

Sensor LSPR para uma rápida deteção da COVID-19

Vânia Micaela Gouveia Moreira

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Biomédica

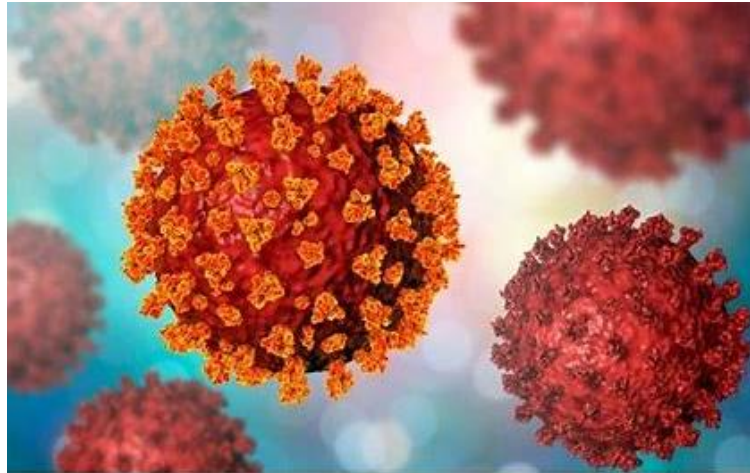
(Versão Final)

Orientadores

Doutora Elisabeta Alegria (DEQ/ISEL)

Doutora Gabriela Almeida (FCT-UNL/UCIBIO, EGAS MONIZ - CRL)

maio de 2022



Sensor LSPR para uma rápida deteção da COVID-19

Vânia Micaela Gouveia Moreira

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores

Doutora Elisabeta Alegria (DEQ/ISEL)

Doutora Gabriela Almeida (FCT-UNL/UCIBIO, EGAS MONIZ - CRL)

Júri

Presidente: Doutor Luís Miguel Minhalma (ISEL/IPL)

Vogais: Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares (FCT-UNL)
Doutora Gabriela Almeida (FCT-UNL/UCIBIO, EGAS MONIZ
- CRL)

maio de 2022

Direitos de Cópia e Financiamento

O Copyright© da presente dissertação pertence a Vânia Micaela Gouveia Moreira, ao Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL) do Instituto Politécnico de Lisboa e à Escola Superior de Tecnologia da Saúde (ESTesL) do Instituto Politécnico de Lisboa.

O Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, a Escola Superior de Tecnologia da Saúde e o Instituto Politécnico de Lisboa têm o direito de arquivar e publicar esta dissertação através de repositórios científicos para fins não comerciais de investigação desde que seja dado o devido crédito ao autor e editor.

Este trabalho foi financiado por fundos nacionais da Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P., através do CiiEM (Projeto BID/04585/2020), a Unidade de Biociências Moleculares Aplicadas – UCIBIO (Projeto UID/Multi/04378/2013), cofinanciado pelo FEDER no âmbito do acordo de parceria PT2020 (POCI-01-0145-FEDER-007728), o programa Research4COVID19 (Projeto n.º 662) e os projetos PhotoAKI (PTDC/NAN-OPT/31311/2017) e MULTIFUN (PTDC/QUI-QIN/29778/2017).

Dedicatória e Agradecimentos

A entrega deste trabalho final de Mestrado representa o fim de um longo percurso que começou numa altura atípica com muitos altos e baixos, onde a compreensão, incentivo e disponibilidade de muitas pessoas foi essencial. Quero agradecer a todas as pessoas que tiveram um papel fundamental neste percurso.

Às minhas orientadoras, a Doutora Elisabete Alegria e a Doutora Gabriela Almeida, pela oportunidade de trabalhar neste projeto, pela vossa orientação, apoio, dedicação, motivação e por toda a disponibilidade até aqui.

Aos professores Alessandro Fantoni e Paulo Mascarenhas cuja ajuda foi fundamental ao longo de todo o trabalho na utilização das nanopartículas e na realização da meta-análise.

Ao Marco e à Una por toda a compreensão e por todas as ferramentas que me proporcionaram e que me permitiram continuar a estudar.

À minha família por terem estado ao meu lado ao longo desta etapa, por todo o apoio, compreensão e motivação ao longo deste tempo, principalmente, nos momentos mais difíceis. Em especial à minha mãe que tem sido um pilar em todos os momentos da minha vida e por todo o apoio e amor incondicional que nos permitiram chegar até aqui.

À minha “ficha tripla” por alegrarem os meus dias com os vossos sorrisos e abraços reconfortantes que me motivam e incentivam a todos os dias a ser melhor.

E, por fim, ao João por ter entrado na minha vida na altura certa, por me apoiar todos os dias, por nunca desistir de mim e por nunca me ter deixado desistir.

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um teste de antígeno (Ag) baseado em Ressonância do Plasmão de Superfície Localizada (LSPR) que combinasse a elevada especificidade dos anticorpos monoclonais (Ab) com a elevada sensibilidade das nanopartículas de ouro (AuNPs). A dissertação teve como subobjetivos estudar a influência de diferentes parâmetros na formação e estabilidade de bionanoconjugados assim como realizar uma meta-análise sobre amostras fisiológicas alternativas.

Os ensaios foram realizados com AuNPs em solução e em placas de ITO com ouro depositado. O primeiro passo consistiu na preparação do ouro que inclui a sua funcionalização com diferentes tióis (MUA, MPA ou mistura de ambos) e a adição de agentes de acoplamento (EDC e NHS). A formação dos bionanoconjugados compreendeu a imobilização de anticorpos com diferentes especificidades e a imobilização de diferentes antígenos ou do vírus SARS-CoV-2. O fenómeno LSPR permitiu detetar um desvio da banda plasmónica após a imobilização das biomoléculas e os bionanoconjugados resultantes foram caracterizados por espectrofotometria de UV-Visível, eletroforese em gel de agarose e microscopia eletrónica de transmissão (TEM). A funcionalização com MUA e a imobilização das biomoléculas da *GenScript* permitiram obter os melhores resultados com um desvio após estas etapas.

A meta-análise consistiu na pesquisa em diferentes bases de dados e à seleção dos artigos que cumpriam o objetivo da meta-análise e, por fim, procedeu-se à avaliação metodológica dos artigos assim como a meta-análise com vista à avaliação da sensibilidade, especificidade e precisão de amostras alternativas na deteção do SARS-CoV-2. A saliva apresentou os melhores resultados com uma precisão de 92.1%, indicando a possibilidade de ser utilizada como amostra alternativa para a deteção da COVID-19.

O presente trabalho permitiu otimizar a estabilidade dos bionanoconjugados e estudar a possibilidade da utilização de amostras alternativas para detetar esta patologia. Contudo, não foi possível concluir o objetivo de desenvolver o teste rápido de antígeno, uma vez que o desvio da banda plasmónica obtido encontrava-se dentro do erro do aparelho de medida.

Palavras-Chave: COVID-19; SARS-CoV-2; Nanopartículas de Ouro; LSPR; Anticorpo; Antígeno; Bionanoconjugados; TRAg.

Abstract

The present work aimed to develop an antigen (Ag) test based on Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) that combines the high specificity of monoclonal antibodies (Ab) with the high sensitivity of gold nanoparticles (AuNPs). The dissertation had the sub-goals to study the influence of different parameters on the formation and stability of bionanoconjugates and perform a meta-analysis on alternative physiological samples.

The assays included AuNPs in solution and ITO plates with gold deposited. The first step consisted of the preparation of AuNPs, which implies the functionalization of the gold with different thiols (MUA, MPA or a mixture of both) and the addition of coupling agents (EDC and NHS). The formation of the bionanoconjugates includes the immobilization of antibodies with different specificities and the immobilization of different antigens or the SARS-CoV-2 virus. The LSPR phenomenon allowed the detection of a plasmon band shift after the immobilization of the biomolecules. The resulting bionanoconjugates were characterized by UV-Visible spectrophotometry, agarose gel electrophoresis and transmission electron microscopy (TEM). The functionalization with MUA and the immobilization of GenScript biomolecules allowed the obtention of the best results with a shift after these steps.

The meta-analysis consisted of a search in different databases and the selection of articles that fulfilled the goal of the meta-analysis, finally, the methodological evaluation of the articles was conducted, as well as the meta-analysis to assess the sensitivity, specificity, and precision of alternative samples in the detection of SARS-CoV-2. Saliva showed the best results with an accuracy of 92.1%, indicating the possibility of being used as an alternative sample for the detection of COVID-19.

The present work allowed the optimization of the stability of the bionanoconjugates and to study the possibility of using alternative samples to detect this pathology. However, it was not possible to complete the aim of developing the rapid antigen test, since the plasmonic band deviation obtained was within the error of the measurement device.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; Gold Nanoparticles; LSPR; Antibody; Antigen; Bionanoconjugates; RAT.

Índice Geral

Direitos de Cópia e Financiamento	i
Dedicatória e Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice de Tabelas	v
Índice de Figuras	x
Abreviaturas	xiv
1. Introdução	1
1.1. O vírus: SARS-CoV-2	1
1.2. A doença: COVID-19	2
1.2.1. Transmissibilidade.....	2
1.2.2. Sintomas	3
1.2.3. Diagnóstico.....	4
1.3. Biossensores	11
1.3.1. Nanopartículas de Ouro.....	12
1.3.2. Bionanoconjugados	15
1.4. Metodologias utilizadas	17
1.4.1. Microscopia eletrônica de Transmissão (TEM)	17
1.4.2. Espectrofotometria	17
1.4.3. Eletroforese em gel de agarose.....	18
2. Objetivos	20
3. Material e métodos	22
3.1. Reagentes e Soluções	22
3.2. Materiais e equipamentos	23
3.3. Procedimento experimental	23
3.3.1. Experiências em solução	23
3.3.2. Experiências em placas de ouro	26
3.3.3. Meta-análise sobre amostras fisiológicas	27
3.4. Técnicas gerais	27
3.4.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	27
3.4.2. Eletroforese em gel de agarose.....	27
4. Resultados e discussão de resultados	28

4.1. Ensaio em solução	28
4.1.1. Influência do tamanho das AuNPs	28
4.1.2. Influência do tipo de AuNPs	34
4.1.3. Influência do tiol	37
4.1.4. Influência das condições de centrifugação	40
4.1.5. Influência do crosslinking	48
4.1.6. Influência do elemento de reconhecimento biológico	52
4.1.7. Influência do anticorpo	54
4.1.8. Influência do antígeno	60
4.2. Ensaio em superfícies sólidas	68
4.3. Meta-análise	71
5. Conclusão	73
6. Trabalhos Futuros	76
7. Publicações e comunicações científicas no âmbito deste trabalho	77
8. Bibliografia	78
A. Anexos	84
I. Determinação da concentração da solução de AuNPs isoladas	84
II. Determinação do volume de tiol necessário	85
III. Determinação dos volumes dos agentes de acoplamento	87
IV. Determinação do volume de anticorpo/antígeno	88
V. Influência do tipo de nanopartícula	89
VI. Influência do tiol	90
VII. Influência das condições de centrifugação	91
VIII. Influência da etapa de <i>crosslinking</i>	92
IX. Influência do elemento de reconhecimento biológico	95
X. Influência do anticorpo	95
XI. Influência do antígeno	98

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Tratamento típico em cada fase da COVID-19 consoante o tipo de sintomas [6,9,11].	3
Tabela 1.2: Vantagens e desvantagens das amostras mais utilizadas para detetar o SARS-CoV-2.....	5
Tabela 1.3: Exemplos de testes serológicos avaliados pela FIND.	7
Tabela 1.4: Exemplos de Kits moleculares avaliados de forma independente pela FIND.....	8
Tabela 1.5: Vantagens e desvantagens dos testes moleculares mais utilizados.	9
Tabela 1.6: Exemplos de TRAg autorizados em Portugal e respetivas seletividades e especificidades.	10
Tabela 1.7: Testes de diagnóstico rápido baseados em tradutores óticos.....	14
Tabela 1.8: Estrutura dos principais tióis utilizados para modificação de nanopartículas.	15
Tabela 1.9: Estrutura molecular dos agentes de acoplamento, EDC e NHS.	16
Tabela 3.1: Tipo e concentração de tiol utilizado, de acordo com o tamanho das AuNP.	24
Tabela 3.2: Condições de centrifugação das AuNPs utilizadas de acordo com o tamanho das mesmas.	24
Tabela 3.3: Proporções AuNP-MUA:Ab utilizadas.	25
Tabela 3.4: Proporção AuNP:Ag utilizadas ao longo do trabalho experimental.....	25
Tabela 4.1: Tamanho estimado e concentração das AuNPs comerciais.	29
Tabela 4.2: Concentração estimada das AuNP-MUA.....	29
Tabela 4.3: Variação da posição da banda plasmónica ao longo do tempo.	30
Tabela 4.4: Razão de agregação, tamanho estimado e concentração das AuNPs de 15 nm (comerciais e sintetizadas).	34
Tabela 4.5: Variação da posição da banda plasmónica ao longo do tempo das AuNPs de 15 nm (comerciais e sintetizadas) com o Ab Spike S1 (GenScript) imobilizado numa proporção de 1:60.	35
Tabela 4.6: Variação da posição da banda plasmónica ao longo do tempo das AuNPs de 15 nm (comerciais e sintetizadas) com o anticorpo Spike S1 (GenScript) imobilizado numa proporção de 1:60.	36
Tabela 4.7: Variação da posição da banda plasmónica das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) de acordo com o seu diâmetro, funcionalização e tempo.....	38
Tabela 4.8: Variação da posição da banda plasmónica das AuNPs de 60 nm comerciais (Cytodiagnosics).	40
Tabela 4.9: Variação da posição da banda plasmónica das AuNPs de 60 nm comerciais (Cytodiagnosics) após a imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:500 e do Ag Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:120.	40
Tabela 4.10: Efeito da centrifugação na razão de agregação, tamanho estimado e concentração das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA.....	42

Tabela 4.11: Efeito da centrifugação na razão de agregação, tamanho estimado e concentração das AuNPs de 15 sintetizadas no laboratório após funcionalização com MUA.	44
Tabela 4.12: Efeito da velocidade de centrifugação na banda plasmónica obtido nas AuNPs de 15 nm (comerciais e sintetizadas) funcionalizadas com MUA.	46
Tabela 4.13: Variação da banda plasmónica ao longo do tempo.	48
Tabela 4.14: Variação das AuNPs de 30 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA com diferentes quantidades de EDC e NHS.	49
Tabela 4.15: Influência da utilização de EDC e NHS recém preparados na banda plasmónica das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório.	50
Tabela 4.16: Influência do solvente utilizado na preparação dos agentes de acoplamento nos comprimentos de onda (nm) obtidos ao longo do tempo.	51
Tabela 4.17: Influência do ERB na variação da banda plasmónica das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) após imobilização numa proporção de 1:120.	53
Tabela 4.18: Influência do Ab imobilizado na variação da posição da banda plasmónica ao longo do tempo.	54
Tabela 4.19: Influência da proporção do Ab Spike S1 (GenScript) na variação da banda plasmónica das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).	56
Tabela 4.20: Comprimento de onda (nm) das AuNPs caseiras de 15 nm antes e após a imobilização do Anticorpo Spike S1 em diferentes proporções.	57
Tabela 4.21: Comprimento de onda (nm) das AuNPs caseiras de 15 nm antes e após a imobilização do Anticorpo Spike S1 em diferentes proporções.	58
Tabela 4.22: Variação da banda plasmónica das AuNPs sintetizadas no laboratório e comerciais de 15 nm ao longo da imobilização do Anticorpo Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:60.	60
Tabela 4.23: Variação da banda plasmónica das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) antes e após a imobilização do Anticorpo Spike S1 (GenScript) e do Antígeno S1 (GenScript) numa proporção de 1:120.	61
Tabela 4.24: Comprimento de onda (nm) das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) antes e após a imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:60 e do Ag S1 (GenScript) numa proporção de 1:120.	62
Tabela 4.25: Variação da banda plasmónica das AuNPs 15 nm sintetizadas no laboratório antes e após a imobilização do Ab Spike (GenScript) numa proporção de 1:60 e diferentes Ag Spike (iBET) numa proporção de 1:150.	63
Tabela 4.26: Variação da banda plasmónica das AuNPs 15 nm sintetizadas no laboratório antes e após a imobilização do Ab Spike (GenScript) numa proporção de 1:60 e dos Ag Spike B02 (iBET) ou Ag RBD (iBET) numa proporção de 1:120.	64

Tabela 4.27: Variação da banda plasmônica das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório antes e após a imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:60 e do vírus SARS-CoV-2 em diferentes proporções.	66
Tabela 4.28: Comprimento de onda (nm) das AuNPs de 15 nm comerciais e sintetizadas no laboratório ao longo da imobilização do Anticorpo Spike S1 (1:60) e do Antígeno Spike (1:120).	68
Tabela A.1: Resultados obtidos através da absorvância das AuNPs comerciais (Cytodiagnosics) de diferentes tamanhos.	84
Tabela A.2: Proporções AuNPs:Tiol utilizadas consoante o tamanho das AuNPs comerciais (Cytodiagnosics).	85
Tabela A.3: Volumes utilizados para a funcionalização das AuNPs comerciais (Cytodiagnosics) e respectivas condições de centrifugação.	86
Tabela A.4: Dados obtidos através do espectro de absorvância das soluções AuNP-MUA preparadas com AuNPs comerciais (Cytodiagnosics).	87
Tabela A.5: Volumes utilizados ao longo da experiência.	89
Tabela A.6: Funcionalização das AuNPs de 15 nm (comerciais e sintetizadas) e condições de centrifugação utilizadas.	90
Tabela A.7: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância das AuNPs de 15 nm (comerciais e sintetizadas).	90
Tabela A.8: Volumes utilizados ao longo do ensaio.	90
Tabela A.9: Volumes utilizados para a funcionalização.	91
Tabela A.10: Volumes utilizados para a funcionalização das AuNPs de 15 nm (comerciais e sintetizadas).	91
Tabela A.11: Parâmetros utilizados para determinar a razão de agregação, tamanho estimado e concentração das soluções AuNP-MUA preparadas com AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics), centrifugadas a diferentes velocidades de centrifugação.	92
Tabela A.12: Parâmetros utilizados para determinar a razão de agregação, tamanho estimado e concentração das soluções AuNP-MUA preparadas com AuNPs de 15 nm sintetizadas, centrifugadas a diferentes velocidades de centrifugação.	92
Tabela A.13: Parâmetros utilizados para o cálculo de alguns parâmetros como a razão de agregação e a concentração das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).	93
Tabela A.14: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) ao longo do tempo.	93
Tabela A.15: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).	93
Tabela A.16: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) isoladas ou funcionalizadas com MUA.	93

Tabela A.17: Volumes utilizados ao longo da experiência.	94
Tabela A.18: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).	94
Tabela A.19: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) isoladas ou funcionalizadas com MUA.	94
Tabela A.20: Volumes utilizados ao longo da experiência.	94
Tabela A.21: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).	95
Tabela A.22: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) isoladas ou funcionalizadas com MUA.	95
Tabela A.23: Volumes utilizados ao longo da experiência.	95
Tabela A.24: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).	96
Tabela A.25: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) isoladas ou funcionalizadas com MUA.	96
Tabela A.26: Volumes utilizados ao longo da experiência.	96
Tabela A.27: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).	96
Tabela A.28: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) isoladas ou funcionalizadas com MUA.	96
Tabela A.29: Volumes utilizados ao longo da experiência.	96
Tabela A.30: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório.	97
Tabela A.31: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório isoladas ou funcionalizadas com MUA.	97
Tabela A.32: Volumes utilizados ao longo da experiência.	97
Tabela A.33: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório.	97
Tabela A.34: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório isoladas ou funcionalizadas com MUA.	97
Tabela A.35: Volumes utilizados ao longo da experiência.	97
Tabela A.36: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).	98
Tabela A.37: Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) isoladas ou funcionalizadas com MUA.	98

Tabela A.38: Volumes utilizados ao longo da experiência.	98
Tabela A.39: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância para as AuNPs de 15 nm sintetizadas.	98
Tabela A.40: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs sintetizadas de 15 nm isoladas ou funcionalizadas com MUA.	99
Tabela A.41: Volumes utilizados ao longo da experiência.	99
Tabela A.42: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância para as AuNPs de 15 nm sintetizadas.	99
Tabela A.43: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs sintetizadas de 15 nm isoladas ou funcionalizadas com MUA.	99
Tabela A.44: Volumes utilizados ao longo da experiência.	99
Tabela A.45: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância para as AuNPs de 15 nm sintetizadas.	100
Tabela A.46: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs sintetizadas de 15 nm isoladas ou funcionalizadas com MUA.	100
Tabela A.47: Volumes utilizados ao longo da experiência.	100
Tabela A.48: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância para as AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).	100
Tabela A.49: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) isoladas ou funcionalizadas com MUA.	100
Tabela A.50: Volumes utilizados ao longo da experiência.	100

Índice de Figuras

Figura 1.1: Representação esquemática do vírus SARS-CoV-2 e dos seus principais componentes. Adaptado de [3].	1
Figura 1.2: Esquema da variação dos anticorpos ao longo do tempo.	6
Figura 1.3: Procedimento usado para detetar o SARS-CoV-2 através da técnica de RT-PCR. Adaptado de [30].	8
Figura 1.4: Esquema do funcionamento do fenómeno SPR. A luz incide sobre a superfície do metal e o feixe de luz refletido é analisado. Adaptada de Biosensingusa.	13
Figura 1.5: Espectro de Absorvância das AuNPs monodispersas e agregadas. Adaptado de (54).	14
Figura 1.6: Etapas para o desenvolvimento do biossensor para detetar o SARS-CoV-2.	15
Figura 3.1: Espectrofotómetro montado in-house.	23
Figura 4.1: Espectro de transmitância das AuNPs comerciais (Cytodiagnosics) de diferentes diâmetros.	28
Figura 4.2: Imobilização do Anticorpo Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:120 em AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA.	30
Figura 4.3: Imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:120 em AuNPs de 30 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA.	31
Figura 4.4: Imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:120 em AuNPs de 60 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA.	31
Figura 4.5: Imagem TEM da solução AuNP-MUA-Ab com AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA. Ampliação: 100kx.	32
Figura 4.6: Imagem TEM da solução AuNP-MUA-Ab com AuNPs de 30 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA e com o Ab Spike S1 (GenScript) e o Ag Spike S1 (GenScript) imobilizados numa proporção de 1:120. Ampliação: 100kx.	32
Figura 4.7: Imagem TEM da solução AuNP-MUA-Ab com AuNPs de 60 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA e com o Ab Spike S1 (GenScript) imobilizado numa proporção de 1:120. Ampliação: 20kx.	32
Figura 4.8: Gel de agarose de diferentes amostras preparadas com AuNPs comerciais.	33
Figura 4.9: Imobilização do Anticorpo Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:60 em AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).	35
Figura 4.10: Imobilização do Anticorpo Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:60 em AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório.	35
Figura 4.11: Comparação dos espectros de transmitância de AuNPs de 15 nm (comerciais e sintetizadas), antes e após a imobilização do Anticorpo Spike S1 (GenScript), numa proporção de 1:60.	36

Figura 4.12: Comparação do espectro de transmitância de AuNPs de 15 nm (comerciais e sintetizadas), antes e após a imobilização do Anticorpo Spike S1 (GenScript), numa proporção de 1:60.	37
Figura 4.13: Espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA medidas a 12/03 e a 16/03.	38
Figura 4.14: Espectro de transmitância das AuNPs de 30 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA medidas a 12/03 e a 16/03 ao longo do tempo.	39
Figura 4.15: Espectro de transmitância das AuNPs de 60 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA medidas a 12/03 e a 16/03.	39
Figura 4.16: Efeito da centrifugação a 4 °C e 2500 rpm durante 10 minutos no espectro de transmitância da solução de AuNP-MUA de 60 nm comerciais (Cytodiagnosics).	40
Figura 4.17: Imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:500 e do Ag Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:120 nas AuNPs de 60 nm comerciais (Cytodiagnosics) ao longo do tempo.	41
Figura 4.18: Soluções AuNP-MUA com AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) centrifugadas a diferentes velocidades de centrifugação. (Da esquerda para a direita: 12651, 11000, 10000 e 9000 rpm).	42
Figura 4.19: Efeito da velocidade de centrifugação no espectro de transmitância obtido das AuNP-MUA de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).	43
Figura 4.20: Soluções AuNP-MUA com AuNPs sintetizadas de 15 nm centrifugadas a diferentes velocidades de centrifugação. (Da esquerda para a direita: 12651, 11000, 10000 e 9000 rpm).	44
Figura 4.21: Espectros de transmitância da solução de AuNP-MUA de 15 nm comerciais centrifugada a diferentes velocidades.	45
Figura 4.22: Comparação entre a centrifugação a 12651 rpm utilizando diferentes tipos de AuNP. ..	46
Figura 4.23: Comparação entre a centrifugação a 11000 rpm utilizando diferentes tipos de AuNP. ..	46
Figura 4.24: Comparação entre a centrifugação a 10000 rpm utilizando diferentes tipos de AuNP. ..	47
Figura 4.25: Comparação entre a centrifugação a 9000 rpm utilizando diferentes tipos de AuNP.	47
Figura 4.26: Efeito da etapa de lavagem no espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) ao longo do tempo.	48
Figura 4.27: Influência da quantidade de EDC 1 mM e de NHS 1 mM no espectro de transmitância das AuNPs de 30 nm comerciais (Cytodiagnosics) com o Ab Spike S1 (Genscript) imobilizado numa proporção de 1:60.	49
Figura 4.28: Influência da utilização de EDC e NHS recém preparados no espectro de transmitância das AuNPs ao longo do tempo.	51
Figura 4.29: Influência do solvente utilizado na preparação dos agentes de acoplamento na Imobilização do Anticorpo.	52

Figura 4.30: Influência do ERB no espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) após imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:120.....	53
Figura 4.31: Influência do Ab imobilizado no espectro de transmitância obtido.	54
Figura 4.32: Imagem TEM das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA e com o Ab Spike S1 (GenScript) imobilizado numa proporção de 1:120. Ampliação: 100kx..	55
Figura 4.33: Imagem TEM AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics)funcionalizadas com MUA e com o Ab RBD (R&D Systems) imobilizado numa proporção de 1:120. Ampliação: 100kx.....	55
Figura 4.34: Influência da proporção do Ab Spike S1 (GenScript) no espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).....	56
Figura 4.35: Efeito da proporção de Ab Spike S1 (GenScript) no espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório.	57
Figura 4.36: Espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório com o anticorpo Spike S1 em diferentes proporções.	58
Figura 4.37: Gel de agarose de diferentes rácios AuNP-MUA:Ab com AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório.	59
Figura 4.38: Espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) antes e após a imobilização do antes e após a imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) e do Ag S1 (GenScript) numa proporção de 1:120.....	61
Figura 4.39: Imagem TEM das AuNPs de 15 nm (Cytodiagnosics) após a imobilização do antes e após a imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) e do Ag S1 (GenScript) numa proporção de 1:120. Ampliação: 100kx.	61
Figura 4.40: Espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) antes e após a imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:60 e do Ag Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:120.....	62
Figura 4.41: Imagem TEM das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) antes e após a imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:60 e do Ag Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:120). Ampliação: 100 kx.	62
Figura 4.42: Espectro de transmitância das AuNPs 15 nm sintetizadas no laboratório antes e após a imobilização do Ab Spike (GenScript) numa proporção de 1:60 e Ag Spike B02 (iBET) numa proporção de 1:150.....	63
Figura 4.43: Espectro de transmitância das AuNPs 15 nm sintetizadas no laboratório antes e após a imobilização do Ab Spike (GenScript) numa proporção de 1:60 e Ag Spike CS+PP (iBET) numa proporção de 1:150.....	64
Figura 4.44: Espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório antes e após a imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:120 e do Ag Spike B02 (iBET) numa proporção de 1:120.....	65

Figura 4.45: Espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório antes e após a imobilização do Anticorpo Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:120 e do Ag RBD (iBET) numa proporção de 1:120.....	65
Figura 4.46: Espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório antes e após a imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:60 e do vírus SARS-CoV-2 numa proporção de 1:70.....	66
Figura 4.47: Espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório antes e após a imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:60 e do vírus SARS-CoV-2 numa proporção de 1:120.....	67
Figura 4.48: Espectro de transmitância da placa de ouro preparada por evaporação térmica após a etapa de funcionalização com MUA.....	69
Figura 4.49: Espectro de transmitância em diferentes zonas da placa de ouro preparada por eletrodeposição.....	69
Figura 4.50: Espectro de transmitância da placa de ouro ao longo do tempo.....	70
Figura A.1: Comparação dos espectros de absorvância das AuNPs comerciais (Cytodiagnosics) de diferentes tamanhos.....	84
Figura A.2: Influência na velocidade de centrifugação no espectro de absorvância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).	91
Figura A.3: Comparação entre as AuNPs de 15 nm sintetizadas centrifugadas a diferentes velocidades de centrifugação.	92

Abreviaturas

AuNPs – Nanopartículas de Ouro

PCR – Reação da Polimerase em Cadeia

RT-PCR – Transcriptase Reversa da Reação da Polimerase em Cadeia

FIND – Fundação para Diagnósticos Inovadores ou Foundation for Innovative New Diagnostics

TRAg – Testes Rápidos de Antígeno

OMS – Organização Mundial de Saúde

ARN – Ácido Ribonucleico

ssARN - Cadeia Simples de Ácido Ribonucleico

E – Proteína Envelope

N – Proteína Nucleocapsídeo

M – Membrana

S – Proteína Spike

ACE2 – Enzima Conversora de Angiotensina Humana II

NPS – Amostra recolhida com uma zaragatoa da região da Nasofaringe ou Nasopharyngeal Swab

OPS – Amostra recolhida com uma zaragatoa da região da Orofaringe ou Oropharyngeal Swab

DGS – Direção Geral de Saúde

ARN - Ácido desoxirribonucleico

cARN – ARN complementar

RNase – Ribonuclease

Orf1ab – Região Open Reading Frame 1ab

RdRP – Gene RNA dependente de RNA polimerase

RT-LAMP – Transcriptase reversa seguida de amplificação isotérmica mediada por loop

CRISPR – Amplificação isotérmica com a tecnologia CRISPR incorporada

H1N1 – Vírus influenza H1N1 ou vírus da gripe H1N1

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática ou Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ERB – Elemento de Reconhecimento Biológico

SPR – Ressonância do Plasmão de Superfície ou Surface Plasmon Resonance

LSPR – Ressonância do Plasmão de Superfície Localizada ou Localized Surface Plasmon Resonance

LDL – “Colesterol Mau” ou Low-density lipoprotein

HDL – “Colesterol Bom” ou High-density lipoprotein

Ab – Anticorpo

Ag – Antígeno

MPA – Ácido 3-mercaptopropiônico

MBA – Ácido 4-mercaptobenzóico

MUA – Ácido 11-mercaptoundecanóico

EDC – Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

NHS – N-hidroxisuccinimida

Tampão MES – Tampão Ácido 2-(n-morfolino)etanosulfônico

Tampão PBS – Tampão Fosfato Salino

SEM – Microscopia Eletrônica de Varrimento ou Scanning Electron Microscope

TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão ou Transmission Electron Microscopy

QUADAS-2 – Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies 2

1. Introdução

1.1. O vírus: SARS-CoV-2

No final de dezembro de 2019, a Organização Mundial de Saúde (OMS) foi alertada para uma pneumonia de causa desconhecida que rapidamente se espalhou pelo mundo. Em janeiro de 2020, o vírus que provocava esta doença começou a ser designado por SARS-CoV-2 (síndrome respiratória aguda grave 2) e a doença associada passou a ser designada por COVID-19.

O SARS-CoV-2 é um vírus de ácido ribonucleico (ARN) de cadeia simples de sentido positivo (ssARN), com um genoma com cerca de 30 kb de comprimento e com 100 nm de diâmetro (*Figura 1.1*). Uma vez que a cápsula viral do vírus se encontra dentro de uma bicamada lipídica, o genoma do vírus codifica diretamente as proteínas virais. Este vírus contém quatro proteínas: E (Envelope), N (Nucleocapsídeo), M (Membrana) e S (Spike) [1,2].

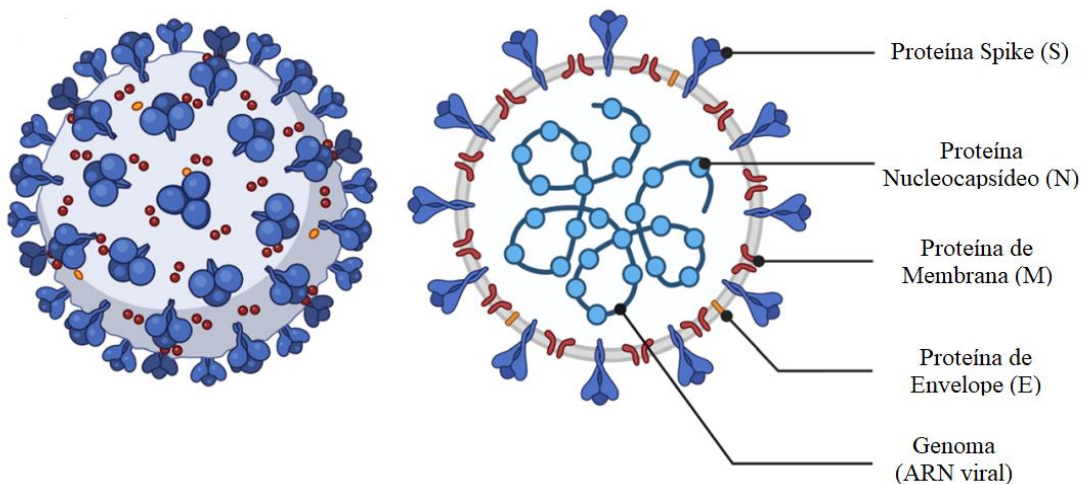


Figura 1.1: Representação esquemática do vírus SARS-CoV-2 e dos seus principais componentes. Adaptado de [3].

Tal como o SARS-CoV-1, o SARS-CoV-2 pertence à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, género *Betacoronavirus* e subgénero *Sarbecovirus* [3,4]. Os coronavírus (CoV) constituem um grupo predominante com 46 vírus conhecidos. No entanto, destes 46 vírus apenas 7 parecem infectar humanos (HCoVs), provocando sintomas leves a moderados. A maioria destes vírus provocam doenças relacionadas com as constipações comuns, como é o caso de garganta inflamada, febre, tosse, dores de cabeça ou secreção nasal. Mas existem outros vírus como o MERS-CoV, o SARS-CoV-1 e o SARS-CoV-2, que tendem a provocar sintomas mais severos que podem levar a pneumonias, falha de órgãos, sepsia e morte [4,5].

