispersas em uma fase contínua, quando duas fases imiscíveis são submetidas a aplicação de elevada energia de cisalhamento via ondas ultrassônicas ou homogeneizador de alta velocidade. As gotículas apresentam uma distribuição de tamanho estreita, variando de 50 a 500 nm, idealmente, não se observa mudanças de tamanho entre a gota de monômero e a partícula de polímero obtida no final da reação (Asua, 2002; Crespy; Landfester, 2010).

Uma formulação típica para a realização da polimerização em miniemulsão, inclui água, uma mistura de monômeros, um coestabilizador, surfactante e iniciador (Asua, 2002). Todos esses componentes são homogeneizados para se obter gotas homogêneas e monodispersas. O objetivo principal em um processo de miniemulsão é iniciar a polimerização em pequenas gotículas de monômero estáveis, que funcionam como “nanorreatores”, sendo esta uma das principais vantagens do método. É essa característica que permite que compostos insolúveis sejam encapsulados com elevada eficiência e em uma única etapa (Landfester e Weiss, 2010). A elevada estabilidade das partículas poliméricas obtidas é resultado da combinação de um surfactante eficiente, que evita a coalescência e de um coestabilizador. O coestabilizador atua como um agente de pressão osmótica dentro das gotículas, neutralizando a pressão de Laplace que é responsável pela degradação difusional (amadurecimento de Ostwald) (Landfester; Weiss, 2010).

A polimerização em miniemulsão é dividida basicamente em duas etapas fundamentais. Na primeira etapa, são formadas pequenas gotas de monômero (50-500 nm) através da emulsificação da fase dispersa e da fase contínua utilizando diferentes equipamentos

de dispersão ou homogeneização para alcançar um estado estacionário, obtido pelo equilíbrio entre a taxa de rompimento e coalescência das gotas da miniemulsão. O tamanho das gotas depende, além do sistema de agitação mecânica, da quantidade e tipo de emulsificante utilizado e da presença de um coestabilizador. Na segunda etapa, as gotas formadas após o processo de homogeneização são polimerizadas sem que ocorram mudanças nas suas características iniciais. A técnica de polimerização em miniemulsão está representada na Figura 6 (Asua, 2002; Landfester; Weiss, 2010; Asua, 2018).

Figura 6 – Processo de polimerização em miniemulsão para encapsulação de compostos insolúveis



Fonte: Adaptado de (Landfester *et al.*, 2010).

A encapsulação de compostos insolúveis, como a magnetita ocorre na própria gota de monômero onde os compostos insolúveis estão dispersos. A encapsulação ocorre em uma única etapa da reação, com uma distribuição homogênea de nanopartículas magnéticas (Landfester; Weiss, 2010).

A polimerização em miniemulsão apresenta uma série de vantagens operacionais como fácil controle térmico, ausência de solventes orgânicos, alta taxa de polimerização e produção de polímeros com altas massas molares. O processo de encapsulação de ativos *in situ* é facilitado a partir da simples mistura do ativo desejado com as gotas de monômero originais, obtendo dispersões poliméricas estáveis e em escala (Mangia *et al.*, 2021).

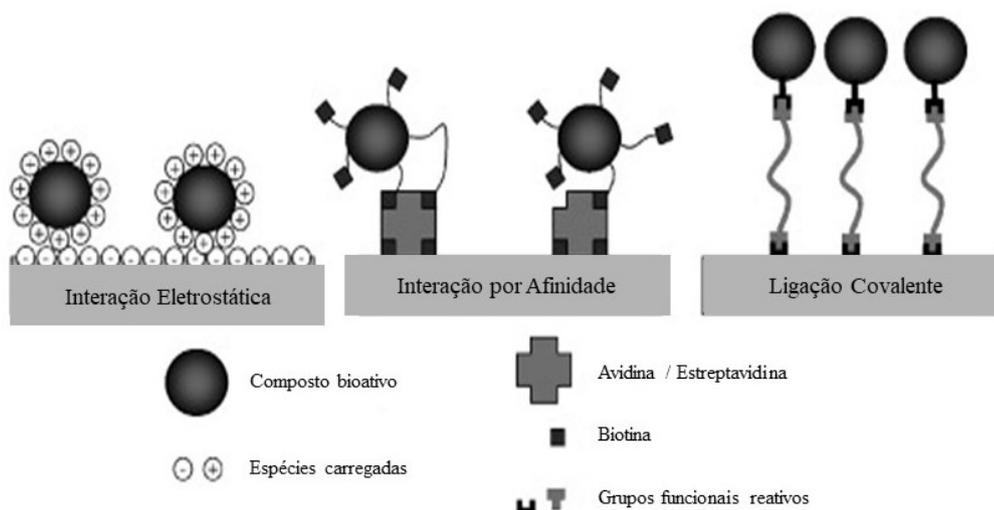
Estudos do nosso grupo reportam através dessa técnica, uma encapsulação eficiente de SPIONs em matriz polimérica com distribuição estreita de tamanho e comportamento superparamagnético (Chiaradia *et al.*, 2015; Feuser *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2017; Santos, *et al.*, 2020).

3.4 FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

A funcionalização de nanopartículas é uma ferramenta versátil para criar estruturas químicas com propriedades físicas, biológicas e farmacológicas desejadas para aplicações específicas (Pichot, 2004; Campos; Ferraz; Pinto, 2016). A funcionalização pode ocorrer durante o processo de polimerização (funcionalização *in situ*), em uma única etapa de reação, ou antes da polimerização, ao funcionalizar o monômero. Além disso, pode ser realizada após a produção das matrizes poliméricas, por meio de reações entre as cadeias poliméricas e grupos funcionais, como frequentemente é realizado nos estudos existentes na literatura (Pinto *et al.*, 2020). Esses métodos permitem a síntese de estruturas poliméricas distintas, a criação de novas superfícies e interfaces, e a obtenção de novos materiais com propriedades diferenciadas por meio de reações de funcionalização (Pinto *et al.*, 2020; Emiliano Charelli *et al.*, 2022).

Diferentes tipos de ligantes, como peptídeos, aminoácidos, anticorpos e surfactantes, podem ser imobilizados em partículas poliméricas por meio de adsorção física ou ligações covalentes, dependendo do objetivo (Mangia *et al.*, 2021). Os principais mecanismos utilizados para imobilizações de biomoléculas em substratos poliméricos são resumidos na Figura 7.

Figura 7 – Principais mecanismos utilizados para imobilizações de biomoléculas em substratos poliméricos



Fonte: Adaptado de (Goddard e Hotchkiss, 2007)

A funcionalização por adsorção física é uma técnica antiga, simples e amplamente utilizada para modificar superfícies de suporte. Baseia-se em interações hidrofóbicas, eletrostáticas e ligações de hidrogênio entre a biomolécula e a superfície (Pichot, 2004; Mangia

et al., 2021; Mylkie *et al.*, 2021). No entanto, apresenta desvantagens, como baixa estabilidade e adsorção inespecífica, o que pode resultar na adsorção de outras proteínas e contaminantes, gerando uma competição por adsorção de compostos indesejáveis e diminuindo a eficiência do processo. Além disso, a orientação da molécula não pode ser controlada em alguns casos, tornando a adsorção não seletiva e fraca (Rodda *et al.*, 2014; Mylkie *et al.*, 2021). Um processo por ligação covalente envolve a formação de uma ligação química entre a partícula e a biomolécula por meio de grupos químicos presentes naturalmente na biomolécula, como amina, hidroxila e carboxila (Pichot, 2004). Esse método cria interações mais estáveis e específicas entre a biomolécula e o suporte (Goddard; Hotchkiss, 2007).

Nanopartículas poliméricas, como as de PMMA, apresentam alta afinidade por biomoléculas, como proteínas, mostrando potencial significativo para aplicações médicas e biotecnológicas. Devido à rápida cinética de polimerização proporcionada pelo seu monômero, o PMMA apresenta altas taxas de conversão. Suas propriedades físicas e químicas, como alta resistência ao calor e à luz, capacidade de modificação química e manipulação de propriedades de superfície, além de estabilidade biológica, o tornam adequado para aplicações médicas (Feuser *et al.*, 2014).

Neste contexto, as nanopartículas poliméricas tornaram-se relevantes na área de diagnóstico, podendo ser adaptadas para aplicações específicas, principalmente em sensores de diagnóstico para detecção de patógenos virais, como a proteína S. O SARS-CoV-2 expressa proteínas na superfície, sendo a proteína spike utilizada para a detecção do vírus através da conjugação específica com o anticorpo antispikes. Além da proteína spike, a nucleoproteína (proteína N) e o RNA também podem ser direcionados como dispositivos de localização para a detecção do SARS-CoV-2 (Yang, 2021; Drobysh *et al.*, 2021b; Emiliano Charelli *et al.*, 2022).

3.5 NANOTECNOLOGIA APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIOS ELISA

Avanços recentes na área de nanotecnologia têm proporcionado ferramentas eficazes para aplicações diagnósticas e terapêuticas, por meio do uso de nanopartículas (Mahmud *et al.*, 2022). Devido à alta capacidade de adsorção, área superficial elevada, reatividade e tamanho quântico destes nanomateriais, imunoenaios em nanoescala apresentam maior sensibilidade de detecção, especificidade e seletividade. Além disso, os grupos funcionais químicos presentes na superfície das nanopartículas podem ser adaptados para diferentes aplicações. Modificações

de superfície utilizando ligantes, de forma covalente ou não covalente, têm o potencial de aumentar o limite de detecção e a especificidade dos imunoenaios. Como resultado, os imunoenaios baseados em nanomateriais são inerentemente mais versáteis, acessíveis e facilmente escalonáveis para atender à demanda durante pandemias (Mahmud *et al.*, 2022; Yari *et al.*, 2023). A capacidade de imobilizar anticorpos na superfície de uma única nanopartícula pode aumentar significativamente a sensibilidade de ensaios como o ELISA e ampliar o intervalo de detecção sem um procedimento de síntese complexo (Gao; Zhou; Chandrawati, 2020).

Diversos estudos demonstraram que o uso da nanotecnologia, como as nanopartículas superparamagnéticas podem melhorar o desempenho diagnóstico, oferecendo novas possibilidades para o desenvolvimento de testes mais rápidos e sensíveis, com resultados mais precisos em um curto espaço de tempo (Ortega; Pérez-Rodríguez; Reguera, 2017; Urusov *et al.*, 2017; Oh *et al.*, 2018; Feuser *et al.*, 2021; Scussel *et al.*, 2022). As SPIONs desenvolvidas reduzem o tempo de operação em comparação a ferramentas de diagnóstico normais para a detecção de COVID 19 (Chaudhary; Kujur; Singh, 2023). Em aplicações de diagnóstico, para simplificar os procedimentos ELISA convencional, nanopartículas magnéticas têm sido usadas para substituir as microplacas como fases sólidas (Liu, R. *et al.*, 2020).

Testes ELISA baseados em nanopartículas magnéticas (MNPs) reduzem significativamente os limites de detecção e encurtaram o tempo de análise devido às seguintes razões: (i) as MNPs conjugadas com anticorpos, bem dispersas, apresentam uma área superficial elevada, o que permite reações mais rápidas entre anticorpos e antígenos, (ii) as MNPs são facilmente manipuláveis com um ímã externo, permitindo a rápida separação e pré-concentração dos antígenos capturados pelas nanopartículas magnéticas conjugadas com anticorpos, aumentando assim a sensibilidade dos imunoenaios (Ha; Kim, 2022).

Os testes ELISA baseados em MNPs, demonstraram uma redução significativa nos limites de detecção e no tempo de análise. Isso se deve à dispersão eficiente das MNPs conjugadas com anticorpos, que possuem uma área superficial elevada, permitindo reações mais rápidas entre anticorpos e antígenos. Essa eficiência contribui consideravelmente para a melhoria da sensibilidade e rapidez dos testes Elisa (Ha; Kim, 2022).

Com o aumento das taxas de mutação do SARS-CoV-2, métodos baseados em nanopartículas podem oferecer novas abordagens de detecção ou aprimorar os métodos existentes para manter altas taxas de sensibilidade e seletividade. Diante do surgimento de variantes e mutações contínuas do SARS-CoV-2, persistem desafios para o diagnóstico rápido, confiável e acessível da COVID-19. Em um estudo, as nanopartículas foram identificadas como

possíveis candidatas para mitigar as desvantagens do RT-PCR no diagnóstico da COVID-19 (Al-Hindawi *et al.*, 2022).

No estudo de Huergo *et al.*, (2021), um Elisa magnético Indireto de execução rápida, demonstrou vantagens em relação ao método convencional, o teste possui 12 min de duração. O sistema apresentou uma sensibilidade de 97% e especificidade de 100% em 165 amostras analisadas. Neste trabalho, 60 nanoesferas magnéticas foram imobilizadas com uma proteína recombinante do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 a fim de detectar anticorpos anti-SARS-CoV-2.

Em nosso grupo de pesquisa, estudos nesta área estão sendo desenvolvidos, a fim de, aperfeiçoar o teste Elisa com o uso de SPIONS. Um ensaio ELISA indireto foi produzido ao conjugar a proteína albumina de soro bovino (BSA) em nanopartículas superparamagnéticas de PMMA. O teste apresentou uma maior sensibilidade comparado ao Elisa tradicional, um tempo menor de execução, e aumentou a interação com anticorpos quando comparado ao BSA livre (Feuser *et al.*, 2021). Scussel *et al.*, (2022) conduziram um ELISA indireto conjugando peptídeos/epítomos das proteínas S e N em SPIONs para detectar a COVID-19. Dentre os peptídeos testados, o conjugado p2pS–SPMNP apresentou sensibilidade e especificidade de 100% e excelente acurácia (área sob a curva (AUC) = 1,0).

Devido as lacunas dos diagnósticos para a COVID-19, este estudo tem como objetivo desenvolver um ELISA nanomagnético a partir da conjugação de peptídeos conformacionais desenvolvidos no trabalho de Scussel *et al.*, (2022), a nanopartículas superparamagnéticas de PMMA para a detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Para a síntese dos peptídeos, foram utilizados os seguintes reagentes: aminoácidos protegidos por 9-fluorenil metoxycarbonil (Fmoc), dimetilformamida (DMF), diclorometano (DMC), metanol, N, N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), etil 2-ciano-2-(hidroxiimino) acetato (Oxyma), éter etílico, 4-metilpiperidina (Piperidina), bromofenol, trietilsilano (TES), 1,2-etanoditiol (EDT), ácido trifluoroacético (TFA), resina *rink*, todos provenientes da Sigma Aldrich e água milli-Q. Para a preparação das nanopartículas superparamagnéticas de magnetita (SPIONs) estabilizadas com ácido oleico (AO) utilizou-se os seguintes reagentes: água destilada (H₂O), cloreto férrico (ClFe₃.5H₂O), sulfato ferroso (FeSO₄.7H₂O), hidróxido de amônia (NH₄OH), ácido oléico (C₁₈H₃₄O₂) e etanol todos provenientes da VETEC Química. Na encapsulação das SPIONs foram utilizados os seguintes reagentes: como monômero, o metacrilato de metila (MMA) da ARINOS Química, como iniciador azobisisobutironitrila (AIBN) e como surfactante o dodecil sulfato de sódio (SDS) ambos provenientes da VETEC Química, como co-estabilizador foi utilizado o Crodamol adquirido da Croda e água destilada.

No ensaio ELISA nanomagnético os seguintes reagentes foram utilizados:

- Solução de lavagem preparada em laboratório utilizando cloreto de sódio (NaCl) e Tween 20, ambos fornecidos pela Sigma Aldrich.
- Tampão citrato pH 5 preparado em laboratório utilizando fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄) e ácido cítrico (C₆H₈O₇), ambos fornecidos pela Sigma Aldrich.
- Solução tampão fosfato (PBS) pH 7,4 preparado em laboratório utilizando cloreto de sódio (NaCl), fosfato de sódio dibásico (anidro) (Na₂HPO₄), fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), cloreto de potássio (KCl), ambos fornecidos pela Sigma Aldrich.
- Solução de bloqueio (BSA 5%) preparado em laboratório utilizando albumina de soro bovina (BSA) e PBS, fornecido pela Sigma Aldrich.
- Solução de revelação preparada em laboratório utilizando o-fenilenodiamina (OPD), tampão citrato e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ambos fornecidos pela Sigma Aldrich. Para a solução de parada foi utilizado ácido sulfúrico (H₂SO₄) (2M). Água destilada foi utilizada na preparação das soluções.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Síntese de peptídeos

As sequências peptídicas sintetizadas neste estudo foram desenvolvidas por (Scussel *et al.*, 2022). Sintetizou-se dois peptídeos identificados pelos autores como p2pS e p3pN. Neste trabalho, será utilizado a mesma nomenclatura de identificação de Scussel e colaboradores. A seleção destes peptídeos para a funcionalização das nanopartículas poliméricas, está relacionada ao melhor desempenho destes como antígeno em ELISA tradicional e no ELISA nanomagnético para o diagnóstico da COVID-19 (Scussel *et al.*, 2022). Nos peptídeos sintetizados, foi ancorado o aminoácido cisteína. A escolha deste aminoácido está relacionada ao grupo tiol (SOH) e à sua maior reatividade, característica que auxiliaria a conjugação desse peptídeo nas nanopartículas produzidas (Boyer *et al.*, 2011).

As sequências peptídicas foram sintetizadas manualmente em fase sólida por química Fmoc conforme descrito por (MacHado De Avila *et al.*, 2011). Nesta técnica, o N-terminal de cada aminoácido é protegido por 9-fluorenil metoxycarbonil (Fmoc). Existe também um grupo de proteção adicional nas cadeias laterais a fim de evitar reações colaterais. A síntese é realizada em uma seringa de 6 mL que contém um filtro de polietileno hidrofóbico 3 x 9 (mm) (#20 µm). O resíduo de aminoácido C-terminal é ancorado por meio de seu grupo ácido carboxílico no suporte sólido insolúvel (resina *rink*). O grupo Fmoc é removido em dois ciclos de desproteção pela adição de piperidina 25% em DMF, incubando a solução na seringa por 5 e 15 min. Após, realiza-se três lavagens rápidas com DMF e uma DCM. O acoplamento do primeiro aminoácido à resina é realizado pela ativação do grupo carboxílico com os reagentes de acoplamento, (N, N diisopropilcarbodiimida) e Oxyma (etil 2-ciano-2- (hidroxiimino) acetato) por 30 min. Posteriormente, são realizadas quatro lavagens com metanol intercalado com DMF e uma última lavagem com DCM. Entre os ciclos de desproteção e acoplamento, realiza-se uma etapa de controle colorimétrico usando azul de bromofenol 0,1% em DMF. Quando o terminal N do aminoácido é desprotegido, a cor do peptídeo-resina fica azul e, quando protegido, a cor é amarela. Os ciclos de desproteção e acoplamento são realizados até que a cadeia peptídica na resina seja totalmente sintetizada por sucessivas ligações peptídicas que acoplam resíduos de aminoácidos do C-terminal em direção ao N-terminal. Após o último ciclo de desproteção, uma etapa de clivagem é realizada a fim de remover os grupos de proteção da cadeia lateral e clivar a cadeia peptídica da resina. A solução de clivagem é composta por ácido trifluoroacético (TFA): H₂O: trietilsilano: 1,2-etanoditiol (92,5: 2,5: 2,5: 2,5, v/v). Nesta etapa a resina é

incubada na solução de clivagem, por um período de 3 horas. Após, a solução é filtrada, recolhida e colocada em um tubo tipo Falcon. Em seguida, o peptídeo é precipitado em éter etílico gelado ($\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) e mantido *overnight* ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) a fim de ser recuperado em um processo de centrifugação. A primeira etapa de centrifugação (10.000 rpm por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) é realizada após o *overnight* e posterior descarte do sobrenadante. Posteriormente, o peptídeo é lavado com éter etílico gelado e centrifugado (10.000 rpm, por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), o sobrenadante é descartado novamente. Após, o peptídeo é liofilizado. Os peptídeos sintéticos foram submetidos à caracterização por meio da espectrometria de massa electrospray. A análise foi conduzida utilizando o espectrômetro de massa Xevo TQ-S micro Triplo Quadrupolo, equipado com uma fonte de ionização de geometria Z-Spray, e acoplado a um sistema UPLC (Waters Corporation, Framingham, MA, EUA). As amostras dos peptídeos foram diluídas em acetonitrila (LC/MS) e introduzidas no equipamento por infusão no modo de ionização positiva. Adotando o limite máximo de detecção do equipamento [2000 m/z], os íons precursores foram submetidos à fragmentação por colisão com argônio, e os espectros resultantes foram incorporados à análise. Os espectros de massas foram adquiridos e analisados por meio do software MassLynx, versão V4.2 SCN1001 (2019, Waters Inc.).

4.2.2 Síntese das Nanopartículas Magnéticas Estabilizadas com AO

Nanopartículas superparamagnéticas de magnetita estabilizadas com ácido oleico (SPIONs) foram sintetizadas pelo método de coprecipitação em meio aquoso, conforme descrito por (Feuser *et al.*, 2021). Foram dissolvidos em um béquer cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (razão molar de 1:1,2) contendo água destilada (250 mL) sob agitação mecânica na faixa de 800 rpm a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se rapidamente hidróxido de amônio (NH_4OH) (11 mL). Após uma hora, as SPIONs foram separadas utilizando um campo magnético e lavadas três vezes com água destilada, a fim de remover impurezas. Na segunda etapa, adicionou-se o AO (35 mL) para estabilizar as SPIONs, a agitação mecânica foi mantida por 30 min. O AO foi utilizado para modificar a superfície das SPIONs para posterior encapsulação. As SPIONs produzidas foram lavadas com etanol a fim de retirar o excesso de AO, em seguida, centrifugadas (5000 rpm por 10 min) para remoção do excesso de AO.

4.2.3 Encapsulação *in situ* das SPIONs em Nanopartículas de PMMA Via Polimerização em Miniemulsão

Para a encapsulação das SPIONs em PMMA utilizou-se a técnica de polimerização em miniemulsão via radicais livres, de acordo com a metodologia proposta por (Feuser *et al.*, 2021), com algumas modificações. Primeiramente, foram realizados testes iniciais fazendo o uso dos surfactantes lecitina e dodecil sulfato de sódio (SDS), a fim de verificar qual deles proporcionaria uma melhor estabilidade no sistema formado.

Foram preparadas duas fases independentes: uma orgânica e outra aquosa. Quando foi utilizado o surfactante lecitina, sua adição ocorreu na fase orgânica, enquanto o SDS foi adicionado na fase aquosa.

A fase orgânica (FO) era composta pelo monômero (MMA), co-estabilizador (Crodamol) e pelo iniciador (AIBN) e foi homogeneizada em agitador magnético (200 rpm por 10 min). A fase aquosa (FA) consistia de água. Quando adicionado o SDS na FA, o sistema também foi homogeneizado em agitador magnético (200 rpm por 10 min). Após, as SPIONs foram redispersas em 500 microlitros de clorofórmio e adicionadas na fase orgânica. Por último, a FA foi vertida em um béquer de 25 mL e colocada em dispersor ultrassônico (Vibra Cell VC 505, Sonics), o dispersor ultrassônico foi ligado e adicionou-se a FO gota a gota. A Figura 8 ilustra o sistema de sonicação utilizado.

Figura 8 - Sistema de sonicação utilizado



Fonte: Autora, (2024)

O tempo de sonicação foi de 5 min em amplitude de 70% (10 s pulso ligado 2 s pulso desligado). Para evitar a perda do monômero devido ao aumento de temperatura, durante o processo de sonicação a dispersão foi mantida em banho de gelo. Após a sonicação, o produto

da miniemulsão foi transferido para ampolas de 10 mL que foram imersas em banho termocriostático a temperatura constante de 70 °C por 3 h. As nanopartículas de PMMA superparamagnéticas (SPIONs-PMMA) foram separadas através de um campo magnético e lavadas duas vezes com água destilada. Em seguida o material foi redisperso em água e armazenado em geladeira (4 °C) para posteriores caracterizações.

As reações de polimerização foram realizadas de acordo com as formulações descritas nas Tabelas Tabela 2 e Tabela 3.

Tabela 2 – Composição do meio reacional para o preparo das nanopartículas SPIONs-PMMA com lecitina

	Reagentes	Quantidade (g)
Fase orgânica	MMA	1,00
	Crodamol	0,06
	AIBN	0,03
	Lecitina	0,04
	SPIONs	0,15
Fase aquosa	Água	10,00

Fonte: Autora, (2024)

Tabela 3 – Composição do meio reacional para o preparo das nanopartículas SPIONs-PMMA com SDS

	Reagentes	Quantidade (g)
Fase orgânica	MMA	1,00
	Crodamol	0,06
	AIBN	0,03
	SPIONs	0,15
	Água	10,00
Fase aquosa	SDS	0,010

Fonte: Autora, (2024)

4.2.4 Funcionalização de Nanopartículas de SPIONs-PMMA com os peptídeos p2pS e p3pN

No contexto deste estudo, foram empregadas as metodologias de adsorção física e ligação covalente para a funcionalização das nanopartículas. O uso dessas duas metodologias

possibilita uma análise mais abrangente, visando verificar qual metodologia é mais adequada para alcançar resultados mais precisos de acordo com o objetivo proposto neste trabalho.

Para a funcionalização com os peptídeos p2pS e p3pN por meio da ligação covalente, as concentrações iniciais dos peptídeos foram calculadas com base na saturação da superfície, conforme detalhado no Apêndice A (Hermanson, 2008). Este cálculo também abrangeu o estudo de Guindani et al., (2020), que estabeleceu a quantidade de 10^{-8} mol de BSA por mL de miniemulsão como suficiente para cobrir a superfície de todas as nanopartículas de PMMA. Inicialmente, realizaram testes com a N-acetilcisteína (NAC), a fim de verificar melhores condições para posteriores testes com os peptídeos. A formulação descrita no item 3.2.3 foi empregada para a preparação das miniemulsões.

A fase da conjugação por ligação covalente foi iniciada após o preparo da miniemulsão. Foram adicionados 0,167 mL de uma solução do peptídeo p2pS (3,0 mg/mL), o equivalente a aproximadamente 0,51 mg de peptídeo na miniemulsão. Posteriormente, foi realizada a polimerização em um banho termocriostático a 70 °C por 3 h. As nanopartículas resultantes foram separadas por um campo magnético, lavadas duas vezes com água destilada e, em seguida, redispersas em água antes de serem armazenadas em geladeira (4 °C) para análises posteriores. As nanopartículas produzidas foram denominadas de SPIONs-PMMA-p2pS para fins de simplificação. Para a funcionalização via ligação covalente com o peptídeo p3pN, a mesma metodologia descrita acima foi aplicada, alterando apenas a quantidade do peptídeo adicionado na miniemulsão. Para o peptídeo p3pN foram adicionados 0,200 mL de uma solução (3,0 mg/mL), o equivalente a 0,60 mg de peptídeo na miniemulsão. As nanopartículas produzidas foram denominadas de SPIONs-PMM-p3pN para fins de simplificação.

A metodologia por adsorção física baseou-se no estudo de Scussel *et al.*, (2022), com algumas modificações específicas para este trabalho. No estudo de Scussel *et al.*, (2022), foi identificada que uma concentração ideal de SPIONs de 0,32 mg/mL não interferia na leitura dos ensaios ELISA, juntamente com uma concentração de peptídeo de 0,1 mg/mL. Esta concentração de peptídeo foi relacionada a testes, onde foi verificado que uma concentração de 10 microgramas de peptídeo por poço da placa no ensaio ELISA era suficiente para diferenciar amostras de soro positivas e negativas de indivíduos contaminados com a COVID-19 (Scussel *et al.*, 2022).

No contexto desta pesquisa, a mesma concentração de SPIONs foi mantida (0,32 mg/mL). É importante destacar que para o cálculo desta concentração foi considerado a massa de magnetita encapsulada, obtida em análise termogravimétrica (aproximadamente 40 mg). No

entanto, foi alterado a concentração de cada peptídeo para (0,1 mg/mL) (0,5 mg/mL) (1,0 mg/mL). Para a realização da conjugação por adsorção física, cada solução de peptídeo foi adicionada, individualmente gota a gota, em béqueres contendo as SPIONs-PMMA (0,32 mg/mL). Em seguida, as misturas foram submetidas a sonicação por 2 h em banho ultrassônico. Posteriormente, as SPIONs-PMAA conjugadas com os peptídeos foram expostas individualmente ao campo magnético de um ímã de neodímio e lavadas com água destilada, removendo os peptídeos não ligados. As nanopartículas produzidas foram denominadas de SPIONs-PMMA-p2pS_0.1, SPIONs-PMMA-p2pS_0.5, SPIONs-PMMA-p2pS_1, SPIONs-PMM-p3pN_0.1, SPIONs-PMM-p3pN_0.5, SPIONs-PMM-p3pN_1 para fins de simplificação.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

4.3.1 Diâmetro de Partícula e Potencial Zeta

O tamanho médio das partículas e o Índice de Polidispersão (PDI) foram medidos utilizando o equipamento (Zetasizer Nano S-Malvern). O tamanho médio em intensidade das partículas foi determinado por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), em que um feixe de luz concentrada é irradiado em partículas dispersas em um meio contínuo (neste trabalho o meio contínuo é água) e a partir da análise da luz espalhada tem-se o tamanho médio das partículas. Flutuações da dispersão elástica da luz do laser devido ao movimento browniano individual da partícula em um solvente é utilizado para determinar as distribuições de tamanho da partícula (Falke; Betzel, 2019). O potencial zeta foi calculado pelo espalhamento de luz eletroforético, em que a partir da incidência de um campo elétrico calcula-se a mobilidade eletroforética das partículas em suspensão (Clogston; Patri, 2011). O potencial zeta foi medido utilizando o equipamento (Zetasizer Nano ZS-Malvern).

Para ambas as análises as amostras foram diluídas em água destilada (1:500 em volume). Neste trabalho, foi selecionada a configuração automática dos equipamentos, em que eram realizadas três medidas de 100 leituras. O resultado obtido para o tamanho médio das partículas e a sua carga superficial foi a média aritmética destas três medições.

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Para análise da morfologia das SPIONS e SPIONS-PMMA, utilizou-se a técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão em um equipamento (JEM-1011 TEM 80 kV) localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina.

Para a realização das análises, as nanopartículas foram diluídas até 0,5 % de teor de sólidos e uma gota foi colocada em uma grade de cobre. Após completa secagem, as amostras foram recobertas com carbono e analisadas.

4.3.3 Termogravimetria (TGA)

A decomposição térmica das SPIONS-PMMA foi realizada por meio de análise termogravimétrica em equipamento STA 449 F3 Júpiter, Netzsch. As análises foram feitas com 10 mg de amostra liofilizada, na faixa de temperatura de 25 a 800 °C, a uma taxa de aquecimento 10 °C/min e fluxo de nitrogênio 20 mL/min. As análises foram realizadas com a cooperação do Prof. Dr. Alexandre Goncalves Dal-Bó do Laboratório de Processamento de Polímeros Avançados LAPPA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

4.3.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

As análises espectroscópicas no infravermelho foram realizadas com a cooperação do Prof. Dr. Alexandre Goncalves Dal-Bó do Laboratório de Processamento de Polímeros Avançados (LAPPA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os espectros de absorção na região do infravermelho das SPIONS -PMMA foram obtidos no equipamento (IRPrestige21, da Shimadzu). As amostras foram liofilizadas e adicionadas a pellets de KBr. Os espectros foram obtidos na faixa espectral de 400 e 4000 cm^{-1} usando resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras.

4.4 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA)

4.4.1 Amostras de soros humanos

Foram utilizadas amostras de soro ($n = 10$) cedidas pelo grupo do professor Dr. Felipe Dal-Pizzol (Laboratório de Fisiopatologia - UNESC). Estas amostras foram coletadas de pacientes internados no hospital São José, Criciúma/SC, Brasil, que testaram positivo para SARS-CoV-2 com teste RT-PCR e que se voluntariaram para participar deste estudo. As

amostras utilizadas foram coletadas no período de novembro de 2020 a março 2021 e com o consentimento documentado de todos os pacientes. Este estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinque, respeitando os princípios éticos em pesquisa envolvendo seres humanos, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital São José, protocolo número CAAE 3138460.6.1001.5364. As amostras de soro ($n = 10$) de indivíduos não infectados, foram selecionados do banco da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma/SC, Brasil. Essas amostras de soro foram coletadas anteriormente ao surto de pandemia de 2020 e foram usadas como controle negativo.

4.4.2 ELISA nanomagnético

Placas convencionais de 96 poços (KASVI) foram utilizadas para a realização do teste ELISA nanomagnético. Em cada poço da placa, foram colocados ímãs de neodímio removíveis ($8 \times 1,5 \text{ mm}^2$) para a execução do ensaio. As etapas do teste ELISA nanomagnético foram realizadas conforme descrito por (Feuser *et al.*, 2021; Scussel *et al.*, 2022) com algumas adaptações.