Apesar da origem do vírus ainda não ser totalmente conhecida, existem algumas hipóteses que têm vindo a ser estudadas um pouco por todo o mundo. A mais plausível, de acordo com a comunidade científica,

continua a ser a de que o vírus não foi criado em laboratório, sendo proveniente de morcegos, [6] pois estudos do genoma do SARS-CoV-2 concluíram que existe entre 88 e 96% de semelhança entre o SARS-CoV-2 e os coronavírus provenientes de morcegos (BatCoV), sugerindo que os morcegos sejam os hospedeiros originais deste vírus. [5,7] Curiosamente, apenas existe uma semelhança de 79% em relação ao SARS-CoV, e de 50% em relação ao MERS-CoV. [5]

De acordo com a literatura [1,3,5], os coronavírus têm um mecanismo que permite manter a taxa de mutações relativamente baixa quando comparado com outros vírus de RNA. No entanto, todos os vírus podem sofrer pequenas mutações ao longo do tempo que podem, ou não, alterar propriedades do vírus como a sua transmissibilidade, a sua severidade, a eficácia das vacinas e das terapêuticas, as ferramentas de diagnóstico, etc. Desde que este vírus foi descoberto, já foram detetadas várias mutações como é o caso das variantes *alpha*, *beta*, *delta*, *gamma*, *lambda*, *mu* e, mais recentemente, *ómicron*. Algumas mutações, são muito impactantes, como é o caso da D614G, no qual houve a conversão do ácido aspártico em glicina na posição 614, levando ao aumento da replicação e também da transmissibilidade do vírus. [5]

1.2. A doença: COVID-19

1.2.1. Transmissibilidade

O SARS-CoV-2 é capaz de provocar uma doença infecciosa designada por COVID-19. Apesar do número básico de reprodução (R_0) deste vírus ser significativamente elevado quando comparado com outros vírus respiratórios e, por conseguinte, um índice de transmissibilidade superior, a sua taxa de letalidade (proporção de mortes em relação aos casos diagnosticados) é muito mais baixa. [5] Isto significa que o principal problema do SARS-CoV-2 não é a sua elevada gravidade da doença, mas sim a fácil e rápida transmissão pela população.

Desde que a pandemia foi declarada, vários estudos têm sido feitos para compreender melhor a doença e a sua transmissibilidade. As proteínas Spike do SARS-CoV-1 e do SARS-CoV-2 são muito idênticas do ponto de vista estrutural, tendo ambas uma elevada afinidade para com a enzima conversora de angiotensina humana II (ACE2), expressa nas células do trato respiratório. [4,8] No entanto, o SARS-CoV-2 parece reconhecer de forma mais eficaz a enzima humana ACE2, elevando a habilidade de transmissão de pessoa para pessoa. [8] Neste momento, sabe-se que a enzima ACE2 é uma das portas de entrada do vírus nas células do corpo humano, permitindo a ligação da proteína Spike. [9]

Desde 2020 foram feitos vários estudos que provam que os pacientes assintomáticos podem transmitir a doença durante semanas, se não forem diagnosticados numa fase inicial da infeção. É de notar que a transmissão pode ocorrer por parte de pessoas, com ou sem sintomas da doença, através de gotículas de

secreções respiratórias (como espirros ou tosse) ou contacto com superfícies contaminadas (metal, plástico, papel, etc.). [9,10]

1.2.2. Sintomas

Os pacientes com covid-19 podem ser divididos em três fases, tendo em conta a gravidade e progressividade da doença: (i) assintomática, (ii) sintomas ligeiros e (iii) sintomas graves. Estima-se que entre 15 e 30% das pessoas infetadas pelo novo coronavírus não têm quaisquer sintomas, mas se a infeção progredir para a fase 2, podem aparecer sintomas leves a moderados como febre, tosse seca, dificuldade respiratória ligeira, perda de olfato e/ou paladar, dores musculares, problemas gastrointestinais, cansaço, entre outras [5,11–14]. Alguns estudos demonstram que cerca de 50% das infeções são provenientes de pacientes sem qualquer sintoma e que a inexistência de sintomas é mais comum em pacientes mais novos, apesar de existirem casos de pacientes mais velhos sem sintomas. [15–17] Contudo, a doença pode progredir para a fase 3 e, neste caso, os sintomas tendem a ser graves, tais como pneumonias, dor no peito, tosse produtiva, ou falência de órgãos múltiplos [4,5,13,14]. Apenas é necessário tratamento quando o paciente tem sintomas, sejam leves, moderados ou severos (*Tabela 1.1*).

De acordo com a OMS, cerca de 80% dos infetados são casos leves ou assintomáticos que recuperam sem necessitar de tratamento hospitalar, 15% são casos severos que necessitam de tratamento hospitalar (oxigénio na maioria dos casos) e 5% são casos críticos que necessitam de cuidados intensivos (ventilação na maioria dos casos). Contudo, os estudos realizados posteriormente mostraram que existem uma maior percentagem de doentes assintomáticos e que a maioria deles não chega a desenvolver quaisquer sintomas [18].

Tabela 1.1: Tratamento típico em cada fase da COVID-19 consoante o tipo de sintomas [6,9,11].

Fase	Casos (%)	Tipo de Sintomas	Tratamento
1	80	Assintomáticos ou sintomas leves	Não é necessária terapia específica
2	15	Tosse seca, febre, falta de ar, dores de cabeça	Alívio/tratamento de sintomas
3	5	Pneumonia, dor no peito, tosse produtiva, falha de órgãos	Redução da inflamação, ventilação mecânica, hemodiálise

A doença grave está normalmente associada à elevada produção de anticorpos neutralizadores que têm um papel importante no combate à doença. Desde início que se sabia que a COVID-19 tendia a ser mais gravosa em pessoas acima dos 65 anos, ou com comorbidades tais como doenças cardíacas, doenças pulmonares, doenças imunodeficientes, entre outras. Mas, ao longo dos últimos meses, concluiu-se que o género tem também um papel importante, pois os homens parecem ter uma maior predisposição de ter

sintomas mais graves. Existem várias hipóteses para este facto, como este género ter uma maior tendência para o consumo de tabaco, o que pode facilmente levar a possíveis problemas cardiorrespiratórios. [5] Para além dos efeitos da COVID-19 se prolongarem no tempo, existem ainda doentes que continuam a ter sintomas meses após testarem negativo. É também importante referir que é possível detetar anomalias em exames radiológicos de doentes assintomáticos. [15,19] A existência de sintomas adversos e de longo termo em pacientes assintomáticos e sintomáticos, aumenta a necessidade de controlar a propagação da doença.

1.2.3. Diagnóstico

O diagnóstico da COVID-19 tem um papel fundamental no controlo da pandemia, permitindo detetar e isolar rapidamente os casos positivos. Contudo, a testagem pode ser mais eficaz se for realizada em larga escala, abrangendo pacientes sintomáticos e assintomáticos para que esta patologia possa ser detetada rapidamente e as cadeias de transmissão possam ser quebradas. Apesar da gravidade da COVID-19 estar a diminuir devido à implementação da vacinação e às mutações sofridas pelo vírus, continua a ser importante uma testagem rápida e eficaz da população que dificulte a infeção dos pacientes mais suscetíveis, como os idosos ou pacientes com outras patologias.

Existem dois parâmetros muito importantes quando falamos de diagnóstico: as amostras fisiológicas que são utilizadas para a deteção e os métodos de deteção que são utilizados.

1.2.3.1. Amostras Fisiológicas

A presença do SARS-CoV-2 pode ser detetada em diversas amostras fisiológicas, desde a nasofaringe, orofaringe, expetoração, saliva, lágrimas, fezes, urina, sangue, fluídos vaginais ou esperma, entre outras (*Tabela 1.2*). Neste momento, a amostra padrão para a deteção da COVID-19 é obtida com uma zaragatoa na região da nasofaringe (NPS) e/ou orofaringe (OPS). Em Portugal, a amostra padrão consiste numa mistura NPS/OPS, por ter tendencialmente uma maior carga viral. No entanto, este procedimento requer técnicos qualificados, e cuidados específicos quando se trabalha com pacientes mais novos ou com problemas nasais. [3,20–22]

A saliva tem sido muito estudada como alternativa às amostras da NPS/OPS por diminuir o desconforto na obtenção da amostra e aumentar a capacidade de testagem. De facto, a saliva tem demonstrado sensibilidades e especificidades relativamente elevadas em testes PCR quando comparada com a amostra padrão [23–25], apesar da necessidade de um maior número de ciclos de PCR. Por outro lado, a sensibilidade e especificidade da saliva em TRAg tende a ser mais baixa [26].

Tabela 1.2: Vantagens e desvantagens das amostras mais utilizadas para detetar o SARS-CoV-2.

Amostra	Vantagens	Desvantagens
NPS	É a amostra padrão para a deteção de vírus respiratórios como o SARS-CoV-2	Necessita de pessoal especializado, o teste pode ser doloroso, difícil de executar em pessoas mais vulneráveis (crianças, idosos) e não deve ser realizado em pessoas com problemas com problemas nasais ou cirurgias faciais recentes
OPS	Fácil de recolher a amostra	É menos sensível do que o NPS
Nasal*	Pouco invasivo	Pouco sensível se for mal-executada, difícil de executar em pessoas mais vulneráveis (crianças, idosos) e não deve ser realizado em pessoas com problemas com problemas nasais ou cirurgias faciais recentes
Saliva	Não é invasivo, não necessita de pessoal especializado para recolher a amostra e permite obter uma grande quantidade de amostra sem aumentar o risco dos profissionais de saúde	Pouco sensível se for mal-executada (contaminantes como restos de alimentos, pasta de dentes, etc.) e pode levar a falsos positivos
Expetoração	Fácil de recolher se o paciente tiver tosse, não necessita de pessoal especializado para a recolha da amostra, possibilidade de obter uma elevada quantidade de amostra, não é invasivo	Nem todos os pacientes produzem expetoração, o fluido é muito viscoso o que implica a fluidificação do mesmo

* O teste nasal é realizado na zona das narinas (idêntico ao que é feito nos autotestes por pessoas inexperientes).

De acordo com a norma de junho de 2021 da DGS (Direção Geral de Saúde), as amostras de saliva podem ser utilizadas para a deteção da infeção pelo coronavírus em crianças e em situações de rastreio em contexto comunitário e/ou ocupacional [27]. Vários laboratórios nacionais utilizam a saliva como alternativa, como é o caso do Unilabs ou da Synlab. Em todo o caso, as amostras de NPS/OPS continuam a ser as amostras preferidas para a deteção do SARS-CoV-2, mesmo em crianças mais pequenas. Mas, enquanto amostra alternativa para detetar vírus respiratórios, a saliva continua a ser explorada através do melhoramento da qualidade da amostra ou da utilização de diferentes genes.

1.2.3.2. Métodos de deteção

O diagnóstico da COVID-19 utiliza métodos diretos que permitem detetar a presença de material de origem viral (RNA, antígeno ou proteína viral de superfície), ou métodos indiretos (testes imunológicos) que detetam os anticorpos produzidos em resposta à infeção provocada pela COVID-19. Como se pode ver na *Figura 1.2*, a presença do vírus pode ser detetada por PCR poucos dias após o início da mesma ao passo que os anticorpos apenas podem ser detetados posteriormente pois começam a ser produzidos alguns dias após a infeção.

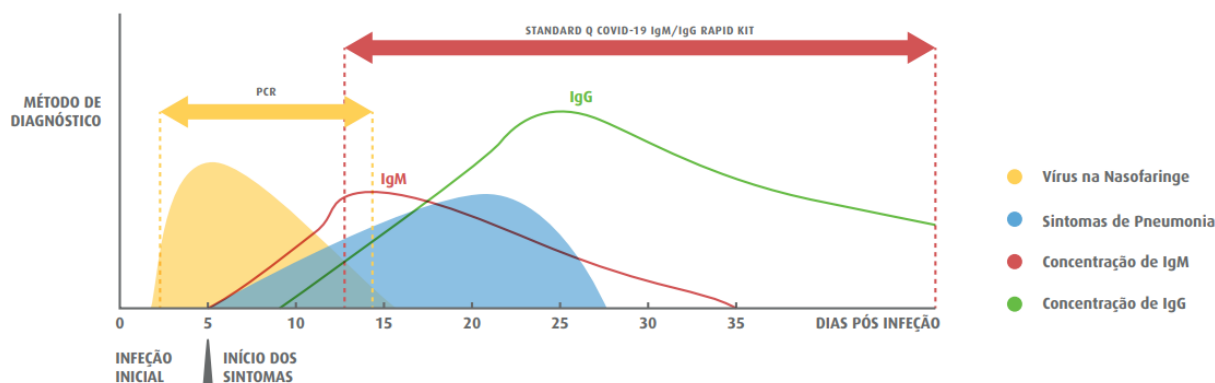


Figura 1.2: Esquema da variação dos anticorpos ao longo do tempo.

(Fonte: Germano de Sousa)

Tanto os métodos diretos como os métodos indiretos são úteis. Contudo, os métodos diretos têm maior relevância quando se pretende detetar a presença de uma infeção, enquanto os métodos indiretos têm uma maior utilidade na avaliação da imunidade dos pacientes através da deteção dos anticorpos produzidos.

1.2.3.2.1. Método indiretos

Os testes serológicos ou imunológicos dividem-se em ensaios de imunoabsorção enzimática (testes ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e testes de diagnóstico rápido. Estes testes permitem detetar os anticorpos produzidos em resposta à infeção provocada pela COVID-19 ou após a toma das vacinas, ou seja, permite saber o indivíduo desenvolveu uma resposta imunitária ao vírus.

Os testes serológicos são realizados através de uma amostra de sangue que permite detetar a presença dos anticorpos (IgM, IgA e IgG). Os IgM são os primeiros anticorpos a serem produzidos pelo nosso sistema imunitário e indicam a presença de uma infeção numa fase inicial. No entanto, quando o corpo começa a lutar contra a infeção, os anticorpos IgG começam a ser produzidos e podem ser detetados juntamente com os IgM (*Figura 1.2*). Após a recuperação total do indivíduo, os IgM desaparecem totalmente, mas os IgA e os IgG podem ser detetados durante algum tempo (processo de seroconversão). Os resultados obtidos podem ser qualitativos, onde é detetada a presença de anticorpos IgG, ou quantitativos e, neste caso, é possível medir a imunidade do paciente. [28,29]

Existem vários testes serológicos no mercado que permitem obter resultados rápidos e com elevada sensibilidade e especificidade. Contudo, a maioria destes testes tem uma sensibilidade inferior e uma especificidade superior aos testes rápidos de antígeno (*Tabela 1.3*) realizados de forma independente pela *Foundation for Innovative New Diagnostics* (FIND).

Tabela 1.3: Exemplos de testes serológicos avaliados pela FIND.

Nome do Teste (Fabricante)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
NowCheck COVID-19 IgM/IgG (Bionote)	73.0	99.0
BIOSYNEX COVID-19 BSS (IgG/IgM) (Biosynex, SA)	86.4	100
2019 nCoV IgG/IgM Rapid Test Cassette (Hangzhou AllTest Biotech Co., Ltd.)	95.9	96.0
BIOCREDIT COVID-19 IgG+IgM Duo (RapiGEN Inc.)	96.5	94.0
Standard Q COVID-19 IgM/IgG Combo Test (SD BIOSENSOR, INC.)	87.2	99.6

1.2.3.2.2. Métodos diretos

Os métodos diretos incluem os testes moleculares que detetam a presença do material genético do vírus e os testes rápidos de antigénio (TRAg) que detetam a presença das proteínas virais, i.e., do antigénio.

O teste molecular mais utilizado para detetar a presença de material genético viral é o método da Transcriptase Reversa da Reação da Polimerase em Cadeia (RT-PCR) que já é utilizado desde o século XX. Devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, este teste é considerado pela OMS, o teste de referência para a deteção do SARS-CoV-2 em amostras do trato respiratório, como as nasofaríngeas (NPS) e as orofaríngeas (OPS). Este método baseia-se numa técnica laboratorial de biologia molecular que consiste na amplificação de uma sequência específica do material genético do alvo em estudo [5].

O rRT-PCR combina a metodologia de um ensaio PCR convencional com uma metodologia que permite amplificar, detetar e quantificar a amostra em tempo real. O primeiro passo para a utilização deste método (*Figura 1.3*) consiste na obtenção da amostra com uma zaragatoa; de seguida, o ARN viral tem de ser extraído e convertido em cADN (ADN complementar) por transcriptase reversa. Por fim, a amostra pode ser amplificada por PCR com recurso a uma sonda de ADN. O SARS-CoV-2 pode ser detetado em tempo real se a amostra tiver uma sonda marcada com um gene repórter fluorescente [30]; a intensidade da fluorescência permite fazer uma análise quantitativa [1].

A técnica de RT-PCR necessita de um termociclador que consiste num equipamento com a capacidade de aquecer e arrefecer as amostras ao longo de vários ciclos, uma sonda de ADN específica ou uma sonda Taqman, marcados com um gene repórter fluorescente (como o SYBR Green). Os marcadores têm de ser específicos, sendo necessário um marcador humano que serve de controlo (RNase P, RP) e marcadores específicos do vírus SARS-CoV-2, que se ligam à amostra tratada de indivíduos infetados. As cadeias alvo com uma sequência conhecida usadas para detetar a presença do vírus, são as seguintes:[1]

- Proteínas N, E e S;
- Região Orf1ab (*Open Reading frame 1ab*);
- Gene RdRP (RNA dependent RNA Polymerase).

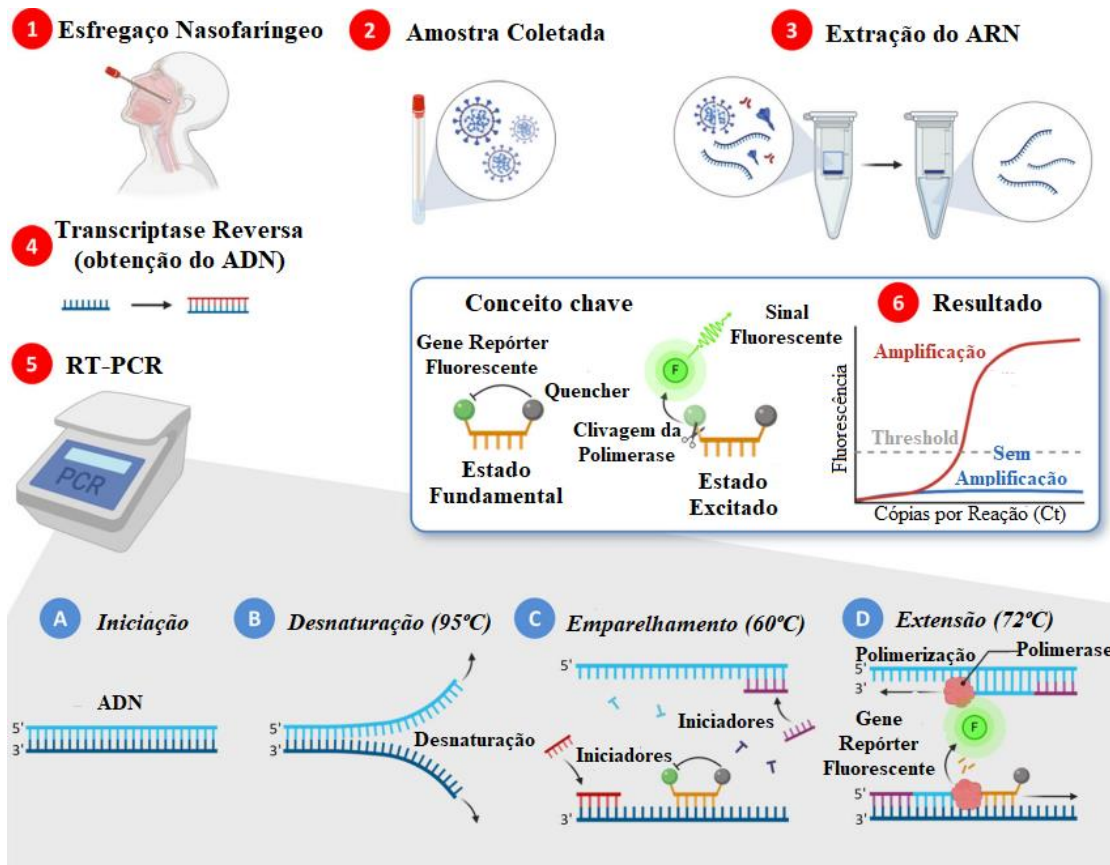


Figura 1.3: Procedimento usado para detetar o SARS-CoV-2 através da técnica de RT-PCR. Adaptado de [30].

As proteínas N, E e S podem ser utilizadas como cadeia alvo, apesar de existirem algumas diferenças em termos de sensibilidade e especificidade entre elas. Por exemplo, a proteína E é altamente conservada e tende a necessitar de menos ciclos de PCR, quando comparada com a proteína N, a qual pode levar a reações cruzadas com outros coronavírus. Por outro lado, a proteína S e o gene RdRP permitem que seja feita uma diferenciação entre o SARS-CoV-2 e outros vírus, pois existem diferenças significativas nestes genes [1]. O gene utilizado para a deteção do SARS-CoV-2 tem também influência na sensibilidade e especificidade do método, tal como mostram os estudos apresentados na FIND (Tabela 1.4).

Tabela 1.4: Exemplos de Kits moleculares avaliados de forma independente pela FIND.

Teste	Gene alvo	Seletividade	Especificidade
RealStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0	E	92	100
	S	92	100
Atila iAMP COVID-19 detection (isothermal detection)	ORF1ab	100	99
	N	100	100
Wantai SARS-CoV-2 RT-PCR Kit	ORF1ab	100	100
	N	100	100
Standard M nCoV Real-Time Detection Kit	E	100	97
	ORF1ab	100	99
TaqPath TM COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit	ORF1ab, S and N	100	100

Apesar do RT-PCR ser o método padrão, no último ano e meio, apareceram no mercado alternativas (*Tabela 1.5*) ao método RT-PCR que permitem a detecção da patologia de forma mais rápida e barata como, por exemplo:

- O RT-LAMP (Transcriptase reversa seguida de amplificação isotérmica mediada por *loop*) que utiliza três pares de iniciadores (dois internos, dois externos e dois de loop) para amplificar a cadeia de ARN;
- O CRISPR (Amplificação isotérmica com a tecnologia CRISPR incorporada) consiste na detecção de proteínas CRISPR microbianas ou associadas (CAS) como é o caso das proteínas Cas12 ou Cas13 que podem ser detetadas através de uma cadeia alvo específica designada por CRISPR ANR (crANR). Estes métodos são muitas vezes utilizados em testes que permitam o diagnóstico rápido através da detecção da presença de uma cadeia alvo após a sua ligação a uma sonda marcada com um composto que altere a tonalidade da amostra como um composto fluorescente.

Tabela 1.5: Vantagens e desvantagens dos testes moleculares mais utilizados.

Teste Molecular	Vantagens	Desvantagens	Referências
RT-PCR	Baixo risco de contaminação, elevada precisão e confiabilidade, detecção direta, maior eficiência por ter um menor número de etapas, processo simples, fácil de executar, automatizado	Demorado, necessita de profissionais treinados, elevado número de falsos negativos, problemas na extração e tratamento da amostra, a carga viral não é a mesma em todos os infetados, utilização de KITS com limites de detecção diferentes, requer temperatura controlada	[1]
RT-LAMP	Deteção rápida, elevada especificidade, requer temperatura constante mais baixa; o resultado pode ser visualizado sem recurso a aparelhos, equipamento e técnicas simples, aplicável a larga escala, mais barato, não necessita de técnicos altamente especializados	Maior probabilidade de contaminação cruzada, existência de falsos negativos, sensibilidade mais baixas	[1,31–33]
CRISPR	Deteção rápida, elevada especificidade, temperatura mais baixa, custos baixos, resultados coincidentes com o RT-PCR, não requer equipamento especializado para a obtenção do resultado, permite a detecção do vírus em amostras de saliva	Seletividade mais baixa, elevado limite de detecção, não permite quantificar, requer dois passos, maior probabilidade de contaminação da amostra, não permite a detecção quando usada isoladamente	[1,34–38]

Os Testes Rápidos de Antígeno (TRAg) chegaram mais recentemente ao mercado, mas têm sido muito utilizados, por serem mais baratos que os testes PCR, serem fáceis de usar e darem um resultado mais

rápido. [39] Os TRAg permitem detetar a presença de proteínas virais (i.e., antígenos) em diferentes tipos de amostras, mas são, normalmente, menos sensíveis do que o teste PCR, o que resulta num elevado número de falsos negativos e à necessidade da confirmação dos casos negativos com um teste molecular. Contudo, estes testes são uma mais-valia, pois permitem diagnosticar casos positivos em menos de 15 minutos. Ao contrário dos testes PCR, os TRAg podem ser usados para uma testagem rápida e em grande escala, quando existe uma maior circulação do vírus na comunidade. De um modo generalizado, os testes rápidos de antígeno são simples de utilizar, rápidos, custo baixo, elevada seletividade, elevada especificidade e reprodutíveis [2].

Vários testes rápidos de antígeno têm chegado ao mercado, a maioria deles com sensibilidades e especificidades elevadas. Para tal, têm de cumprir os procedimentos regulamentares para testes de diagnóstico, tal como exigido pela lei.

Tabela 1.6: Exemplos de TRAg autorizados em Portugal e respetivas seletividades e especificidades.

Nome do Teste (Fabricante)	Amostra	Tempo de espera (minutos)	Seletividade (%)	Especificidade (%)
Panbio COVID-19 Ag Rapid Test Device (Abbott Rapid Diagnostics Jena GmbH)	NPS ou Nasal	15-20	NPS: 93.3 Nasal: 98.1	NPS: 99.4 Nasal: 99.8
STANDARD Q COVID-19 Ag (SD Biosensor Inc.)	NPS ou Nasal	15-20	NPS: 96.5 Nasal: 90.6	NPS: 99.7 Nasal: 98.6
Teste Rápido Coronavirus Ag (N) (PANTEST, S.A.)	NPS	10-20	95.0	97.8
SARS-CoV-2 Antigen Test Kit (LFIA) (Jiangsu Medomics Medical Technology Co., Ltd.)	NPS/OPS	15-20	97.7	99.5
Covid-19 Antigen Rapid Test (latex) (Joinstar Biomedical Technology Co., Ltd.)	Expetoração	10-15	95	100
SARS-CoV-2 Antigen Test Kit (Colloidal Gold) (Genrui Biotech Inc.)	Nasal	15-20	91.2	99.0
COVID-19 Ag Respi-Strip (CORIS BIOCONCEPT)	NPS	15-30	91.2	99.4

Segundo alguns investigadores, é importante que existam testes múltiplos que combinem os testes de antígeno com os testes imunológicos pois, deste modo, seria possível detetar em simultâneo a infeção pelo SARS-CoV-2 e a presença de anticorpos contra o vírus. Alguns investigadores consideram também importante ter testes que permitam detetar, em simultâneo, diferentes doenças respiratórias, como o SARS-CoV, MERS-CoV e H1N1. Isto é particularmente importante porque a COVID-19 tem muitos sintomas que podem ser facilmente encontrados noutras patologias, como a gripe ou pneumonia, e é importante detetar e tratar rapidamente esses casos, mesmo que não sejam COVID-19. Com efeito, em 2021 apareceram no mercado alguns testes que permitem a testagem de diferentes vírus em simultâneo,

como é o caso do “COVID-19 and Influenza A+B Antigen Combo Rapid Test”, da Hangzhou AllTest Biotech Co. Ltd., que permite detetar a COVID-19, o Influenza A e o Influenza B, em simultâneo. No entanto, o número de testes deste género aprovados pelas autoridades portuguesas é ainda muito reduzido. Em Portugal estão autorizados TRAg com sensibilidade igual ou superior a 90%, e especificidade igual ou superior a 97% (*Tabela 1.6*) [40].

Os TRAg usados em Portugal utilizam, na sua maioria, amostras NPS ou nasais. Contudo, existem também alguns testes que utilizam amostras OPS ou de expetoração. Até ao momento, não há nenhum TRAg autorizado pelas autoridades portuguesas que utilize a saliva como amostra para a deteção do SARS-CoV-2, apesar da saliva continuar a ser alvo de muitos estudos, um pouco por todo o mundo. A seção seguinte fala sobre as diferentes amostras fisiológicas que permitem a deteção do SARS-CoV-2.

Os biossensores podem ser utilizados como meio de diagnóstico de diferentes patologias como é o caso do SARS-CoV-2 através da deteção de ácidos nucleicos, anticorpos ou antigénios. A seção seguinte fala dos biossensores e das suas aplicações em diagnóstico.

1.3. Biossensores

Os biossensores são dispositivos analíticos que permitem detetar a presença de um analito através da interação específica com um elemento de reconhecimento biológico (ERB). Idealmente, os biossensores devem cumprir diversos requisitos como a elevada sensibilidade, seletividade, exatidão e precisão. Além disso, existem outros parâmetros igualmente importantes tais como baixos limites de deteção, a rapidez de diagnóstico, a obtenção de resultados em tempo real, um elevado tempo de vida que permita a sua reutilização, entre outros. [41]

Estes dispositivos são constituídos por (i) um elemento de reconhecimento biológico (ERB) que reconhece e interage com o analito, (ii) um transdutor que irá converter o sinal resultante da interação num sinal mensurável e quantificável, e (iii) um sistema elétrico que amplifica o sinal. [41] O transdutor pode ser eletroquímico (amperométrico, potenciométrico ou condutimétrico), calorimétrico, piezoelétrico, ótico e é responsável pela sensibilidade e o limite de deteção (LoD) do dispositivo. O ERB pode ser constituído por células, tecidos, enzimas, anticorpos, antigénios ou ácidos nucleicos (como ADN) e é responsável pela especificidade e seletividade do biossensor.

Neste trabalho, pretende-se desenvolver um biossensor de antigénio baseado na interação específica anticorpo/antigénio (Ab/Ag). O ponto central deste biossensor consiste na imobilização do ERB à superfície do transdutor, permitindo a formação de um imunocomplexo entre o ERB e amostra que contém o analito que se pretende detetar. A deteção é direta quando é utilizado o ERB e um analito, e é indireta quando na deteção é utilizado um marcador (tipicamente um anticorpo marcado ou um anticorpo secundário). A deteção indireta tem algumas desvantagens, como um aumento de custos associados

devido ao número adicional de etapas, e à utilização de outros reagentes que dificultam a possibilidade de reutilização do ERB após a quebra da ligação específica entre o ERB e o analito de interesse.

Os transdutores devem ter em conta o tipo de reconhecimento biológico e o resultado da interação entre o ERB e o analito de interesse. Os sinais obtidos podem ser bastante diversificados desde alterações na massa, variações na densidade ótica, absorção/emissão de luz, oxidação/redução, entre outros. Existem diferentes tipos de transdutores, contudo, os transdutores óticos são os mais relevantes para este trabalho. Estes transdutores detetam alterações nos parâmetros óticos de um feixe de radiação que atravessa a biocamada como é o caso da absorvância, o índice de refração, a intensidade da luz absorvida/emitida, a polarização, entre outros. [41]. Se o biossensor ótico tiver como ERB um anticorpo ou antigénio, o sinal medido pode depender essencialmente da alteração da massa molecular à superfície do transdutor através da ligação Ab/Ag ou Ag/Ab.

As nanopartículas de ouro (AuNPs) têm um papel importante no desenvolvimento de biossensores devido à sua elevada sensibilidade e com uma elevada área superficial que proporciona um ambiente propício para a imobilização de biomoléculas como anticorpos ou antigénios, sem que a atividade biológica destes seja afetada. [42] Neste trabalho, pretende-se desenvolver um biossensor para a deteção do SARS-CoV-2 que combine a elevada sensibilidade das AuNPs com a elevada especificidade dos anticorpos monoclonais. Como tal, é importante perceber as características destes materiais e a sua importância na obtenção de bionanoconjugados com elevada biocompatibilidade.

1.3.1. Nanopartículas de Ouro

A nanotecnologia é uma área em contínua ascensão que inclui a síntese, caracterização estrutural e morfológica e aplicabilidade de nanoestruturas entre 1 e 100 nm. Alguns nanomateriais têm propriedades físicas e químicas muito distintas dos macromateriais, que permitem a aplicabilidade dos primeiros em diferentes áreas tais como a química, a física, a biologia, a engenharia ou até a medicina. [43] A aplicação da nanotecnologia na medicina tem permitido avanços nesta área com a possibilidade de detetar e diagnosticar patologias como o cancro, através do uso de nanomateriais em imagiologia ou deteção de biomarcadores, a entrega de fármacos (permite que o mesmo chegue ao local do corpo humano onde é necessário), prevenção e controlo de doenças através da pesquisa em nanotecnologia e desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico e controlo de patologias como é o caso dos biossensores [44–48].

As nanopartículas de ouro têm propriedades óticas que as tornam especiais, nomeadamente, o facto de exibirem um fenómeno designado por ressonância do plasmão de superfície (SPR – do inglês *Surface Plasmon Resonance*). O SPR é um fenómeno que ocorre quando feixes de luz polarizada através do vidro do prisma tocam na interface de um filme metálico com diferentes índices de refração (*Figura*

1.4). Este fenômeno permite exibir e detectar oscilações de elétrons livres no filme metálico superficial (plasmão de superfície), no qual a luz é focada [49,50].

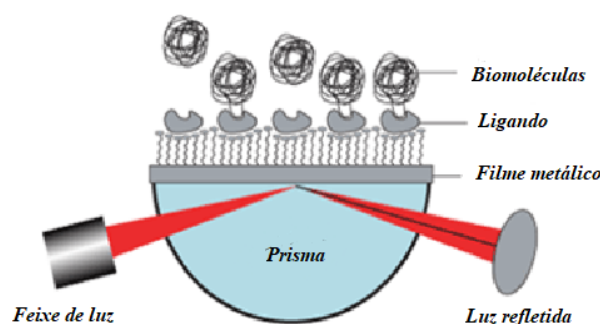
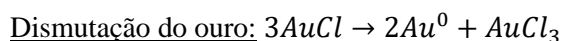
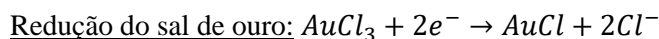
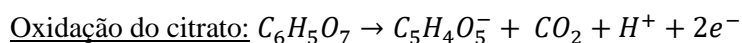


Figura 1.4: Esquema do funcionamento do fenômeno SPR. A luz incide sobre a superfície do metal e o feixe de luz refletido é analisado. Adaptada de Biosensingusa.

O fenômeno de ressonância do plasmão de superfície localizado (LSPR – do inglês *Localized Surface Plasmon Resonance*) consiste na interação da componente elétrica e da componente magnética da luz com os elétrons livres que se encontram na superfície das nanopartículas. Como consequência desta interação, os elétrons vibram, originando um pico máximo de absorção característico designado por LSPR. A posição da banda do LSPR pode ser desviada para outros comprimentos de onda através da ligação de outras moléculas como é o caso dos anticorpos ou antigénios [51,52].

As AuNPs podem ser sintetizadas pelo método de Turkevich [53], o qual foi posteriormente otimizado por Kimling [54]. Este método utiliza o citrato de sódio como agente redutor do sal de ouro ($Au^{3+} \rightarrow Au^0$) e, sendo que o citrato serve ainda para vai revestir as nanopartículas formadas, protegendo-as e estabilizando-as, assim prevenindo a agregação devido à carga negativa superficial. O primeiro passo consiste no aquecimento da água até ao ponto de ebulição e, de seguida, adiciona-se o citrato de sódio. Após a oxidação do citrato de sódio, adiciona-se o ácido cloroáurico ($HAuCl_4$) para que a reação de redução do sal de ouro pelo citrato de sódio ocorra tal como indicado nas equações químicas seguintes:



O método de Turkevich permite a obtenção de AuNPs de diferentes tamanhos através de pequenas variações no rácio entre o precursor ($HAuCl_4$) e o redutor de ouro (citrato de sódio), na temperatura ou no tempo de síntese. Para além de revestir o ouro, conferindo-lhe uma camada de moléculas carregadas à superfície, o citrato permite ainda controlar o tamanho das nanopartículas e o seu formato geométrico, de modo a obtermos nanopartículas de ouro do tamanho pretendido.

As nanopartículas de ouro esféricas têm uma zona plasmônica entre os 515 e os 572 nm, consoante o tamanho da nanopartícula. Quanto maior for o tamanho da nanopartícula, maior o comprimento de onda a que ocorre o máximo de absorvância, sendo isto válido tanto para nanopartículas isoladas de maior dimensão, agregado de nanopartículas ou até após ligação de biomoléculas. Uma das propriedades mais exploradas consiste no desvio da banda plasmônica que indica o aumento do tamanho da nanopartícula. Contudo, se as AuNPs se encontrarem agregadas (*Figura 1.5*), a tonalidade da solução muda para um tom azul-arroxeadado, e o máximo de absorvância passa para um comprimento de onda próximos de 600 nm. Na *Tabela 1.7* encontram-se alguns exemplos de biossensores óticos que se baseiam no fenómeno LSPR para a deteção de diferentes analitos de interesse.

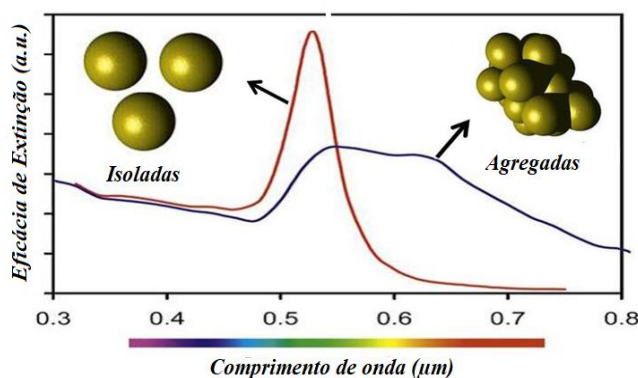


Figura 1.5: Espectro de Absorvância das AuNPs monodispersas e agregadas. Adaptado de (54).

Tabela 1.7: Testes de diagnóstico rápido baseados em tradutores óticos.

Deteção	Nanopartícula	ERB	Vantagens	Desvantagens	Referências
Caseína do leite	AuNPs	Anticorpo	Boa reprodutibilidade, elevada precisão, baixo custo, rápido e simples.	Possuir vários passos, necessita de pessoal especializado e equipamento externo.	[55]
Colesterol (LDL e HDL)	AuNPs	Anticorpo	Rápido e económico.	Necessita de pessoal especializado e equipamento externo.	[56]
Melanina	AuNPs de 20 nm	ρ -NA (ρ -nitroanilina)	Elevada sensibilidade, deteção rápida, baixo custo	Possuir vários passos, necessita de pessoal especializado e equipamento externo.	[57]
Biomarcadores inflamatórios	AuNPs	Anticorpo	Deteção contínua e dinâmica que permite a monitorização, diagnóstico e prognóstico	Sensibilidade e uniformidade devem ser melhoradas assim como diminuir o tempo necessário para a deteção.	[58]

1.3.2. Bionanoconjugados

Os bionanoconjugados consistem na conjugação de biomoléculas na superfície das nanopartículas levando à obtenção de materiais complexos com elevada sensibilidade e estabilidade que permitem detetar o analito de interesse. Existem vários fatores que influenciam a ligação das proteínas à superfície das nanopartículas, como a carga à sua superfície, a hidrofobicidade, o tamanho, a morfologia e a forma. Estes fatores influenciam também a velocidade e a capacidade de cobrir a superfície das nanopartículas com as biomoléculas, a cinética, o equilíbrio e a quantidade de proteína ligada.

O desenvolvimento de biossensores baseados em bionanoconjugados inclui passos preliminares que permitem melhorar a estabilização, reatividade e biocompatibilidade das AuNPs e do ERB. Neste trabalho, pretende-se desenvolver um biossensor para a deteção do SARS-CoV-2 e, tal como indica o esquema apresentado na *Figura 1.6*, divide-se em três passos distintos: (A) funcionalização das AuNPs com um composto tiol e adição dos agentes de acoplamento, (B) imobilização do Ab específico (ERB) e (C) ligação ao Ag (ou do vírus).

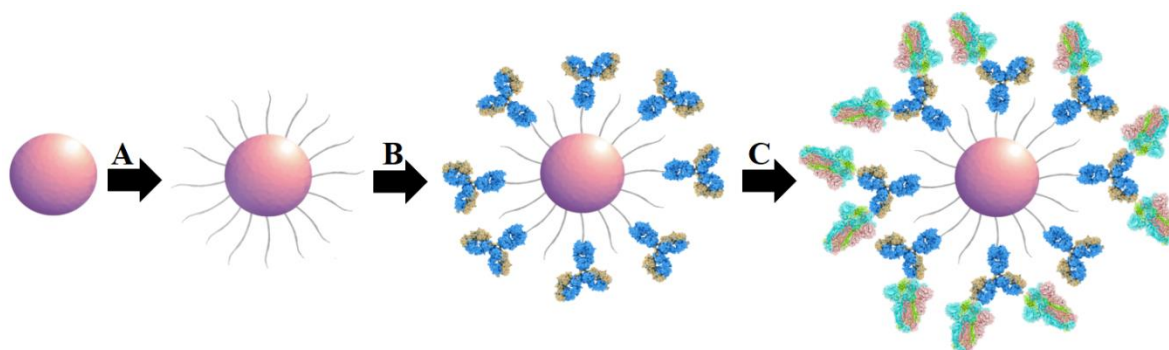


Figura 1.6: Etapas para o desenvolvimento do biossensor para detetar o SARS-CoV-2.

O primeiro passo consiste na imobilização de um tiol na superfície das AuNPs como o MPA (Ácido 3-mercaptopropiónico), o MBA (Ácido 4-mercaptobenzóico) ou o MUA (Ácido 11-mercaptoundecanóico) (*Tabela 1.8*). Estes compostos são muito utilizados para a funcionalização por terem uma elevada afinidade para superfícies metálicas, como é o caso do ouro.

Tabela 1.8: Estrutura dos principais tióis utilizados para modificação de nanopartículas.

Tiol	MPA	MBA	MUA
Estrutura	<chem>SCCC(=O)O</chem>	<chem>SC1=CC=C(C=C1)C(=O)O</chem>	<chem>SCCCCCCCCCCCC(=O)O</chem>

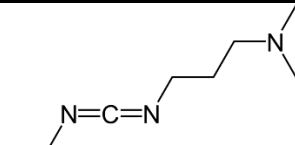
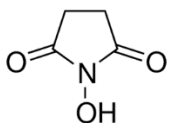
Neste caso, o átomo de enxofre liga-se ao átomo de ouro através de uma ligação covalente, aumentando a estabilidade das AuNPs e facilitando a ligação de outros compostos à *posteriori*. Esta funcionalização

tem várias vantagens, como uma melhoria na estabilidade da biocamada, apesar de elevar o custo e haver a possibilidade de alterações conformacionais e/ou de orientação do ERB. [59]

A etapa seguinte consiste na ativação do grupo carboxílico do tiol, promovendo a ligação covalente das biomoléculas às AuNPs, previamente funcionalizadas, sem que ocorram alterações na estrutura. Os ligandos mais utilizados para a preparação de AuNPs são os oligoetilenoglicóis que contêm um grupo tiol que se liga à superfície do ouro, sendo que o grupo carboxi ou amina terminal funciona como local de ligação da biomolécula, permitindo que a mesma se ligue. [60] Existem vários agentes de acoplamento que podem ser utilizados com esta finalidade tais como o EDC e o NHS (*Tabela 1.9*).

O EDC é uma carbodiimida que catalisa a formação de ligações amida entre os grupos carboxi e amina, enquanto o NHS é uma hidroxissuccinimida que aumenta a estabilidade dos intermediários nas reações de acoplamento através da formação de grupos funcionais éster. [60]

Tabela 1.9: Estrutura molecular dos agentes de acoplamento, EDC e NHS.

Agentes de acoplamento	EDC	NHS
Estrutura		

O EDC e o NHS são moléculas solúveis em água e em solventes orgânicos como o tampão MES (tampão ácido 2-(n-morfolino)etanosulfônico) ou o tampão PBS (tampão fosfato de sódio). No entanto, o EDC perde a sua atividade rapidamente devido à sua elevada instabilidade em solução, obrigando à utilização de preparações frescas de modo a evitar problemas de atividade. A etapa de ligação cruzada pode ser um desafio em nanopartículas coloidais solúveis em água devido à instabilidade destes compostos que dificulta uma ligação eficiente. Contudo, existem outros parâmetros que influenciam a estabilidade, tais como: (i) solvente utilizado, (ii) concentração do tampão, (iii) duração da imobilização [60].

O segundo passo, consiste na imobilização do Ab (ERB) à superfície das AuNPs, formando um complexo AuNP-MUA-Ab. Os anticorpos podem ser adsorvidos ou desadsorvidos da superfície da nanopartícula, bastando para isso que existam condições propícias para que tal ocorra como a temperatura, a natureza da proteína, a superfície das nanopartículas, a forças iônica, a concentração da proteína e da tensão à superfície da nanopartícula. De seguida, a amostra que contém o vírus é adicionada, permitindo detetar se existe especificidade entre o Ab e o Ag. O resultado do teste é positivo quando existe a formação de um complexo AuNP-MUA-Ab-Ag.

1.4. Metodologias utilizadas

1.4.1. Microscopia eletrônica de Transmissão (TEM)

A visão humana tem várias limitações que não permitem visualizar átomos. Por esse motivo, houve a necessidade de encontrar mecanismos que permitam a ampliação das amostras através de lupas, microscópios, entre outros.

As nanopartículas têm dimensões muito reduzidas que implicam a utilização de microscópios eletrônicos que utilizam feixes de elétrons para a obtenção da imagem e ampliam a imagem permitindo visualizar o conteúdo da amostra com detalhe. Estes microscópios são constituídos por uma fonte de iluminação, uma lente de condensação que converge o feixe para a amostra, uma lente de objetiva que amplia a imagens, e uma lente de projetor que projeta a imagem para um plano que permita a obtenção da imagem.

Os microscópios podem ser de (i) Transmissão onde o feixe da sonda que passa pela amostra é refratado e depois absorvido ou (ii) Varrimento onde o feixe da sonda é varrido sobre a superfície até criar uma imagem ponto-a-ponto. Tanto a microscópio eletrônico de varrimento como de transmissão são ferramentas importantes em diferentes áreas como a química, a biologia, a nanotecnologia, entre outros pois permitem estudar e caracterizar diferentes materiais. As amostras devem ser estáveis e condutoras em vácuo para permitir a sua visualização nestes microscópios, obrigando muitas vezes ao tratamento prévio das amostras [42].

Os microscópios de transmissão são tendencialmente mais complexos, mas permitem obter informação à escala atômica como a matriz circundante das AuNPs ou o seu formato. O TEM é constituído por diferentes componentes: (i) um canhão de elétrons que vai gerar o feixe de elétrons, (ii) uma coluna onde se encontra o canhão de elétrons e onde é formado o vácuo, (iii) lentes eletromagnéticas que direcionam o feixe de elétrons, (iv) detetores, (v) um porta amostras onde são colocadas as amostras, (vi) um painel de controlo que controla os campos gerados pelas lentes para focagem da amostra e (viii) uma câmara de visualização que permitem a visualização da imagem da amostra. O modo de funcionamento é idêntico ao microscópio ótico convencional, mas utilizando fótons como fonte de radiação. As amostras precisam de ter espessura adequada para que o feixe de elétrons consiga atravessá-las [42].

1.4.2. Espectrofotometria

A espectrofotometria é uma técnica analítica (atômica ou molecular) que permite estudar a interação de diferentes tipos de radiação com a matéria através de transdutores. A espectroscopia molecular pode também ser designada por espectrofotometria de absorção molecular ultravioleta/visível (UV/Vis).

A espectrofotometria UV/Vis tem por base a medição da luz refletida através da amostra e permite fazer análises qualitativas e/ou quantitativas da constituição de uma amostra. Esta análise tem por base a absorção da radiação UV/Vis, permitindo detetar a presença de um determinado composto através do

desvio da banda plasmónica. Contudo, através da *Equação 1* é possível converter a absorvância em transmitância. Este método de análise pode ser aplicado a diferentes áreas, sendo crucial em muitas análises químicas ou bioquímicas.

$$A = -\log (T) \leftrightarrow T = -\log \left(\frac{1}{T} \right) \quad \text{Equação 1}$$

As principais causas de desvios podem ser (i) físicas se forem provenientes do equipamento ou (ii) químicas se estiverem relacionadas com a amostra. Algumas das causas físicas podem ser a falta de monocromaticidade da radiação, respostas não lineares ou variação da intensidade luminosa, enquanto que as causas químicas estão normalmente associadas a interações moleculares entre os componentes da amostra.

Os espectrofotómetros tradicionais são constituídos por: (i) uma fonte de radiação com uma lâmpada adequada, (ii) um seletor de comprimento de onda, (iii) um local para colocação das cuvetes com a amostra, (iv) um sistema de deteção e (v) um transdutor. Como resultado, pode ser obtido um espectro de absorvância e/ou transmitância onde constam os valores obtidos e as bandas resultantes permitem, muitas vezes, detetar qual a constituição da amostra. A largura da banda deve ser estreita, de modo a aumentar a sensibilidade das medições.

A espectrofotometria de UV/Vis é simple de utilizar e tem uma elevada precisão, permitindo fazer análises quantitativas de forma muito rápida. Contudo, é necessário ter alguns cuidados relativamente à luz externa, ruídos ou contaminantes que possam interferir nos resultados.

Neste trabalho, os espectros de transmitância obtidos foram utilizados para monitorizar a posição da banda plasmónica ao longo das várias etapas do processo de imobilização. De acordo com Haiss *et al.* [61], é possível estimar parâmetros como a razão de agregação, o diâmetro e concentração das AuNP através da absorvância da amostra.

A razão de agregação corresponde ao quociente da absorvância máxima do LSPR da solução coloidal pela absorção a 450 nm. Através deste parâmetro é possível determinar o tamanho da nanopartícula que corresponde a um coeficiente de extinção molar, ϵ_{450} ($M^{-1}cm^{-1}$), que se encontra tabelado [62]. Através da absorvância a 450 nm, o comprimento do percurso ótico e o ϵ_{450} , é possível aplicar a *Equação 2* que permite calcular a concentração das AuNP.

$$C_{AuNP} = \frac{A_{450} \times l}{\epsilon_{450}} \quad \text{Equação 2}$$

1.4.3. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose é uma técnica de análise que permite caracterizar diferentes tipos de biomoléculas tais como ácidos nucleicos (ADN e ARN), proteínas ou anticorpos. No entanto, mais

recentemente surgiram alguns estudos que utilizam esta técnica para separar nanopartículas de acordo com carga, tamanho e forma [63–65].

Os géis de agarose permitem a migração das nanopartículas (isoladas ou conjugadas) em direção ao eletrodo de carga oposta, a uma velocidade que depende do seu tamanho. As nanopartículas de tamanho mais pequeno, migram mais rapidamente, enquanto que as nanopartículas de maiores dimensões ficam mais retidas no gel. A distância percorrida permite calcular a mobilidade eletroforética (μ) da amostra e, conseqüentemente, a massa das nanopartículas.

Este tipo de eletroforese permite que sejam realizadas várias corridas em simultâneo sem a necessidade de preparar diferentes géis [64]. O gel de agarose deve ser preparado numa percentagem adequada à porosidade pretendida (tipicamente entre 0.3-2%) [63–65].

2. Objetivos

A COVID-19 é uma doença infecciosa causada pelo vírus SARS-CoV-2 que pode causar sintomas leves a moderados ou graves. No final de 2020, a população portuguesa começou a ser vacinada atingindo uma taxa de vacinação de 85% em setembro de 2021. Apesar da vacinação permitir uma redução do número de casos graves da doença, não impede que a mesma seja transmitida. Deste modo, para além de continuar a ser necessário manter o distanciamento físico e a etiqueta respiratória, também é importante continuar a testar regularmente a população, de modo a impedir a propagação da doença.

Neste momento, o método padrão para o diagnóstico da COVID-19 consiste num teste RT-PCR em amostras da nasofaringe e/ou orofaringe. O PCR tem diversas limitações como o custo, a demora desde a colheita até execução do teste, o elevado número de passos que facilitam a contaminação, o elevado tempo de espera até à obtenção de resultados, a necessidade de equipamento e pessoal de laboratório especializado. Apesar da existência de vários testes rápidos de antigénio (TRAg) no mercado que permitem detetar a COVID-19 de forma rápida e com um baixo custo associado, a sensibilidade e especificidade destes testes tende a ser mais baixa e existe a necessidade de utilizar amostras NPS/OPS que requerem pessoal especializado.

O principal objetivo desta dissertação consiste no desenvolvimento de um teste de antigénio que permita detetar o vírus SARS-CoV-2 em grande escala de uma forma fácil, rápida e sensível. O imunossensor irá combinar a elevada sensibilidade das AuNPs com a elevada especificidade dos anticorpos monoclonais para com o analito de interesse. A estratégia de transdução deste imunossensor ótico tem por base o fenómeno LSPR exibido pelas nanopartículas de ouro que permite detetar desvios na banda plasmónica devido à formação de bionanoconjugados. Estes TRAg trazem algumas vantagens em comparação com os testes que já existem no mercado tais como a possibilidade de ser utilizado em grande escala, um custo associado mais baixo, sensibilidade e especificidade mais altas que permitam detetar correta e rapidamente todos os casos positivos e possibilidade de utilização de amostras fisiológicas menos invasivas como é o caso da saliva.

A otimização dos bionanoconjugados será efetuada com as AuNPs em solução e em superfícies sólidas. Para atingir este objetivo, será estudada a influência de diferentes fatores na construção dos bionanoconjugados, tais como:

- Tamanho das AuNPs;
- Tipo de AuNPs;
- Condições de funcionalização;
- Condições de centrifugação (das AuNPs em solução);
- Elemento de reconhecimento biológico;
- Protocolo de imobilização das biomoléculas (anticorpo, antigénio e vírus);

- ◆ Proporção de biomolécula;
- ◆ Tempo de imobilização;
- Par anticorpo/antigénio.

A estratégia para construção do imunossensor compreende três passos distintos: (i) funcionalização das AuNPs e ligação dos agentes de acoplamento, (ii) imobilização do anticorpo monoclonal e (iii) captação do antigénio/vírus. Numa primeira fase, as AuNPs vão ser revestidas com MUA (ácido 11-mercaptopundecanóico), MPA (ácido 3-mercaptopropionico) ou uma mistura de 1:1 de ambos. De seguida, os agentes de acoplamento, EDC e NHS, serão adicionados para estabilizar e promover a ligação dos anticorpos monoclonais (Ab) que constituem um dos pontos chave para a maximização do efeito plasmónico das AuNPs e posterior ligação do antigénio/vírus. A proteína que se pretende ligar às nanopartículas é um anticorpo monoclonal específico para a região Spike S1 (Spike S1 da GenScript) ou para a região RBD (RBD da R&D Systems) através da adsorção química. Após a formação de um bionanoconjugado AuNP-MUA-Ab, imobilizou-se um antigénio específico para a região Spike S1 (da GenScript e do iBET), RBD (iBET) ou do vírus SARS-CoV-2. No final, pretende-se obter um bionanoconjugado de AuNPs-MUA-Ab-Ag que permita detetar a ligação do antigénio através do desvio do comprimento de onda da banda plasmónica (LSPR) das nanopartículas de ouro.

Ao longo deste trabalho serão utilizadas diferentes técnicas de análise tal como a microscopia eletrónica de transmissão (TEM), a espectrofotometria de UV/Vis e a eletroforese em gel de agarose. A microscopia eletrónica vai permitir visualizar o formato e tamanho das nanopartículas, tanto isoladas como conjugadas com os anticorpos e respetivos antigénios. A espectrofotometria de UV/Vis vai permitir monitorizar o espectro de transmitância das AuNPs ao longo do trabalho. Espera-se que a espectrofotometria possibilite a deteção dos desvios da banda plasmónica e verificar se houve a formação de um imunocomplexo Ab-Ag à superfície das AuNPs. A eletroforese em gel de agarose vai permitir separar as AuNPs de acordo com o seu tamanho e será útil para verificar a formação dos bionanoconjugados AuNP-MUA-Ab com diferentes proporções de Ab.

No âmbito desta dissertação será ainda realizada uma meta-análise sobre amostras fisiológicas alternativas que permitam detetar a COVID-19 com elevada precisão. A utilização de outras amostras fisiológicas tem como principais objetivos a diminuição do desconforto dos pacientes na recolha de amostras de referência, diminuir o risco de contaminação e uma melhoria no processo de testagem em grande escala. Esta meta-análise terá um papel importante, permitindo estudar amostras fisiológicas alternativas que permitam detetar a COVID-19 com elevada precisão e que possam vir a ser utilizadas no biossensor LSPR a desenvolver.

3. Material e métodos

Nesta secção serão apresentados os materiais e procedimentos que foram utilizados nas várias etapas para a determinação das condições ótimas de construção do biossensor LSPR.

3.1. Reagentes e Soluções

Todos os reagentes eram de grau de pureza *pro analysis*.

- AuNPs sintetizadas com um diâmetro de 15 nm¹;
- AuNPs comerciais de 15, 30 e 60 nm (Cytodiagnosics);
- Placas de vidro com ouro²;
- Ácido 11-mercaptoundecanóico, MUA (Sigma-Aldrich);
- Ácido 3-metilfosfónico, MPA (Sigma-Aldrich);
- Etanol absoluto (Carlo Erba);
- 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, EDC (Sigma-Aldrich);
- N-hidroxissuccinimida, NHS (Sigma-Aldrich);
- Tampão ácido 2-(n-morfolino)etanosulfónico, MES, 5 mM a pH 6.4 (já preparados);
- Tampão fosfato de sódio, PBS, 5 mM a pH 7.2 e pH 7.4 (já preparados);
- Trizma base (Sigma-Aldrich);
- Ácido acético glacial (Panreac);
- EDTA (Panreac);
- Glicerol (Panreac);
- Agarose (fornecida);
- Anticorpo Spike S1 (GenScript);
- Anticorpo RBD (R&D Systems);
- Antigénio Spike S1 (GenScript);
- Antigénios Spike (iBET);
- Antigénio RBD (iBET);
- Vírus SARS-CoV-2 (ATCC-VR-1986HK, LGC Standards).

¹ Sintetizadas no laboratório pelo Método de Turkevich pela Mestre Rosaceleste Zumpano e pelo Mestre Hugo Lapa

² Preparadas por eletrodeposição pelo Mestre Hugo Lapa e evaporação térmica pelo Mestre Yuri Vygranenko (ISEL).

3.2. Materiais e equipamentos

- Cuvetes de plástico;
- Cuvetes de quartzo de 100 μL (CV10Q1, Thorlabs);
- Micropipetas de volume variável entre 20 e 1000 μL (Eppendorf e VWR);
- Centrífuga refrigerada (5810R, Eppendorf);
- Espectrofotômetro portátil (CCS100, Thorlabs);
- Fonte para eletroforese (PowerPac Basic, Bio-Rad);
- Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEM-1200 EX, JEOL).

3.3. Procedimento experimental

3.3.1. Experiências em solução

3.3.1.1. Caracterização das nanopartículas de ouro (AuNPs)

Neste trabalho foram utilizadas AuNPs esféricas com um diâmetro de 15 nm, sintetizadas pelo método de Turkevich [53], tal otimizado por Kimling et al. [54] e AuNPs comerciais de diferentes diâmetros (15, 30 e 60 nm).

As AuNPs foram caracterizadas por espectroscopia de UV-Vis recorrendo a um espectrofotômetro portátil (CCS100, Thorlabs) montado *in-house* (Figura 3.1) operando numa gama de comprimentos de onda entre os 400 e os 750 nm. Todos os espectros de transmitância foram registados utilizando cuvetes de quartzo de 100 μL (CV10Q1, Thorlabs) e cuvetes de plástico descartáveis.

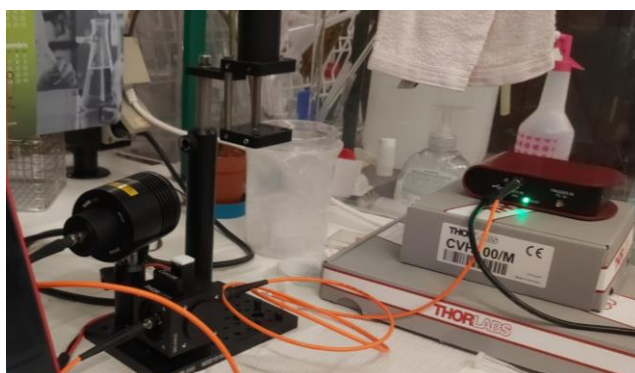


Figura 3.1: Espectrofotômetro montado *in-house*.

3.3.1.2. Funcionalização das nanopartículas de ouro

As AuNPs foram sintetizadas na presença de citrato de sódio, o qual funciona como um agente de revestimento das AuNPs. O primeiro passo consistiu na substituição da camada de citrato por um tiol de cadeia longa, de modo a promover a imobilização covalente do anticorpo à superfície das AuNPs.

Neste trabalho foram utilizados dois tióis distintos, o ácido 11-mercaptoundecanóico, MUA, e o ácido 3-metilfosfónico, MPA, de acordo com o indicado na *Tabela 3.1*. Os tióis foram preparados em etanol absoluto, a solução de MPA numa concentração de 10 mM, e o MUA em concentrações de 1, 5 e 10 mM. As razões molares AuNP:MUA utilizadas foram de 1:5000 no caso das AuNPs de 15 nm, 1:20000 no caso das AuNPs de 30 nm e 1:80000 no caso das AuNPs de 60 nm.

Tabela 3.1: Tipo e concentração de tiol utilizado, de acordo com o tamanho das AuNP.

Amostra	Tamanho (nm)	Tiol utilizado	Concentração do tiol (mM)
AuNPs	15	MUA, MPA e MUA:MPA (1:1)	10
	30	MUA	1 e 5
	60	MUA	1

Após 24 h de funcionalização, a 4 °C, alíquotas de 500 ou 1000 µL foram retiradas e centrifugadas com diferentes velocidades e tempos, de acordo com o seu tamanho (*Tabela 3.2*). Após a centrifugação, removeu-se o sobrenadante e as amostras foram suspensas em tampão ácido 2-(n-morfolino)etanosulfónico (MES) 5 mM, a pH 6.4.

Tabela 3.2: Condições de centrifugação das AuNPs utilizadas de acordo com o tamanho das mesmas.

Amostra	Tamanho (nm)	Centrifugação*		
		Temperatura (°C)	Velocidade (rpm)	Duração (minutos)
AuNP	15	4	9000, 9500, 10000, 11000, 12651	20, 25, 30
	30	4	4000, 5000, 6500, 6509	10
	60	4	2000, 2500, 3260	10

*a centrifugação foi realizada a velocidade diferentes e durante diferentes tempos de modo a determinar as melhores condições para a obtenção de bionanoconjugados estáveis

A etapa de reação cruzada entre as AuNPs de 15 nm funcionalizadas e o anticorpo foi realizada recorrendo ao método de adsorção química. Para tal, utilizou-se EDC e NHS a 1 mM, preparados com dois solventes distintos, água desionizada ou tampão MES 5 mM, a pH 6.4. Colocou-se, aproximadamente, 1×10^{-12} mol de AuNP-MUA num microtubo, ao qual se adicionou 50 µL de EDC e 100 µL de NHS. Após 25 minutos, a amostra foi centrifugada para remoção do excesso de EDC e de NHS, ou procedeu-se logo à imobilização do anticorpo. No caso das AuNPs-MUA de maiores dimensões, utilizaram-se 1×10^{-13} mol de partículas, ao qual se adicionou o EDC e o NHS em diferentes quantidades. Foram realizados estudos com EDC e NHS recém preparados e também com soluções preparados em dias anteriores, para estudar o efeito da estabilidade destes reagentes.

Foram utilizados dois anticorpos distintos, o Ab Spike S1 e o Ab RBD. Após a etapa de reação cruzada, o anticorpo Spike S1 foi adicionado nas razões molares de AuNP-MUA:Ab apresentadas na *Tabela 3.3*. De seguida, aferiu-se a solução para os 500 μL com tampão PBS 5 mM a pH 7.2 ou 7.4, de modo a igualar o volume de todas as soluções. A transmitância das amostras foi medida ao longo dos 60 ou 90 minutos de imobilização à temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C) para verificar as alterações no espectro e o respetivo desvio da banda plasmónica. A amostra foi centrifugada a 4 °C e 9000 rpm durante 15 minutos e, de seguida, a amostra foi novamente suspensa em 125 μL de solução tampão fosfato de sódio (PBS) 5 mM a pH 7.4. Por último, traçou-se novamente o espectro de transmitância entre os 450 e os 700 nm para confirmar o formato do espectro assim como o desvio total após a ligação do anticorpo.

Tabela 3.3: Proporções AuNP-MUA:Ab utilizadas.

Anticorpo	Proporções Molares AuNP-MUA:Ab
Spike S1	1:25, 1:50, 1:60, 1:75; 1:100; 1:120, 1:250, 1:500
RBD	1:120

3.3.1.5. Imobilização do antigénio

Foram utilizados três antigénios diferentes: Ag Spike S1 (GenScript), Ag Spike (iBET) e o antigénio RBD (iBET). As proporções bionanoconjugado/Ag utilizadas encontram-se descritas na *Tabela 3.4*. Após a adição do Ag, o espectro de transmitância foi medido ao longo dos 90 minutos, entre 450 e 700 nm. A amostra foi armazenada a 4°C até ao dia seguinte, sempre que não foram detetados desvios da banda plasmónica e, em caso de desvio, a amostra era centrifugada a 4 °C e 9500 rpm, durante 10 minutos. Por último, traçou-se novamente o espectro de transmitância.

Tabela 3.4: Proporção AuNP:Ag utilizadas ao longo do trabalho experimental.

Antigénio	Proporção (AuNP-MUA:Ag)
Spike S1	1:120
Spike (B02)	1:120, 1:150, 1:240
Spike (CS+PP)	1:120, 1:150, 1:240
RBD	1:120
Vírus	1:70, 1:120

Nota: na maioria dos ensaios, o anticorpo foi imobilizado em primeiro lugar e, de seguida, imobilizou-se o respetivo antigénio. No entanto, foram ainda realizados ensaios onde o antigénio foi imobilizado em primeiro lugar, seguindo-se a imobilização do anticorpo. Este estudo teve como objetivo perceber qual seria mais viável: o teste de antigénio ou o teste de anticorpo. A única alteração relativamente ao

protocolo descrito anteriormente foi a alteração do Ab Spike S1 da *GenScript* pelo Ag Spike S1 da *GenScript* numa proporção de 1:120.

3.3.2. Experiências em placas de ouro

3.3.2.1. Caracterização das placas de ouro

As placas de ITO com ouro foram preparadas por eletrodeposição e por evaporação térmica e então foram fornecidas para que fossem utilizadas nos ensaios em solução. A eletrodeposição compreendeu a preparação de uma solução 1 M de KCl com 0.5 mM de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e, de seguida, a célula eletroquímica foi purgada com azoto. Utilizou-se um elétrodo de platina como contra elétrodo, um elétrodo calomelano saturado em KCl como elétrodo de referência e o elétrodo de trabalho (ITO) foi sonificado com água desionizada, etanol, acetona, água desionizadas e secagem. Aplicou-se um potencial de -0.6 V durante 20 segundos e a voltametria cíclica foi realizada com potenciais entre -0.5 e 0.75 V com uma velocidade de varrimento de 50 mV/s ao longo de 25 ciclos. As amostras obtidas foram lavadas suavemente com água desionizada antes da sua análise. Por outro lado, as placas de ouro preparadas por evaporação térmica visaram a obtenção de um filme com uma espessura entre 5-7 nm. O filme de nanoilhas de ouro de, aproximadamente, 5 nm foi colocado na superfície do ITO e, de seguida, a amostra foi sujeita a anelamento a 400 °C.