No ensaio, as nanopartículas de SPIONs-PMMA, SPIONs-PMMA-p2pS, SPIONs-PMMA-p3pN, SPIONs-PMMA-p2pS_0.1, SPIONs-PMMA-p2pS_0.5, SPIONs-PMMA-p2pS_1, SPIONs-PMM-p3pN_0.1, SPIONs-PMM-p3pN_0.5, SPIONs-PMM-p3pN_1 foram usadas como suporte, não sendo necessário deixar a placa sensibilizando overnight, como no ELISA convencional. O procedimento ELISA para as nanopartículas funcionalizadas via adsorção física e covalente foi o mesmo.

A primeira etapa foi a sensibilização da placa com $100 \mu\text{L/poço}$ das soluções de SPIONs-PMMA, SPIONs-PMMA-p2pS, SPIONs-PMMA-p3pN, SPIONs-PMMA-p2pS_0.1, SPIONs-PMMA-p2pS_0.5, SPIONs-PMMA-p2pS_1, SPIONs-PMM-p3pN_0.1, SPIONs-PMM-p3pN_0.5, SPIONs-PMM-p3pN_1. Nesta etapa, foram colocados os ímãs de neodímio por aproximadamente 2 min. As SPIONs-PMMA atuaram como controle negativo no teste. Após a sensibilização, a placa foi lavada duas vezes com solução de lavagem. É importante ressaltar que o ímã de neodímio ($8 \times 1,5 \text{ mm}$) foi usado em cada poço para separação magnética das nanopartículas em todas as etapas de lavagem.

A próxima etapa foi a incubação. As amostras de soro positivo e negativo foram diluídas 1:100 em BSA 0,5% em PBS-T e adicionadas à placa ($100 \mu\text{L/poço}$). A placa foi então incubada a 37°C por 1 h. Posteriormente, os poços foram lavados três vezes com solução de lavagem e incubados a 37°C por mais 1 h com $100 \mu\text{L/poço}$ de anti-humano IgA, IgM e IgG (polivalente)

conjugado com peroxidase, previamente diluído 1:5000 em BSA 0,5% em PBS. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com solução de lavagem.

A etapa final foi a revelação. Foi utilizada uma solução de OPD (0,2 mg/mL em tampão citrato, pH 5) com 2 μ L de peróxido de hidrogênio, adicionada a 100 μ L/poço para detecção colorimétrica. A reação foi incubada por 20 min no escuro, em temperatura ambiente, e interrompida com ácido sulfúrico 2 M. A absorbância a 492 nm foi determinada por espectrofotometria de placa SpectraMax M3 (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA).

4.4.3 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos dados foram executadas pelo *software GraphPad Prism*, versão 8.0.1. Valores de p menores que 0,05 serão considerados significativos. Para diferenciar amostras negativas de amostras positivas contra os peptídeos testados como antígenos para detectar SARS-CoV-2, as curvas ROCs, assim como a sensibilidade e especificidade, foram determinadas, e o valor do *cut-off* foi determinado a partir da média mais três desvios padrão (SD) da média das amostras de controles negativos (pacientes saudáveis). As áreas sob as curvas (AUCs) serão calculadas individualmente para determinar a acurácia das nanopartículas funcionalizadas e analisar o desempenho dos peptídeos testados diferenciando os positivos e negativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos na aplicação de nanopartículas superparamagnéticas de PMMA funcionalizadas, em sorodiagnóstico de COVID-19. Foram investigadas duas estratégias de funcionalização, incluindo adsorção física e covalente. O foco deste estudo foi contribuir para o desenvolvimento de um ELISA nanomagnético a partir da conjugação de peptídeos conformacionais a nanopartículas superparamagnéticas de PMMA para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2.

Para melhor compreensão, primeiro será apresentado a caracterização das sínteses peptídicas, seguida da caracterização do suporte (SPIONs-PMMA). Em seguida, serão apresentados os resultados relacionados ao processo de funcionalização das nanopartículas e por fim, sua aplicação em ensaio ELISA nanomagnético.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Os peptídeos sintetizados neste estudo foram desenhados por (Scussel *et al.*, 2022). Os autores identificaram epítomos específicos das proteínas alvo imunogênicas, S e N, do SARS-CoV-2 por meio de ferramentas de bioinformática especializadas para a predição de epítomos conformacionais. Após, sintetizaram quimicamente peptídeos análogos destas regiões, que foram utilizados como antígeno de cobertura em imunoensaio (Scussel *et al.*, 2022). A abordagem com peptídeos conformacionais oferece vantagens, pois permite a criação de uma combinação de regiões epitópicas que mimetizam a conformação da estrutura proteica. Tal característica intensifica a interação e a afinidade entre antígeno e anticorpo. Além disso, esses epítomos podem ser desenhados com o propósito de minimizar reações cruzadas e outros efeitos adversos, conforme indicado por estudos anteriores (Demolombe *et al.*, 2019). Para a funcionalização das nanopartículas superparamagnéticas de PMMA foram selecionados dois peptídeos identificados por p2pS e p3pN que apresentaram melhor desempenho em ensaio ELISA nanomagnético (Scussel *et al.*, 2022).

A Tabela 4 mostra as sequências de aminoácidos obtidas para os dois peptídeos que mimetizam epítomos conformacionais da proteína S e N e suas propriedades físico-química obtidas pelas ferramentas de bioinformática.

Tabela 4 – Sequência peptídica e propriedades físico-químicas do peptídeo p2pS e p3pN

Peptídeo	Sequência peptídica	Massa	Ponto	Solubilidade
		isotrópica (g/mol)	isoeletrico (pH)	em água
p2pS	YAGSTPNGCVEFLQLYDK	2005,23	4,37	Baixa
p3pN	KKSAAEASKKPRQKRTA	2297,69	11,76	Boa

Fonte: Autora, (2024)

Após a conclusão da síntese química de cada peptídeo, estes foram caracterizados por meio de espectrometria de massas, visando confirmar a massa molecular e assegurar a identificação precisa de cada peptídeo com base na relação m/z. Devido às limitações de detecção e análise do equipamento utilizado, o íon precursor foi fragmentado por argônio. A informação referente à sequência de aminoácidos dos peptídeos foi extraída dos espectros de fragmentação (MS/MS), gerados a partir da massa molecular do íon precursor, para a caracterização dos peptídeos. Para determinar a massa monoisotópica de cada peptídeo e o padrão de fragmentação, foi utilizado a ferramenta Molecular Weight Calculator do software MassLynx. A Tabela 5 demonstra os resultados de caracterização obtidos no espectro de massas.

Tabela 5 – Resultados do cálculo de peso molecular da massa monoisotópica e padrão de fragmentação para os dois peptídeos analisados

Peptídeo	Fórmula molecular	Massa isotrópica	Fragmentação
p2pS	C ₈₇ H ₁₂₈ N ₂₀ O ₂₈	1902,18 g/mol	1901,92 (+1)
			951,46 (+2)
			634,64 (+3)
			476,23 (+4)
p3pN	C ₇₉ H ₁₄₅ N ₂₉ O ₂₄	1885,20 g/mol	1885,11 (+1)
			943,06 (+2)
			629,05 (+3)
			472,03 (+4)
			377,82 (+5)

Fonte: Autora, (2024)

5.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS SPIONs-PMMA

Nesta etapa do estudo, foi realizado a caracterização das nanopartículas SPIONs-PMMA produzidas, de acordo com o diâmetro médio de partículas, carga superficial, morfologia (por meio da técnica TEM), estrutura química (por meio da técnica de FTIR) e análise termogravimétrica.

Antes de serem encapsuladas, as nanopartículas de magnetita foram recobertas com ácido oleico, conferindo-lhes propriedades hidrofóbicas para possibilitar a dispersão no polímero. Após a síntese, as nanopartículas magnéticas foram encapsuladas em matriz polimérica de poli(metacrilato de metila) com o intuito de evitar aglomeração e oxidação. É importante ressaltar que o procedimento de caracterização da síntese de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro e sua subsequente encapsulação na matriz polimérica de PMMA está solidamente estabelecido e bem documentado, conforme confirmado por vários estudos de nosso grupo (Chiaradia *et al.*, 2015; Feuser *et al.*, 2015; Feuser *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2017; Ronco *et al.*, 2018; Cordeiro *et al.*, 2020; Feuser *et al.*, 2021).

A seguir serão apresentadas e discutidas as propriedades da magnetita encapsulada em PMMA.

5.2.1 Nanopartículas superparamagnéticas encapsuladas em PMMA (SPIONs-PMMA).

5.2.1.1 Morfologia e tamanho

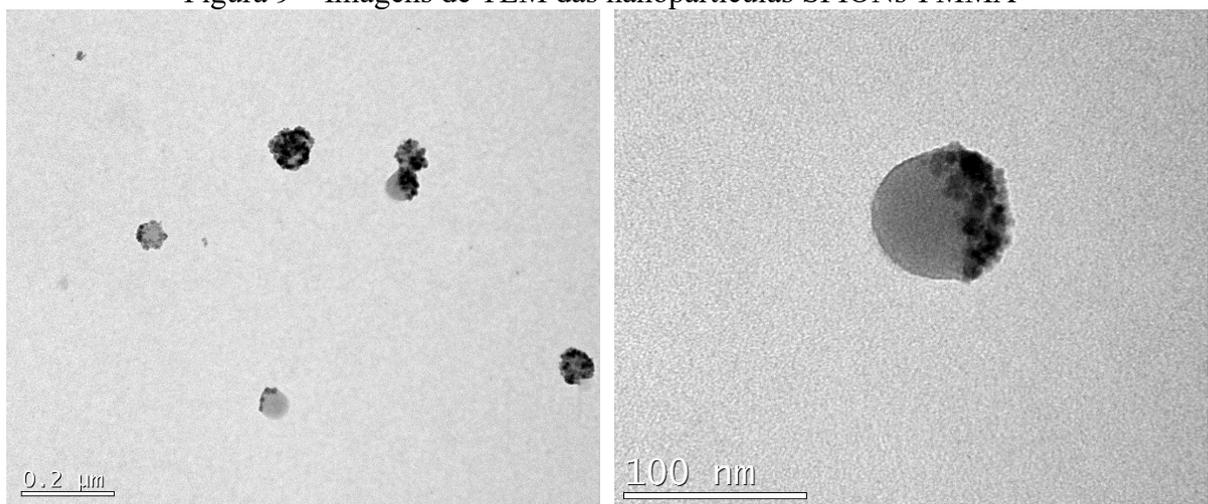
A determinação do diâmetro de nanopartículas é crucial para compreender suas propriedades magnéticas e seu comportamento em diversas aplicações (Arora, 2012; Dadfar *et al.*, 2019; Feuser *et al.*, 2015; Ha *et al.*, 2018; Ha; Kim, 2022; Singh e Sahoo, 2014; Wei *et al.*, 2010). Métodos analíticos, como a microscopia eletrônica de transmissão (TEM), possibilitam a observação da morfologia e do tamanho das partículas com alta resolução, permitindo a determinação do diâmetro a partir da contagem de um número representativo de partículas. Por outro lado, técnicas de espalhamento de luz (DLS) oferecem uma análise mais rápida do tamanho das partículas em suspensão. Na caracterização, as medidas de DLS fornecem informações sobre o diâmetro médio das partículas e a largura da sua distribuição através do índice de polidispersão (PDI). O PDI indica a variação do tamanho da amostra em relação à sua distribuição por intensidade. Esse valor é adimensional, variando de 0 a 1, e quanto menor, mais

uniforme é a distribuição das partículas, resultando em maior homogeneidade do diâmetro das partículas no sistema (Falke; Betzel, 2019).

No presente trabalho, o uso de polimerização em miniemulsão visou a diminuição da agregação das SPIONs, permitindo também a obtenção de uma distribuição mais homogênea de tamanhos. Além de proporcionar o encapsulamento das SPIONs em uma única etapa de reação. Visto que, nanopartículas revestidas com polímeros, possuem uma tendência menor a agregação e maiores possibilidades para processos de funcionalização com biomoléculas (Schoth *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2017; Mahdih, Mahdavian e Salehi-Mobarakeh, 2017; Campos, I. M. F. *et al.*, 2020; Bustamante-Torres *et al.*, 2022).

De acordo com a Figura 9, as nanopartículas superparamagnéticas de PMMA apresentaram morfologia esférica, onde a matriz apresenta pontos escuros atribuídos às partículas magnéticas. As imagens de TEM confirmam a encapsulação eficaz das nanopartículas de magnetita, sugerindo a ausência de contato direto entre o núcleo magnético e o meio reacional, mantendo suas propriedades magnéticas inalteradas. De acordo com a Tabela 6, nota-se que as nanopartículas formadas apresentaram diâmetros médios em intensidade de 110 nm. Adicionalmente, observa-se um valor baixo de PDI, evidenciando a formação de um sistema com distribuições de tamanho estreitas e monodispersas. Resultados similares foram obtidos em estudos do nosso grupo de pesquisa (Feuser *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2017).

Figura 9 – Imagens de TEM das nanopartículas SPIONs-PMMA



Fonte: Autora, (2024)

Tabela 6 – Diâmetro médio em intensidade (Dp), polidispersidade (PDI) e potencial zeta das SPIONs-PMMA

	Dp (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
SPIONs-PMMA	110 ± 3	0,189 ±0,003	-32,7±3

Fonte: Autora, (2024)

5.2.1.2 Potencial Zeta

O potencial Zeta é uma medida determinante em estudos envolvendo nanopartículas, especialmente na caracterização de suas propriedades de superfície e estabilidade em dispersões coloidais. A magnitude do potencial Zeta fornece informações importantes sobre a carga elétrica na superfície das nanopartículas. Valores altos de potencial Zeta, acima de ± 30 mV, indicam uma repulsão elétrica eficiente entre as partículas, o que contribui para a estabilidade das dispersões coloidais evitando as partículas de se aglomerar ou sedimentar, mantendo-se dispersas de forma homogênea por um período prolongado (Clogston; Patri, 2011). Variações no potencial Zeta podem ser atribuídas a alterações na composição da interface partícula-solvente, como a adsorção de moléculas na superfície das partículas podendo influenciar diretamente na estabilidade da dispersão (Bhattacharjee, 2016).

As partículas superparamagnéticas de PMMA foram diluídas em água e apresentaram um pH pouco abaixo de 7, na temperatura de 25 °C. A partir da análise da Tabela 4, pode-se concluir que foram obtidas dispersões poliméricas estáveis devidos aos valores elevados de potencial zeta (módulo acima de 30 mV), indicando estabilidade por repulsão elétrica. A presença de valores negativos de potencial Zeta pode ser relacionada à utilização de um surfactante com carga aniônica, como o SDS. Sendo um surfactante, o SDS tem a propriedade de se depositar na superfície polimérica, desempenhando um papel crucial na estabilização das partículas, impedindo assim a sua coalescência (Campos; Ferraz; Pinto, 2016).

5.2.1.3 Análise termogravimétrica

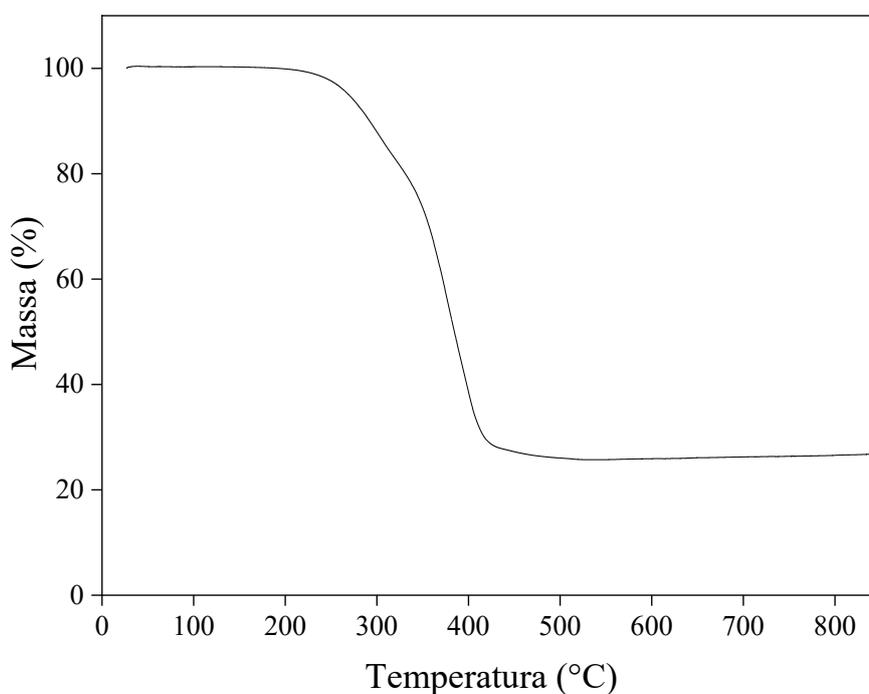
A análise termogravimétrica foi realizada, a fim de determinar a proporção de magnetita encapsulada nas SPIONs-PMMA.