3.3.2.2. Funcionalização das placas de ouro

Em primeiro lugar, traçou-se o espectro de transmitância da placa de ouro despida. Mais uma vez foi utilizado o espectrofotómetro portátil (CCS100, Thorlabs) com uma gama de comprimentos de onda entre os 400 e os 700 nm. Após a obtenção do espectro de transmitância das placas de ouro antes da funcionalização, dilui-se a solução de MUA, previamente preparada, de 10 mM para 1 mM. De seguida, procedeu-se à imobilização do MUA (1 mM) na placa de ouro durante cerca de 24 horas a 4 °C. No dia seguinte, as placas de ouro foram lavadas com 5 mL de etanol absoluto durante alguns segundos e, de seguida, as placas foram secas no ar comprimido. Após este passo, traçou-se o respetivo espectro para verificar se houve alterações na banda plasmónica. O próximo passo consistiu em misturar EDC e NHS 1 mM numa proporção de 1:2 num microtubo. Após 15 minutos, esta mistura foi despejada em cima da placa de ouro. Cerca de 30 minutos depois, a placa foi lavada novamente com 5 mL de etanol absoluto e seca no ar comprimido. Mais uma vez, traçou-se o respetivo espectro para verificar se houve alterações na banda plasmónica. A imobilização foi também realizada por *drop casting*, colocando 5 ou 10 μL de anticorpo Spike S1 ou RBD em tampão PBS 5 mM a pH 7.2 ou 7.4. Todas alterações no espectro foram monitorizadas ao longo de 90 minutos. Após este tempo, a placa foi lavada com tampão PBS 5 mM, a pH 7.2 ou 7.4, e deixou-se secar ao ar. Por fim, traçou-se novamente o espectro de transmitância para detetar qualquer alteração da banda plasmónica.

3.3.3. Meta-análise sobre amostras fisiológicas

O primeiro passo consistiu numa pesquisa em diferentes bases de dados (*PubMed, Scopus, Web of Science, ClinicalTrial.gov e NIPH Clinical Trial*) utilizando as seguintes palavras-chave: (*COVID-19 OR COVID19 OR n-CoV19 OR SARS-CoV-2 OR SARS-CoV2*) AND (*Diagnosis OR Diagnostic OR Test OR Detection*) OR (*Saliva OR Salivary OR “Oral fluid” OR Sputum OR Expectoratation OR Gob OR Tears OR Conjunctival OR Stool OR Feces OR Fecal OR Urine*). De seguida, utilizou-se o *Mendeley* para auxiliar na organização dos artigos, excluir todos os artigos duplicados ou que não cumpriam o objetivo da meta-análise. O passo seguinte consistiu na extração de todas as informações importantes que se encontravam disponíveis nos artigos em análise, a avaliação do risco de viés através da ferramenta *Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies 2 (QUADAS-2)* e a utilização da ferramenta *robvis* para gerar os respetivos gráficos. Por fim, o *MetaDTA* foi utilizado para determinar a sensibilidade, especificidade, precisão de cada uma das amostras fisiológicas alternativas e para realizar as meta-regressões.

3.4. Técnicas gerais

3.4.1. Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM)

A técnica de microscopia foi realizada pelo Doutor António Pedro do Centro de Microscopia Eletrónica e Histopatologia (Cmicros) do Centro de Investigação Interdisciplinar da Egas Moniz (CIIEM). A amostra foi preparada colocando uma gota da solução a analisar num filme de parafina plástica, deixou-se secar e removeu-se o excesso de líquido. De seguida, adicionou-se uma gota de acetato de uranilo e deixou-se secar antes de remover o excesso de líquido. Por fim, as amostras preparadas foram visualizadas por TEM (JEM-1200 EX, JEOL).

3.4.2. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose teve como objetivo a caracterização das nanopartículas durante as várias etapas de funcionalização. Preparou-se a solução tampão Tris-Acetato-EDTA, TAE, 0.125x a pH 8 e, de seguida, preparou-se o gel de agarose 0.5%, neste tampão. Após solidificação do gel na tina de eletroforese horizontal, este foi imerso em tampão TAE 0.125x, a pH 8. As amostras preparadas no ponto 3.5 foram novamente centrifugadas a 4 °C, 9500 rpm, durante 15 minutos, para total separação e, de seguida, suspensas em 13.5 µL de tampão PBS 5 mM, a pH 7.4, adicionando-se então, aproximadamente 1.5 µL de glicerol 87%. As amostras foram colocadas nos respetivos poços e, de seguida, deixou-se correr durante 40 minutos, a 150 V, num sistema de eletroforese.

4. Resultados e discussão de resultados

Neste trabalho foram utilizadas nanopartículas de ouro comerciais de 15, 30 e 60 de diâmetro, e nanopartículas sintetizadas no laboratório com as dimensões de 15 nm. Foram realizados vários estudos em simultâneo de modo a determinar as condições mais apropriadas para a preparação dos bioconjugados a usar no desenvolvimento do biossensor.

4.1. Ensaio em solução

4.1.1. Influência do tamanho das AuNPs

Numa primeira fase do trabalho, utilizaram-se AuNPs comerciais de diferentes diâmetros (15, 30 e 60 nm), para verificar qual o efeito desta variável na imobilização do anticorpo e do antigénio e nos respetivos parâmetros espectrais.

O espectro de transmitância destas AuNPs permitiu a determinação do comprimento de onda da banda plasmónica e a concentração da amostra. Os espectros de transmitância obtidos (*Figura 4.1*) estão dentro do esperado sendo possível visualizar uma banda plasmónica característica a 514, 519 e 540 nm para as AuNPs de 15, 30 e 60 nm, respetivamente (*Tabela 4.3*).

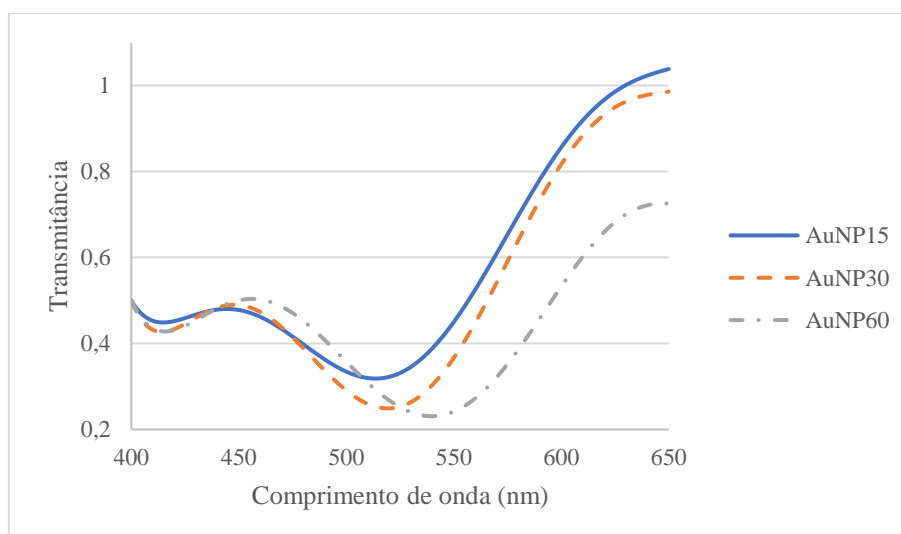


Figura 4.1: Espectro de transmitância das AuNPs comerciais (Cytodiagnosics) de diferentes diâmetros.

Os valores de transmitância foram convertidos em absorvância (*Tabela A.1 em Anexo*) e calcularam-se as informações que constam na *Tabela 4.1* com vista à determinação da concentração através do quociente entre o produto da absorvância a 450 nm e o comprimento do percurso ótico (l) pelo ϵ_{450} .

Os valores obtidos no ponto 3.3.1.1 encontravam-se relativamente próximos dos valores fornecidos pelo fabricante (*Tabela 4.1*), tendo para a funcionalização das AuNPs comerciais, sido considerados os

valores de concentração fornecidos pelo fabricante. As AuNPs foram funcionalizadas de acordo com o seu diâmetro, as AuNP₁₅ foram funcionalizadas numa proporção de 1:5000, as AuNP₃₀ de 1:20000 e as AuNP₆₀ de 1:80000. Estas AuNPs encontravam-se muito diluídas pelo que foi necessário diluir o MUA para 5 nM.

Tabela 4.1: Tamanho estimado e concentração das AuNPs comerciais.

Solução	Tamanho estimado (nm)	ϵ_{450}	Concentração (nM)	
			Estimado	Fabricante
AuNP ₁₅	19.7	2.18E+08	2.70	2.72
AuNP ₃₀	59.2	1.96E+09	0.20	0.30
AuNP ₆₀	67.8	1.73E+10	0.02	0.03

* ϵ_{450} é o coeficiente de extinção molar.

As soluções AuNP-MUA foram centrifugadas, removeu-se o sobrenadante e, de seguida, suspendeu-se em tampão MES 5 mM, a pH 6.4 tendo o cuidado de utilizar menor quantidade de tampão de modo a obter uma solução AuNPs-MUA mais concentrada (*Tabela A.3 em Anexo*).

A experiência permitiu concluir que as condições de centrifugação utilizadas não eram as mais apropriadas e, posteriormente, foram feitos alguns estudos que permitiram melhorar este parâmetro. As AuNPs de menor dimensão requerem uma velocidade e um tempo de centrifugação mais elevados. Por outro lado, as AuNPs de maiores dimensões devem ser centrifugadas durante menos tempo e a velocidades muito mais moderadas.

Tabela 4.2: Concentração estimada das AuNP-MUA.

Solução	Concentração estimada (nM)
AuNP ₁₅ -MUA	7.8
AuNP ₃₀ -MUA	0.9
AuNP ₆₀ -MUA	0.1

Através dos valores obtidos antes da funcionalização (*Tabela 4.1*), estimou-se a concentração das diferentes soluções AuNP-MUA. A solução AuNP₁₅-MUA apresentava pequenos aglomerados de cor escura visíveis a olhos nu que indicavam alguma agregação, apesar de não terem sido detetadas alterações significativas no formato do espectro. Detetou-se um desvio positivo da banda plasmónica em todas as soluções AuNP-MUA preparadas. tanto maior quanto menor a dimensão das AuNPs, mais concretamente, o desvio foi de 6, 4 e 2 nm para as AuNP₁₅, AuNP₃₀ e AuNP₆₀, respetivamente (*Tabela 4.3*).

O passo seguinte consistiu na adição dos agentes de acoplamento, EDC e NHS, previamente preparados em água desionizada. As quantidades de EDC e de NHS tinham sido determinadas previamente no grupo, tendo em conta os resultados obtidos com anticorpo para a proteína NGAL: 50 μ L de EDC (1 mM) e 100 μ L de NHS (1 mM). Contudo, estes estudos foram realizados para AuNP₁₅ com uma concentração de 8 nM, enquanto as AuNPs comerciais se encontravam mais diluídas, pelo que foi necessário realizar novos cálculos para manter esta proporção (*Tabela A.5 em Anexo*).

Tabela 4.3: Variação da posição da banda plasmónica ao longo do tempo.

Solução	Comprimento de onda máximo (nm)		
	AuNP	AuNP-MUA	AuNP-MUA-Ab
AuNP ₁₅	514	520	539
AuNP ₃₀	519	523	602
AuNP ₆₀	540	542	560

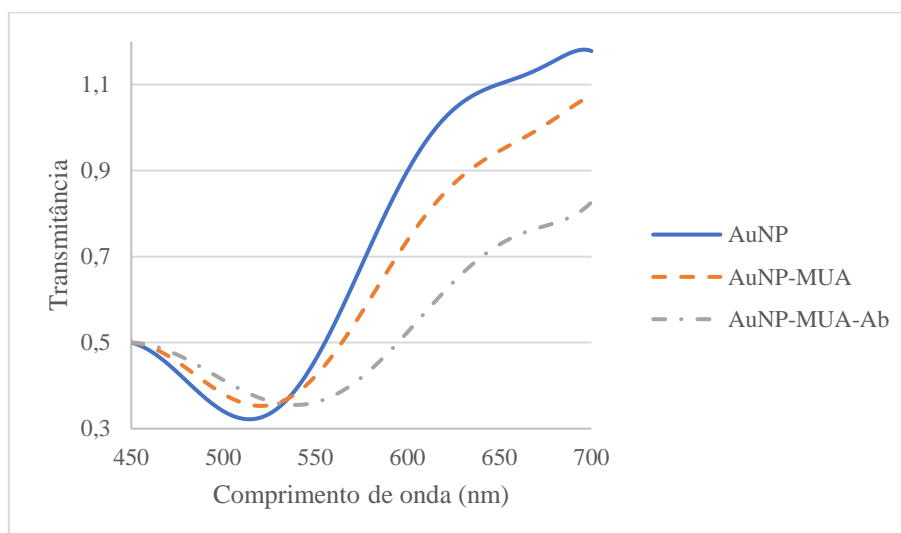


Figura 4.2: Imobilização do Anticorpo Spike S1 (*GenScript*) numa proporção de 1:120 em AuNPs de 15 nm comerciais (*Cyodiagnosics*) funcionalizadas com MUA.

As AuNP₁₅ apresentaram melhores resultados com um desvio total de, aproximadamente, 19 nm e um ligeiro alargamento da banda plasmónica (*Figura 4.2*). No caso das AuNP₃₀ e AuNP₆₀ foi possível observar uma maior agregação que afetou a reprodutibilidade dos ensaios. As AuNPs de maiores dimensões são mais instáveis e, por esse motivo, mais suscetíveis à agregação, uma vez que após a adição do Ab Spike S1 e do tampão PBS 5 mM a pH 7.4, houve uma alteração para uma tonalidade arroxeadada e uma alteração do espectro de transmittância (*Figuras 4.3 e 4.4*).

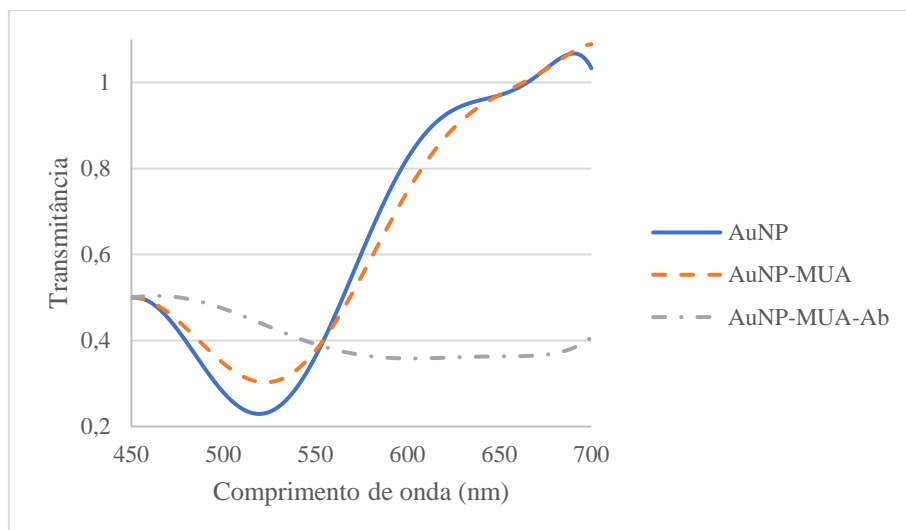


Figura 4.3: Imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:120 em AuNPs de 30 nm comerciais (Cytodiagnostics) funcionalizadas com MUA.

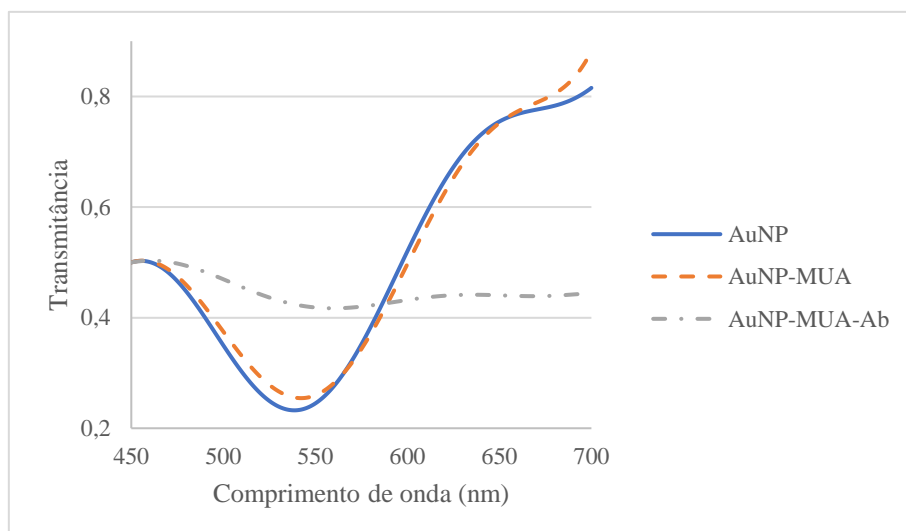


Figura 4.4: Imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:120 em AuNPs de 60 nm comerciais (Cytodiagnostics) funcionalizadas com MUA.

As soluções anteriores foram analisadas por TEM (Figuras 4.5 a 4.7) alguns dias após terem sido preparadas. A imagem TEM da solução AuNP-MUA-Ab preparada com as AuNP₁₅ foi analisada por Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM) onde podemos ver que as AuNPs não se encontravam agregadas, sendo notória a imobilização do Ab à superfície do ouro. Contudo, foi possível constatar alguns indícios de material orgânico que não foi possível identificar, mas que podem estar relacionadas com alguma contaminação ou até algum componente que se encontre em excesso. É também importante referir que estas soluções foram analisadas alguns dias após a sua preparação e, como tal, podia ter sofrido algumas alterações. Teria sido importante a nova medição da transmissância de modo a verificar o estado destas amostras antes das mesmas terem sido analisadas por TEM.

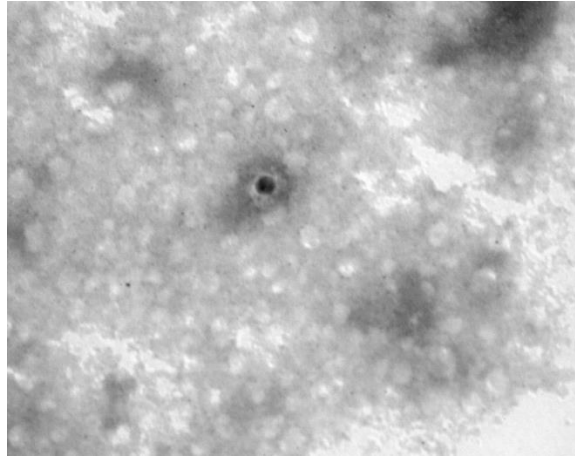


Figura 4.5: Imagem TEM da solução AuNP-MUA-Ab com AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA. Ampliação: 100kx.

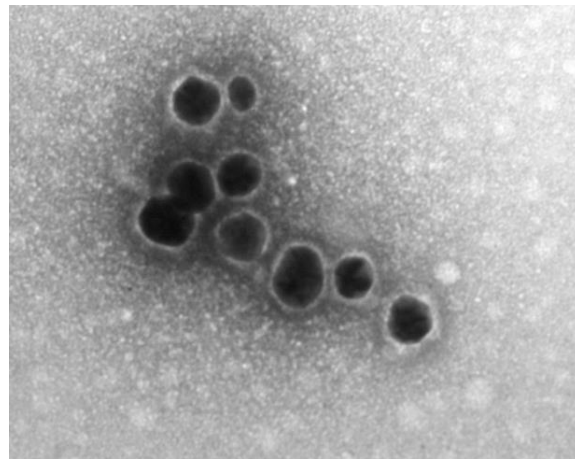


Figura 4.6: Imagem TEM da solução AuNP-MUA-Ab com AuNPs de 30 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA e com o Ab Spike SI (GenScript) e o Ag Spike SI (GenScript) imobilizados numa proporção de 1:120. Ampliação: 100kx.

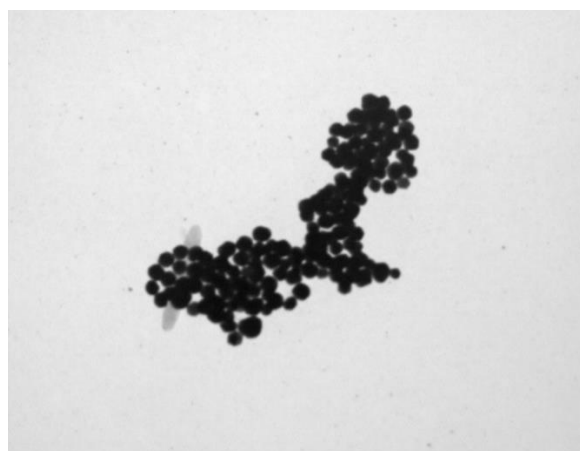


Figura 4.7: Imagem TEM da solução AuNP-MUA-Ab com AuNPs de 60 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA e com o Ab Spike SI (GenScript) imobilizado numa proporção de 1:120. Ampliação: 20kx.

A amostra preparada com as AuNP₆₀ foi analisada por TEM (*Figura 4.7*), não tendo sido possível detetar a imobilização de qualquer molécula. Contudo, foi possível verificar que estas nanopartículas estavam demasiado próximas evidenciando alguma agregação que inclusive já tinha sido observada através da alteração da tonalidade para um tom arroxado intenso e alterações no espectro de transmitância. Nesta mesma imagem é ainda possível verificar a presença de material orgânico tal como aconteceu na imagem TEM anterior. Apesar da dificuldade em trabalhar com as AuNP₃₀ e AuNP₆₀, teria sido importante a repetição destas amostras para que as mesmas fossem analisadas por eletroforese em gel de agarose de modo a verificar a imobilização destas biomoléculas. Estes resultados indicam que as AuNPs de 15 nm são mais fáceis de trabalhar, não agregam tão facilmente e apresentam uma elevada estabilidade ao longo do tempo em comparação com as AuNPs de maiores dimensões. As AuNPs de 60 nm foram as mais difíceis de trabalhar e agregaram muito facilmente.

O objetivo da eletroforese em gel de agarose era utilizar nanopartículas de diferentes tamanhos, contudo, isso não foi possível devido à tonalidade pouco intensa de algumas amostras como é o caso das AuNPs de 60 nm de origem comercial devido essencialmente à baixa concentração destas nanopartículas.

Através do gel de agarose (*Figura 4.8*) concluiu-se que não foi possível visualizar qualquer banda nos poços 5, 8, 11, 12 e 14 uma vez que estas soluções estavam muito diluídas. Este facto foi comum em todas as amostras com o Ab e o Ag imobilizados, pois estas tendem a estar mais diluídas. No entanto, foi possível visualizar as bandas de bionanoconjugados nos poços 3, 6, 7, 9 e 13.

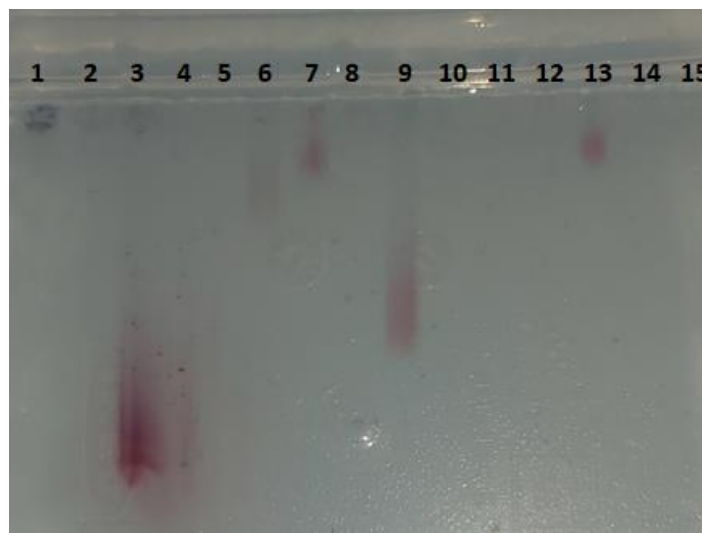


Figura 4.8: Gel de agarose de diferentes amostras preparadas com AuNPs comerciais.

Poços: 1 - AuNPs isoladas de 15 nm; 2, 3, 5 - AuNP-MUA com AuNPs de 15 nm; 6 - AuNP-MUA-AbAg numa proporção 1:120 com AuNPs de 15 nm; 7 - AuNP-MUA-Ab numa proporção 1:60 com AuNPs de 15 nm; 8 - AuNP-MUA-AbAg com o Ab numa proporção 1:60 e o Ag numa proporção 1:120 com AuNPs de 15 nm; 9 - AuNP-MUA-Ag numa proporção 1:120 com AuNPs de 15 nm; 11 - AuNPs isoladas de 30 nm; 12 - AuNP-MUA com AuNPs de 30 nm; 13 - AuNP-MUA-Ab numa proporção 1:60; 14 - AuNP-MUA-AbAg com o Ab numa proporção 1:60 e o Ag numa proporção 1:120 com AuNPs de 30 nm; 4, 10, 15 - poços vazios.

A amostra de AuNPs de 15 nm comerciais (poço 1) mudou para um tom violeta intenso após a centrifugação e as AuNPs migraram muito pouco devido à agregação. A amostra de AuNPs de 15 nm funcionalizadas com MUA (3) migrou mais, como seria de esperar, pois estas partículas são necessariamente mais pequenas e migram mais rapidamente ao longo do gel. Nos poços 7 e 13 encontravam-se as soluções de AuNP comerciais de 15 e de 30 nm, respetivamente, funcionalizadas com MUA e imobilizadas com o Ab Spike S1 da *GenScript* (1:60). Tanto no poço 7 como no poço 13 visualizou-se uma diferença significativa em relação ao poço 3, indicando que estas partículas são de maiores dimensões e, como tal, migraram mais lentamente. No entanto, não foi possível comparar esta última solução com as AuNP de 30 nm comerciais porque estas se encontravam muito translúcidas. No poço 9 foi colocada uma solução de AuNPs de 15 nm comerciais funcionalizadas com MUA e imobilizadas com o antígeno S1 numa proporção de 1:120, estas partículas migraram significativamente ao longo do gel, o que sugere que estas AuNPs são mais pequenas do que acontece com a amostra de AuNP-MUA-Ab com AuNPs de 15 nm.

Comparando os resultados obtidos, concluiu-se que uma proporção de anticorpo de 1:120 já existe saturação uma vez que a migração é pouco significativa. Isto evidenciou a necessidade de estudar proporções mais baixas numa fase posterior do trabalho.

4.1.2. Influência do tipo de AuNPs

Nesta fase do trabalho foram utilizadas AuNPs esféricas de 15 nm comerciais e sintetizadas no laboratório pelo método de Turkevich como referido anteriormente.

Utilizou-se o mesmo protocolo em ambos os casos tendo o cuidado de utilizar as mesmas condições em todas as fases de modo a diminuir o risco de viés. Após a funcionalização *overnight*, as AuNPs foram centrifugadas a 9500 rpm durante 20 minutos, removeu-se o sobrenadante e resuspendeu-se em tampão MES 5 mM a pH 6.5 (*Tabela A.6 em Anexo*) e traçou-se um novo espectro de transmitância (*Figura 4.9 e 4.10*). Os parâmetros que constam na *Tabela 4.4* foram calculados a partir dos valores de absorvância obtidos (*Tabela A.7 em Anexo*).

Tabela 4.4: Tamanho e concentração estimados para as AuNPs de 15 nm (comerciais e sintetizadas).

Solução		Tamanho estimado (nm)	ϵ_{450}	Concentração (nM)
Comerciais	<i>AuNP</i>	19.7	2.18E+08	2.7
	<i>AuNP-MUA</i>	18.2		3.1 *
Sintetizadas	<i>AuNP</i>	15.1		4.7
	<i>AuNP-MUA</i>	11.3		5.2 *

*a concentração das soluções AuNP-MUA foi estimada

As etapas seguintes consistiram na adição de EDC e de NHS 1 mM e na imobilização do anticorpo à superfície das AuNPs de acordo com a *Tabela A.8 em Anexo*. Após este passo, concluiu-se que o comportamento das AuNPs comerciais e caseiras foi distinto.

Tabela 4.5: Variação da posição da banda plasmônica ao longo do tempo das AuNPs de 15 nm (comerciais e sintetizadas) com o Ab Spike S1 (GenScript) imobilizado numa proporção de 1:60.

Nanopartículas	Comprimento de onda máximo (nm)		
	AuNP	AuNP-MUA	AuNP-MUA-Ab
Comerciais	514	521	544
Sintetizadas	521	524	533

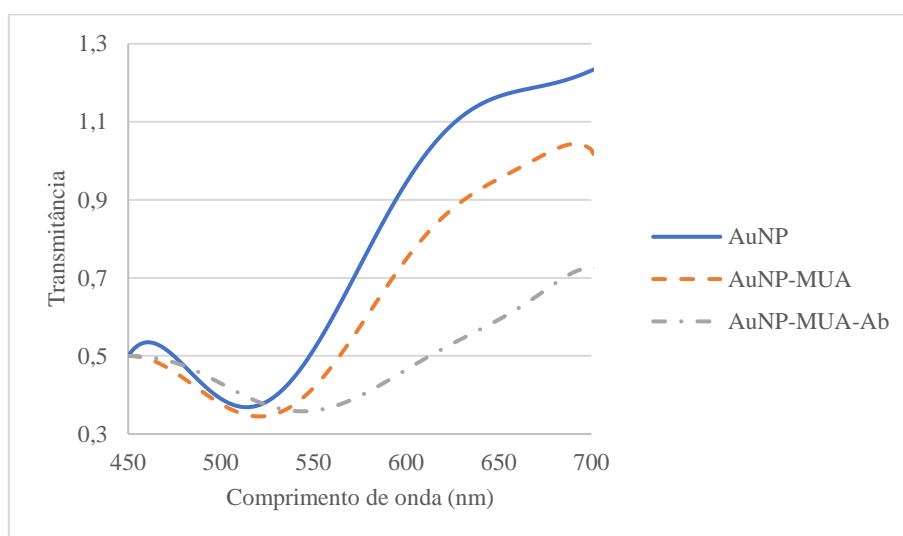


Figura 4.9: Imobilização do Anticorpo Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:60 em AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnostics).

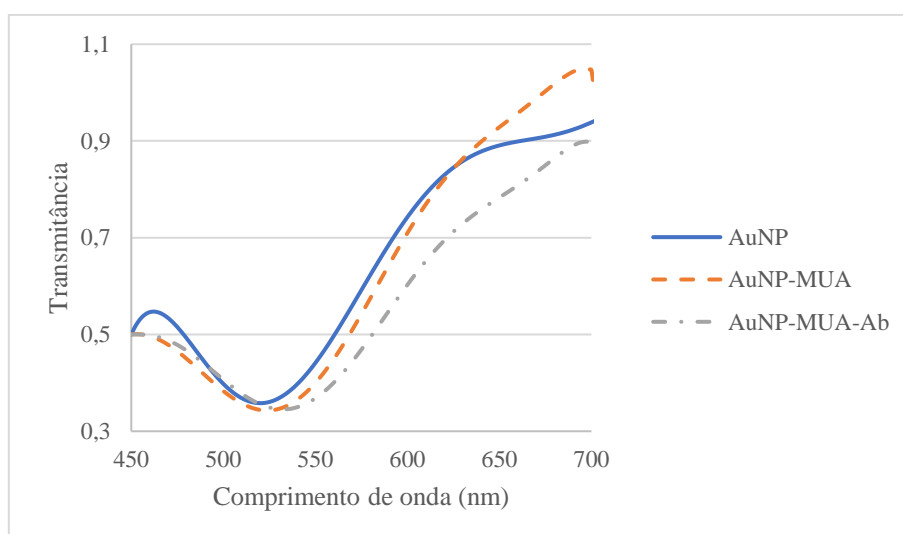


Figura 4.10: Imobilização do Anticorpo Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:60 em AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório.

No caso das AuNPs comerciais de 15 nm, houve um alargamento significativo da banda plasmónica com um desvio do mínimo de transmitância de 521 para 544 nm (*Tabela 4.5*) com uma alteração no formato da curva, mas sem alterações na sua tonalidade que se manteve rosada e sem formação de qualquer precipitado (*Figura 4.9*). Contudo, os espectros de transmitância das AuNPs sintetizadas de 15 nm mostrou um desvio da banda plasmónica dos 524 para os 533 nm (*Tabela 4.5*) sem alterações significativas no formato da curva e sem alteração na tonalidade da amostra (*Figura 4.10*).

Se compararmos os tipos de AuNPs (*Tabela 4.6*) podemos concluir que houve um desvio de 10 nm na banda plasmónica das AuNPs comerciais de 15 nm após a funcionalização com MUA, e de 46 nm após a imobilização do Ab. Contudo, após a etapa de imobilização, houve um alargamento significativo da banda plasmónica (*Figura 4.11*). Tendo em conta todos os ensaios que foram realizados, as AuNPs comerciais de 15 nm parecem mais estáveis quando mantidas a 4°C, mas mostraram uma menor estabilidade após a funcionalização e imobilização das biomoléculas. Por outro lado, as AuNPs sintetizadas de 15 nm sofreram um desvio de 3 nm após a funcionalização, e de 9 nm após a imobilização do Ab, sem alargamento significativo da banda plasmónica apesar da diminuição da intensidade (*Figura 4.12*). No entanto, as AuNPs sintetizadas de 15 nm mostraram terem uma tendência para agregação, mesmo quando mantidas a 4 °C,

Tabela 4.6: Variação da posição da banda plasmónica ao longo do tempo das AuNPs de 15 nm (comerciais e sintetizadas) com o anticorpo Spike S1 (GenScript) imobilizado numa proporção de 1:60.

Tipo de AuNPs	Comprimento de onda máximo (nm)		
	AuNP	AuNP-MUA	AuNP-MUA-Ab
Comerciais	514	524	570
Sintetizadas	522	525	534

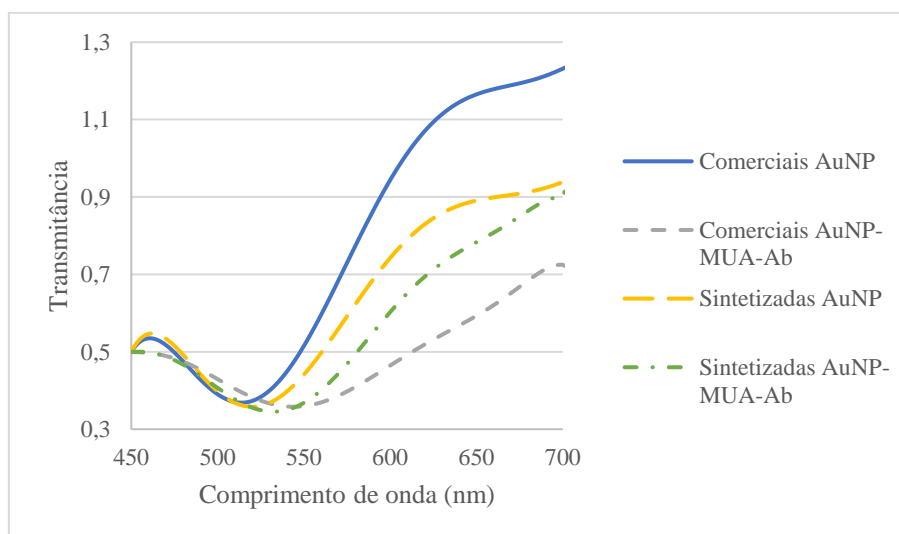


Figura 4.11: Comparação dos espectros de transmitância de AuNPs de 15 nm (comerciais e sintetizadas), antes e após a imobilização do Anticorpo Spike S1 (GenScript), numa proporção de 1:60.