A análise termogravimétrica das SPIONs-PMMA é mostrada na Figura 10. De acordo com essa análise, não se observa qualquer perda de massa até atingir 150 °C, sugerindo a ausência de umidade no material (Hong *et al.*, 2009). Posteriormente, nota-se uma redução

gradual na massa devido à degradação do PMMA e AO, aproximadamente até 410 °C (Ferriol *et al.*, 2023).

A concentração residual de óxido de ferro presente nas SPIONs - PMMA foi aproximadamente de 27%, enquanto os restantes 73% correspondem ao polímero e ao ácido oleico (Hong *et al.*, 2009). Resultados semelhantes foram obtidos por (Feuser *et al.*, 2015). De acordo com pesquisas anteriores, essa concentração de óxido de ferro, bem como o valor de magnetização de saturação, é suficiente para que sejam facilmente direcionadas pela influência de um gradiente de campo magnético externo, promovendo aplicações diversas na área biomédica (Feuser *et al.*, 2016; Urusov *et al.*, 2017; Guindani *et al.*, 2020).

Figura 10 – Análise termogravimétrica das nanopartículas SPIONs-PMMA



Fonte: Autora, (2024)

5.2.1.4 Estrutura Química (FTIR)

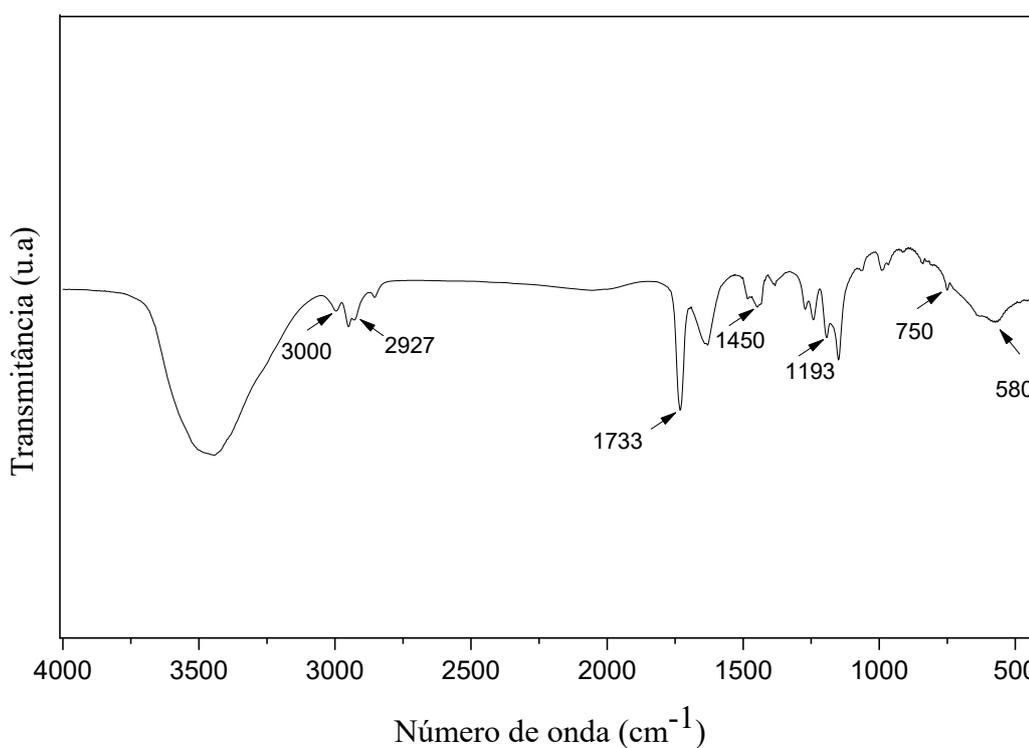
A análise FTIR desempenha um papel essencial na identificação da posição e intensidade dos picos de absorção presentes no espectro, fornecendo informações sobre a estrutura e composição dos materiais (Ramesh *et al.*, 2007).

A Figura 11 apresenta o espectro de absorção no infravermelho das SPIONs-PMMA. Ao analisar o espectro verifica-se que predominam as vibrações associadas às ligações do tipo C-O, um comportamento característico do PMMA. Além disso, foram identificados picos de

absorção em torno de 3.000 e 2.920 cm^{-1} (alongamento CH), 1750 cm^{-1} (alongamento C = O), 1450 cm^{-1} (alongamento CH_3), 1195 cm^{-1} ($-\text{OCH}_3$) e 750 cm^{-1} (C=O) relacionados ao PMMA (Ramesh *et al.*, 2007; Singhal *et al.*, 2013; Campos; Ferraz; Pinto, 2016; Cordeiro *et al.*, 2020).

As nanopartículas de óxido de ferro possuem um pico característico em 587 cm^{-1} (vibração Fe-O). O espectro resultante da mistura SPIONs-PMMA apresenta os picos característicos de ambos os componentes, validando a coexistência desses materiais na nanoestrutura (Marinca *et al.*, 2016; Cordeiro *et al.*, 2020).

Figura 11 – Espectros de FTIR obtidos para as nanopartículas SPIONs-PMMA



Fonte: Autora, (2024)

5.3 FUNCIONALIZAÇÃO DAS SPIONs-PMMA-PEPTÍDEOS

Diversos métodos têm sido empregados para funcionalizar biomoléculas na superfície de nanopartículas, seja por meio de ligações covalentes ou por adsorção física. As ligações covalentes exploradas na literatura envolvem a conjugação de grupos tiol, aminas primárias, ácido carboxílico e amina primária, maleimida e tiol, hidrazida e aldeído, amina primária e aldeído (Werengowska-Cietwierz *et al.*, 2015). Um grande desafio atual, relatado em diversos

estudos é a busca por estratégias simples para ancorar peptídeos na superfície de nanopartículas, garantindo sua exposição adequada e orientação para uma ligação eficiente (Conte *et al.*, 2023).

Na primeira parte de nosso estudo, o objetivo foi funcionalizar as SPIONs-PMMA com os peptídeos via ligação covalente pelo grupamento tiol. Nos dois peptídeos utilizados neste trabalho, p2pS e p3pN foi adicionada cisteína às cadeias peptídicas destes, para auxiliar no processo de conjugação tanto via ligação covalente, como por adsorção física. Em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa, foi relatado que partículas superparamagnéticas de PMMA foram funcionalizadas via adsorção física com albumina sérica bovina (BSA) obtendo resultados satisfatórios em ensaio Elisa nanomagnético. Sendo assim, optou-se por trabalhar com esta matriz polimérica de fácil obtenção e reprodutibilidade para servir como matriz polimérica neste estudo (Guindani *et al.*, 2020; Feuser *et al.*, 2021). Posteriormente, testou-se dois surfactantes a lecitina e o dodecil sulfato de sódio (SDS), a fim de verificar qual sistema demonstraria uma maior estabilidade ao processo de funcionalização. Nesta etapa, testes iniciais foram feitos com a N-acetilcisteína (NAC), para posteriores conjugações com os peptídeos. Foi verificado uma maior estabilidade no sistema com o surfactante SDS. Ao utilizar a lecitina, foi constatado que a NAC estava precipitando durante o processo de polimerização, causando instabilidade no sistema. Devido a este problema, optou-se por seguir os testes com o dodecil sulfato de sódio.

Realizou-se análises de tamanho de partícula e carga superficial para verificar se a funcionalização influencia o diâmetro final da nanopartícula e sua estabilidade. Qualquer modificação destas propriedades pode indicar que a estabilidade do látex foi afetada (Mahmoud Elsabahy; Wooley, 2012). Segundo a Tabela 7, as nanopartículas funcionalizadas com os peptídeos por ligação covalente são caracterizadas por diâmetros similares as SPIONs-PMMA. Os valores reduzidos de PDI reforçam o aspecto monodisperso e estreito da distribuição de tamanhos das nanopartículas produzidas. Com relação ao potencial zeta, foram observados valores similares aos das SPIONs-PMMA. Este fato apresenta importante impacto, pois alterações poderiam indicar que os peptídeos estavam interagindo com o surfactante posicionado na superfície da partícula modificando a carga superficial. Apesar de não ter sido detectada alteração no potencial zeta, a interação entre o surfactante e o peptídeo não pode ser totalmente descartada, pois a variação também irá depender da concentração de ambas as espécies. Em relação aos resultados, pode-se afirmar que a funcionalização não apresentou efeitos significativos sobre o diâmetro e o potencial zeta das nanopartículas funcionalizadas, como relatado também em outros estudos (Portioli *et al.*, 2017; Mangia *et al.*, 2021; Conte *et al.*, 2023).

Tabela 7 – Diâmetro médio em intensidade (Dp), polidispersidade (PDI) e potencial zeta das SPIONs-PMMA-PEPTÍDEOS funcionalizadas por ligação covalente

Nanopartículas	Razão mássica peptídeo/SPIONs-PMMA (mg/mg)	Dp (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
SPIONs-PMMA	0	110±3	0,189±0,003	-32,7±3
SPIONs-PMMA-p2pS	0,51/1150	118±3	0,187±0,004	-33,9±3
SPIONs-PMMA-p3pN	0,60/1150	112±4	0,201±0,004	-33,3±3

Fonte: Autora, (2024)

Portioli *et al.*, (2017), funcionalizaram NPs de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) com um peptídeo (sequência: CGGWGG-LRKLRKLLR-NH₂) usando um adaptador N- (2-aminoetil) maleimida para ligar o PLGA carboxílico ao tiol cisteína do peptídeo. Neste estudo, os autores verificaram um aumento pequeno do diâmetro das nanopartículas após funcionalização, concluindo que independentemente da estratégia de conjugação e modificação, uma quantidade máxima de 150 µg de peptídeos foram efetivamente associados às NPs. Vale destacar que no estudo, os autores encapsularam isotiocianato de fluoresceína (FITC) em NPs PLGA e após realizaram o processo de funcionalização. A razão mássica (peptídeo/NPs PLGA) foi de 0,25/20 (mg/mg) (Portioli *et al.*, 2017).

Nas nanopartículas funcionalizadas por adsorção física, houve um aumento significativo do diâmetro das partículas, mudança do potencial zeta e perda de estabilidade. As Tabelas Tabela 8 e Tabela 9 apresentam os valores de diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta das SPIONs-PMMA-p2pS e SPIONs-PMMA-p3pN funcionalizadas por adsorção física.

Tabela 8 – Diâmetro médio em intensidade (Dp), polidispersidade (PDI) e potencial zeta das SPIONs-PMMA-p2pS funcionalizadas por adsorção física

Nanopartículas	Razão mássica peptídeo/SPIONs-PMMA (mg/mg)	Dp (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
SPIONs-PMMA	0	110±3	0,189±0,003	- 32,75±3,2
SPIONs-PMMA-p2pS_0.1	0,1/0,32	647±50	0,573±0,065	12,42±3,7
SPIONs-PMMA-p2pS_0.5	0,5/0,32	316±78	0,313±0,013	21,10±2,0
SPIONs-PMMA-p2pS_1	1,0/0,32	289±37	0,340±0,062	30,15±0,1

Fonte: Autora, (2024)

Tabela 9 – Diâmetro médio em intensidade (Dp), polidispersidade (PDI) e potencial zeta das SPIONs-PMMA-p3pN funcionalizadas por adsorção física

Nanopartículas	Razão mássica peptídeo/SPIONs-PMMA (mg/mg)	Dp (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
SPIONs-PMMA	0	110±3	0,189±0,003	-32,75±3
SPIONs-PMMA-p3pN_0.1	0,1/0,32	266±29	0,274±0,037	35,25±1,77
SPIONs-PMMA-p3pN_0.5	0,5/0,32	271±13	0,282±0,031	30,95±6,58
SPIONs-PMMA-p3pN_1.0	1,0/0,32	315±70	0,285±0,008	30,10±1,41

Fonte: Autora, (2024)

O aumento do diâmetro médio em intensidade das partículas (Dp) e PDI ao adicionar os dois peptídeos as SPIONs-PMMA caracteriza uma perda de estabilidade no sistema, que causa uma agregação das nanopartículas (Matusiak e Grządka, 2017). É importante frisar que valores de PDI maiores que 0,2 indicam uma distribuição de tamanhos de partícula muito grande. No caso, o DLS mede o tamanho dos agregados como se fosse uma partícula com um diâmetro equivalente ao agregado formado, e é justamente a formação dos agregados que causa o aumento do Dp e PDI.

As nanopartículas antes do processo de funcionalização por adsorção física apresentavam um pH neutro, quando os peptídeos foram adicionados foi observado coagulação do sistema causado pela eletropositividade destes peptídeos em solução ácida. O ponto isoelétrico do peptídeo p2pS é 4,37, já para o p3pN é 11,76. Quando ambos são adicionados ao

sistema foi observado um potencial Zeta positivo, seguido de valores de PDI maiores que 0,2, relacionado a perda de instabilidade dos sistemas com as nanopartículas. O ponto isoelétrico é um conceito fundamental no estudo da estabilidade de nanopartículas, seu valor está relacionado ao pH no qual uma nanopartícula possui carga elétrica líquida zero, resultando em uma maior tendência à agregação de partículas devido às forças de repulsão eletrostática reduzidas. À medida que o pH se aproxima do ponto isoelétrico, a repulsão eletrostática entre as partículas diminui, aumentando a probabilidade de aglomeração. A estabilidade coloidal é aumentada quando as nanopartículas possuem uma carga líquida significativa, seja positiva ou negativa, afastando-as umas das outras. O controle do pH em função do ponto isoelétrico é uma estratégia eficaz para modular a estabilidade coloidal. Em sistemas nos quais a repulsão eletrostática é crítica para a prevenção da aglomeração. O uso de surfactantes não iônicos também auxilia neste processo, pois são menos afetados pela variação de pH (Tai; Lai; Abdul Hamid, 2016; Matusia; Grządka, 2017).

A principal dificuldade enfrentada neste estudo foi a caracterização da conjugação dos peptídeos com as nanopartículas. A caracterização da conjugação revelou-se desafiadora devido à limitação de equipamentos disponíveis para medição da ligação formada entre a superfície das nanopartículas e o peptídeo e à natureza das biomoléculas envolvidas, os peptídeos. Em comparação com proteínas, a massa de peptídeo ligada a superfície das nanopartículas é muito menor. Assim, o método utilizado para quantificar proteínas, como BSA por exemplo, não pode ser empregado para determinar a quantidade de peptídeo ligado.

Análises como microscopia eletrônica de transmissão (TEM), Espectroscopia de Espalhamento Dinâmico (DLS), Medição de Potencial Zeta, Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e análises espectroscópicas não possibilitaram a determinação da quantidade de peptídeo efetivamente biconjugado. Esta dificuldade foi encontrada em outros estudos e são relacionadas a dificuldades técnicas de caracterização (Murar; Pujals; Albertazzi, 2023).

A maioria das técnicas empregadas para a caracterização da funcionalização de ligantes depende de resultados em massa, que por sua vez depende da concentração empregada do agente funcionalizante em relação ao suporte. As técnicas de caracterização empregadas incluem análises espectrométricas ou colorimétricas, no entanto, ambas têm limitações em termos do tipo de ligante utilizado. Estas técnicas funcionam predominantemente para medir moléculas maiores, como proteínas e anticorpos. São necessários abordagens combinatórias, o que acaba sendo demorada e nem sempre eficiente (Mourdikoudis; Mullen; Banaszak Holl, 2011; Pallares; Thanh, 2018; Andrian *et al.*, 2021; Tian; Zhou, 2021). Portanto, há uma

necessidade clara de técnicas de caracterização que permitam quantificação robusta de ligantes de peptídeos em superfícies (Murar; Pujals; Albertazzi, 2023).

Chandrasiri *et al.*, (2022), verificou que reações de bioconjugação envolvendo peptídeos e materiais poliméricos requerem atenção na caracterização devido a tendência de reações indesejadas. Em seu estudo, reações indesejáveis durante a conjugação como a reticulação, fez com que métodos indiretos de quantificação de peptídeos fornecessem informações incorretas sobre a conjugação peptídica. Os autores realizaram o ensaio de 2,5 O-ftaldialdeído (OPA) que quantifica peptídeos por reações com aminas. Foi observado ineficiência do método que sugere um fenômeno relacionado com reações indesejadas de aminas primárias e não com a quantidade de peptídeo conjugado. A ocorrência de reticulação pode influenciar a avaliação precisa da quantidade de peptídeo, potencialmente afetando os resultados. No caso do ensaio OPA, o reagente interage com as aminas primárias encontradas no peptídeo, gerando um subproduto detectável por fluorometria. Quando o peptídeo contém múltiplas aminas primárias, as aminas primárias não ligadas são utilizadas para determinar a quantidade de peptídeos em cadeias poliméricas ou bioconjugadas. Entretanto, à medida que a reticulação transforma essas aminas primárias remanescentes em aminas secundárias, o ensaio pode gerar resultados negativos, mesmo que o peptídeo esteja ligado quimicamente à estrutura polimérica. A cromatografia de permeação em gel (GPC), se mostrou um método de caracterização secundário para a obtenção de informações convincentes sobre a conjugação. No entanto, os autores destacaram que a precisão deste método varia de acordo com as propriedades dos biomateriais selecionados (Chandrasiri *et al.*, 2022).

Ligantes podem ser adsorvidos livremente à superfície durante a conjugação, mas depois removidos durante lavagens subsequentes, levando a uma superestimativa da densidade do ligante adsorvido. Além disso, os protocolos publicados para quantificação de proteínas, utilizam albumina sérica bovina em vez da proteína de interesse como padrão de calibração, o que poderia diminuir a precisão do ensaio (Rodda *et al.*, 2014). E mesmo assim, são estudos para proteínas, e não peptídeos, que apresentam uma massa molar muito menor.

Este estudo, como relatado anteriormente se fundamentou nos trabalhos de Feuser *et al.*, (2021) e Scussel *et al.*, (2022). No trabalho de Scussel *et al.*, (2022), nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro foram conjugadas com o aminoácido cisteína para posteriores caracterizações. A ligação covalente pelo grupamento tiol foi comprovada com técnicas de potencial zeta e diâmetro da partícula. Foi observado um tamanho de partícula de 34 nm para as SPIONs livres em comparação às associadas a cisteína-SPIONs que apresentaram um tamanho de 54 nm. Os autores destacaram também o potencial zeta dos sistemas formados.

O complexo cisteína-SPIONs apresentou potencial zeta positivo de 18 mV, já SPIONs sem funcionalização apresentaram um potencial zeta negativo de -28 mV. Uma mudança do potencial zeta de negativo para valor positivo está relacionado à protonação de grupos amino e carboxílicos na superfície das SPIONs, evidenciando funcionalização das mesmas com os peptídeos via cisteína. Vale ressaltar que as amostras foram diluídas em água destilada e analisadas em triplicata a 25 °C (pH ~7) (Scussel *et al.*, 2022). Já no estudo de Feuser *et al.*, (2021), as SPIONs-PMMA foram funcionalizadas via adsorção física com BSA. O sucesso na funcionalização foi comprovado por técnicas de DLS, potencial zeta, ensaio de quantificação de proteína (Lowry) e o próprio ensaio ELISA (Feuser *et al.*, 2021).

Hamidreza, (2017), modificaram nanopartículas magnéticas revestidas com uma mistura de poli (ácido acrílico), PAA, e quitosana com duas proteínas: BSA (albumina sérica bovina) e IgG (imunoglobulina G). Após, funcionalização via adsorção física com BSA e proteína IgG, notou-se que a adsorção de BSA era muito baixa em contraste com a ligação à proteína IgG. Os autores concluíram que uma conjugação menor de BSA em NPs de PAA-Fe₃O₄ estava relacionada à repulsão eletrostática (Hamidreza, 2017). O nível de adsorção de proteínas, para qualquer densidade de carga de nanopartículas, dependerá da estrutura da proteína. Nanopartículas carregadas negativamente ligam-se a proteínas com pontos isoelétricos superiores a 5,5, como apresentado pela proteína IgG. Em contraste, partículas carregadas positivamente ligam-se a proteínas com pontos isoelétricos inferiores a 5,5, como a albumina (Boyer *et al.*, 2010).

Mangia *et al.*, (2021), sintetizou nanopartículas de P(MMA-co-AA) via miniemulsão direta e funcionalizou as nanopartículas com peptídeo e aminoácido lisina via ligação covalente. Para confirmação da funcionalização, os autores empregaram a técnica de FTIR. Foi observado um pequeno pico na região de 1640 cm⁻¹ apenas para as nanopartículas funcionalizadas. No estudo, como a massa molar do peptídeo é muito superior ao da lisina (1559,83g/mol contra 146,19g/mol), optou-se por reduzir a carga mássica no sistema, para evitar impedimento estérico, durante a funcionalização. Quando comparados, observou-se que o espectro de FTIR das nanopartículas funcionalizadas com o peptídeo possuía uma baixa intensidade, sugerindo uma reduzida eficiência de funcionalização quando comparada à lisina, provavelmente pela menor massa de peptídeo empregada.

Peixoto, (2013), realizou funcionalização via adsorção física de BSA, adicionando-se grupos químicos por intermédio de copolimerização em miniemulsão entre o MMA e os comonômeros AA, AMA, HEMA, DMAEMA e MAM. A técnica utilizada foi capaz de promover com sucesso a funcionalização das nanopartículas. Observou-se que os materiais, de

forma geral, apresentaram-se como bons adsorventes, capazes de imobilizar de 15% a 35% da solução de proteína inicial. Um ponto a se destacar neste trabalho, é que as quantidades de iniciador e surfactante usados na formulação de acordo com a autora exercem papel fundamental na manutenção da proteína adsorvida. A autora também utilizou análises de FTIR para comprovar interações polímero-proteína. Quando o polímero possui proteína adsorvida, pode-se verificar o surgimento de alguns novos picos associado à atenuação de picos característicos do polímero, principalmente o pico referente ao grupo C=O, que era bem pronunciado antes da adsorção.

No artigo de revisão de Rodda *et al.*, (2014), os autores descrevem uma série de caracterizações utilizadas para quantificação de ligantes a substratos poliméricos, elencando suas vantagens e desvantagens. Dentre elas, métodos espectroscópicos como espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS), espectroscopia infravermelha (IR), espectroscopia UV-vis e espectrometria de massa são usados para detecção de ligantes em uma superfície. Estas técnicas podem detectar sinais característicos de componentes de um ligante e do material ao qual ele está ligado, por exemplo, a composição elementar, grupos funcionais. No entanto, relatam que estas técnicas muitas vezes são incapazes de distinguir componentes do ligante ligado de componentes semelhantes na superfície (por exemplo, amidas peptídicas em uma superfície contendo amida), o que pode tornar algumas técnicas de uso limitado em algumas situações.

Um ponto a ser considerado é que em relação as proteínas, os peptídeos possuem maior resistência a calor e solventes, são mais fáceis de obter numa forma única e quimicamente e são mais facilmente modificados, características que são favoráveis ao processo de miniemulsão, utilizado neste estudo. No entanto, nenhum sistema peptídico possui a complexidade funcional, especificidade e afinidade da maioria das proteínas. As proteínas frequentemente se ligam a substratos com maior afinidade do que os peptídeos devido à uma estrutura bem definida (Barker, 2011; Rodda *et al.*, 2014).

A comprovação da funcionalização das nanopartículas produzidas e a quantificação destas moléculas na superfície das nanopartículas é importante para a análise da técnica utilizada para conjugação e para a etapa subsequente do procedimento experimental, que é a aplicação destas nanopartículas funcionalizadas em ensaio ELISA.

5.4 ELISA NANOMAGNÉTICO

Inicialmente, para adaptar o ELISA convencional para o nanomagnético, a primeira etapa foi funcionalizar as SPIONs-PMMA com os peptídeos de melhor desempenho, p2pS e

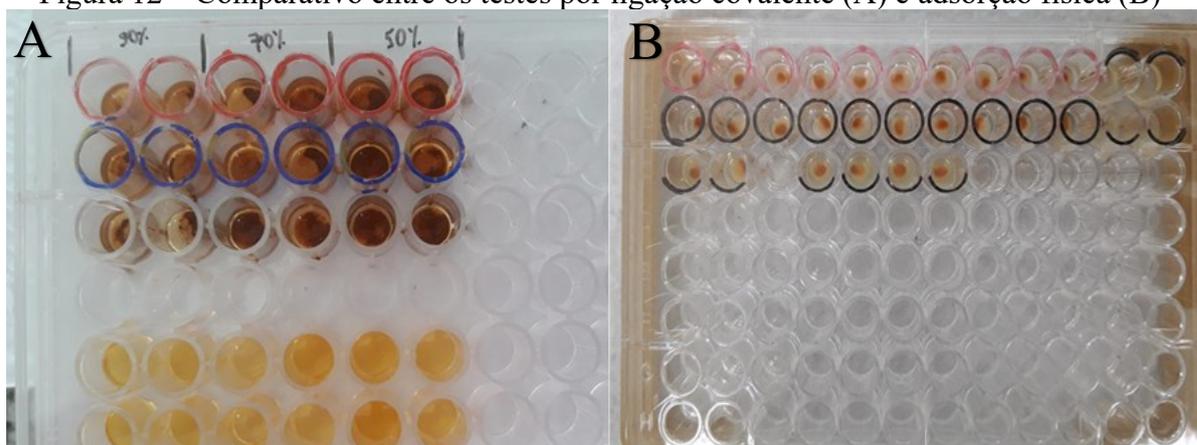
p3pN, conforme identificados no estudo de (Scussel *et al.*, 2022). Originalmente, planejava-se abordar apenas a funcionalização covalente das nanopartículas, no entanto, considerando a incerteza sobre a eficiência da conjugação dos peptídeos nas nanopartículas, as SPIONs-PMMA também foram funcionalizados por adsorção física. No estudo de (Scussel *et al.*, 2022) foi verificado que uma concentração de 0,1 mg/mL de peptídeos, era suficiente para a obtenção de resultados promissores em ELISA nanomagnético. No presente estudo, além da concentração de 0,1 mg/mL foram testadas as concentrações de 0,5 mg/mL e 1 mg/mL.

A fim de verificar se seria possível identificar ou quantificar a funcionalização das nanopartículas produzidas, realizou-se ensaios preliminares de ELISA. Visto que, o ensaio pode fornecer indicações da bioatividade do funcionalizante, uma vez que a ligação do anticorpo/receptor depende da conformação deste em substrato polimérico (Rodda *et al.*, 2014).

Os primeiros testes com as SPIONs-PMMA funcionalizadas por ligação covalente com os peptídeos p2pS e p3pN estão ilustrados na Figura 12 (A). No ensaio ELISA, realizado com as nanopartículas funcionalizadas por ligação covalente, SPIONs-PMMA-p2pS e SPIONs-PMMA-p3pN estas foram preparadas e funcionalizadas previamente, com uma concentração definida de SPIONs-PMMA e peptídeos. No entanto, ao realizar o ensaio ELISA observou-se que para este tipo de ligação a quantidade de SPIONs-PMMA influencia no teste. Na Figura 12 (A), é possível notar uma quantidade significativa de nanopartículas superparamagnéticas de PMMA nos poços da placa, o que dificultou a detecção dos anticorpos nas amostras testadas. Valores elevados de absorbância foram observados no ensaio para ambas as nanopartículas SPIONs-PMMA-p2pS SPIONs-PMMA-p3pN, devido à presença de íons de ferro no meio, que dificultaram a leitura. Para as duas nanopartículas, SPIONs-PMMA-p2pS SPIONs-PMMA-p3pN não ocorreu diferenciação as amostras de soros positivos e negativos.

Em contraste, as nanopartículas funcionalizadas por adsorção física apresentaram resultados diferentes, como mostrado na Figura 12 (B). Inicialmente, foi determinada uma concentração de SPIONs-PMMA que não influenciaria o resultado do teste, como observado para as nanopartículas funcionalizadas por ligação covalente. Conforme descrito por (Scussel *et al.*, 2022) uma concentração de 0,32 mg/mL de nanopartículas de magnetita não influenciou a leitura do ensaio ELISA proposto em seu trabalho. Essa mesma concentração de 0,32 mg/mL foi utilizada no presente trabalho. Posteriormente, com os desafios observados nas nanopartículas funcionalizadas por ligação covalente, as próximas etapas do trabalho seguiram apenas com as nanopartículas funcionalizadas por adsorção física.

Figura 12 – Comparativo entre os testes por ligação covalente (A) e adsorção física (B)

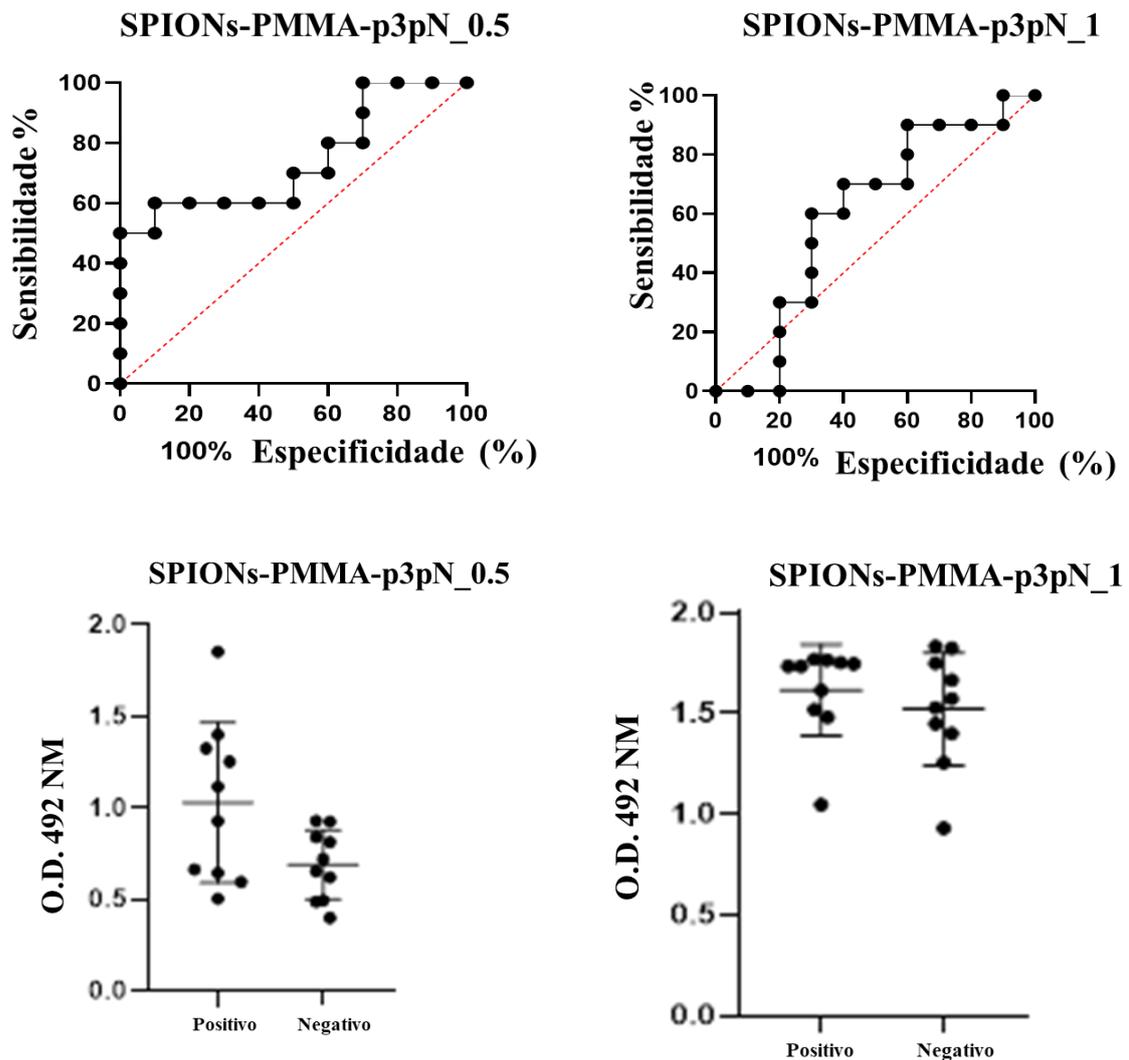


Fonte: Autora, (2024)

A Figura 13 ilustra as curvas ROC das nanopartículas funcionalizadas por adsorção física. Nesta etapa, realizaram-se testes iniciais com os dois peptídeos do estudo, p2pS e p3pN. Todavia, as nanopartículas funcionalizadas via adsorção física com o peptídeo p2pS em todas as concentrações testadas (0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL) não permitiram diferenciar amostras positivas de negativas adequadamente. A mesma situação ocorreu com as nanopartículas SPIONs-PMMA-p3pN_0,1.