Foram realizados outros ensaios com vista à confirmação destes resultados. Se analisarmos a *Figura 4.12* conseguimos verificar que, mais uma vez, houve um alargamento muito significativo da banda plasmónica das AuNPs comerciais de 15 nm assim como uma diminuição na intensidade das curvas. Contudo, as AuNPs sintetizadas de 15 nm sofreram um ligeiro desvio da banda plasmónica sem um alargamento muito significativo da banda.

As AuNPs comerciais apresentaram melhor estabilidade quando isoladas. Contudo, nas fases seguintes da experiência, as AuNPs apresentaram uma maior tendência para a agregação com o aparecimento de partículas de cor preta ou alteração na tonalidade das soluções. Por outro lado, as AuNPs sintetizadas no laboratório apresentaram uma melhor estabilidade sem problemas de agregação apesar de ter sofrido alterações no seu espectro algumas semanas após a sua síntese. É também importante referir que as AuNPs comerciais estavam muito diluídas, aumentando a dificuldade de obter a solução AuNP-MUA a 8 nM. Após algumas experiências, as experiências passaram a ser realizadas com número de moles em alternativa.

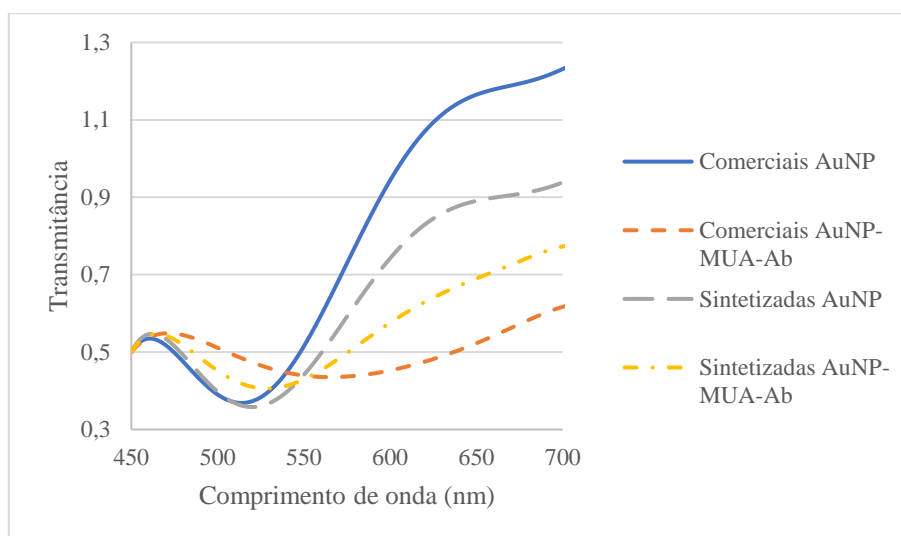


Figura 4.12: Comparação do espectro de transmitância de AuNPs de 15 nm (comerciais e sintetizadas), antes e após a imobilização do Anticorpo Spike S1 (GenScript), numa proporção de 1:60.

4.1.3. Influência do tiol

O estudo sobre a influência do tiol utilizado para a funcionalização das AuNPs foi realizado apenas com AuNPs comerciais de 15 nm e consistiu essencialmente no desvio da banda plasmónica após esta etapa. A funcionalização foi feita numa proporção AuNP:Tiol de 1:5000 e foram utilizadas as seguintes soluções: (i) MUA com diferentes concentrações (1, 5 e 10 mM), (ii) MPA a 10 mM e (iii) uma mistura de MUA:MPA de 1:1 (*Tabela A.9 em Anexo*).

A funcionalização com MPA levou a uma alteração da tonalidade das nanopartículas para um tom negro, enquanto a funcionalização com a mistura MUA:MPA (1:1) levou a uma alteração para uma tonalidade

arroxeada. Após a obtenção destes resultados, a funcionalização passou a ser feita unicamente com MUA, o qual foi testado em diferentes concentrações, para efeitos de otimização do protocolo. As AuNPs funcionalizadas com MUA 1 mM mudaram para um tom escuro após a etapa de crosslinking, enquanto que as AuNPs funcionalizadas com MUA 5 mM mudaram para uma tonalidade escura após esta etapa. Contudo, a funcionalização de AuNPs com MUA 10 mM mostrou produziu AuNPs mais estáveis, que não agregavam tão facilmente. Uma vez que a quantidade de etanol foi a única alteração significativa, estes resultados parecem indicar que as AuNPs que estavam a ser utilizadas tendem a ser mais estáveis em menores concentrações de etanol.

A funcionalização com MUA 10 mM também mostrou melhores resultados (*Tabela 4.7*) de estabilidade ao longo do tempo, sem alterações na tonalidade e sem agregação nas AuNP₁₅ e AuNP₆₀. Contudo, os resultados não foram concordantes para as AuNP₃₀, as quais agregaram na mesma faixa temporal, havendo também uma alteração da sua tonalidade para uma cor escura. Estes resultados foram repetidos sem que as AuNP₃₀ tivessem agregados o que indica que possivelmente houve algum problema de medição inicial que levou à agregação no primeiro ensaio.

Tabela 4.7: Variação da posição da banda plasmónica das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) de acordo com o seu diâmetro, funcionalização e tempo.

Nanopartícula	Tamanho (nm)		
	15	30	60
AuNP	514	519	538
AuNP-MUA (medido a 12/03)	520	522	540
AuNP-MUA (medido a 16/03)	520	575	541

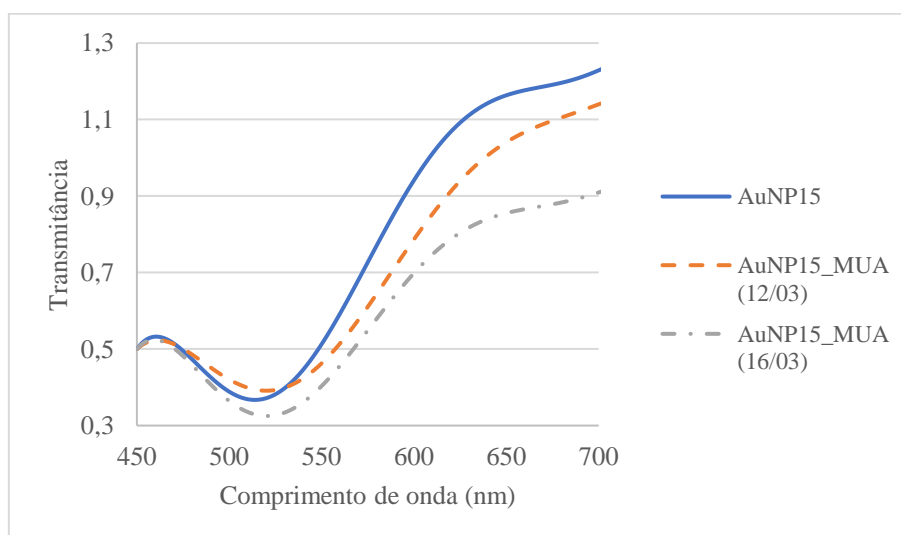


Figura 4.13: Espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA medidas a 12/03 e a 16/03.

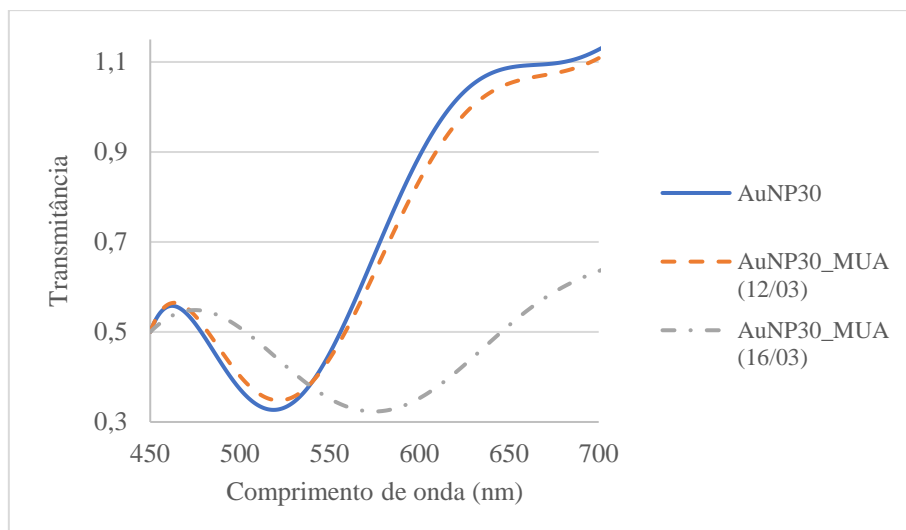


Figura 4.14: Espectro de transmitância das AuNPs de 30 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA medidas a 12/03 e a 16/03 ao longo do tempo.

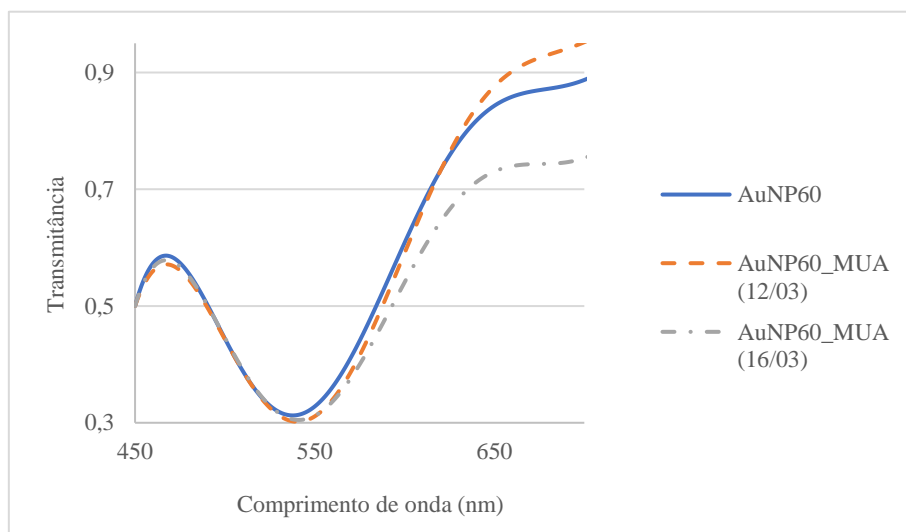


Figura 4.15: Espectro de transmitância das AuNPs de 60 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA medidas a 12/03 e a 16/03.

As AuNP₁₅ sofreram um desvio positivo da banda plasmônica de cerca de 6 nm, após a funcionalização com MUA 10 mM (Figura 4.13). As AuNP₃₀ tiveram uma alteração na tonalidade para um tom violeta após alguns dias, sendo visível no espectro o desvio e alargamento da banda plasmônica (Figura 4.14). As AuNP₆₀ tiveram um pequeno desvio positivo de apenas 2 nm, e não houve alterações significativas no espectro ao longo deste tempo (Figura 4.15)

de acordo com os resultados obtidos, o desvio da banda plasmônica após a etapa de funcionalização com MUA tende a ser mais significativo nas nanopartículas de ouro de 15 nm. Estes resultados sugerem precisamente que, quanto maior a nanopartícula, menor o desvio obtido após a funcionalização com MUA. A partir deste momento, a funcionalização passou a ser feita com MUA 10 mM,

4.1.4. Influência das condições de centrifugação

As condições de centrifugação influenciam a estabilidade das AuNPs ao longo das diferentes etapas do trabalho. Este estudo em particular teve como objetivo melhorar a estabilidade dos bionanoconjugados após esta etapa que tinha favorecido a agregação e a adsorção nas paredes do *ependorf*.

Em experiências anteriores já tinha sido possível verificar que após a etapa de centrifugação, as AuNPs sofriam alterações no seu espectro e, em muitos casos, a tonalidade da amostra alterava para um tom arroxeadado, especialmente, nas AuNPs de 60 nm.

Tabela 4.8: Variação da posição da banda plasmónica das AuNPs de 60 nm comerciais (Cytodiagnosics).

Nanopartícula	AuNPs isoladas	AuNP-MUA	
		(antes da centrifugação)	(após a centrifugação)
Comprimento de onda (nm)	540	544	537

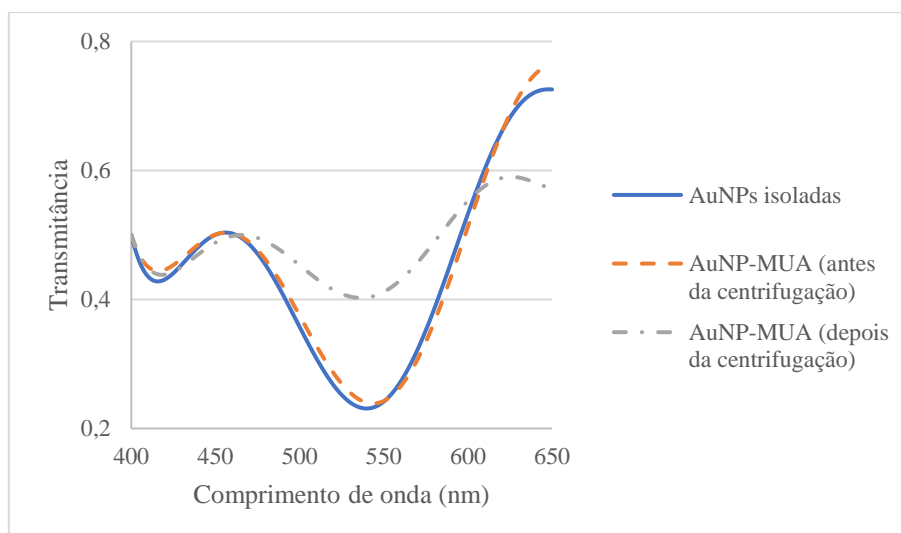


Figura 4.16: Efeito da centrifugação a 4 °C e 2500 rpm durante 10 minutos no espectro de transmitância da solução de AuNP-MUA de 60 nm comerciais (Cytodiagnosics).

Tabela 4.9: Variação da posição da banda plasmónica das AuNPs de 60 nm comerciais (Cytodiagnosics) após a imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:500 e do Ag Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:120.

Solução	AuNP	AuNP-MUA	AuNP-MUA-Ab	AuNP-MUA-Ab-Ag	
				(antes da centrifugação)	(após a centrifugação)
Comprimento de onda (nm)	539	545	549	551	545

Na *Figura 4.16* encontra-se o espectro obtido para as AuNPs comerciais de 60 nm antes e após a funcionalização. Após a etapa de centrifugação para remover o excesso de MUA, a banda plasmónica moveu-se para o lado esquerdo e houve uma alteração na intensidade da banda plasmónica. Na *Figura*

4.17, o espectro mostrou um resultado semelhante em relação à solução AuNP-MUA-Ab-Ag antes e após a etapa de funcionalização onde podemos ver uma alteração significativa no espectro. Tendo em conta os resultados obtidos, considerou-se importante estudar o efeito da velocidade de centrifugação nas AuNPs de 15 nm uma vez que estas apresentavam melhor estabilidade em comparação com outros tamanhos.

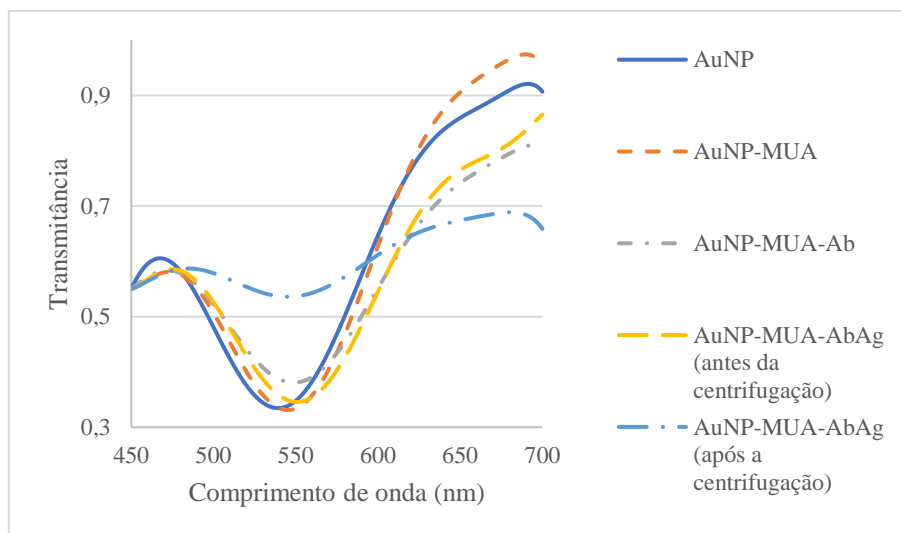


Figura 4.17: Imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:500 e do Ag Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:120 nas AuNPs de 60 nm comerciais (Cytodiagnosics) ao longo do tempo.

4.1.4.1. AuNPs comerciais

A etapa de centrifugação após a funcionalização permite lavar as nanopartículas, removendo o excesso de tiol que não ficou ligado. Ao longo do trabalho foi possível constatar que as condições de centrifugação tinham de ser adaptadas ao trabalho que estava a ser desenvolvido, levando à necessidade de estudar a influência deste parâmetro na solução AuNP-MUA com AuNPs de 15, 30 e 60 nm. Contudo, apenas foi realizado um estudo aprofundado para as AuNPs de 15 nm por estas parecem mais estáveis ao longo do processo.

O primeiro passo consistiu na funcionalização da solução de AuNPs overnight a 4 °C de acordo com o especificado na *Tabela A.10 em Anexo*. De seguida, as soluções AuNP-MUA de 15 nm foram centrifugadas em alíquotas de 500 µL a diferentes velocidades de centrifugação (12651, 11000, 10000 e 9000 rpm) durante 30 minutos de modo a determinar a melhor velocidade de centrifugação. Para que fosse possível comparar as diferentes amostras, todas as soluções obtidas foram ressuspensas na mesma quantidade de tampão MES antes de ser traçado o respetivo espectro de transmitância. Todas as soluções encontravam-se com uma tonalidade rosada (*Figura 4.18*) apesar do aparecimento de algumas partículas de cor negra nas amostras centrifugadas a 12651, 11000 e 10000 rpm.

Segundo o fabricante das AuNPs comerciais, estas deveriam ser centrifugadas a cerca de 12651 rpm. A centrifugação a esta velocidade, as AuNP-MUA mantiveram uma tonalidade rosada pouco intensa com formação de pequenas partículas de cor negra, havendo apenas alterações no espectro após os 700 nm.

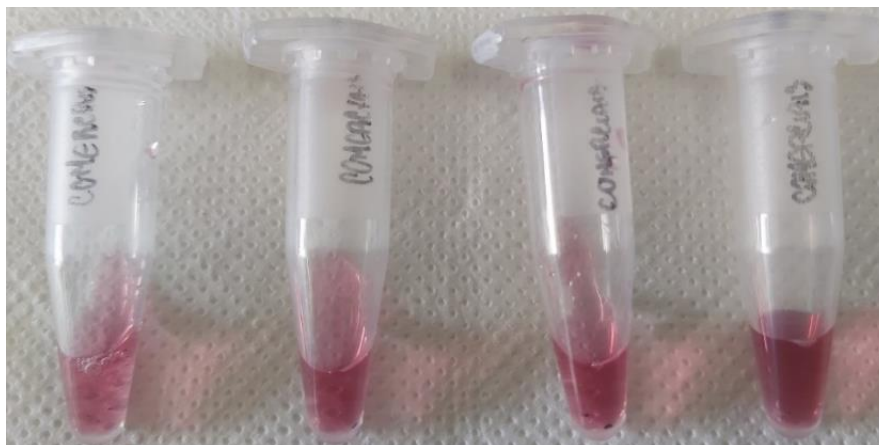


Figura 4.18: Soluções AuNP-MUA com AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) centrifugadas a diferentes velocidades de centrifugação. (Da esquerda para a direita: 12651, 11000, 10000 e 9000 rpm).

Após a centrifugação a 11000 rpm, a solução manteve o tom rosado apesar da formação de partículas de cor negra. Mais uma vez foi visível a alteração do espectro ocorreu a partir dos 700 nm. A centrifugação a 10000 rpm levou a resultados similares com uma solução de tom rosado com partículas de cor escura. Contudo, neste caso, não houve alteração significativa após os 700 rpm.

A centrifugação a 9000 rpm mostrou resultados mais estáveis com uma solução com uma tonalidade avermelhada mais intensa do que as AuNP-MUA centrifugadas a 12651 rpm que demonstra também uma maior concentração de AuNPs. Desta vez, não houve formação de partículas de cor escura e não houve alterações muito significativas no formato do espectro após os 700 nm.

Tabela 4.10: Efeito da centrifugação na razão de agregação, tamanho estimado e concentração das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA.

Solução	Velocidade de centrifugação (rpm)	Razão de Agregação	Tamanho estimado	ϵ_{450}	Concentração (nM)
AuNP-MUA	12651	1.5	10.2	2.18E+08	3.6
	11000	1.4	7.1	2.18E+08	5.2
	10000	1.6	15.0	2.18E+08	5.4
	9000	1.7	16.4	2.18E+08	4.4

Após a obtenção do espectro (Figura 4.19), realizaram-se os cálculos necessários para determinar alguns parâmetros como a razão de agregação, tamanho estimado e a concentração (Tabela 4.10) através da Tabela A.11 do Anexo. Apesar de todas as amostras terem sido centrifugadas durante 30 minutos, as razões de agregação e tamanho estimado obtidas foram distintas.

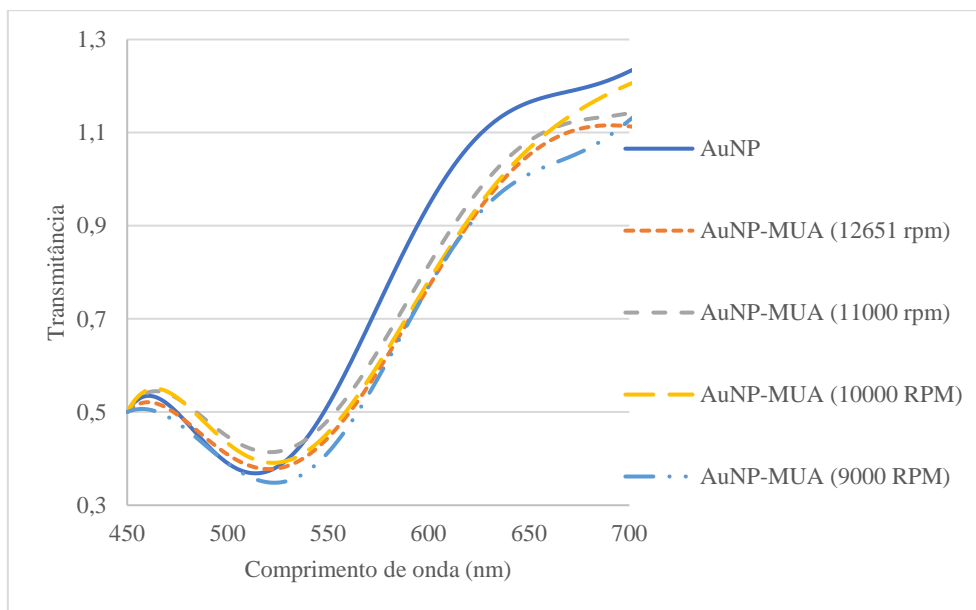


Figura 4.19: Efeito da velocidade de centrifugação no espectro de transmitância obtido das AuNP-MUA de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).

Os resultados das soluções centrifugadas a 12651 e a 11000 rpm levaram a resultados distintos que não coincidem com os valores obtidos para as soluções centrifugadas a 10000 e 9000 rpm uma vez que as soluções centrifugadas a uma maior velocidade de centrifugação tiveram uma razão de agregação e um tamanho estimado mais elevado. Contudo, as nanopartículas a 9000 rpm mostraram uma maior estabilidade uma vez que não houve agregação nem precipitação de AuNPs apesar de não terem sido detetadas alterações significativas no espectro destas AuNPs. Segundo a tabela anterior, a velocidade de centrifugação parece ter alguma influência no comprimento de onda da banda plasmónica, uma vez que as AuNPs centrifugadas a maiores velocidades, tiveram um menos comprimento de onda.

As AuNPs de 15 nm necessitam de condições de centrifugação mais agressivas do que as AuNPs de 30 e de 60 nm que foram centrifugadas durante 10 minutos a 4000 rpm e a 2500 rpm, respetivamente. Apesar da retificação na velocidade de centrifugação, as soluções com AuNPs de 30 e de 60 nm continuaram a agregar mais facilmente, evidenciando a necessidade de retificar outros parâmetros para além da centrifugação.

4.1.4.2. AuNPs sintetizadas

As AuNPs sintetizadas de 15 nm também foram centrifugadas a diferentes velocidades de modo a perceber a influência deste parâmetro ao longo do tempo. As velocidades de centrifugação utilizadas foram as mesmas assim como a solução de MUA 10 mM (*Tabela A.10 em Anexo*) e o tampão MES. Após a centrifugação, todas as nanopartículas de ouro de 15 nm foram ressuspensas em 125 μ L de MES 5 mM a pH 6.5 e foi então traçado o respetivo espectro de transmitância.

Através deste ponto, concluiu-se que a velocidade de centrifugação não teve uma grande influência negativa nestas AuNPs, uma vez que todas as amostras mantiveram a tonalidade avermelhada sem qualquer indício de agregação (*Figura 4.20*). Contudo, para além do desvio da banda plasmónica esperado, houve também uma alteração no espectro após os 650 nm (*Figura 4.21*). No caso das AuNPs caseiras não houve problemas de precipitação visível e as principais diferenças que se notaram foram relativamente ao espectro a partir dos 650 nm. No entanto, a zona relevante para este estudo encontra-se entre os 500 e os 550 nm.

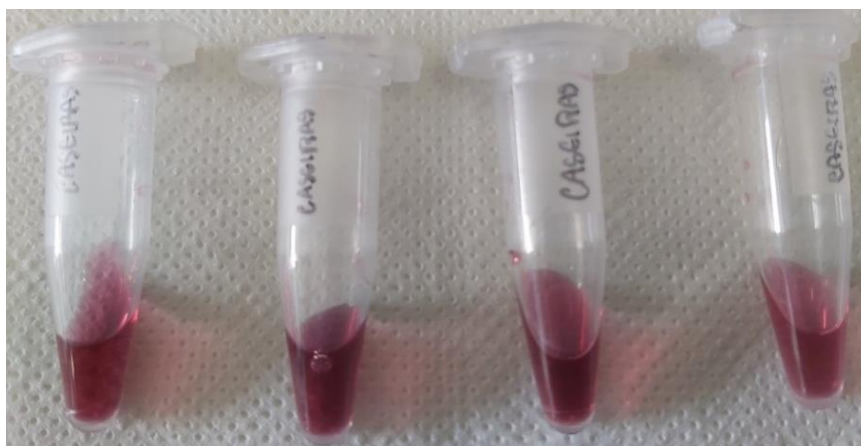


Figura 4.20: Soluções AuNP-MUA com AuNPs sintetizadas de 15 nm centrifugadas a diferentes velocidades de centrifugação. (Da esquerda para a direita: 12651, 11000, 10000 e 9000 rpm).

Após a obtenção do espectro (*Figura 4.21*), realizaram-se os cálculos necessários para determinar alguns parâmetros como a razão de agregação, tamanho estimado e a concentração (*Tabela 4.11*) através da *Tabela A.12 do Anexo*. Apesar de todas as amostras terem sido centrifugadas durante 30 minutos, as razões de agregação e tamanho estimado obtidas foram distintas.

Tabela 4.11: Efeito da centrifugação na razão de agregação, tamanho estimado e concentração das AuNPs de 15 sintetizadas no laboratório após funcionalização com MUA.

Solução	Velocidade de centrifugação (rpm)	Razão de Agregação	Tamanho estimado	ϵ_{450}	Concentração (nM)
AuNP-MUA	12651	1.6	15.2	2.18E+08	3.1
	11000	1.8	21.7	2.18E+08	10.2
	10000	1.6	11.9	2.18E+08	10.1
	9000	1.7	15.8	2.18E+08	10.7

*o parâmetro ϵ_{450} é o coeficiente de extinção molar.

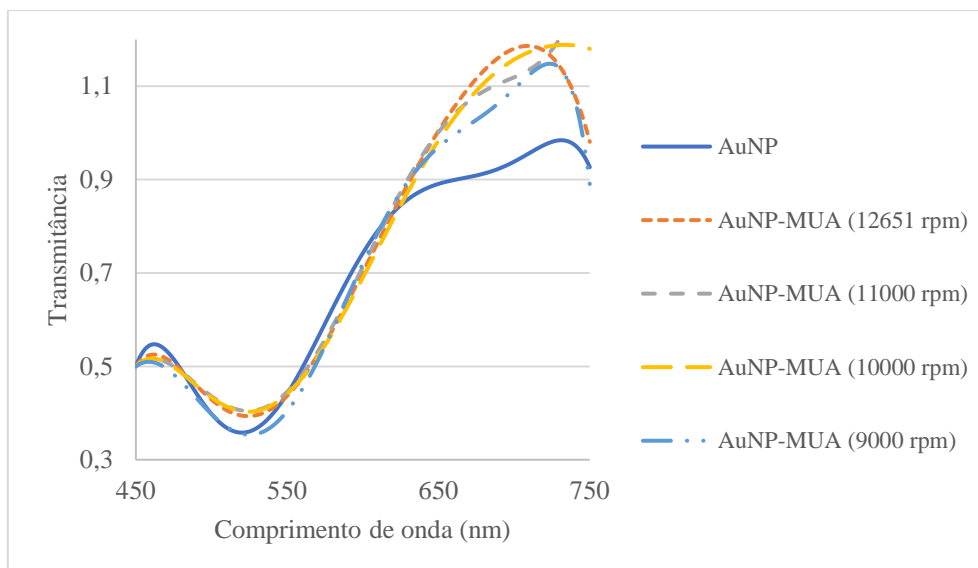


Figura 4.21: Espectros de transmitância da solução de AuNP-MUA de 15 nm comerciais centrifugada a diferentes velocidades.

4.1.4.3. Comparação da centrifugação das AuNPs comerciais e sintetizadas

A velocidade de centrifugação tem uma elevada influência no formato do espectro da transmitância das nanopartículas. Os resultados obtidos sugerem que a agregação é fortemente favorecida por uma elevada velocidade de centrifugação.

O ponto mais importante é que as AuNPs comerciais foram mais estáveis a velocidades mais baixas, ao contrário do que é referido pelo fabricante que indica uma velocidade de 12651 rpm, uma vez que nestas condições houve alteração do espectro da transmitância e houve alguma agregação. No entanto, não houve alterações significativas no espectro que impossibilitem a utilização destas nanopartículas e, como tal, as soluções que continham partículas escuras foram filtradas e armazenadas pois não houve qualquer alteração no espectro que impossibilite a sua posterior utilização. Através dos gráficos acima é também possível concluir que as nanopartículas comerciais estáveis, visto que o seu espectro de transmitância não sofreu alterações muito significativas ao longo do tempo. Contudo, os resultados não foram coincidentes após a imobilização do anticorpo tal como foi falado no ponto 4.1.2.

Relativamente às AuNPs sintetizadas no laboratório, houve uma alteração no espectro após os 650 nm que não pareceu significativa pois fica fora da zona de interesse. A banda plasmónica manteve-se nos mesmos valores na maioria dos ensaios, o que sugere uma elevada estabilidade destas AuNPs quando submetidas a diferentes velocidades de centrifugação. Contudo, o desvio da banda plasmónica foi significativamente inferior no caso das AuNP-MUA sintetizadas no laboratório centrifugadas a 9000 rpm.

Tabela 4.12: Efeito da velocidade de centrifugação na banda plasmônica obtido nas AuNPs de 15 nm (comerciais e sintetizadas) funcionalizadas com MUA.

Solução	Comprimento de onda (nm)			
	12651	11000	10000	9000
Comerciais	AuNPs isoladas		514	
	AuNP-MUA	522	524	525
Sintetizadas	AuNPs isoladas		521	
	AuNP-MUA	527	527	527

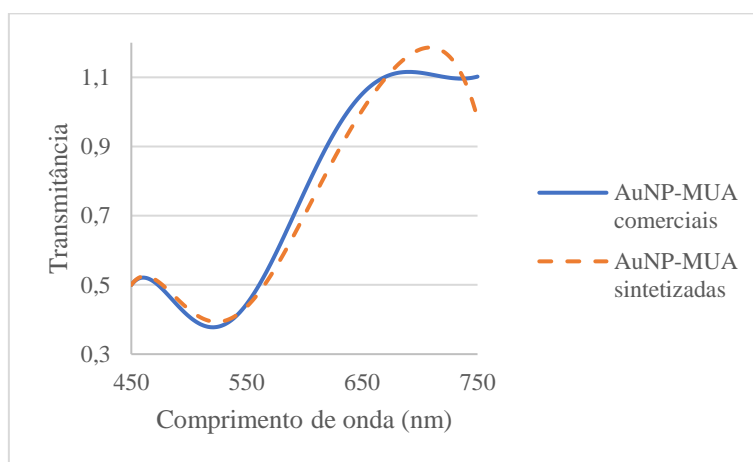


Figura 4.22: Comparação entre a centrifugação a 12651 rpm utilizando diferentes tipos de AuNP.