Utilizando o ensaio ELISA nanomagnético com as SPIONs-PMMA funcionalizadas com o peptídeo p3pN, com as concentrações de 0,5 mg/mL e 1 mg/mL, foram obtidos resultados significativos na análise ROC (Tabela 10) (Figura 13). Para a concentração de 0,5 mg/mL, observou-se um AUC de 0.74 (IC 95%: 0.510-0.960, $p=0.0069$), indicando uma boa capacidade discriminatória do teste. A sensibilidade foi de 60.0% (IC 95%: 31.2%-83.1%) e a especificidade de 90.0% (IC 95%: 59.5%-99.4%). Em contraste, a concentração de 1 mg/mL apresentou um AUC de 0.60 (IC 95%: 0.336-0.863, $p=0.0449$), com sensibilidade e especificidade de 60.0% (IC 95%: 31.2%-83.1%) e 70.0% (IC 95%: 39.6%-89.2%), respectivamente. Estes resultados sugerem que a concentração de 0,5 mg/mL do peptídeo p3pN possui maior eficácia no diagnóstico, conforme indicado pela maior AUC e especificidade.

Figura 13– Conjugados por adsorção física de SPIONs-PMMA-p3pN como antígeno para sorodiagnóstico por ELISA nanomagnético para COVID-19 e respectivas curvas ROC



Fonte: Autora, (2024)

O ensaio ELISA é comumente aplicado para analisar ligantes em uma solução, e protocolos indiretos simples que comparam a concentração de uma solução de ligante antes e depois da conjugação podem ser usados para inferir a densidade superficial de ligantes em determinado substrato. No entanto, tal como acontece com os testes colorimétricos, os testes indiretos podem ser imprecisos. Vários tipos de modificações podem alterar as propriedades funcionais de pequenos peptídeos, proporcionando maior afinidade e especificidade no ensaio ELISA. No entanto, a afinidade por um ligante pode diminuir se o peptídeo for restringido a uma conformação desfavorável (Rodda *et al.*, 2014). O grau de especificidade e afinidade do ligante em relação a um receptor pode ser influenciado por exemplo pelo número de aminoácidos e sua sequência (Heckmann; Kessler, 2007). Estudos mostram que mudanças de

conformação, utilizar sequencias peptídicas mais longas podem aumentar a eficácia de ligação entre ligante e receptor (Khew; Zhu;Tong, 2007).

Tabela 10 – Parâmetros de análise ROC de detecção específica de ELISA usando peptídeo nanomagnético p3pN em diferentes concentrações

Antígeno	Parâmetros				
	AUC (IC 95%)	Valor de P	Cut-off	Se (IC 95%)	Sp (IC 95%)
SPIONs- PMMA-p3pN 50ug	0,74 (51,0; 96,0)	0,069	> 0,92	60,0 (31,2; 83,1)	90,0 (59,5; 99,4)
SPIONs- PMMA-p3pN 100ug	0,60 (33,6; 86,3)	0,449	>1,70	60,0 (31,2; 83,1)	70,0 (39,6; 89,2)

Legenda: Amostras de soro de pacientes (n=10) e controles (n=10), foram usadas em ELISA baseado em peptídeo nanomagnético para determinar a sensibilidade (Se), especificidade (Sp) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) para análise de curva ROC.

Fonte: Autora, (2024)

Um aspecto a ser considerado neste estudo é que apesar das vantagens dos epítomos, estes também apresentam limitações. Por exemplo, peptídeos/epítomos têm massa e acessibilidade de superfície muito menores do que proteínas de comprimento total (Rodda *et al.*, 2014). O que torna ainda mais um desafio alcançar um desempenho satisfatório em ensaios ELISA (Barker, 2011; Rodda *et al.*, 2014; Jiang, Li; Tao, 2023).

A abordagem do ELISA nanomagnético tem sido reconhecida por sua eficácia, proporcionando um processo mais ágil. Essa metodologia reduz significativamente o tempo total de processamento do ensaio, enquanto mantém um desempenho notável em termos de sensibilidade e especificidade no diagnóstico, conforme destacado por estudos diversos estudos (Petrakova *et al.*, 2015; Ortega; Pérez-Rodríguez; Reguera, 2017; Feuser *et al.*, 2021; Huergo *et al.*, 2021; Scussel *et al.*, 2022). No contexto deste estudo, ao compara-lo com a literária, verifica-se que as nanopartículas empregadas na literatura exibem uma área superficial quase 10 vezes superior ao do presente estudo e, adicionalmente, apresentam um tamanho de partícula consideravelmente menor, fatores que auxiliam na eficiência de funcionalização de nanopartículas por ligantes (Pichot, 2004; Thanh; Green, 2010; Ganapathe *et al.*, 2020; Liu, *et al.*, 2020; Scussel *et al.*, 2022; Conte *et al.*, 2023).

O presente estudo tem o potencial de conduzir o aprimoramento e o desenvolvimento de novos testes de sorodiagnóstico. Contudo, a necessidade de aprofundar a pesquisa é evidente devido aos problemas encontrados no procedimento de funcionalização destas nanopartículas, o que resultou em testes que não mantiveram a capacidade de diferenciar adequadamente amostras de soro positivas de negativas. Em razão da concentração de peptídeo nas nanopartículas ser relativamente baixa e limitada em função da área superficial disponível, esta baixa concentração/disponibilidade fez com que a detecção e seletividade fosse baixa. Uma outra limitante do estudo era a quantidade de soro disponível para teste (n=10) A qualidade dos soros empregados nos ensaios ELISA é de grande importância para assegurar resultados precisos e confiáveis, assim como o seu armazenamento. Os soros utilizados neste estudo foram coletados no início da pandemia, podendo resultar em variações na qualidade e na eficácia dos resultados.

Portanto, uma vez realizados mais estudos, incluindo ajustes na metodologia de funcionalização, redução do tamanho das partículas a fim de aumentar a área superficial e ajustes na conformação desses peptídeos a nanopartículas, plataformas nanomagnéticas podem se tornar opções viáveis para uso comercial no diagnóstico sorológico da COVID-19 e outras doenças, fazendo o uso de nanopartículas superparamagnéticas poliméricas.

6 CONCLUSÃO

Ao longo deste estudo, foi investigado o desenvolvimento de um teste ELISA nanomagnético por meio da conjugação de peptídeos a nanopartículas superparamagnéticas de poli(metacrilato de metila), visando a detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2. A técnica de polimerização em miniemulsão foi adotada para incorporar as nanopartículas superparamagnéticas em uma única etapa da reação, visando não apenas a estabilidade coloidal aprimorada, mas também a especificidade necessária para o reconhecimento de biomoléculas, aspectos cruciais para a aplicação deste estudo.

A escolha do polímero PMMA foi respaldada pela sua alta afinidade com biomoléculas, como as proteínas. Os peptídeos p2pS e p3pN foram selecionados para a bioconjugação devido ao seu desempenho notável em testes ELISA convencionais e nanomagnéticos. A funcionalização dos peptídeos foi realizada tanto por ligação covalente quanto por adsorção física nas nanopartículas superparamagnéticas de PMMA.

As nanopartículas superparamagnéticas de PMMA produzidas apresentaram um diâmetro médio de 110 nm e alta estabilidade coloidal. No processo de funcionalização por ligação covalente para os dois peptídeos utilizados no presente estudo, não ocorreu alterações significativas de diâmetro e potencial zeta. Diferente do processo por adsorção física, em que foi observado um aumento no diâmetro médio das partículas e uma mudança no potencial zeta, de negativo para positivo. Para as nanopartículas funcionalizadas por adsorção física observou-se menor estabilidade quando comparadas ao processo por funcionalização via ligação covalente, associada a coagulação do sistema.

Posteriormente, as nanopartículas produzidas foram submetidas a ensaios ELISA. Após análises preliminares, constatou-se que as amostras funcionalizadas por ligação covalente não poderiam ser utilizadas em ensaios ELISA devido à elevada concentração de magnetita. Essa concentração excessiva teve impacto nas leituras dos testes, prejudicando sua interpretação. As nanopartículas funcionalizadas por adsorção física foram obtidas com uma maior concentração de peptídeo por nanopartícula, o que permitiu reduzir a concentração de nanopartículas nos testes de aplicação, diminuindo sua interferência nas medidas. Nestes testes, observou-se que as nanopartículas com o peptídeo p2ps não foram capazes de distinguir entre amostras positivas e negativas de soro. Dos peptídeos testados, o p3pN conseguiu diferenciar as amostras positivas e negativas sendo sua acurácia inferior a 0,8 nas concentrações testadas (0,5 mg/mL e 1 mg/mL).

Diante dos resultados obtidos, é evidente que a metodologia utilizada requer uma revisão criteriosa. É crucial compreender que a ciência é um campo dinâmico, onde desafios experimentais são frequentes e oferecem oportunidades valiosas para aprimorar o conhecimento. Os resultados deste estudo não representam apenas um ponto de reflexão, mas também uma base sólida para investigações futuras. A continuidade deste trabalho demanda uma análise minuciosa das condições experimentais, a consideração de abordagens alternativas e possivelmente a exploração de novas estratégias para alcançar a funcionalização desejada das nanopartículas.

Em síntese, este trabalho abre perspectivas para estudos posteriores visando o desenvolvimento de suportes para ensaios ELISA com nanopartículas poliméricas funcionalizadas, tornando-os mais atrativos e economicamente viáveis.

6.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilização de surfactantes não iônicos: Propõe-se aprofundar uma investigação das condições ideais para a aplicação de surfactantes não iônicos nas reações de miniemulsão propostas neste trabalho. A fim de proporcionar a resolução de problemas de instabilidade em sistemas como o relatado neste estudo.
- Síntese de nanopartículas com menor diâmetro e maior área superficial: Recomenda-se a exploração de sínteses de nanopartículas com diâmetros menores e uma área superficial específica total maior. Propriedades específicas, como a reatividade tem grande influência em procedimentos como a funcionalização de biomoléculas.
- Investigação do pH em formulações funcionalizadas: Variações no pH desempenham um papel significativo nas propriedades químicas das nanopartículas, podendo afetar sua estabilidade. Investigar essa variável, permitirá verificar os efeitos que são causados na funcionalização de biomoléculas como os peptídeos.
- Utilizar proteínas para a funcionalização das nanopartículas: Proteínas frequentemente se ligam a substratos com maior afinidade do que os peptídeos devido a sua complexidade funcional e estrutura bem definida. Investigar se é possível caracterizar e quantificar estas biomoléculas em nanopartículas. Além de sua aplicação em ensaio ELISA, verificando a performance do teste.

REFERÊNCIAS

- AKOBENG, A. K. Understanding diagnostic tests 1: Sensitivity, specificity and predictive values. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, v. 96, n. 3, p. 338–341, mar. 2007.
- AL-HINDAWI, A.; ALDALLAL, U.; WALY, Y. M.; HUSSAIN, M. H.; SHELIQ, M.; SALEH ELMITWALLI, O. S. M. M.; DEEN, G. R.; HENARI, F. Z. An Exploration of Nanoparticle-Based Diagnostic Approaches for Coronaviruses: SARS-CoV-2, SARS-CoV and MERS-CoV. **Nanomaterials**, v. 12, n. 20, 1 out. 2022.
- AL-JIGHEFEE, H. T.; YASSINE, H. M.; AL-NESEF, M. A.; HSSAIN, A. A.; TALEB, S.; MOHAMED, A. S.; MAATOUG, H.; MOHAMEDALI, M.; NASRALLAH, G. K. Evaluation of Antibody Response in Symptomatic and Asymptomatic COVID-19 Patients and Diagnostic Assessment of New IgM/IgG ELISA Kits. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 161, 3 fev. 2021.
- ANDRIAN, T.; DELCANALE, P.; PUJALS, S.; ALBERTAZZI, L. Correlating Super-Resolution Microscopy and Transmission Electron Microscopy Reveals Multiparametric Heterogeneity in Nanoparticles. **Nano Letters**, v. 21, n. 12, p. 5360–5368, 23 jun. 2021.
- ANSARI, S. A. M. K.; FICIARÀ, E.; RUFFINATTI, F. A.; STURA, I.; ARGENZIANO, M.; ABOLLINO, O.; CAVALLI, R.; GUIOT, C.; D'AGATA, F. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Functionalization for Biomedical Applications in the Central Nervous System. **Materials** 2019, v. 12, n. 3, p. 465, 2 fev. 2019.
- AREVALO-RODRIGUEZ, I. *et al.* FALSE-NEGATIVE RESULTS OF INITIAL RT-PCR ASSAYS FOR COVID-19: A SYSTEMATIC REVIEW. **medRxiv**, p. 2020.04.16.20066787, 13 ago. 2020.
- ARORA, S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 3445–3471, 2012.
- ASSELAH, T.; DURANTELE, D.; PASMANT, E.; LAU, G.; SCHINAZI, R. F. COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. **Journal of Hepatology**, v. 74, n. 1, p. 168–184, 1 jan. 2021.
- ASUA, J. M. Miniemulsion polymerization. **Progress in Polymer Science**, v. 27, n. 7, p. 1283–1346, 1 set. 2002.
- ASUA, J. M. Ostwald ripening of reactive costabilizers in miniemulsion polymerization. **European Polymer Journal**, v. 106, p. 30–41, 1 set. 2018
- BARKER, T. H. The role of ECM proteins and protein fragments in guiding cell behavior in regenerative medicine q. **Biomaterials**, v. 32, n. 18, p. 4211–4214, 2 jul. 2011.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 10 ago. 2016.

BOYER, C.; HUANG, X.; WHITTAKER, M. R.; BULMUS, V.; DAVIS, T. P. An overview of protein-polymer particles. **Soft Matter**, v. 7, n. 5, p. 1599–1614, 7 mar. 2011.

BOYER, C.; WHITTAKER, M. R.; BULMUS, V.; LIU, J.; DAVIS, T. P. The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications. **NPG Asia Materials**, v. 2, n. 1, p. 23–30, 21 jan. 2010.

BRODEUR, A.; GRAY, D.; ISLAM, A.; BHUIYAN, S. A literature review of the economics of COVID-19. **Journal of Economic Surveys**, v. 35, n. 4, p. 1007–1044, 1 set. 2021.

BUSTAMANTE-TORRES, M.; ROMERO-FIERRO, D.; ESTRELLA-NUÑEZ, J.; ARCENTALES-VERA, B.; CHICHANDE-PROAÑO, E.; BUCIO, E. Polymeric Composite of Magnetite Iron Oxide Nanoparticles and Their Application in Biomedicine: A Review. **Polymers**, v. 14, n. 4, p. 752, 15 fev. 2022.

CAMPOS, E. V. R.; PEREIRA, A. E. S.; OLIVEIRA, J. L. DE; CARVALHO, L. B.; GUILGER-CASAGRANDE, M.; LIMA, R. DE; FRACETO, L. F. How can nanotechnology help to combat COVID-19? Opportunities and urgent need. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 18, n. 1, p. 1–23, 5 set. 2020.

CAMPOS, I. M. F.; BARROS, I. R. DE; FERRAZ, H. C.; PINTO, J. C. P(MMA-co-AA) Nanoparticles Loaded with Clloquinol and Functionalized with TAT Peptide. **Macromolecular Reaction Engineering**, v. 14, n. 2, p. 1900046, 1 abr. 2020.

CAMPOS, I. M. F.; FERRAZ, H. C.; PINTO, J. C. Production and Functionalization of P(MMA-co-AA) Nanoparticles by Miniemulsion Polymerization. **Macromolecular Symposia**, v. 368, n. 1, p. 70–77, 1 out. 2016.

CARTER, L. J. *et al.* Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. **ACS Central Science**, v. 6, n. 5, p. 591–605, 27 maio 2020.

CHANDRASIRI, I.; LIU, Y.; ADJEI-SOWAH, E.; XIAO, B.; BENOIT, D. S. W. Reproducible and controlled peptide functionalization of polymeric nanoparticles. **Frontiers in Biomaterials Science**, v. 1, p. 1003172, 3 out. 2022.

CHAUDHARY, K. R.; KUJUR, S.; SINGH, K. Recent advances of nanotechnology in COVID 19: A critical review and future perspective. **OpenNano**, v. 9, p. 100118, 1 jan. 2023.