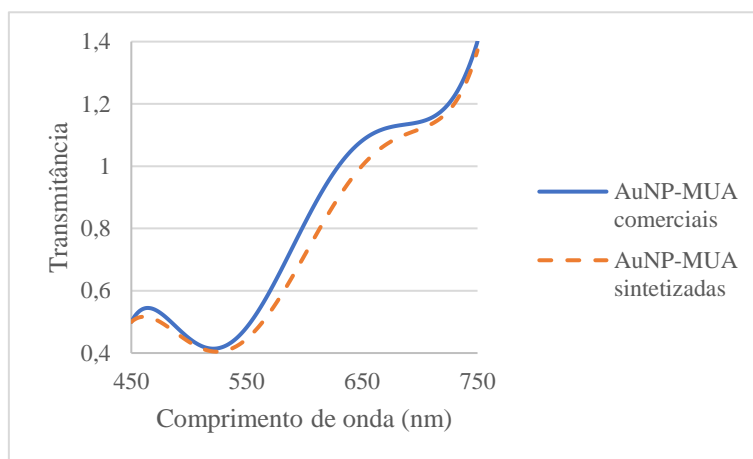


Figura 4.23: Comparação entre a centrifugação a 11000 rpm utilizando diferentes tipos de AuNP.

Se compararmos diretamente os diferentes espectros consoante a velocidade de centrifugação (Figuras 4.22 a 4.25) utilizada é possível concluir que os espectros das soluções AuNP-MUA centrifugadas a 9000 rpm (Figura 4.22) eram similares sem que tenha existido alterações muito significativas no alargamento do espectro. Tendo em conta os espectros obtidos, as AuNPs sintetizadas de 15 nm têm

uma maior sensibilidade a condições de centrifugação mais agressivas. Por outro lado, as AuNPs comerciais de 15 nm mostraram uma maior estabilidade, uma vez que não houve alterações significativas nos diferentes espectros.

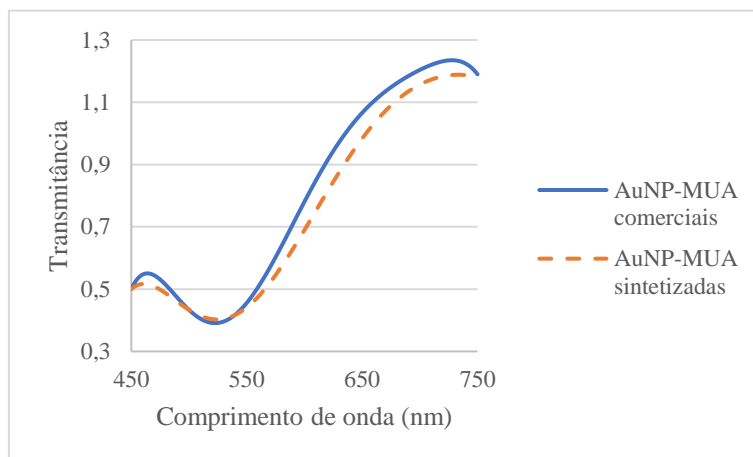


Figura 4.24: Comparação entre a centrifugação a 10000 rpm utilizando diferentes tipos de AuNP.

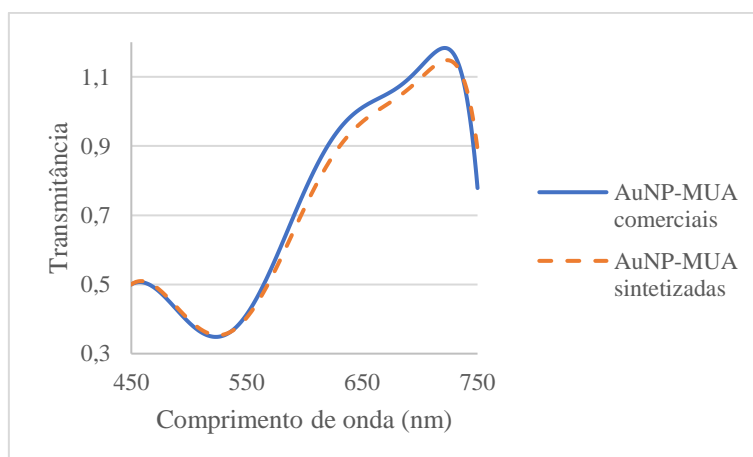


Figura 4.25: Comparação entre a centrifugação a 9000 rpm utilizando diferentes tipos de AuNP.

O espectro obtido após a centrifugação a 9000 rpm (*Figura 4.22*) foi muito idêntico para os dois tipos de nanopartículas, mostrando uma boa estabilidade nestas condições.

As soluções que foram centrifugadas posteriormente continuavam com uma tonalidade muito rosada e, como tal, concluiu-se que a duração da centrifugação não seria a mais apropriada. Após alguns estudos de estabilidade, concluiu-se que as AuNP-MUA deviam ser divididas em alíquotas de 500 μ L e então centrifugadas a 4 $^{\circ}$ C e 9500 rpm durante 20 minutos. Esta alteração permitiu que houvesse uma separação mais eficaz num menor espaço de tempo. Relativamente às soluções AuNP-MUA-Ab ou AuNP-MUA-Ab-Ag, a centrifugação passou a ser feita a 4 $^{\circ}$ C e 9000 rpm durante 15 minutos para uma separação total. É também de notar que em muitos ensaios houve uma adsorção muito significativa nas

paredes do *ependorf* após esta etapa de centrifugação assim como alterações no espectro de transmitância.

4.1.5. Influência do crosslinking

A etapa de crosslinking com EDC e NHS permite melhorar a eficácia e a estabilidade da imobilização do ERB à superfície das AuNPs. Existem muitos protocolos distintos nesta área sendo que em alguns é incluída uma etapa de lavagem, o modo de preparação dos reagentes, a quantidade de reagentes e a forma de aplicação. Neste ponto, estudou-se a influência desta etapa na estabilidade das AuNPs.

4.1.5.1. Etapa de limpeza

Foi realizada uma experiência com um protocolo alternativo que consistia na lavagem das AuNPs após a etapa de crosslinking. Contudo, esta etapa adicional de centrifugação (utilizando as condições previamente descritas) não mostrou resultados satisfatórios, uma vez que após a centrifugação, a amostra ficou com uma tonalidade escura e detetou-se um alargamento significativo no espectro de transmitância.

A etapa adicional de centrifugação não foi benéfica para as AuNPs e, como podemos ver na *Figura 4.26* e na *Tabela 4.13*, favoreceu a agregação. A partir deste momento, todas as experiências foram realizadas sem esta etapa.

Tabela 4.13: Variação da banda plasmônica ao longo do tempo.

Solução	AuNP	AuNP-MUA	AuNP-MUA-EDC/NHS	
			(antes da centrifugação)	(após a centrifugação)
Comprimento de onda (nm)	514	523	576	583

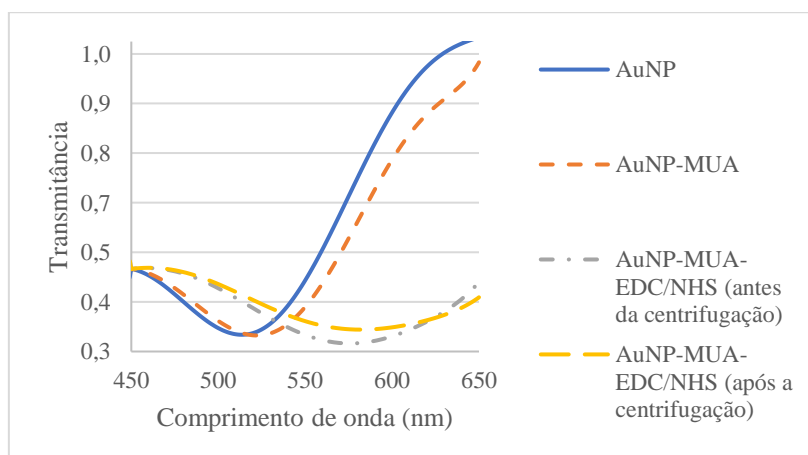


Figura 4.26: Efeito da etapa de lavagem no espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) ao longo do tempo.

4.1.5.2. Volume de EDC e de NHS

Como referido anteriormente, houve um estudo prévio que permitiu concluir que a etapa de crosslinking deveria ser realizada com 50 μL de EDC 1 mM e 100 μL de NHS 1 mM para AuNPs de 15 nm a 8 nM. Contudo, ao longo das experiências verificou-se que as AuNPs comerciais de 30 e de 60 nm agregavam muito facilmente após a adição do anticorpo e do tampão PBS em algumas situações. Os resultados sugeriram que estes problemas de agregação poderiam estar relacionados com a quantidade de EDC e de NHS utilizadas. Como tal, foram realizadas algumas experiências com diferentes quantidades destes reagentes de modo a verificar a sua influência na estabilidade das AuNPs.

A verificação deste ponto foi realizada com AuNPs comerciais de 30 e de 60 nm e a única alteração feita ao protocolo consistiu na alteração do volume de EDC e NHS utilizado. Num dos ensaios, o volume destes reagentes foi adaptado consoante a concentração das AuNPs e, no outro ensaio, utilizaram-se 50 μL de EDC e 100 μL .

Tabela 4.14: Variação das AuNPs de 30 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA com diferentes quantidades de EDC e NHS.

Solução	AuNP	AuNP- MUA	AuNP-MUA-Ab
Quantidades Fixas	520	524	527
Quantidades Adaptadas	520	524	602

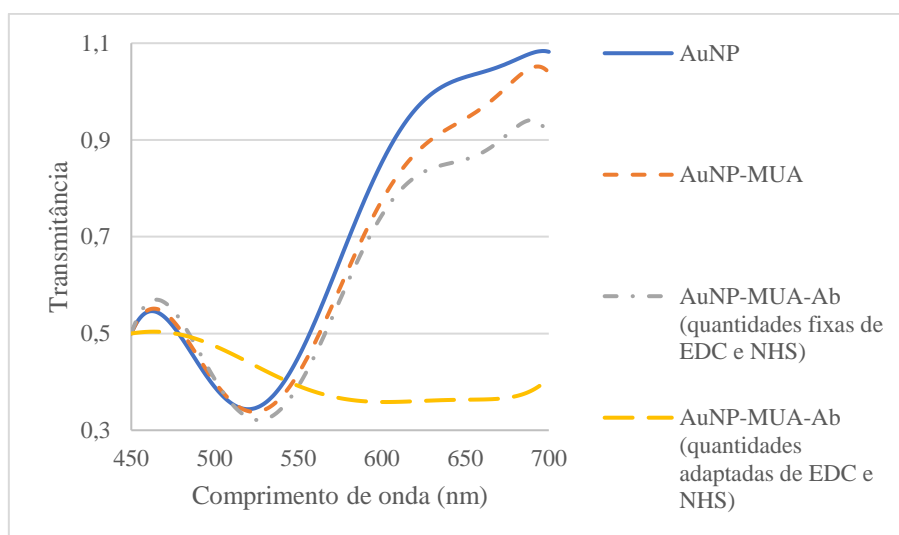


Figura 4.27: Influência da quantidade de EDC 1 mM e de NHS 1 mM no espectro de transmitância das AuNPs de 30 nm comerciais (Cytodiagnosics) com o Ab Spike S1 (Genscript) imobilizado numa proporção de 1:60.

O espectro de transmitância obtidos foram muito distintos e mostram que a quantidade de EDC e de NHS tende a influenciar a estabilidade das AuNPs. Na *Figura 4.27* encontra-se o espectro de transmitância da experiência com 50 μL de EDC 1 mM e 100 μL de NHS 1 mM e com as quantidades de EDC 1 mM e de NHS 1 mM reduzidas de modo a compensar a baixa concentração destas AuNPs

(Tabela A.17 em Anexo). No primeiro caso, houve uma linearidade nos resultados obtidos com um desvio de 4 nm após a funcionalização e de 3 nm após a imobilização do anticorpo (Tabela 4.14). Contudo, no segundo espectro podemos ver que logo após a funcionalização as AuNPs encontravam-se com um desvio da banda plasmónica, mas, após a adição do anticorpo, houve uma alteração para uma tonalidade arroxeadada que se intensificou após a centrifugação.

Ao longo de todo o trabalho, foram feitas mais experiências similares que mostraram que, de facto, o EDC e o NHS influenciam os resultados obtidos. Todos os ensaios tiveram melhores resultados quando se utilizava 50 µL de EDC 1 mM e 100 µL de NHS 1 mM. Teria sido interessante fazer mais experiências com diferentes quantidades de modo a verificar se haveria uma maior estabilidade ao longo do tempo utilizando, por exemplo, uma maior quantidade destes reagentes.

4.1.5.3. Modo de preparação dos agentes de acoplamento

Numa fase inicial do trabalho, as soluções de EDC e NHS que estavam utilizadas encontravam-se já preparadas, mas com o passar do tempo notaram-se alterações no espectro de transmitância das amostras preparadas e alguns problemas de agregação. Através da literatura concluiu-se que os agentes de acoplamento poderiam ser uma das causas destas alterações. O EDC é altamente solúvel em água e perde rapidamente a sua atividade quando se encontra em solução. Por esse motivo é aconselhável que este composto seja preparado pouco antes da sua utilização de modo a garantir a sua eficácia. Contudo, o NHS apesar de ser solúvel em água não perde a sua atividade tão rapidamente.

O estudo da influência da preparação dos agentes de acoplamento começou com uma comparação entre a utilização de reagente recém preparados e reagentes preparados anteriormente (os volumes utilizados encontram-se na Tabela A.20 em Anexo). O EDC e NHS recém preparado mostrou levar a resultados mais satisfatórios sem a alteração do espectro de transmitância obtido (Figura 4.28) e sem problemas de agregação. Contudo, a utilização de EDC e NHS previamente preparado levou a uma alteração do formato do espectro de transmitância assim como uma alteração da tonalidade após a adição do anticorpo e do tampão PBS. Se verificarmos a informação que consta na Tabela 4.15 é possível constatar que não houve desvio da banda plasmónica após a adição do EDC e do NHS recém preparado, mas houve uma alteração de 5 nm após a adição destes reagentes previamente preparados.

Tabela 4.15: Influência da utilização de EDC e NHS recém preparados na banda plasmónica das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório.

Solução	AuNP	AuNP-MUA	AuNP-MUA-EDC/NHS	
			(EDC e NHS recém preparados)	(EDC e NHS já preparados)
Comprimento de onda (nm)	520	524	524	529

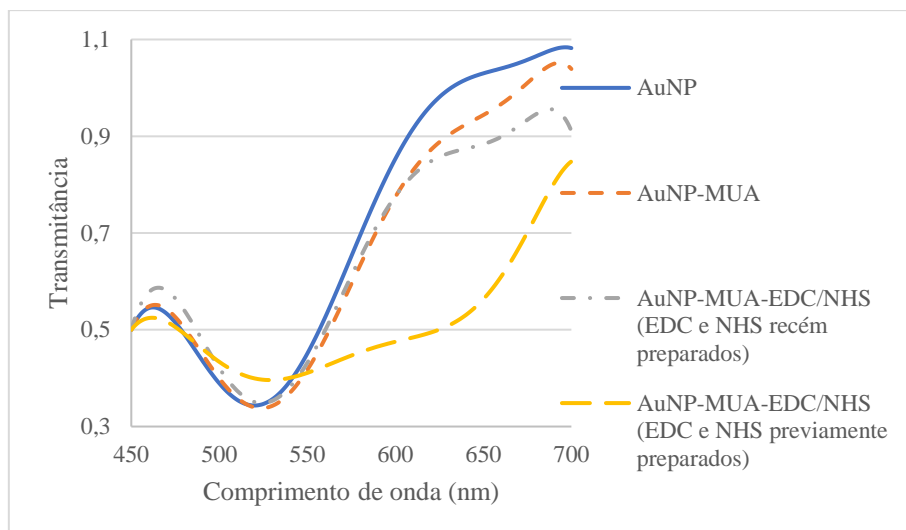


Figura 4.28: Influência da utilização de EDC e NHS recém preparados no espectro de transmitância das AuNPs ao longo do tempo.

De facto, esta parece ser a tendência quando não se utilizam reagentes recém preparados em todos os ensaios que foram realizados, havendo um desvio da banda plasmónica juntamente com uma alteração do formato do espectro de transmitância. Os resultados indicam que, tal como era de esperar, os agentes de acoplamento influenciam a estabilidade das nanopartículas, sendo importante utilizar reagente recém preparados de modo a melhorar os resultados. Contudo, os resultados obtidos ao longo do tempo mostram que o NHS é mais estável e que não necessita de ser preparado previamente.

De acordo com a literatura, o EDC e o NHS podem ser preparados com água miliQ ou com soluções-tampão como é o caso do tampão PBS e do tampão MES. Numa fase inicial deste projeto, estes reagentes estavam a ser preparados com água miliQ à temperatura ambiente. No entanto, o tampão MES tem sido muito utilizado em biossensores LSPR, conferindo uma maior estabilidade ao longo do tempo.

Nesta fase do trabalho, os reagentes foram preparados com água miliQ e com tampão MES 5 mM a pH 6.5 (de acordo com os volumes apresentados na *Tabela A.20 em Anexo*).

Tabela 4.16: Influência do solvente utilizado na preparação dos agentes de acoplamento nos comprimentos de onda (nm) obtidos ao longo do tempo.

Solução	Comprimento de onda (nm)		
	AuNP	AuNP-MUA	AuNP-MUA-Ab
EDC e NHS preparados com água miliQ	519	524	529
EDC e NHS preparados com tampão MES 5 mM a pH 6.5	519	524	529

Através da análise da *Figura 4.29* é possível verificar que a solução AuNP-MUA apresenta um espectro similar com um desvio da banda plasmónica de 5 nm após a funcionalização (*Tabela 4.16*) com um

desvio um desvio de 5 nm após a imobilização do anticorpo em ambos os casos, mas o alargamento da banda plasmónica foi mais significativo na solução onde foi utilizada água miliQ na preparação dos reagentes.

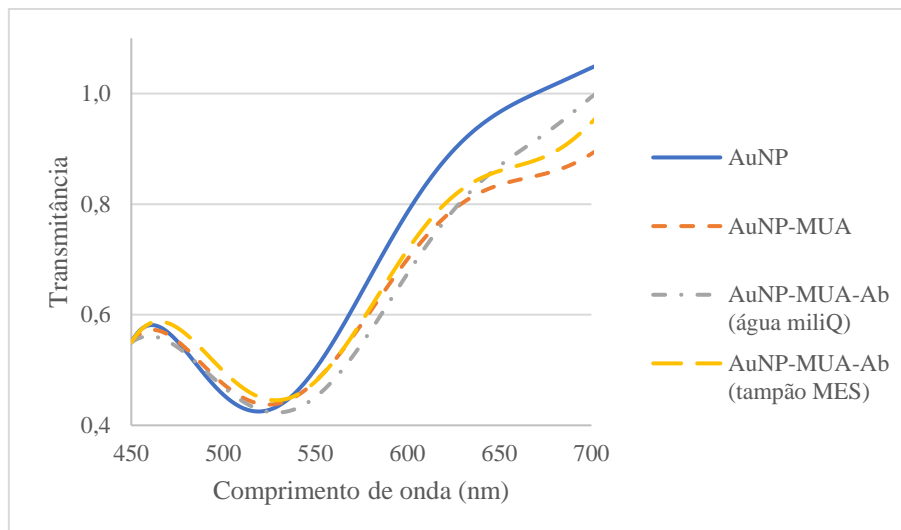


Figura 4.29: Influência do solvente utilizado na preparação dos agentes de acoplamento na Imobilização do Anticorpo.

As experiências foram repetidas e foram obtidos resultados mais satisfatórios aquando da utilização de tampão como solvente. De acordo com os resultados obtidos, a água miliQ tende a favorecer a agregação das AuNPs apesar de não ter sido detetada qualquer alteração na tonalidade da amostra, o eppendorf onde esta amostra foi centrifugada encontrava-se ligeiramente rosada, indicando que houve adsorção nas paredes do eppendorf. Contudo, esta adsorção não foi tao significativa na solução AuNP-MUA-Ab preparada com tampão MES. A partir deste momento, o tampão MES passou a ser utilizado como solvente.

4.1.6. Influência do elemento de reconhecimento biológico

O elemento de reconhecimento biológico (ERB) permite distinguir o tipo de teste que se pretende obter. Num teste antigénio, o objetivo é detetar na presença do antigénio através da bioespecificidade entre o anticorpo imobilizado à superfície do transdutor e o antigénio existe na amostra do paciente. Por outro lado, num teste anticorpo, o objetivo é detetar a presença de um anticorpo através da bioespecificidade entre o antigénio imobilizado à superfície do transdutor e o anticorpo presente na amostra do paciente.

O objetivo deste trabalho consiste no desenvolvimento de um teste antigénio que permita detetar o SARS-CoV-2. Contudo, numa fase inicial do trabalho, procedeu-se também à imobilização do antigénio em primeiro lugar de modo a verificar a possibilidade do desenvolvimento de um teste de anticorpo. O primeiro passo consistiu na funcionalização das nanopartículas de ouro, seguindo-se a etapa de

crosslinking e a imobilização do elemento de reconhecimento biológico de acordo com a *Tabela A.23 em Anexo*.

Em ambos os casos, houve um desvio e um alargamento da banda plasmónica (*Figura 4.30*), sendo este mais significativo no caso da imobilização do Anticorpo Spike S1 da GenScript. No caso do anticorpo, o desvio obtido foi de 6 nm após a funcionalização com MUA e de 18 nm após a imobilização do anticorpo enquanto que no caso do Antígeno Spike S1, houve um desvio de 6 nm após a funcionalização e de 11 após a imobilização do antígeno (*Tabela 4.17*). Apesar de ter existido um alargamento da banda plasmónica em ambos os casos, na experiência com o antígeno, houve ainda uma alteração no formato do espectro de transmitância.

Tabela 4.17: Influência do ERB na variação da banda plasmónica das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) após imobilização numa proporção de 1:120.

Solução	Comprimento de onda (nm)		
	AuNP	AuNP-MUA	AuNP-MUA-ERB
Anticorpo Spike S1	514	520	538
Antígeno Spike S1	514	520	531

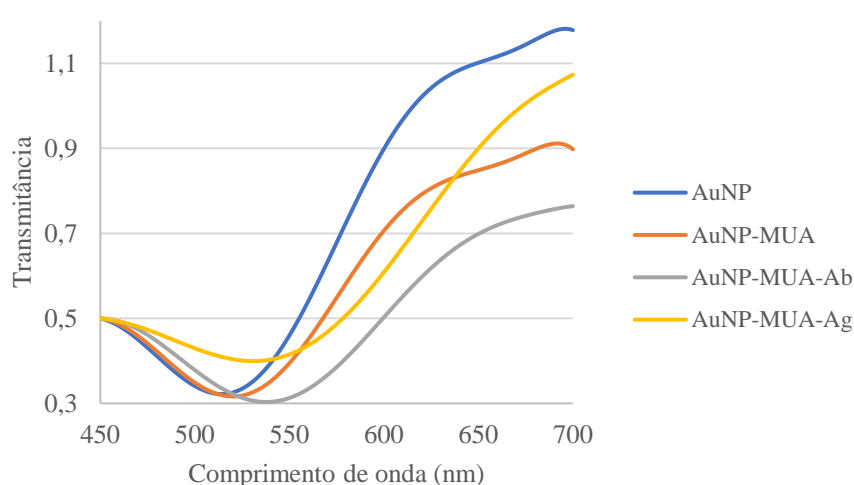


Figura 4.30: Influência do ERB no espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) após imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:120.

As experiências realizadas sugerem que o ERB influencia o formato do espectro de transmitância e explicam algumas alterações nos espectros que foram detetadas noutras experiências. Uma vez que houve uma alteração significativa do espectro obtido após a imobilização do antígeno como ERB, não foram realizadas experiências com a adição do antígeno de forma a obter um teste de anticorpo.

4.1.7. Influência do anticorpo

4.1.7.1. Anticorpo imobilizado

Os dois anticorpos disponíveis no laboratório foram estudados de modo a perceber a influência do anticorpo na estabilidade das nanopartículas e qual o mais adequado para o trabalho em estudo. Foram utilizados dois anticorpos diferentes: Spike S1 da GenScript e RBD da R&D Systems. Após a funcionalização com MUA e a etapa de *crosslinking* com EDC e NHS, os anticorpos foram adicionados de acordo com o exposto na *Tabela A.26 do Anexo*.

O anticorpo RBD levou a uma alteração na tonalidade para um tom arroxeadado e um alargamento muito significativo da banda plasmônica (*Figura 4.30*) em todos os ensaios que foram realizados com um desvio de 10 nm após a funcionalização e de 31 nm após a imobilização do anticorpo (*Tabela 4.18*). Contudo, o anticorpo Spike S1 deu melhores resultados com um desvio de 4 nm após a imobilização do anticorpo (*Tabela 4.18*) e sem alterações no formato da curva obtida ou na tonalidade da amostra (*Figura 4.31*).

Tabela 4.18: Influência do Ab imobilizado na variação da posição da banda plasmônica ao longo do tempo.

Anticorpo	Comprimento de onda (nm)		
	AuNP	AuNP-MUA	AuNP-MUA-Ab
RBD	515	525	556
Spike	515	525	529

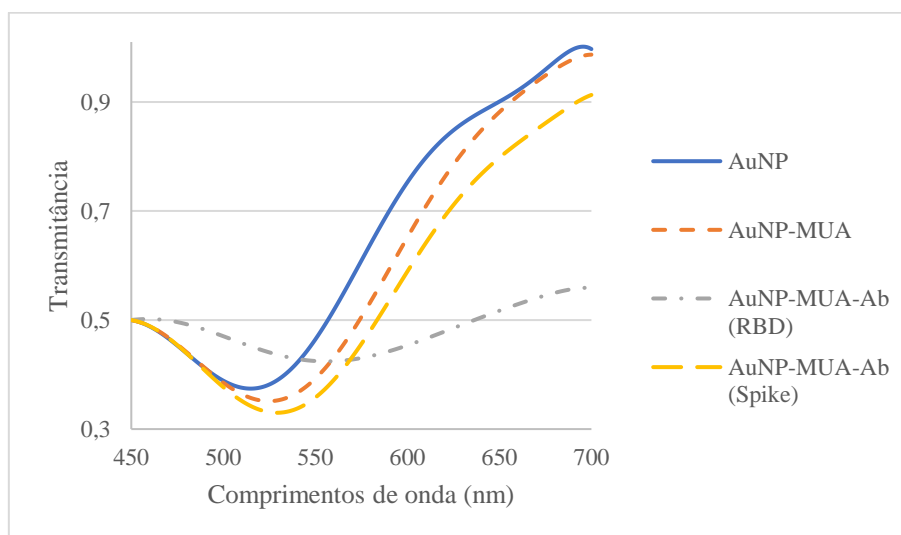


Figura 4.31: Influência do Ab imobilizado no espectro de transmitância obtido.

Após a análise das imagens obtidas por TEM concluiu-se que as AuNPs com o Ab Spike S1 imobilizado encontravam-se isoladas sendo ainda possível detetar uma camada à volta das AuNPs (*Figura 4.32*).

Mas, por outro lado, as AuNPs com o Ab RBD imobilizado estavam agregadas, sendo visível a formação de aglomerados (*Figura 4.33*).

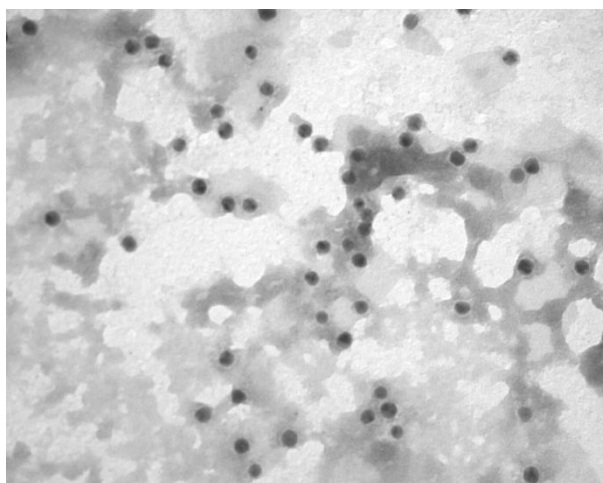


Figura 4.32: Imagem TEM das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA e com o Ab Spike S1 (GenScript) imobilizado numa proporção de 1:120. Ampliação: 100kx.

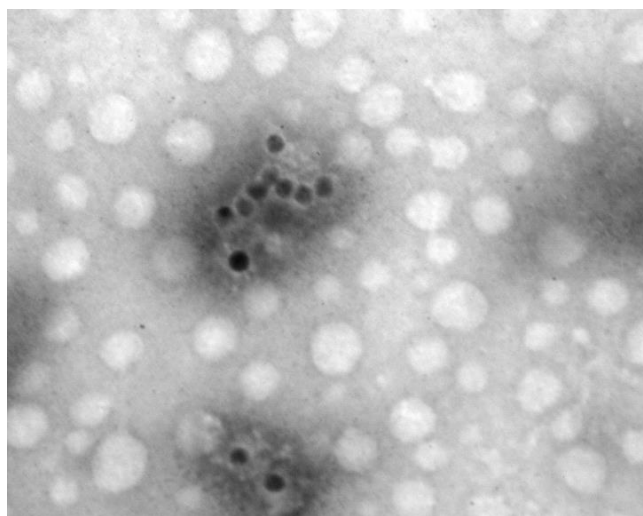


Figura 4.33: Imagem TEM AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) funcionalizadas com MUA e com o Ab RBD (R&D Systems) imobilizado numa proporção de 1:120. Ampliação: 100kx.

Através dos resultados obtidos foi possível concluir que o Ab Spike S1 permite obter um desvio da banda plasmónica sem alteração na curva obtida ou na tonalidade da amostra. Contudo, este desvio não foi significativamente elevado, estando dentro do erro do aparelho utilizado. Por outro lado, o anticorpo RBD levou à alteração na tonalidade da amostra e a um alargamento significativo da banda plasmónica que indica agregação tal como foi possível verificar após a análise da imagem obtida por TEM. Os ensaios que se seguiram foram realizados com o anticorpo Spike S1.

4.1.7.2. Proporção de Anticorpo

O anticorpo Spike S1 da GenScript foi o mais utilizado ao longo das várias experiências pois mostrou uma boa reprodutibilidade e estabilidade ao longo do tempo.

Utilizaram-se diferentes proporções de anticorpo para determinar à proporção que levava a melhores resultados. A experiência inicial foi realizada com duas proporções distintas de 1:60 e 1:120 (de acordo com o expresso na *Tabela A.29 em Anexo*) que permitiu concluir que esta variável tem influência no desvio da banda plasmónica obtido (*Figura 4.34*).

O desvio da banda plasmónica após a imobilização do anticorpo Spike S1 numa proporção de 1:60 foi de 6 nm e de 15 nm no caso da imobilização numa proporção de 1:120 (*Tabela 4.19*). Concluiu-se então que o desvio da banda plasmónica tende a ser inversamente proporcional à proporção de anticorpo utilizada. Para além do desvio obtido, concluiu-se ainda que a reação tende a ser mais rápida quando é utilizada uma maior quantidade de anticorpo, ou seja, o desvio da banda plasmónica pode ser detetado mais rapidamente.

Tabela 4.19: Influência da proporção do Ab Spike S1 (GenScript) na variação da banda plasmónica das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).

Solução	Comprimento de onda (nm)		
	AuNP	AuNP-MUA	AuNP-MUA-Ab
Proporção 1:60	515	523	529
Proporção 1:120	515	523	538

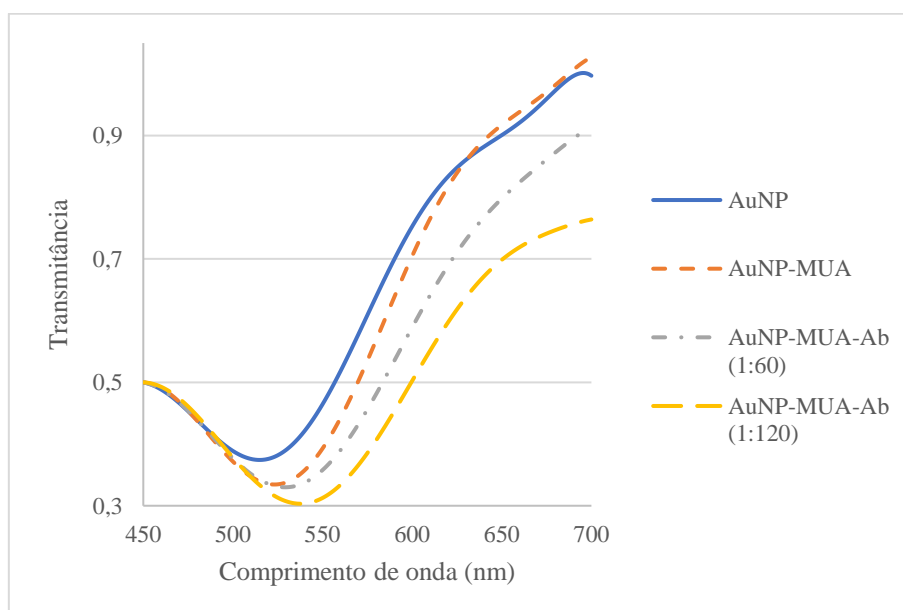


Figura 4.34: Influência da proporção do Ab Spike S1 (GenScript) no espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).

Posteriormente foi feito um novo estudo com outras proporções de modo a perceber o efeito da proporção na estabilidade das AuNPs. Desta vez o estudo foi realizado com AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório com o Ab Spike S1 imobilizado em diferentes proporções (1:25, 1:50, 1:75 e 1:100) utilizando os volumes expressos na *Tabela A.32 em Anexo*. Os resultados que se encontram na *Tabela 4.20* permitem verificar que o desvio parece aumentar à medida que se aumenta a proporção de anticorpo sem que existam alterações significativas no formato da curva (*Figura 4.35*).

Apesar desta experiência ter sido repetida, não foi possível obter desvios significativos da banda plasmónica sendo que, na maioria dos casos, as AuNPs não sofriam qualquer desvio ou levavam a resultados pouco lineares. Um desses exemplos encontra-se na *Figura 4.36* onde é possível verificar que a proporção 1:25 levou a um alargamento muito significativo da banda plasmónica devido ao uso de uma solução de anticorpo previamente diluída e um desvio de 22 nm da banda plasmónica (*Tabela 4.21*). As proporções 1:75 e 1:100 levaram a um desvio negativo de 2 e de 5 nm, respetivamente. A única experiência que levou a um desvio positivo foi a proporção de 1:50 com um desvio de 7 nm. Ao longo das várias experiências, concluiu-se que as proporções mais estáveis eram de 1:50 e de 1:60 uma vez que era possível detetar um desvio da banda plasmónica sem que houvesse agregação.