CHIARADIA, V.; VALÉRIO, A.; FEUSER, P. E.; OLIVEIRA, D. DE; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Incorporation of superparamagnetic nanoparticles into poly(urea-urethane) nanoparticles by step growth interfacial polymerization in miniemulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 482, p. 596–603, 5 out. 2015.

CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Zeta potential measurement. **Methods in molecular biology**, v. 697, p. 63–70, 2011.

COLOMBO, M.; CARREGAL-ROMERO, S.; CASULA, M. F.; GUTIE´RREZGUTIE´RREZ, L.; MORALES, M. P.; BO´HMBO´HM, I. B.; HEVERHAGEN, J. T.; PROSPERI, D.; PARAK, W. J. Biological applications of magnetic nanoparticles. **Chem. Soc. Rev**, v. 41, p. 4306–4334, 2012.

CONDE, J.; DIAS, J. T.; GRAZÚ, V.; MOROS, M.; BAPTISTA, P. V.; LA FUENTE, J. M. DE. Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, p. 2296–2646, 2014.

CONTE, C. *et al.* Non-covalent strategies to functionalize polymeric nanoparticles with NGR peptides for targeting breast cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 633, p. 122618, 25 fev. 2023.

CORDEIRO, A. P.; FEUSER, P. E.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Encapsulation of Magnetic Nanoparticles and Copaíba Oil in Poly(methyl methacrylate) Nanoparticles via Miniemulsion Polymerization for Biomedical Application. **Macromolecular Symposia**, v. 394, n. 1, p. 100–112, 16 dez. 2020.

COTA, G.; FREIRE, M. L.; SOUZA, C. S. DE; PEDRAS, M. J.; SALIBA, J. W.; FARIA, V.; ALVES, L. L.; RABELLO, A.; AVELAR, D. M. Diagnostic performance of commercially available COVID-19 serology tests in Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 101, p. 382–390, 1 dez. 2020.

CRESPY, D.; LANDFESTER, K. Miniemulsion polymerization as a versatile tool for the synthesis of functionalized polymers. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 1132–1148, 1 dez. 2010.

D. HOWES, P.; RANA, S.; M. STEVENS, M. Plasmonic nanomaterials for biodiagnostics. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 11, p. 3835–3853, 15 maio 2014.

DADFAR, S. M.; ROEMHILD, K.; DRUDE, N. I.; STILLFRIED, S. VON; KNÜCHEL, R.; KIESSLING, F.; LAMMERS, T. Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 138, p. 302–325, 1 jan. 2019.

DEMOLOMBE, V.; BREVERN, A. G. DE; FELICORI, L.; NGUYEN, C.; MACHADO DE AVILA, R. A.; VALERA, L.; JARDIN-WATELET, B.; LAVIGNE, G.; LEBRETON, A.; MOLINA, F.; MOREAU, V. PEPOP 2.0: new approaches to mimic non-continuous epitopes. **BMC bioinformatics**, v. 20, n. 1, 11 jul. 2019.

DHAWAN, G.; KAPOOR, R.; DHAWAN, R.; SINGH, R.; MONGA, B.; GIORDANO, J.; CALABRESE, E. J. Low dose radiation therapy as a potential life saving treatment for COVID-19-induced acute respiratory distress syndrome (ARDS). **Radiotherapy and Oncology**, v. 147, p. 212–216, 1 jun. 2020.

DOMENICO, M. DI; ROSA, A. DE; BOCCELLINO, M. Detection of SARS-COV-2 Proteins Using an ELISA Test. **Diagnostics**, v. 11, n. 4, p. 698, 14 abr. 2021.

DROBYSH, M.; RAMANAVICIENE, A.; VITER, R.; RAMANAVICIUS, A.; KURABAYASHI, K.; CHEN, P. micromachines Affinity Sensors for the Diagnosis of COVID-19. 2021a.

EJAZI, S. A.; GHOSH, S.; ALI, N. Antibody detection assays for COVID-19 diagnosis: an early overview. **Immunology and Cell Biology**, v. 99, n. 1, p. 21–33, 1 jan. 2021.

- ELSLANDE, J. VAN; HOUBEN, E.; DEPYPERE, M.; BRACKENIER, A.; DESMET, S.; ANDRÉ, E.; RANST, M. VAN; LAGROU, K.; VERMEERSCH, P. Diagnostic performance of seven rapid IgG/IgM antibody tests and the Euroimmun IgA/IgG ELISA in COVID-19 patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 8, p. 1082–1087, 1 ago. 2020.
- EMILIANO CHARELLI, L.; CALIDONE DE MATTOS, G.; JESUS SOUSA-BATISTA, A. DE; CARLOS PINTO, J.; ALBERTINI BALBINO, T. Polymeric nanoparticles as therapeutic agents against coronavirus disease. **J Nanopart Res**, v. 24, n. 1, 10 jan. 2022.
- FALKE, S.; BETZEL, C. Dynamic Light Scattering (DLS). *Em: Radiation in Bioanalysis*, v. 8p. 173–193, 2019.
- FERRIOL, M.; GENTILHOMME, A.; COCHEZ, M.; OGET, N.; MIELOSZYNSKI, J. L. Thermal degradation of poly(methyl methacrylate) (PMMA): modelling of DTG and TG curves. **Polymer Degradation and Stability**, v. 79, p. 271–281, 4 set. 2002.
- FEUSER, P. E.; BUBNIAK, L. D. S.; SILVA, M. C. D. S.; VIEGAS, A. D. C.; CASTILHO FERNANDES, A.; RICCI-JUNIOR, E.; NELE, M.; TEDESCO, A. C.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H. DE. Encapsulation of magnetic nanoparticles in poly(methyl methacrylate) by miniemulsion and evaluation of hyperthermia in U87MG cells. **European Polymer Journal**, v. 68, p. 355–365, 17 maio 2015.
- FEUSER, P. E.; GASPAR, P. C.; RICCI-JÚNIOR, E.; SILVA, M. C. S. DA; NELE, M.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H. DE. Synthesis and characterization of poly(methyl methacrylate) pmma and evaluation of cytotoxicity for biomedical application. **Macromolecular Symposia**, v. 343, n. 1, p. 65–69, 1 set. 2014.
- FEUSER, P. E.; GUINDANI, C.; POSSATO, J. C.; GUESSI, J. P.; CORDEIRO, A. P.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H. DE. Bovine Serum Albumin Conjugation in Superparamagnetic/Poly(methyl methacrylate) Nanoparticles as an Alternative for Magnetic Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 21, n. 11, p. 5493–5498, 13 maio 2021.
- FEUSER, P. E.; JACQUES, A. V.; ARÉVALO, J. M. C.; ROCHA, M. E. M.; SANTOS-SILVA, M. C. DOS; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H. DE. Superparamagnetic poly(methyl methacrylate) nanoparticles surface modified with folic acid presenting cell uptake mediated by endocytosis. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 18, n. 4, p. 1–14, 2016.
- GANAPATHE, L. S.; MOHAMED, M. A.; YUNUS, R. M.; BERHANUDDIN, D. D. Magnetite (Fe₃O₄) Nanoparticles in Biomedical Application: From Synthesis to Surface Functionalisation. **Magnetochemistry**, v. 6, n. 4, p. 68, 3 dez. 2020.
- GAO, Y.; ZHOU, Y.; CHANDRAWATI, R. Metal and Metal Oxide Nanoparticles to Enhance the Performance of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **ACS Applied Nano Materials**, v. 3, n. 1, p. 1–21, 24 jan. 2020.
- GODDARD, J. M.; HOTCHKISS, J. H. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. **Prog. Polym. Sci**, v. 32, p. 698–725, 2007.

GOSTIN, L. O. Public Health Emergency Preparedness: Globalizing Risk, Localizing Threats. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 320, n. 17, p. 1743–1744, 6 nov. 2018.

GRALINSKI, L. E.; BARIC, R. S. Molecular pathology of emerging coronavirus infections. **The Journal of Pathology**, v. 235, n. 2, p. 185–195, 1 jan. 2015.

GUINDANI, C.; FEUSER, P. E.; CORDEIRO, A. P.; MENESES, A. C. DE; POSSATO, J. C.; SILVA ABEL, J. DA; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H. DE. Bovine serum albumin conjugation on poly(methyl methacrylate) nanoparticles for targeted drug delivery applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 56, n. September 2019, p. 101490, 1 abr. 2020.

GUO, L. *et al.* Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 71, n. 15, p. 778–785, 1 ago. 2020.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995–4021, 1 jun. 2005.

HA, Y.; KIM, I. Recent Developments in Innovative Magnetic Nanoparticles-Based Immunoassays: From Improvement of Conventional Immunoassays to Diagnosis of COVID-19. **BioChip Journal**, v. 16, p. 351–365, 2022.

HA, Y.; KO, S.; KIM, I.; HUANG, Y.; MOHANTY, K.; HUH, C.; MAYNARD, J. A. Recent Advances Incorporating Superparamagnetic Nanoparticles into Immunoassays. **ACS Applied Nano Materials**, v. 1, n. 2, p. 512–521, 23 fev. 2018.

HABIBZADEH, F.; HABIBZADEH, P.; YADOLLAHIE, M. Special issue: Responsible writing in science On determining the most appropriate test cut-off value: the case of tests with continuous results Lessons in biostatistics. **Biochemia Medica**, v. 26, n. 3, p. 297–307, 2016.

HAMIDREZA, S. Synthesis of Nanocomposition of Poly Acrylic Acid/Chitosan Coated-Magnetite Nanoparticles to Investigation of Interaction with BSA and IGG Proteins. **International Journal of Nanomaterials, Nanotechnology and Nanomedicine**, p. 27–033, 6 mar. 2017.

HASANZADEH, A.; ALAMDARAN, M.; AHMADI, S.; NOURIZADEH, H.; BAGHERZADEH, M. A.; MOFAZZAL JAHROMI, M. A.; SIMON, P.; KARIMI, M.; HAMBLIN, M. R. Nanotechnology against COVID-19: Immunization, diagnostic and therapeutic studies. **Journal of Controlled Release**, v. 336, p. 354–374, 10 ago. 2021.

HE, X. *et al.* Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. **Nature medicine**, v. 26, n. 5, p. 672–675, 1 maio 2020.

HECKMANN, D.; KESSLER, H. Design and Chemical Synthesis of Integrin Ligands. **Methods in Enzymology**, v. 426, p. 463–503, 1 jan. 2007.

HERMANSON, G. T. Microparticles and Nanoparticles. **Bioconjugate Techniques**, p. 582–626, 1 jan. 2008.

HONG, R. Y.; FENG, B.; CAI, X.; LIU, G.; LI, H. Z.; DING, J.; ZHENG, Y.; WEI, D. G. Double-mini-emulsion preparation of Fe₃O₄/poly(methyl methacrylate) magnetic latex. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 112, n. 1, p. 89–98, 5 abr. 2009.

HU, B.; GUO, H.; ZHOU, P.; SHI, Z.-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nat Rev Microbiol**, v. 19, p. 141–154, 2022.

HUERGO, L. F. *et al.* Magnetic Bead-Based Immunoassay Allows Rapid, Inexpensive, and Quantitative Detection of Human SARS-CoV-2 Antibodies. **ACS Sensors**, v. 6, n. 3, p. 703–708, 26 mar. 2021.

JEONG, U.; TENG, X.; WANG, Y.; YANG, H.; XIA, Y. Superparamagnetic Colloids: Controlled Synthesis and Niche Applications. **Advanced Materials**, v. 19, n. 1, p. 33–60, 8 jan. 2007.

JIANG, H. W.; LI, Y.; TAO, S. C. SARS-CoV-2 peptides/epitopes for specific and sensitive diagnosis. **Cellular & Molecular Immunology** **2023 20:5**, v. 20, n. 5, p. 540–542, 27 mar. 2023.

KHEW, S. T.; ZHU, X. H.; TONG, Y. W. An Integrin-Specific Collagen-Mimetic Peptide Approach for Optimizing Hep3B Liver Cell Adhesion, Proliferation, and Cellular Functions. **Tissue Eng**, v. 13, n. 10, p. 2451–2463, 1 out. 2007.

KOLHATKAR, A. G.; JAMISON, A. C.; LITVINOV, D.; WILLSON, R. C.; LEE, T. R. Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles. **Int. J. Mol. Sci**, v. 14, p. 14, 2013.

KOLIFARHOOD, G.; AGHAALI, M.; SAADATI, H. M.; TAHERPOUR, N.; RAHIMI, S.; IZADI, N.; NAZARI, S. S. H. Epidemiological and Clinical Aspects of COVID-19; a Narrative Review. **Archives of Academic Emergency Medicine**, v. 8, n. 1, p. e41, 1 jan. 2020.

LAI, C. K. C.; LAM, W. Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 538, p. 226–230, 29 jan. 2021.

LANDFESTER, K.; MUSYANOVYCH, A.; MAILÄNDER, V.; MAILÄNDER, M. From Polymeric Particles to Multifunctional Nanocapsules for Biomedical Applications Using the Miniemulsion Process. **J Polym Sci Part A: Polym Chem**, v. 48, p. 493–515, 2010.

LANDFESTER, K.; RAMÍREZ, L. P. Encapsulated magnetite particles for biomedical application. **J. Phys.: Condens. Matter**, v. 15, p. 1345–1361, 2003.

LANDFESTER, K.; WEISS, C. K. Encapsulation by Miniemulsion Polymerization. **Adv Polym Sci**, v. 229, p. 1–49, 2010.

LAUER, S. A.; GRANTZ, K. H.; BI, Q.; JONES, F. K.; ZHENG, Q.; MEREDITH, H. R.; AZMAN, A. S.; REICH, N. G.; LESSLER, J. The Incubation Period of Coronavirus Disease

2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. **Annals of internal medicine**, v. 172, n. 9, p. 577–582, 5 maio 2020.

LEÓN-JANAMPA, N.; SHINKARUK, S.; GILMAN, R. H.; KIRWAN, D. E.; FOUQUET, E.; SZLOSEK, M.; SHEEN, P.; ZIMIC, M. Biorecognition and detection of antigens from *Mycobacterium tuberculosis* using a sandwich ELISA associated with magnetic nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 215, p. 114749, 5 jun. 2022.

LI, R.; PEI, S.; CHEN, B.; SONG, Y.; ZHANG, T.; YANG, W.; SHAMAN, J. Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2). **Science (New York, N.Y.)**, v. 368, n. 6490, p. 489–493, 1 maio 2020.

LIMA, J. S.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C.; SOUZA, A. A. U.; VIEGAS, A. C.; OLIVEIRA, D. DE. Cellulase immobilization on magnetic nanoparticles encapsulated in polymer nanospheres. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 4, p. 511–518, 1 abr. 2017.

LIU, R.; SHI, R.; ZOU, W.; CHEN, W.; YIN, X.; ZHAO, F.; YANG, Z. Highly sensitive phage-magnetic-chemiluminescent enzyme immunoassay for determination of zearalenone. **Food Chemistry**, v. 325, p. 126905, 30 set. 2020.

LIU, S.; YU, B.; WANG, S.; SHEN, Y.; CONG, H. Preparation, surface functionalization and application of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 281, p. 102165, 1 jul. 2020.

MACHADO DE AVILA, R. A.; STRANSKY, S.; VELLOSO, M.; CASTANHEIRA, P.; SCHNEIDER, F. S.; KALAPOTHAKIS, E.; SANCHEZ, E. F.; NGUYEN, C.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Mimotopes of mutalysin-II from *Lachesis muta* snake venom induce hemorrhage inhibitory antibodies upon vaccination of rabbits. **Peptides**, v. 32, n. 8, p. 1640–1646, 1 ago. 2011.

MAHDIEH, A.; MAHDAVIAN, A. R.; SALEHI-MOBARAKEH, H. Chemical modification of magnetite nanoparticles and preparation of acrylic-base magnetic nanocomposite particles via miniemulsion polymerization. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 426, p. 230–238, 15 mar. 2017.

MAHMOUD ELSABAHY; L. WOOLEY, K. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2545–2561, 12 mar. 2012.

MAHMUD, N.; ANIK, M. I.; HOSSAIN, M. K.; KHAN, M. I.; UDDIN, S.; ASHRAFUZZAMAN, M.; RAHAMAN, M. M. Advances in Nanomaterial-Based Platforms to Combat COVID-19: Diagnostics, Preventions, Therapeutics, and Vaccine Developments. **ACS applied bio materials**, v. 5, n. 6, p. 2431–2460, 20 jun. 2022.

MANGIA, L. H. R.; FERRAZ, H. C.; SOUZA, R. S. D.; PEREIRA, M. C. S.; PINTO, J. C. In situ encapsulation of rivastigmine in TAT-functionalized P(MMA-co-AA) nanoparticles through miniemulsion polymerization. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 624, p. 126776, 5 set. 2021.

- MARINCA, T. F.; CHICINAȘ, H. F.; NEAMȚU, B. V.; ISNARD, O.; PASCUTA, P.; LUPU, N.; STOIAN, G.; CHICINAȘ, I. Mechano-synthesis, structural, thermal and magnetic characteristics of oleic acid coated Fe₃O₄ nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, v. 171, p. 336–345, 1 mar. 2016.
- MARTINS, M. G. Encapsulamento de nanopartículas magnéticas em polímeros acrílicos e avaliação de hipertermia para potencial tratamento de câncer /. **Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química**, p. 1–160, 2017.
- MATUSIAK, J.; GRZĄDKA, E. Stability of colloidal systems - a review of the stability measurements methods. **Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, sectio AA – Chemia**, v. 72, n. 1, p. 33, 8 dez. 2017.
- MOHIT, E.; ROSTAMI, Z.; VAHIDI, H. A comparative review of immunoassays for COVID-19 detection. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2021.1908886>, v. 17, n. 6, p. 573–599, 2021.
- MOURDIKOU DIS, S.; PALLARES, R. M.; THANH, N. T. K. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. **Nanoscale**, v. 10, n. 27, p. 12871–12934, 13 jul. 2018.
- MULLEN, D. G.; BANASZAK HOLL, M. M. Heterogeneous ligand-nanoparticle distributions: a major obstacle to scientific understanding and commercial translation. **Accounts of chemical research**, v. 44, n. 11, p. 1135–1145, 15 nov. 2011.
- MURAR, M.; PUJALS, S.; ALBERTAZZI, L. Multivalent effect of peptide functionalized polymeric nanoparticles towards selective prostate cancer targeting. **Nanoscale Advances**, v. 5, n. 5, p. 1378–1385, 28 fev. 2023.
- MYLKIE, K.; NOWAK, P.; RYBCZYNSKI, P.; ZIEGLER-BOROWSKA, M. Polymer-Coated Magnetite Nanoparticles for Protein Immobilization. **Materials**, v. 14, n. 2, p. 248, 6 jan. 2021.
- NAHM, F. S. Receiver operating characteristic curve: overview and practical use for clinicians. **Korean J Anesthesiol**, v. 75, n. 1, p. 25–36, 18 jan. 2022.
- NETO, W. S.; DUTRA, G. V. S.; JENSEN, A. T.; ARAÚJO, O. A.; GARG, V.; OLIVEIRA, A. C. DE; VALADARES, L. F.; SOUZA, F. G. DE; MACHADO, F. Superparamagnetic nanoparticles stabilized with free-radical polymerizable oleic acid-based coating. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 739, p. 1025–1036, 30 mar. 2018.
- OH, S.; KIM, J.; TRAN, V. T.; LEE, D. K.; AHMED, S. R.; HONG, J. C.; LEE, J. J.; PARK, E. Y.; LEE, J. J. Magnetic Nanozyme-Linked Immunosorbent Assay for Ultrasensitive Influenza A Virus Detection. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 10, n. 15, p. 12534–12543, 18 abr. 2018.
- ONG, D. S. Y.; FRAGKOU, P. C.; SCHWEITZER, V. A.; CHEMALY, R. F.; MOSCHOPOULOS, C. D.; SKEVAKI, C. Narrative review How to interpret and use COVID-19 serology and immunology tests. 2021.

ORTEGA, G. A.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, S.; REGUERA, E. Magnetic paper-based ELISA for IgM-dengue detection. **RSC Advances**, v. 7, n. 9, p. 4921–4932, 17 jan. 2017.

PARK, S. H.; GOO, J. M.; JO, C. H. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve: Practical Review for Radiologists. **Korean Journal of Radiology**, v. 5, n. 1, p. 11–18, 1 mar. 2004.

PASCARELLA, G.; STRUMIA, A.; PILIEGO, C.; BRUNO, F.; BUONO, R. DEL; COSTA, F.; SCARLATA, S.; AGRÒ, F. E. COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review. **Journal of Internal Medicine**, v. 288, n. 2, p. 192–206, 1 ago. 2020.

PECORARO, V.; NEGRO, A.; PIROTTI, T.; TRENTI, T. Estimate false-negative RT-PCR rates for SARS-CoV-2. A systematic review and meta-analysis. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 52, n. 2, p. e13706, 1 fev. 2022.

PEIXOTO, A. C. B. **Funcionalização de nanopartículas poliméricas para liberação de medicamentos sítio-dirigida**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química., 2013.

PETRAKOVA, A. V.; URUSOV, A. E.; ZHERDEV, A. V.; DZANTIEV, B. B. Magnetic ELISA of aflatoxin B1-pre-concentration without elution. **Analytical Methods**, v. 7, n. 24, p. 10177–10184, 21 dez. 2015.

PICHOT, C. Surface-functionalized latexes for biotechnological applications. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, n. 3–4, p. 213–221, 1 nov. 2004.

PINTO, MARTINA C C *et al.* Production of New Functionalized Polymer Nanoparticles and Use for Manufacture of Novel Nanobiocatalysts. **Macromol. Mater. Eng**, v. 305, n. 6, p. 1–10, 30 abr. 2020.

POKHREL, P.; HU, C.; MAO, H. Detecting the Coronavirus (COVID-19). **ACS Sensors**, v. 5, n. 8, p. 2283–2297, 2020.

POLAND, G. A.; OVSYANNIKOVA, I. G.; KENNEDY, R. B. SARS-CoV-2 immunity: review and applications to phase 3 vaccine candidates. **The Lancet**, v. 396, n. 10262, p. 1595–1606, 14 nov. 2020.

PORTIOLI, C.; BOVI, M.; BENATI, D.; DONINI, M.; PERDUCA, M.; ROMEO, A.; DUSI, S.; MONACO, H. L.; BENTIVOGLIO, M. Novel functionalization strategies of polymeric nanoparticles as carriers for brain medications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 105, n. 3, p. 847–858, 1 mar. 2017.

RAI, P.; KUMAR, B. K.; DEEKSHIT, V. K.; KARUNASAGAR, INDRANI; KARUNASAGAR, IDDYA. Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 2, p. 441–455, 1 jan. 2021.

RAMESH, S.; LEEN, K. H.; KUMUTHA, K.; AROF, A. K. FTIR studies of PVC/PMMA blend based polymer electrolytes. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 66, n. 4–5, p. 1237–1242, 1 abr. 2007.

- RODDA, A. E.; MEAGHER, L.; NISBET, D. R.; FORSYTHE, J. S. Specific control of cell–material interactions: Targeting cell receptors using ligand-functionalized polymer substrates. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 7, p. 1312–1347, 1 jul. 2014.
- RONCO, L. I.; FEUSER, P. E.; CAS VIEGAS, A. DA; MINARI, R. J.; GUGLIOTTA, L. M.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H. Incorporation of Magnetic Nanoparticles in Poly(Methyl Methacrylate) Nanocapsules. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 219, n. 6, p. 1–7, 2018.
- SANTOS, P. C. M. DOS; FEUSER, P. E.; CORDEIRO, A. P.; SCUSSEL, R.; ABEL, J. DA S.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; ROCHA, M. E. M.; SAYER, C.; HERMES DE ARAÚJO, P. H. Antitumor activity associated with hyperthermia and 4-nitrochalcone loaded in superparamagnetic poly(thioether-ester) nanoparticles. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 31, n. 15, p. 1895–1911, 12 out. 2020.
- SCHOTH, A.; KEITH, A. D.; LANDFESTER, K.; MUÑOZ-ESPÍ, R. Silanization as a versatile functionalization method for the synthesis of polymer/magnetite hybrid nanoparticles with controlled structure. **RSC Advances**, v. 6, n. 59, p. 53903–53911, 2 jun. 2016.
- SCUSSEL, R.; FEUSER, P. E.; LUIZ, G. P.; GALVANI, N. C.; FAGUNDES, M. Í.; GONÇALVES DAL-BÓ, A.; HERMES DE ARAÚJO, P. H.; COELHO, E. A. F.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A. Peptide-Integrated Superparamagnetic Nanoparticles for the Identification of Epitopes from SARS-CoV-2 Spike and Nucleocapsid Proteins. **ACS Applied Nano Materials**, v. 5, n. 1, p. 642, 1 jan. 2022.
- SHANG, J.; YE, G.; SHI, K.; WAN, Y.; LUO, C.; AIHARA, H.; GENG, Q.; AUERBACH, A.; LI, F. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. **Nature**, v. 581, n. 7807, p. 221–224, 30 mar. 2020.
- SHARFSTEIN, J. M.; BECKER, S. J.; MELLO, M. M. Diagnostic Testing for the Novel Coronavirus. **JAMA**, v. 323, n. 15, p. 1437–1438, 21 abr. 2020.
- SHEN, M.; ZHOU, Y.; YE, J.; ABDULLAH AL-MASKRI, A. A.; KANG, Y.; ZENG, S.; CAI, S. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 2, p. 97–101, 1 abr. 2020.
- SINGH, A.; SAHOO, S. K. Magnetic nanoparticles: A novel platform for cancer theranostics. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 4, p. 474–481, 2014.
- SINGH, P.; SINGH, D.; SA, P.; MOHAPATRA, P.; KHUNTIA, A.; SAHOO, S. K. Insights from nanotechnology in COVID-19: Prevention, detection, therapy and immunomodulation. **Nanomedicine**, v. 16, n. 14, p. 1219–1235, 1 jun. 2021.
- SINGHAL, A.; DUBEY, K. A.; BHARDWAJ, Y. K.; JAIN, D.; CHOUDHURY, S.; TYAGI, A. K. UV-shielding transparent PMMA/In₂O₃ nanocomposite films based on In₂O₃ nanoparticles. **RSC Advances**, v. 3, p. 20913–20921, 7 maio 2013.
- TAHAMTAN, A.; ARDEBILI, A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 20, n. 5, p. 453–454, 3 maio 2020.

- TAI, M. F.; LAI, C. W.; ABDUL HAMID, S. B. Facile Synthesis Polyethylene Glycol Coated Magnetite Nanoparticles for High Colloidal Stability. **Journal of Nanomaterials**, v. 2016, 2016.
- TANG, Y. W.; SCHMITZ, J. E.; PERSING, D. H.; STRATTON, C. W. Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 6, 1 jun. 2020.
- TEJA, A. S.; KOH, P. Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, v. 55, n. 1–2, p. 22–45, mar. 2009.
- THANH, N. T. K.; GREEN, L. A. W. Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. **Nano Today**, v. 5, n. 3, p. 213–230, 1 jun. 2010.
- TIAN, Y.; ZHOU, S. Advances in cell penetrating peptides and their functionalization of polymeric nanoplatfoms for drug delivery. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 13, n. 2, p. e1668, 1 mar. 2021.
- URUSOV, A. E.; PETRAKOVA, A. V.; VOZNIAK, M. V.; ZHERDEV, A. V.; DZANTIEV, B. B. Rapid immunoenzyme assay of aflatoxin B1 using magnetic nanoparticles. **Sensors (Switzerland)**, v. 14, n. 11, p. 21843–21857, 18 nov. 2014.
- URUSOV, A. E.; PETRAKOVA, A. V.; ZHERDEV, A. V.; DZANTIEV, B. B. Application of Magnetic Nanoparticles in Immunoassay. **Nanotechnologies in Russia**, v. 12, n. 9–10, p. 471–479, 1 set. 2017.
- VANDENBERG, O.; MARTINY, D.; ROCHAS, O.; BELKUM, A. VAN; KOZLAKIDIS, Z.; BELKUM, A.; KOZLAKIDIS, Z. Considerations for diagnostic COVID-19 tests. **Nat Rev Microbiol**, v. 19, n. 3, p. 171–183, 2021.
- VOGL, T.; LEVIATAN, S.; SEGAL, E. SARS-CoV-2 antibody testing for estimating COVID-19 prevalence in the population. **Cell Reports Medicine**, v. 2, p. 100191, 2021.
- WEI, Q.; LI, T.; WANG, G.; LI, H.; QIAN, Z.; YANG, M. Fe₃O₄ nanoparticles-loaded PEG-PLA polymeric vesicles as labels for ultrasensitive immunosensors. **Biomaterials**, v. 31, n. 28, p. 7332–7339, 1 out. 2010.
- WEISSLEDER, R.; LEE, H.; KO, J.; PITTET, M. J. COVID-19 diagnostics in context. **Science Translational Medicine**, v. 12, n. 546, p. 1931, 3 jun. 2020a.
- WERENGOWSKA-CIETWIERZ, K.; WIVNIEWSKI, M.; TERZYK, A. P.; FURMANIAK, S. The Chemistry of Bioconjugation in Nanoparticles-Based Drug Delivery System. **Advances in Condensed Matter Physics**, v. 2015, p. 1–27, 2015.
- WHO. Disponível em: <<https://www.who.int/>>. Acesso em: 7 jul. 2022.
- WIBOWO, D.; JORRITSMA, S. H. T.; GONZAGA, Z. J.; EVERT, B.; CHEN, S.; REHM, B. H. A. Polymeric nanoparticle vaccines to combat emerging and pandemic threats. **Biomaterials**, v. 268, p. 120597, 1 jan. 2021.

WOLOSHIN, S.; PATEL, N.; KESSELHEIM, A. S. False Negative Tests for SARS-CoV-2 Infection — Challenges and Implications. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 6, p. 38, 6 ago. 2020.

WU, J. T.; LEUNG, K.; LEUNG, G. M. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. **The Lancet**, v. 395, n. 10225, p. 689–697, 29 fev. 2020.

WU, K.; SU, D.; LIU, J.; SAHA, R.; WANG, J. P. Magnetic nanoparticles in nanomedicine: A review of recent advances. **Nanotechnology**, v. 30, n. 50, p. 502003, 27 set. 2019.

WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, n. 11, p. 397, 2 nov. 2008.

WU, W.; JIANG, C. Z.; ROY, V. A. L. Designed synthesis and surface engineering strategies of magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Nanoscale**, v. 8, n. 47, p. 19421–19474, 21 dez. 2016.

YANG, D. Application of nanotechnology in the COVID-19 pandemic. **International Journal of Nanomedicine**, v. 16, p. 623–649, 2021.

YANG, Y. *et al.* Laboratory Diagnosis and Monitoring the Viral Shedding of SARS-CoV-2 Infection. **The Innovation**, v. 1, n. 3, p. 100061, 25 nov. 2020.

YARI, P.; LIANG, S.; CHUGH, V. K.; REZAEI, B.; MOSTUFA, S.; KRISHNA, V. D.; SAHA, R.; CHEERAN, M. C.-J.; WANG, J.-P.; GÓMEZ-PASTORA, J.; WU, K. Nanomaterial-Based Biosensors for SARS-CoV-2 and Future Epidemics. **Analytical Chemistry**, v. 95, n. 42, p. 15419–15449, 24 out. 2023.

YÜCE, M.; FILIZTEKIN, E.; ÖZKAYA, K. G. COVID-19 diagnosis —A review of current methods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 172, p. 112752, 15 jan. 2021.

ZENG, W. *et al.* Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 527, n. 3, p. 618–623, 30 jun. 2020.

ZHAO, J. *et al.* Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 71, n. 16, p. 2027–2034, 15 out. 2020.

ZHU, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 20 fev. 2020.

ZOU, L. *et al.* SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 12, p. 1177, 3 mar. 2020.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Cálculo da área específica média e concentração de proteína para adsorção de uma monocamada

Supondo que as partículas produzidas sejam esféricas e usando o diâmetro (d) médio medido por espalhamento de luz, os cálculos de área seguiram o seguinte equacionamento:

$$\text{Área por partícula } (A_p) = \pi \cdot d^2$$

$$\text{Número de partículas total } (N_{pt}) = \frac{\left(\frac{\text{massa MMA}}{\rho_{MMA}}\right)}{\frac{\pi \cdot d^3}{6}}$$

$$\text{Área total } (A_t) = A_p \cdot N_{pt}$$

Para o cálculo da concentração de peptídeo utilizada baseada na saturação da superfície (monocamada), foi utilizada a área calculada acima, supondo uma conformação esférica do peptídeo:

$$\text{Área de peptídeo } (A_{pet}) = \pi \left(\frac{d^2}{4}\right)$$

$$\text{Moléculas de peptídeo para a monocamada } (M_{pm}) = \frac{A_t}{A_{pet}}$$

$$\text{Moléculas de peptídeo por partícula} = \frac{M_{pm}}{N_{pt}}$$