Tabela 4.20: Comprimento de onda (nm) das AuNPs caseiras de 15 nm antes e após a imobilização do Anticorpo Spike S1 em diferentes proporções.

Solução	AuNP	AuNP-MUA	AuNP-MUA-Ab			
			1:25	1:50	1:75	1:100
Comprimento de onda (nm)	519	525	524	526	525	528

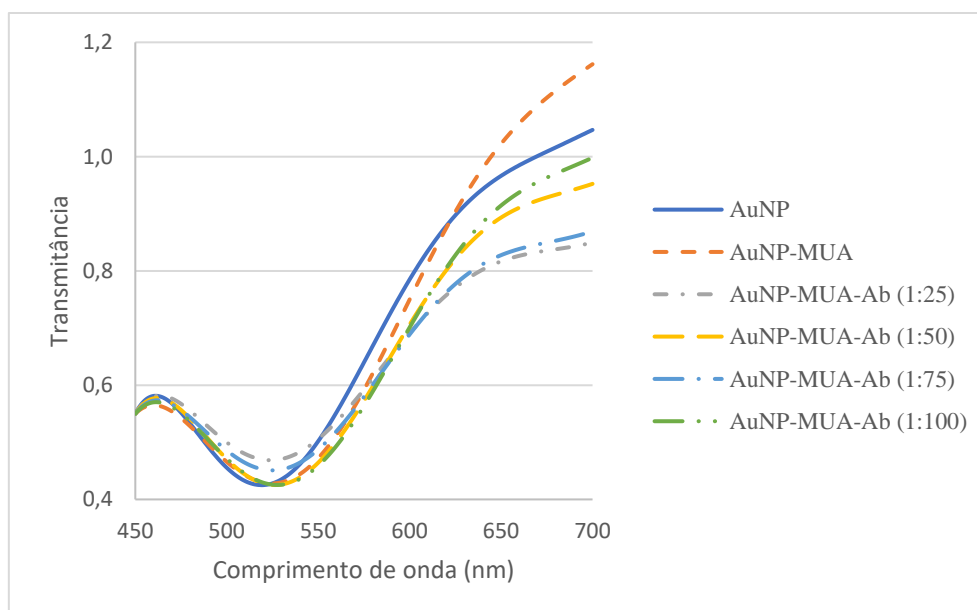


Figura 4.35: Efeito da proporção de Ab Spike S1 (GenScript) no espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório.

O estudo com diferentes proporções mostrou que existe uma grande tendência para a agregação quando são utilizadas proporções muito reduzidas de anticorpo. Através das diferentes experiências foi possível encontrar alguns parâmetros que favorecem a agregação das AuNPs como as características dos reagentes como o EDC e o NHS, a quantidade de tampão PBS que foi utilizada para perfazer um volume de 500 μ L em todas as amostras, a etapa de centrifugação, entre outras.

Este estudo foi repetido utilizando as mesmas proporções e as mesmas AuNPs funcionalizadas com MUA de modo a confirmar estes resultados. Desta vez utilizaram-se os volumes apresentados na *Tabela A.36*.

Tabela 4.21: Comprimento de onda (nm) das AuNPs caseiras de 15 nm antes e após a imobilização do Anticorpo Spike S1 em diferentes proporções.

Solução	AuNP	AuNP-MUA	AuNP-MUA-Ab*			
			1:25	1:50	1:75	1:100
Comprimento de onda (nm)	521	529	551	536	527	524

* Proporções de AuNP-MUA:Ab utilizadas

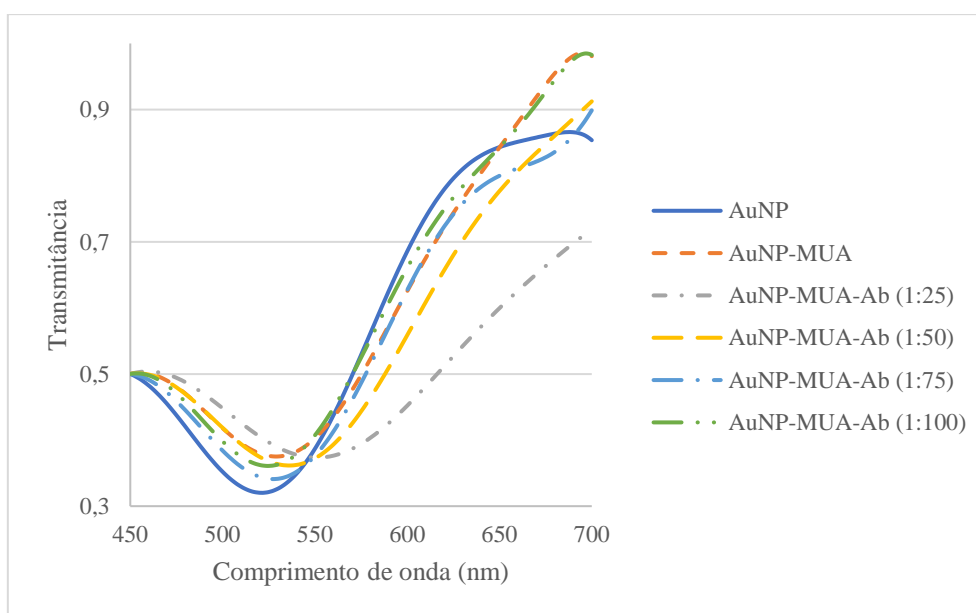


Figura 4.36: Espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório com o anticorpo Spike S1 em diferentes proporções.

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para verificar o tamanho das AuNPs tal como aconteceu no ponto 4.1.2., desta vez utilizando AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório. No gel de agarose (Figura 4.37), os poços 1 e 3 que continham as AuNP de 15 nm funcionalizadas com mais do que as restantes amostras. No entanto, a amostra 3 migrou um pouco mais quando comparada com a amostra 1, o que indica que estas partículas são ligeiramente mais pequenas. As amostras de AuNP-MUA-Ab numa proporção 1:25 e 1:50 (poço 5 e 7, respetivamente), não sofreram qualquer migração e como se

pode notar na imagem anterior, esta solução estava com um tom violenta intenso, indicando que houve agregação. No poço 9 estava a amostra de AuNP-MUA-Ab numa proporção de 1:75 sofreu alguma migração ao longo do gel. Contudo, a amostra colocada no poço 11 (AuNP-MUA-Ab numa proporção de 1:100) teve uma migração idêntica quando deveria ter migrado menos por ter uma maior quantidade de anticorpo.

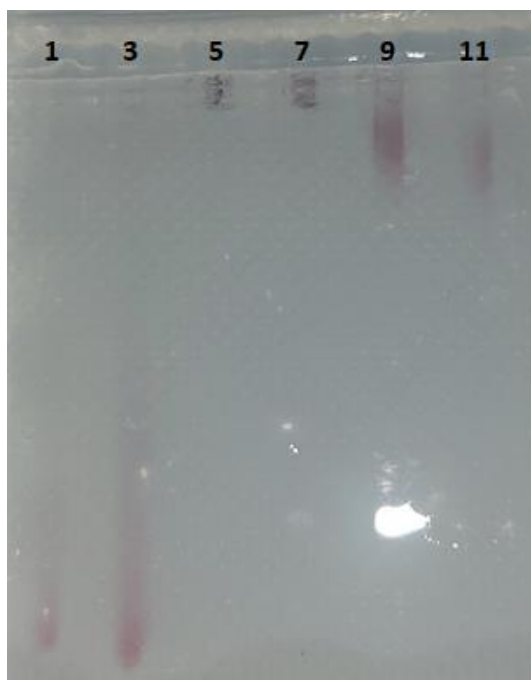


Figura 4.37: Gel de agarose de diferentes rácios AuNP-MUA:Ab com AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório.

Poços: 1 e 3 – AuNP-MUA de 15 nm; 5 – AuNP-MUA-Ab numa proporção 1:25; 7 – AuNP-MUA-Ab numa proporção 1:50; 9 – AuNP-MUA-Ab numa proporção 1:75; 11 – AuNP-MUA-Ab numa proporção de 1:100; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 14, 15 – poços vazios.

Através desta experiência foi possível concluir que a quantidade de anticorpo influencia o desvio da banda plasmónica assim como o tempo de reação, sendo que proporções mais elevadas tendem a levar a reações mais rápidas e com um desvio mais significativo. Contudo, existiu alguma dificuldade na reprodutibilidade destes resultados em particular para as proporções mais baixas.

4.1.7.3. Tempo de imobilização

A imobilização do anticorpo Spike S1 foi monitorizada ao longo de 90 minutos nos primeiros ensaios sendo que se concluiu que havia um desvio logo após os primeiros minutos. Estes resultados mostram que esta reação tende a ocorrer de forma quase imediata após a adição do anticorpo à solução. Nos ensaios seguintes, houve sempre uma monitorização ao longo de 60 minutos pois, concluiu-se que após este tempo deixavam de ser detetadas alterações significativas no espectro.

Após a adição do anticorpo nas AuNPs comerciais, houve um desvio de cerca de 2 nm após os primeiros 5 minutos com um desvio total foi de 3 nm após a centrifugação. Por outro lado, após a adição do anticorpo nas AuNPs sintetizadas, não houve um desvio imediato. Contudo, houve um desvio de cerca de 4 nm após 10 minutos de imobilização e um desvio total foi de 3 nm após a centrifugação (*Tabela 4.22*).

Tabela 4.22: Variação da banda plasmônica das AuNPs sintetizadas no laboratório e comerciais de 15 nm ao longo da imobilização do Anticorpo Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:60.

Solução	AuNPs de 15 nm	
	Comerciais	Sintetizadas
AuNP	515	520
AuNP-MUA	525	523
	0	530
	5	532
	10	532
	20	533
AuNP-MUA-Ab*	30	532
	40	533
	50	533
	60	534
	90	533

* medições ao longo do tempo

Através destas experiências que foram realizadas, concluiu-se que o anticorpo se ligava após os primeiros 10 minutos e, como tal, não se considera haver necessidade de esperar 90 minutos. A partir deste momento, a monitorização passou a ser feita durante os primeiros 30 minutos independentemente da quantidade de anticorpo adicionada. Esta monitorização acabou por não ser realizada para o anticorpo RBD uma vez que se concluiu que este anticorpo não era o mais indicado para o trabalho em estudo.

4.1.8. Influência do antigénio

4.1.8.1. Antigénio imobilizado

Foram utilizados diferentes antigénios (Spike S1 da GenScript, Spike (B02 e CS+PP) do iBet e o RBD do iBET) e o vírus SARS-CoV-2. Os primeiros ensaios foram realizados com o antigénio Spike S1 da GenScript em AuNPs comerciais de 15 nm. Contudo, nos ensaios com as AuNPs sintetizadas de 15 nm foram utilizados os antigénios Spike do iBET devido à indisponibilidade do antigénio inicial.

O antigénio foi imobilizado nas AuNPs após a imobilização do anticorpo Spike S1 em diferentes proporções de acordo com o expresso na *Tabela A.38 em Anexo*. Os resultados dos primeiros ensaios (*Tabela 4.23*) mostraram um desvio de 15 nm após a funcionalização com MUA, 18 nm após a imobilização do anticorpo Spike S1 GenScript numa proporção de 1:120 e um desvio de 2 nm após a

imobilização do antígeno Spike S1 da GenScript. O espectro de transmitância (*Figura 4.38*) mostrou um comportamento regular com um desvio da banda plasmônica com um ligeiro alargamento da mesma. Mais uma vez, a imagem TEM (*Figura 4.39*) mostrou que as AuNPs se encontravam isoladas sem qualquer indício de agregação tal como os resultados no espectrofotômetro sugeriram.

No entanto, foram realizadas outras experiências com diferentes proporções do mesmo par Ab-Ag com resultados foram distintos. Através da *Tabela 4.24* é possível verificar que houve um desvio de 13 nm após a funcionalização com MUA, 5 nm após a imobilização do anticorpo Spike S1 numa proporção de 1:60 e um desvio negativo de 1 nm após a imobilização do antígeno.

Tabela 4.23: Variação da banda plasmônica das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) antes e após a imobilização do Anticorpo Spike S1 (GenScript) e do Antígeno S1 (GenScript) numa proporção de 1:120.

Solução	AuNP	AuNP-MUA	AuNP-MUA-Ab	AuNP-MUA-Ab-Ag
Comprimento de onda (nm)	515	520	538	540

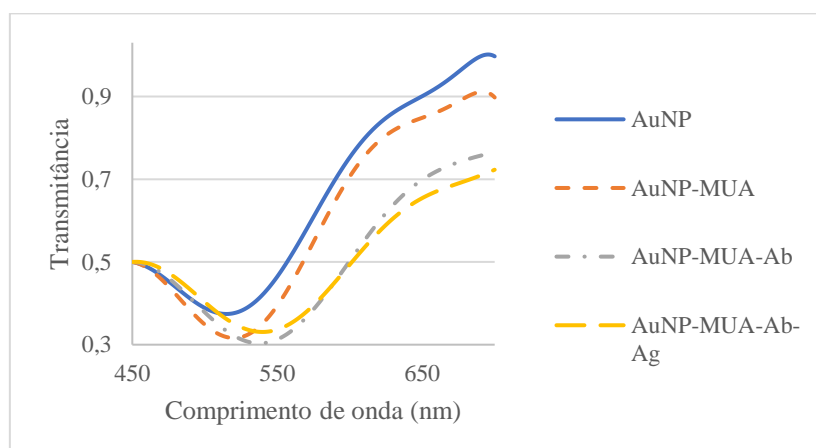


Figura 4.38: Espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) antes e após a imobilização do antes e após a imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) e do Ag S1 (GenScript) numa proporção de 1:120.

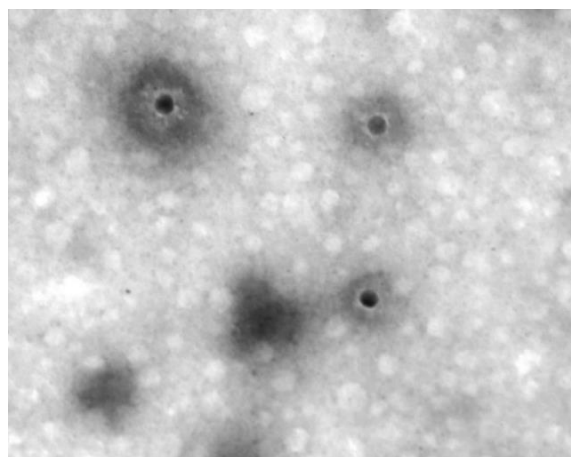


Figura 4.39: Imagem TEM das AuNPs de 15 nm (Cytodiagnosics) após a imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) e do Ag S1 (GenScript) numa proporção de 1:120. Ampliação: 100kx.

O espectro de transmitância (*Figura 4.40*) permitiu verificar que para além do desvio negativo, houve uma alteração no formato da curva e um ligeiro alargamento da mesma. A imagem TEM (*Figura 4.41*) mostrou alguns sinais de agregação uma vez que as AuNPs se encontravam muito próximas umas das outras.

Tabela 4.24: Comprimento de onda (nm) das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) antes e após a imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:60 e do Ag S1 (GenScript) numa proporção de 1:120.

Solução	AuNP	AuNP-MUA	AuNP-MUA-Ab	AuNP-MUA-Ab-Ag
Comprimento de onda (nm)	515	528	533	532

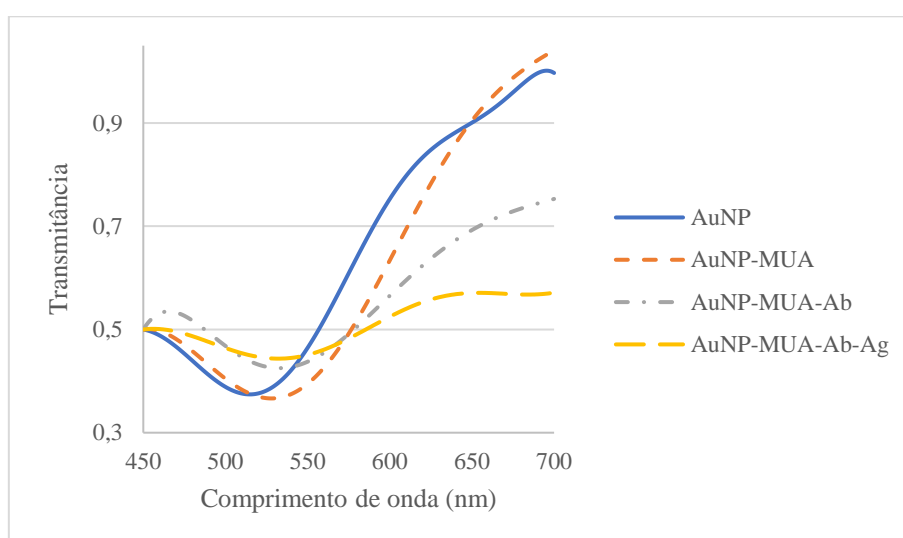


Figura 4.40: Espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) antes e após a imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:60 e do Ag Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:120.

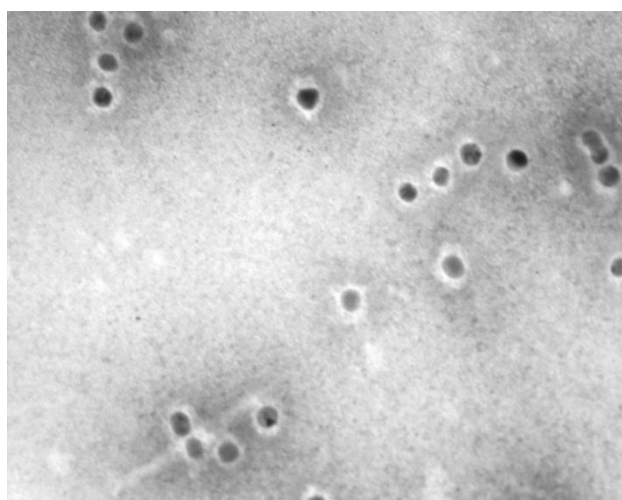


Figura 4.41: Imagem TEM das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) após a imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:60 e do Ag Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:120). Ampliação: 100 kx.

Após a indisponibilidade do antígeno Spike S1 da GenScript, os antígenos Spike cedidos pelo iBET, Spike B02 e Spike CS+CC, começaram a ser utilizados tendo sido feita uma comparação entre a utilização destes antígenos na estabilidade das AuNPs. Estes ensaios foram realizados em AuNPs de 15 nm comerciais e sintetizadas no laboratório tendo sido utilizados os volumes que constam nas Tabelas A.41 e A.44 em Anexo.

O antígeno Spike B02 foi utilizado no ensaio realizado com AuNPs de 15 nm sintetizadas onde se detetou um desvio de 4 nm após a funcionalização com MUA e de 7 nm após a imobilização do anticorpo, mas o desvio não foi significativo após a imobilização do antígeno (Tabela 4.25). Relativamente ao espectro de transmitância (Figura 4.42), houve uma alteração muito significativa no espectro após a etapa de imobilização do antígeno com um ligeiro alargamento da banda plasmónica. Por outro lado, houve uma alteração significativa do espectro no caso do antígeno Spike CS+PP (Figuras 4.43) que impossibilitou a obtenção de uma banda plasmónica característica.

Tabela 4.25: Variação da banda plasmónica das AuNPs 15 nm sintetizadas no laboratório antes e após a imobilização do Ab Spike (GenScript) numa proporção de 1:60 e diferentes Ag Spike (iBET) numa proporção de 1:150.

Solução	Comprimento de onda (nm)			
	AuNP	AuNP-MUA	AuNP-MUA-Ab	AuNP-MUA-Ab-Ag
Antígeno Spike B02	521	525	532	529
Antígeno Spike CS+PP	521	525	530	-

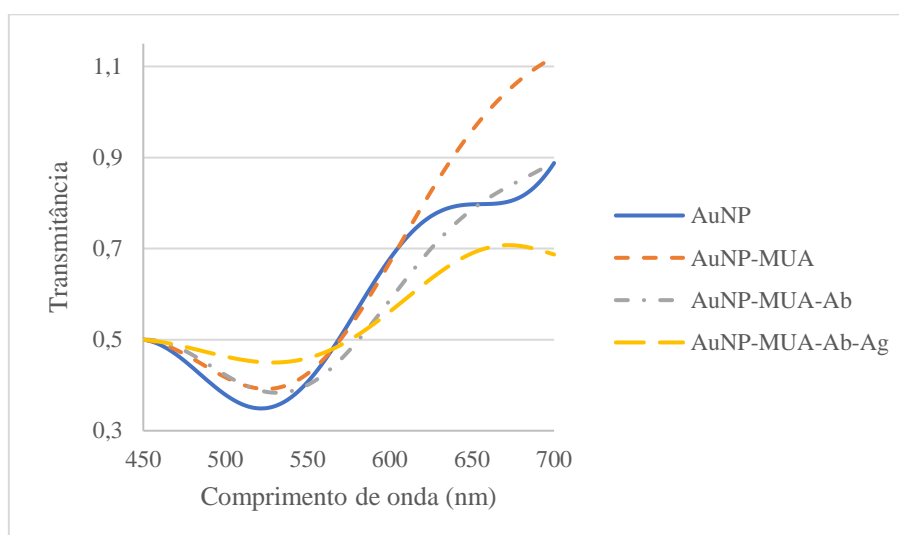


Figura 4.42: Espectro de transmitância das AuNPs 15 nm sintetizadas no laboratório antes e após a imobilização do Ab Spike (GenScript) numa proporção de 1:60 e Ag Spike B02 (iBET) numa proporção de 1:150.

Comparando os ensaios anteriores, concluiu-se que os melhores resultados foram obtidos para o antígeno S1 da GenScript pois não levou a alterações significativas no formato do espectro, indicando que estas AuNPs mantiveram a sua estabilidade. Relativamente aos antígenos Spike do iBET, concluiu-

se que o antígeno Spike B02 tende a funcionar melhor apesar do desvio obtido ser pouco significativo e negativo.

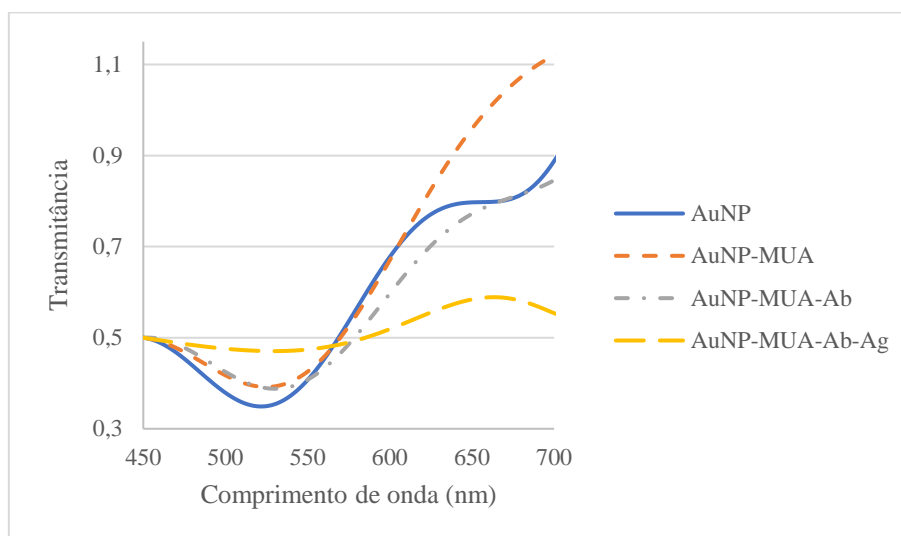


Figura 4.43: Espectro de transmitância das AuNPs 15 nm sintetizadas no laboratório antes e após a imobilização do Ab Spike (GenScript) numa proporção de 1:60 e Ag Spike CS+PP (iBET) numa proporção de 1:150.

O iBET cedeu ainda o antígeno RBD que também foi utilizado em alguns ensaios de modo a perceber se este poderia dar origem a um par Ab-Ag mais eficaz. O protocolo utilizado manteve-se e foram utilizados os volumes que constam na *Tabela A.47 em Anexo*. Analisando os comprimentos de onda obtidos (*Tabela 4.26*) verificou-se que o comprimento de onda obtido após a imobilização do anticorpo Spike S1 foi de 4 nm em ambos os casos. Tal como no caso anterior, o espectro de transmitância após a imobilização do Ag Spike B02 não sofreu alterações drásticas, havendo apenas um ligeiro desvio da banda plasmónica (*Figura 4.44*). Contudo, após a imobilização do antígeno RBD, esta amostra mudou para um tom arroxado e deixou de ser possível visualizar a banda plasmónica característica das AuNPs nesta amostra (*Figura 4.45*).

Tabela 4.26: Variação da banda plasmónica das AuNPs 15 nm sintetizadas no laboratório antes e após a imobilização do Ab Spike (GenScript) numa proporção de 1:60 e dos Ag Spike B02 (iBET) ou Ag RBD (iBET) numa proporção de 1:120.

Solução	Comprimento de onda (nm)			
	AuNP	AuNP-MUA	AuNP-MUA-Ab	AuNP-MUA-Ab-Ag
Antígeno Spike B02	523	526	530	525
Antígeno RBD	523	526	530	-

Comparando todos os estudos que foram feitos, o antígeno que deu melhores resultados foi o antígeno Spike S1 da GenScript apesar do desvio pouco significativo com tendência negativa. Apesar dos resultados com o antígeno Spike B02 também terem levado a um desvio negativo da banda plasmónica, houve uma alteração no formato da curva obtido. Os antígenos Spike CS+PP e RBD do iBET foram os

que levaram a piores resultados com uma alteração muito significativo do espectro de transmitância após a sua imobilização que não permitiu a detecção de uma banda plasmônica característica como aconteceu nos casos anteriores.

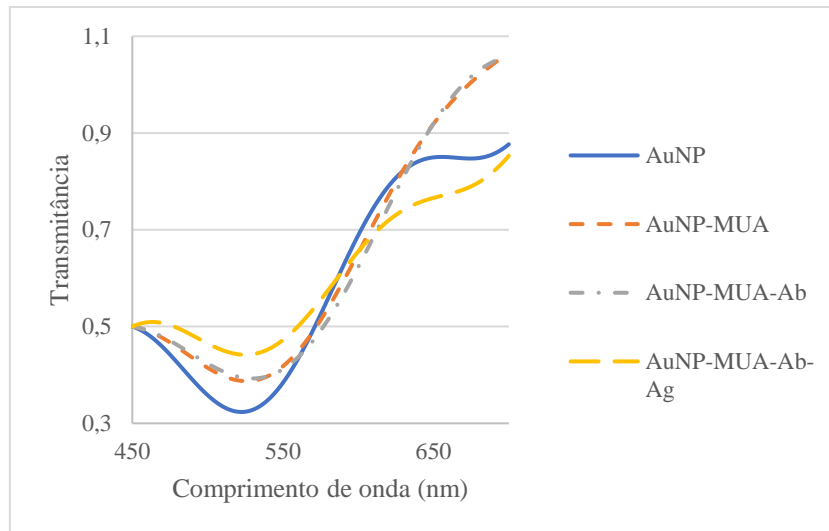


Figura 4.44: Espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório antes e após a imobilização do *Ab Spike S1* (GenScript) numa proporção de 1:120 e do *Ag Spike B02* (iBET) numa proporção de 1:120.

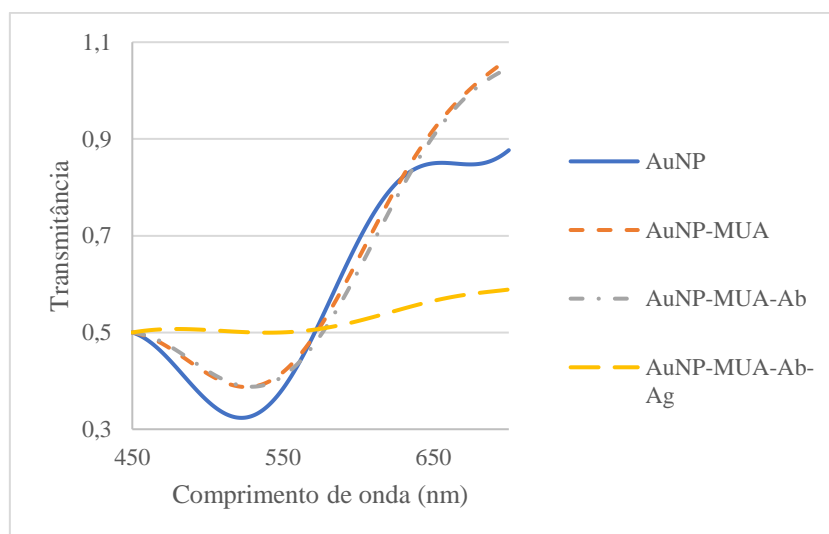


Figura 4.45: Espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório antes e após a imobilização do *Anticorpo Spike S1* (GenScript) numa proporção de 1:120 e do *Ag RBD* (iBET) numa proporção de 1:120.

4.1.8.2. Vírus SARS-CoV-2

De modo a verificar se existia ligação e se era obtido um desvio da banda plasmônica mais significativo, o vírus SARS-CoV-2 foi também imobilizado nas AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório após a etapa de funcionalização com MUA e imobilização do anticorpo Spike S1.

Uma vez que nem todas as informações sobre o vírus foram disponibilizadas pelo fabricante, os ensaios seguintes foram realizados com diferentes volumes de vírus (*Tabela A.50 em Anexo*), apesar de não ter sido possível determinar a proporção AuNP-MUA:Ab com precisão.

Os resultados obtidos em ambos os casos foram muito distintos, havendo um maior desvio da banda plasmônica após a imobilização do anticorpo e do antigénio no caso em que se utilizou uma proporção mais baixa com um desvio de 9 e de 6 nm, respetivamente (*Tabela 4.27*). Por outro lado, a proporção mais baixa levou a um desvio de apenas 3 nm após a imobilização do anticorpo e não houve qualquer desvio após a adição do antigénio (*Tabela 4.27*). Contudo, através do espectro de transmitância (*Figura 4.46*) concluiu-se que a banda plasmônica alargou ligeiramente e houve ainda uma perda de intensidade na mesma. O ensaio com uma maior proporção de antigénio (*Figura 4.47*) levou a uma alteração do espectro com um alargamento significativo da banda plasmônica assim como uma diminuição da intensidade.

Tabela 4.27: Variação da banda plasmônica das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório antes e após a imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:60 e do vírus SARS-CoV-2 em diferentes proporções.

Proporção de vírus SARS-CoV-2	Comprimento de onda (nm)			
	AuNP	AuNP-MUA	AuNP-MUA-Ab	AuNP-MUA-Ab-Ag
1:70	515	520	529	535
1:120	515	523	526	526

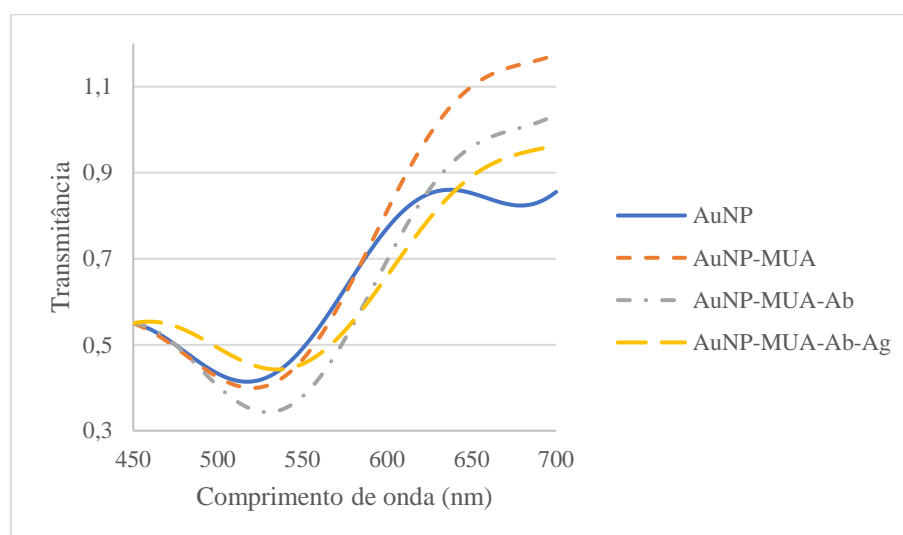


Figura 4.46: Espectro de transmitância das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório antes e após a imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:60 e do vírus SARS-CoV-2 numa proporção de 1:70.

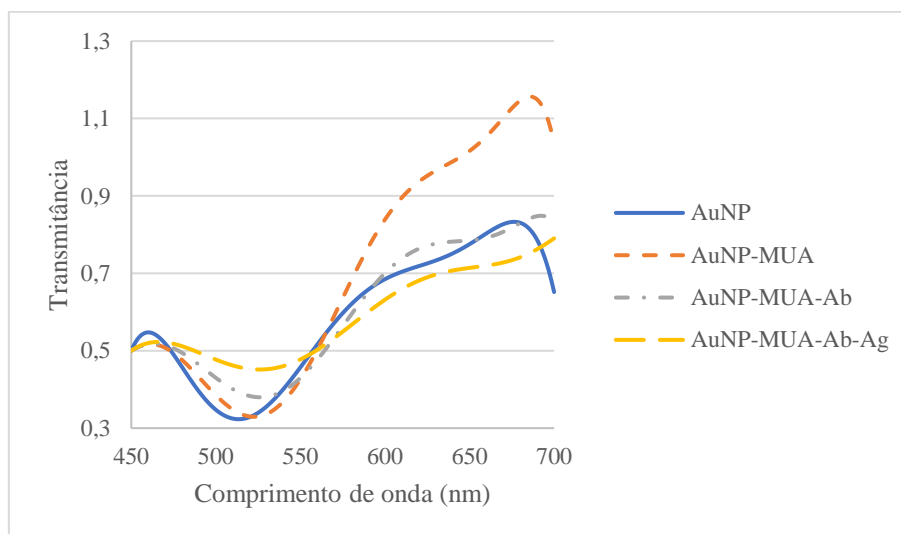


Figura 4.47: Espectro de transmittância das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório antes e após a imobilização do Ab Spike S1 (GenScript) numa proporção de 1:60 e do vírus SARS-CoV-2 numa proporção de 1:120.

4.1.8.3. Proporção de antígeno

Foram utilizadas diferentes proporções de antígeno ao longo do trabalho de modo a determinar qual seria a mais adequada para o trabalho em estudo. Apenas foi possível visualizar um desvio da banda plasmónica após a utilização de proporções a partir de 1:120 apesar do desvio obtido não ter sido significativo. Foram ainda realizados ensaios com proporções superiores sem que houvesse melhorias no desvio. É importante referir que a etapa de centrifugação após a imobilização do antígeno levou, muitas vezes, a um alargamento muito significativo da banda plasmónica e a alteração da sua cor para um tom lilás que indica alguma agregação. Contudo, a maioria dos ensaios foi realizado com uma proporção de 1:120 visto ter sido a proporção que levou a uma melhor reprodutibilidade.

4.1.8.4. Tempo de imobilização do antígeno

Os tempos necessários para a imobilização do antígeno também foram estudados através da monitorização após a adição do antígeno.

Tal como seria de esperar, esta reacção dá-se mais lentamente e o desvio obtido é pouco significativo. No caso das AuNPs de 15 nm comerciais, obteve-se um desvio negativo de 2 nm após a centrifugação e, no caso das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório, o desvio negativo foi de cerca de 1 nm ao longo do tempo (Tabela 4.28). O desvio obtido foi pouco significativo e encontra-se dentro do erro do aparelho de medição utilizado.

Tabela 4.28: Comprimento de onda (nm) das AuNPs de 15 nm comerciais e sintetizadas no laboratório ao longo da imobilização do Anticorpo Spike S1 (1:60) e do Antígeno Spike (1:120).

Solução	AuNPs de 15 nm	
	Comerciais	Sintetizadas
AuNP	515	521
AuNP-MUA	525	524
AuNP-MUA-Ab	533	529
	5	534
	10	534
	20	534
	30	533
AuNP-MUA-Ab-Ag* ¹	40	533
	50	533
	60	533
	90	531
		* ²

*¹ medições ao longo do tempo

*² não foi possível visualizar a banda plasmónica após a centrifugação

Em alguns ensaios, optou-se por armazenar as amostras a 4°C até ao dia seguinte de modo a verificar se havia alguma alteração após este tempo, contudo, não foi possível visualizar nenhuma alteração significativa havendo apenas um pequeno desvio de 1 ou 2 nm na maioria dos casos. Na maioria dos ensaios, deixou de ser possível visualizar a banda plasmónica após a etapa de centrifugação ou detetou-se uma alteração significativa na tonalidade das amostras para um tom arroxeadado.

4.2. Ensaios em superfícies sólidas

A maioria dos ensaios foram realizados em fase líquida, contudo, foram também realizados alguns ensaios onde o ouro foi depositado à superfície da placa de ITO. Esta fase do trabalho teve como objetivo estudar a formação dos bionanoconjugados em placas de modo a possibilitar o uso de *chips* no biossensor LSPR para detetar o SARS-CoV-2. O ouro foi depositado no ouro através de diferentes técnicas: eletrodeposição e evaporação térmica.

As placas de ouro preparadas por evaporação térmica deviam ser mais estáveis do que as anteriores de acordo com as informações fornecidas, contudo, após a etapa de imobilização do anticorpo deixou de ser possível visualizar qualquer banda e não foi possível prosseguir com a imobilização do antígeno (Figura 4.48).

Era esperado que as placas de ouro preparadas por eletrodeposição tivessem uma banda plasmónica mais pronunciada apesar da resposta pouco reprodutível devido à elevada instabilidade. Contudo, estas placas não mostraram uma banda plasmónica tão pronunciada quanto o esperado. Para além do facto da transmitância obtida estar acima de 1, o valor medido foi diferente consoante o local da placa onde se

procedia à respetiva medição, o que indica que a deposição do ouro não foi uniforme, havendo zonas da placa sem ouro ou apenas com vestígios deste (*Figura 4.49*).

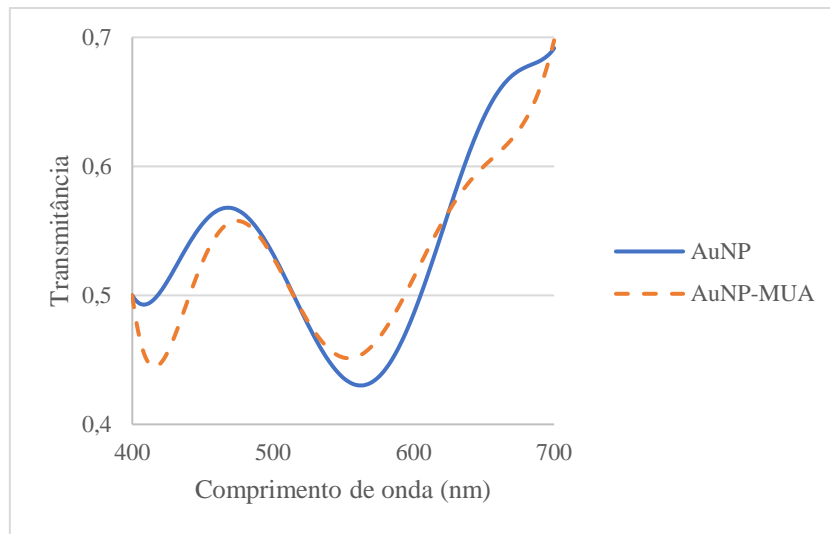


Figura 4.48: Espectro de transmitância da placa de ouro preparada por evaporação térmica após a etapa de funcionalização com MUA.

Apesar do ouro não estar distribuído uniformemente, esta placa de ouro foi utilizada nas fases seguintes do trabalho. Após as etapas de funcionalização e imobilização do anticorpo Spike S1 e do antigénio Spike B02 tendo sido possível visualizar apenas uma banda plasmónica na placa antes de ser funcionalizada e após a etapa de imobilização do anticorpo Spike S1 (*Figuras 4.50*).

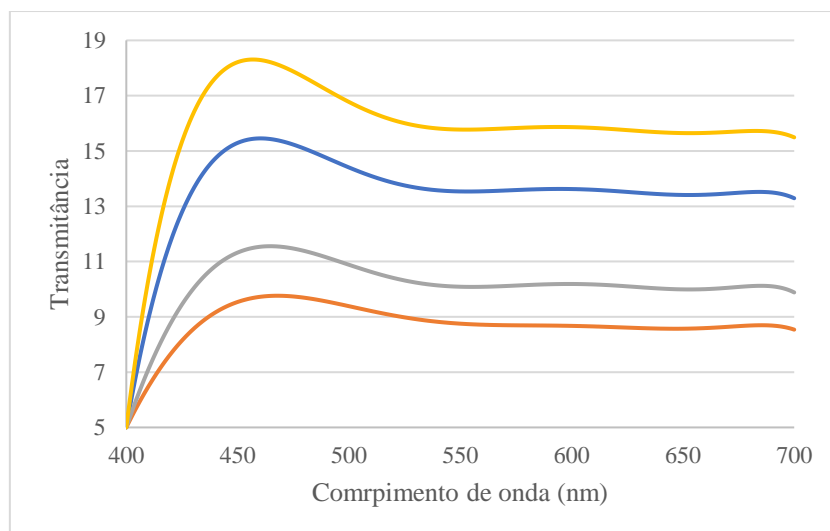


Figura 4.49: Espectro de transmitância em diferentes zonas da placa de ouro preparada por eletrodeposição.

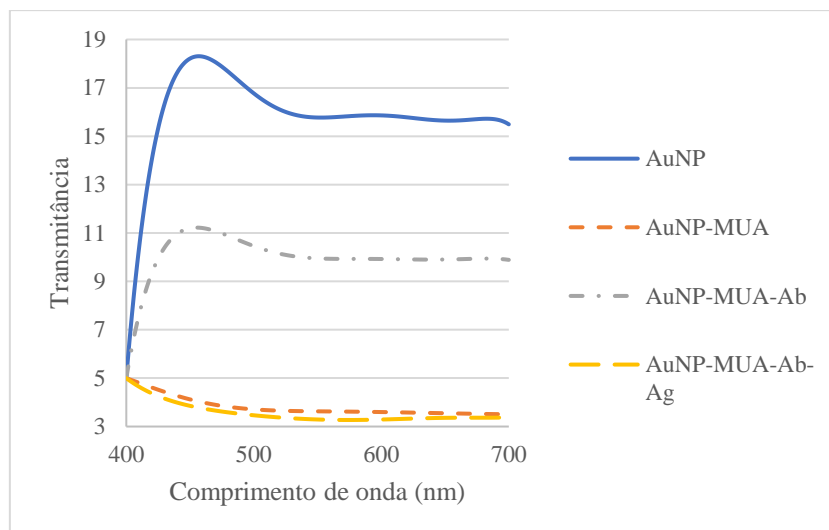


Figura 4.50: Espectro de transmittância da placa de ouro ao longo do tempo.

Tal como se pode ver na figura em causa, houve uma alteração no formato da curva após a etapa de funcionalização e novamente após a etapa de imobilização do antigénio.

Os resultados mostram uma grande instabilidade destas AuNPs uma vez que as etapas de funcionalização e de acoplamento impediram a visualização da banda plasmónica no espectrofotómetro. Para além da necessidade de otimizar este protocolo de modo a garantir que as propriedades das AuNPs são mantidas, a otimização destas placas é importante para manter a sua estabilidade e para que as AuNPs sejam depositadas por toda a placa.

Tanto as placas preparadas por eletrodeposição como as placas preparadas por evaporação térmica mostraram alguma instabilidade para além da existência de zonas sem ouro depositado. É também importante referir que a transmittância deveria estar sempre abaixo de 1 e isso não aconteceu nas placas de ouro preparadas por eletrodeposição.

4.3. Meta-análise

Os vírus respiratórios são, normalmente, detetados através de amostras fisiológicas da região nasal ou da orofaringe. Contudo, a extração destas amostras é complexa, requer pessoal de laboratório especializado e cuidados especiais quando se lidam com pessoas mais vulneráveis como idosos, crianças ou pessoas com problemas nasais.

Ao longo dos últimos anos têm sido realizados diversos estudos com vista à obtenção de amostras fisiológicas que permitam detetar diferentes patologias com elevada precisão. Apesar da saliva ser muito estudada, ainda não existem muitos protocolos para a deteção com esta amostra e os resultados obtidos até então têm sido pouco consistentes. No entanto, o início da pandemia aumentou a necessidade de realizar mais estudos relacionados com amostras fisiológicas alternativas que permitissem uma testagem do SARS-CoV-2 em grande escala e de forma mais rápida, prática e precisa.

A revisão sistemática teve como principais objetivos avaliar a precisão, sensibilidade e especificidade de diferentes amostras como a saliva, a saliva da garganta funda, expetoração, urina, fezes e lágrimas em comparação com o método tradicional (NPS, OPS ou uma combinação de ambos) e avaliar a sua eficácia no diagnóstico do SARS-CoV-2. A primeira etapa consistiu na pesquisa onde foram utilizadas cinco bases de dados distintas para recolha de dados que permitiram obter 3022 artigos dos quais 1462 foram excluídos por estarem em duplicado. Após a exclusão de todos os artigos que não cumpriam os critérios para a inclusão no estudo como a não utilização do RT-PCR como teste de referência ou não fornecer todos os dados necessários para realizar a meta-análise (resultados positivos e negativos ou número de ciclos das amostras fisiológicas alternativas em comparação com as amostras padrão), apenas 33 artigos seguiram para a revisão sistemática e meta-análise. A qualidade metodológica dos artigos foi avaliada através do *Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies 2* (QUADAS-2) através do qual foi possível concluir que a maioria dos artigos selecionados tinha um baixo risco de viés (63.6%) ou apresentavam algumas preocupações (33.3%). Por fim, realizou-se a meta-análise através do MetaDTA para estimar a precisão, sensibilidade e especificidade de cada amostra fisiológica assim como a diferença entre o número de ciclos de PCR necessário para detetar o SARS-CoV-2 em diferentes amostras.

O diagnóstico através de amostras de saliva tem uma precisão de, aproximadamente, 92.1% com uma sensibilidade estimada de 83.9% e uma especificidade estimada de 96.4%. As amostras da saliva da garganta funda e de expetoração, mostraram sensibilidades elevadas (90.1 e 87.5%, respetivamente) e especificidades relativamente baixas (63.1 e 25.0%, respetivamente) que indica que apesar da amostra ser eficaz na deteção dos casos positivos, existe um elevado número de falsos positivos, ou seja, pacientes que são detetados com a doença apesar de não estarem contaminados. As lágrimas e as fezes, levaram a resultados inversos com sensibilidades baixas (17.4 e 46.0%, respetivamente) e

especificidades elevadas (96.1 e 91.4%, respetivamente). Estes resultados indicam que estas amostras não são eficazes a detetarem os casos positivos da doença com a existência de muitos falsos negativos.

Estudou-se ainda a diferença do número de ciclos de PCR necessário até à deteção do SARS-CoV-2 nas diferentes amostras fisiológicas. Os resultados obtidos permitiram ainda concluir que a deteção do SARS-CoV-2 através da saliva ou da saliva da garganta funda necessitam de um maior número de ciclos de PCR quando comparada com a amostra NPS/OPS.

5. Conclusão

O presente trabalho tinha como objetivo o desenvolvimento de um teste de antigénio que permitisse a deteção do SARS-CoV-2. Apesar de não ter sido possível o desenvolvimento do biossensor LSPR como desejado, este trabalho de projeto teve vários pontos positivos tais como o estudo da influência de diferentes fatores na estabilidade das AuNPs e perceber quais as AuNPs mais adequadas para o trabalho em estudo. Foi ainda possível realizar uma meta-análise sobre as amostras fisiológicas para a deteção do SARS-CoV-2. Foi ainda possível estudar a influência

Em primeiro lugar, estudou-se a influencia do tipo de nanopartícula no qual se concluiu que as AuNPs de 15 nm comerciais apresentam uma melhor estabilidade ao longo do tempo quando isoladas apesar de agregarem mais facilmente após a funcionalização com MUA. Por outro lado, as AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório começaram a sofrer algumas alterações no seu espectro após algumas semanas, mas levaram a melhores resultados após a imobilização do anticorpo e do antigénio. Uma vez que as AuNPs comerciais estavam disponíveis em diferentes tamanhos, estudou-se a influencia desta variável ao longo do processo, permitindo concluir que as AuNPs de 15 nm apresentam uma melhor estabilidade ao longo do tempo e que as AuNPs de 30 e, em particular, as AuNPs de 60 nm têm uma maior predisposição para a agregação.

O primeiro passo consistiu na funcionalização das AuNPs isoladas com diferentes tióis (MUA, MPA e ou uma mistura de MUA/MPA) numa proporção AuNPs:Tiol de 1:5000. O processo de funcionalização com MUA mostrou resultados mais satisfatórios com um desvio positivo da banda plasmónica e sem alterações na tonalidade das amostras. Apesar de terem sido testadas outras concentrações, concluiu-se que a concentração de 10 mM levava a uma melhoria da estabilidade das AuNPs o que indica uma tendência para a agregação com uma elevada concentração de etanol.

Os agentes de acoplamento, EDC e NHS, mostraram ter uma grande influencia na estabilidade das AuNPs. O EDC e o NHS funcionam melhor quando preparados poucos minutos antes da sua utilização e, ao longo do tempo, tendem a perder atividade. Por outro lado, os solventes utilizados na sua preparação também influenciam todo o processo e, através dos resultados obtidos, foi possível concluir que a utilização de tampão MES na preparação destes reagentes levou a melhores resultados sem um alargamento tão significativo da banda plasmónica. Concluiu-se ainda que o volume utilizado influencia a estabilidade das AuNPs, sendo que uma menor quantidade de EDC e de NHS em AuNPs comerciais de 30 e de 60 nm favoreceu a sua agregação.

Foram estudados dois anticorpos distintos: o Spike S1 da GenScript e o RBD da R&D Systems. Após algumas otimizações no protocolo, foi possível imobilizar o anticorpo à superfície das AuNPs com sucesso. Contudo, os resultados obtidos para o anticorpo Spike S1 foram mais satisfatórios uma vez que levou a um desvio positivo da banda plasmónica sem fossem detetadas alterações na tonalidade da amostra ou no seu espectro de transmitância. Foi importante testar diferentes proporções AuNP-

MUA: Ab de modo a perceber a influencia desta variável na estabilidade do processo, concluindo-se que uma proporção de 1:60 é suficiente para detetar um desvio da banda plasmónica. Houve ainda uma tentativa de diluir o anticorpo de forma a permitir um estudo mais aprofundado relativamente às proporções de anticorpo mais baixas, contudo, esta diluição facilitou a agregação das AuNPs, tendo sido detetada uma alteração para uma tonalidade arroxeadada em todos os ensaios realizados. A microscopia eletrónica de transmissão permitiu verificar que o anticorpo e o antigénio se encontravam ligados às AuNPs. Verificou-se ainda que o anticorpo Spike S1 levava a nanopartículas isoladas, ao contrário do que aconteceu com o anticorpo RBD onde foi possível visualizar aglomerados.

Ao longo do trabalho foram utilizados diferentes antigénios distintos: Spike S1 da GenScript, Spike B02 e CS+PP do iBET, RBD do iBET e ainda o vírus SARS-CoV-2. Contudo, a etapa de imobilização do antigénio não correu como esperado uma vez que não foi possível obter desvios da banda plasmónica significativos e a maioria dos ensaios com o antigénio levou a um desvio negativo da banda plasmónica entre 2 e 3 nm. Os melhores resultados foram obtidos para o antigénio Spike S1 da GenScript e os piores resultados foram obtidos para o Spike CS+PP e o RBD do iBET. Um dos problemas detetados ao longo do trabalho foi a instabilidade após a etapa de centrifugação, uma vez que estas amostras agregavam muito facilmente ou ficavam muito translúcidas, impedindo a visualização das respetivas bandas. Teria sido benéfico fazer algumas otimizações neste campo de modo a melhorar este processo.

A centrifugação mostrou ser uma variável importante ao longo de todo o processo e permitiu concluir que as AuNPs de menores dimensões necessitam de condições de centrifugação mais agressivas de modo a possibilitar uma separação eficiente. A etapa de centrifugação foi otimizada para as AuNPs de 15 nm (comerciais e sintetizadas) de modo a dificultar a agregação devido a este ponto. A otimização permitiu que as AuNPs de 15 nm comerciais deixassem de apresentar partículas de cor negra após a funcionalização. Contudo, continuou a existir alguma adsorção nas paredes do eppendorf independentemente do tipo de nanopartícula.

A eletroforese em gel de agarose permitiu separar as AuNPs de acordo com a sua carga e tamanho/formato apesar de não ter sido possível visualizar todas as bandas devido a problemas de agregação ou até de coloração como aconteceu com as amostras AuNP-MUA-AbAg. Foi possível chegar a um protocolo que permitiu realizar a corrida eletroforética de forma eficaz, permitindo visualizar a maioria das bandas. Contudo, era necessário realizar algumas otimizações no processo de centrifugação de modo a melhorar a estabilidade destas amostras antes de serem utilizadas na corrida.

O espectrofotómetro utilizado ao longo do trabalho teve como pontos positivos a facilidade de utilização. Contudo, o desvio obtido para a imobilização do antigénio encontra-se dentro do erro do aparelho o que impossibilita o desenvolvimento de um teste de antigénio baseado em LSPR como era esperado.

As placas de ouro mostraram ser instáveis e, após algumas etapas como a funcionalização com MUA, deixou de ser possível visualizar a banda plasmónica. Por outro lado, o espectro de transmitância das placas de ouro levou a valores superiores a 1 ao contrário do que seria de esperar. Isto sugere que existiu algum problema no aparelho aquando destas medições.

A meta-análise realizada permitiu concluir que nem todas as amostras fisiológicas apresentam a mesma precisão, sensibilidade e especificidade quando comparadas com a amostra padrão. A saliva foi a amostra fisiológica que apresentou melhores resultados, possibilitando a sua utilização no futuro com vista a diminuir o desconforto dos pacientes e permitir a obtenção de amostras de forma mais rápida e eficiente. Apesar da saliva ter mostrado resultados mais satisfatórios com uma sensibilidade e especificidade mais elevadas, a deteção obriga a um maior número de ciclos de PCR para detetar o SARS-CoV-2. Contudo, estes resultados não são conclusivos uma vez que os números de estudos com esta informação eram muito reduzidos.

6. Trabalhos Futuros

A presente dissertação pode levar a trabalhos futuros na área com vista à melhoria dos resultados obtidos com vista ao desenvolvimento do biossensor. Um dos pontos que é necessário melhorar será a síntese e o armazenamento das AuNPs de modo que as suas propriedades possam ser mantidas durante mais tempo. Uma vez que o desvio obtido para os bionanoconjugados foi pouco significativo, a utilização de nanopartículas com diferente estrutura como as nanoestrelas podia também ser estudada com vista à obtenção de um desvio mais significativo.

A otimização de outros parâmetros como diferentes agentes de funcionalização e de acoplamento de forma a promover uma melhoria da ligação do anticorpo às nanopartículas, aumentando a sensibilidade. Esta etapa de acoplamento pode também ser estudada uma vez que podem ser testadas outras concentrações e outros volumes de modo a melhorar a estabilidade ao longo do tempo. Podem ser utilizados diferentes tampões como o tampão PBS na preparação dos agentes de acoplamento de modo a estudar a influência de outros solventes. O anticorpo podia ainda ser diluído de forma a manter as suas propriedades e permitir um estudo mais aprofundado com proporções mais baixas sem a necessidade de utilizar uma quantidade de nanopartículas tão elevada. O processo de centrifugação também deve ser melhorado de forma a evitar a agregação das AuNPs e evitar que estas adsorvam nas paredes do *ependorff* durante o processo.

A eletroforese em gel de agarose também pode ser melhorada de modo a evitar problemas de agregação e permitir uma melhor visualização das AuNPs com o Ab e o Ag imobilizados. Isso poderá ser feito através da otimização do tampão de corrida, utilização de uma agarose mais apropriada para o estudo das nanopartículas e otimização das condições de centrifugação de modo a evitar a agregação neste passo.

O processo de deposição do ouro no ITO seja otimizado para que toda a placa tenha ouro e melhorar a sua estabilidade. O protocolo utilizado nas placas de ouro também pode ser otimizado com vista à obtenção de melhores resultados.

Por último, a meta-análise enalteceu a necessidade de melhorar os métodos de tratamento desta amostra de modo a torná-la apta para a utilização em testes de diagnóstico.

7. Publicações e comunicações científicas no âmbito deste trabalho

Artigo publicado:

Moreira VM, Mascarenhas P, Machado V, Botelho J, Mendes JJ, Taveira N, et al. Diagnosis of SARS-Cov-2 Infection by RT-PCR Using Specimens Other Than Naso- and Oropharyngeal Swabs: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diagnostics* [Internet]. 2021 Feb 21;11(2):363. Available from: <https://doi.org/10.3390/diagnostics11020363>

Comunicação em congresso:

Moreira VM, Lapa H, Celeste R, Fantoni A, Alegria E, Matos APA, Almeida MG. Development of a LSPR-based biosensor for the SARS-CoV-2 detection. XXI SPB National Congress of Biochemistry 2020. 14-16 October **2021**. Évora, Portugal. Available from: <http://www.xxispbcongress2020.uevora.pt/congress-book/>

8. Bibliografia

1. Feng W, Newbigging AM, Le C, Pang B, Peng H, Cao Y, et al. Molecular Diagnosis of COVID-19: Challenges and Research Needs. *Anal Chem* [Internet]. 2020;92(15):10196–209. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02060>
2. Karakuş E, Erdemir E, Demirbilek N, Liv L. Colorimetric and electrochemical detection of SARS-CoV-2 spike antigen with a gold nanoparticle-based biosensor. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2021;1182. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338939>
3. World Health Organization. Diagnostic testing for SARS-CoV-2 [Internet]. World Health Organization. 2020. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/334254/WHO-2019-nCoV-laboratory-2020.6-eng.pdf>
4. Harapan H, Itoh N, Yufika A, Winardi W, Keam S, Te H, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review. *J Infect Public Health* [Internet]. 2020;13(5):667–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.03.019>
5. Sharma A, Kontodimas K, Bosmann M. Nanomedicine: A Diagnostic and Therapeutic Approach to COVID-19. *Front Med* [Internet]. 2021;8(June):1–16. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.648005>
6. World Health Organization. WHO-convened Global Study of Origins of SARS-CoV-2 : China Part (14 January-10 February 2021). *Jt WHO-China Study Team Rep* [Internet]. 2021;(February):120. Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/who-convened-global-study-of-origins-of-sars-cov-2-china-part>
7. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* [Internet]. 2020;579(7798):270–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
8. Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med* [Internet]. 2020;46(4):586–90. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05985-9>
9. Ruiz-Hitzky E, Darder M, Wicklein B, Ruiz-Garcia C, Martín-Sampedro R, del Real G, et al. Nanotechnology Responses to COVID-19. *Adv Healthc Mater* [Internet]. 2020;9(19):1–26. Available from: <https://doi.org/10.1002/adhm.202000979>
10. World Health Organization. Clinical management Clinical management Living guidance COVID-19. *World Heal Organ* [Internet]. 2021;(January):16–44. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/338882>
11. Kim G-U, Kim M-J, Ra SH, Lee J, Bae S, Jung J, et al. Clinical characteristics of asymptomatic and symptomatic patients with mild COVID-19. *Clin Microbiol Infect* [Internet].

- 2020;26(7):948.e1-948.e3. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.04.040>
12. Yanes-Lane M, Winters N, Fregonese F, Bastos M, Perlman-Arrow S, Campbell JR, et al. Proportion of asymptomatic infection among COVID-19 positive persons and their transmission potential: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* [Internet]. 2020;15(11 November):1–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0241536>
 13. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). Novo coronavírus SARS-CoV-2 [Internet]. 2020. Available from: <http://www.insa.min-saude.pt/category/areas-de-atuacao/doencas-infeciosas/novo-coronavirus-sars-cov-2-covid-19/>
 14. Ramanathan K, Antognini D, Combes A, Paden M, Zakhary B, Ogino M, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* [Internet]. 2020;395(January):497–506. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
 15. Kronbichler A, Kresse D, Yoon S, Lee KH, Effenberger M, Shin J Il. Asymptomatic patients as a source of COVID-19 infections: A systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2020;98:180–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.06.052>
 16. Tao J, Zhang X, Musa SS, Yang L, He D. High Infection Fatality Rate Among Elderly and Risk Factors Associated With Infection Fatality Rate and Asymptomatic Infections of COVID-19 Cases in Hong Kong. *Front Med* [Internet]. 2021;8(May):1–8. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.678347>
 17. Johansson MA, Quandelacy TM, Kada S, Prasad PV, Steele M, Brooks JT, et al. SARS-CoV-2 Transmission From People Without COVID-19 Symptoms. *JAMA Netw Open* [Internet]. 2021 Jan 7;4(1):e2035057. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/fullarticle/2774707>
 18. World Health Organization. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Situation Report - 46. 2020;(March).
 19. Setti L, Kirienco M, Dalto SC, Bonacina M, Bombardieri E. FDG-PET/CT findings highly suspicious for COVID-19 in an Italian case series of asymptomatic patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* [Internet]. 2020;47(7):1649–56. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00259-020-04819-6>
 20. Czumbel LM, Kiss S, Farkas N, Mandel I, Hegyi A, Nagy Á, et al. Saliva as a Candidate for COVID-19 Diagnostic Testing: A Meta-Analysis. *Front Med*. 2020;7(August):1–10.
 21. Sapkota D, Sølund TM, Galtung HK, Sand LP, Gianecchini S, To KKW, et al. COVID-19 salivary signature: diagnostic and research opportunities. *J Clin Pathol*. 2020;jclinpath-2020-206834.
 22. Fernandes LL, Pacheco VB, Borges L, Athwal HK, de Paula Eduardo F, Bezinelli L, et al. Saliva in the Diagnosis of COVID-19: A Review and New Research Directions. *J Dent Res*. 2020;
 23. Shirazi S, Stanford CM, Cooper LF. Characteristics and Detection Rate of SARS-CoV-2 in

- Alternative Sites and Specimens Pertaining to Dental Practice: An Evidence Summary. *J Clin Med* [Internet]. 2021 Mar 10;10(6):1158. Available from: <https://doi.org/10.3390/jcm10061158>
24. Nacher M, Mergeay-Fabre M, Blanchet D, Benois O, Pozl T, Mesphoule P, et al. Diagnostic accuracy and acceptability of molecular diagnosis of COVID-19 on saliva samples relative to nasopharyngeal swabs in tropical hospital and extra-hospital contexts: The COVISAL study. *PLoS One* [Internet]. 2021;16(9 September):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257169>
 25. Masse S, Bonnet C, Vilcu AM, Benamar H, Swital M, van der Werf S, et al. Are posterior oropharyngeal saliva specimens an acceptable alternative to nasopharyngeal sampling for the monitoring of sars-cov-2 in primary-care settings? *Viruses* [Internet]. 2021;13(5). Available from: <https://doi.org/10.3390/v13050761>
 26. Brümmer LE, Katzenschlager S, Gaeddert M, Erdmann C, Schmitz S, Bota M, et al. Accuracy of novel antigen rapid diagnostics for SARS-CoV-2: A living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2021;18(8):1–41.
 27. Direção-Geral da Saúde. Norma 019/2020, 26/10/2020, atualizado a 22/06/2021, COVID-19 Estratégia Nacional de Testes para SARS-CoV-2 [Internet]. 2021. Available from: <https://www.dgs.pt/normas-orientacoes-e-informacoes/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0192020-de-26102020.aspx>
 28. MedTech Europe. What types of diagnostic tests exist to detect COVID-19? [Internet]. 2020. Available from: <https://www.medtecheurope.org/wp-content/uploads/2020/04/medtecheurope-ivd-covid19tests-updated-december-2020.pdf>
 29. Infarmed, INSA D. Circular Informativa Conjunta - Testes Laboratoriais para SARS-CoV-2; Testes Rápidos [Internet]. 2020. Available from: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/circular-informativa-conjunta-dgsinfarmedinsa-n-003cd10020200-de-27052020-pdf.aspx>
 30. Majumder J, Minko T. Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19. *AAPS J*. 2021;23(1).
 31. Jiang M, Pan W, Arasthfer A, Fang W, Ling L, Fang H, et al. Development and Validation of a Rapid, Single-Step Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) System Potentially to Be Used for Reliable and High-Throughput Screening of COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10.
 32. Augustine R, Hasan A, Das S, Ahmed R, Mori Y, Notomi T, et al. Loop-mediated isothermal amplification (Lamp): A rapid, sensitive, specific, and cost-effective point-of-care test for coronaviruses in the context of coviAugustine, Robin Hasan, Anwarul Das, Suvarthi Ahmed, Rashid Mori, Yasuyoshi Notomi, Tsugunori Kevadi. *Biology (Basel)* [Internet]. 2020;9(182):1–17. Available from: <https://doi.org/10.3390/biology9080182>
 33. Chow FW-N, Chan TT-Y, Tam AR, Zhao S, Yao W, Fung J, et al. A rapid, simple,

- inexpensive, and mobile colorimetric assay covid-19-lamp for mass on-site screening of covid-19. *Int J Mol Sci*. 2020;21(15):1–10.
34. Ma L, Yin L, Li X, Chen S, Peng L, Liu G, et al. A smartphone-based visual biosensor for CRISPR-Cas powered SARS-CoV-2 diagnostics. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2022;195(March 2021):113646. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113646>
 35. Wang X, Zhong M, Liu Y, Ma P, Dang L, Meng Q, et al. Rapid and sensitive detection of COVID-19 using CRISPR/Cas12a-based detection with naked eye readout, CRISPR/Cas12a-NER. *Sci Bull* [Internet]. 2020;65(17):1436–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scib.2020.04.041>
 36. Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, et al. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2020;38(7):870–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>
 37. Joung J, Ladha A, Saito M, Segel M, Bruneau R, Huang M-LW, et al. Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics. *medRxiv* [Internet]. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.05.04.20091231>
 38. Patchsung M, Jantarug K, Pattama A, Aphicho K, Suraritdechachai S, Meesawat P, et al. Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA. *Nat Biomed Eng* [Internet]. 2020 Dec 26;4(12):1140–9. Available from: <http://doi.org/10.1038/s41551-020-00603-x>
 39. Behrouzi K, Lin L. Gold nanoparticle based plasmonic sensing for the detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid proteins. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2022;195(August 2021):113669. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113669>
 40. Infarmed, INSA D. Circular Informativa Conjunta - Diagnóstico COVID-19 - Testes de pesquisa de antígeno [Internet]. 2020. Available from: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/circular-informativa-conjunta-dgsinfarmedinsa-n-003cd10020200-de-27052020-pdf.aspx>
 41. Wang H, Shen G, Yu R. Aspects of recent development of immunosensors. In: *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications* [Internet]. Elsevier; 2008. p. 237–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-012373738-0.50011-8>
 42. Pradeep T. *Nano: The Essentials. Understanding Nanoscience and Nanotechnology*. McGraw-Hill, editor. New Delhi: Tata McGraw-Hill; 2007. 3–40 p.
 43. Arruebo M, Valladares M, González-Fernández Á. Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications. *J Nanomater* [Internet]. 2009;2009(May 2014):1–24. Available from: <http://doi.org/10.1155/2009/439389>
 44. Cao L, Yang S-T, Wang X, Luo PG, Liu J-H, Sahu S, et al. Competitive Performance of Carbon “Quantum” Dots in Optical Bioimaging. *Theranostics* [Internet]. 2012;2(3):295–301. Available from: <https://doi.org/10.7150/thno.3912>

45. Senapati S, Mahanta AK, Kumar S, Maiti P. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2018 Dec 16;3(1):7. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41392-017-0004-3>
46. Lee JH, Cho HY, Choi HK, Lee JY, Choi JW. Application of gold nanoparticle to plasmonic biosensors. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7).
47. Wolfbeis OS. An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. *Chem Soc Rev* [Internet]. 2015;44(14):4743–68. Available from: <https://doi.org/10.1039/C4CS00392F>
48. Hosein Mohimani, Alexey Gurevich, Alla Mikheenko, Neha Garg, Louis-Felix Nothias, Akihiro Ninomiya, Kentaro Takada, Pieter C. Dorrestein³ and PAP. Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems [Internet]. Vol. 176, *Physiology & behavior*. 2017. 139–148 p. Available from: <https://doi.org/10.1039/C5CS00798D>
49. Jin R, Zeng C, Zhou M, Chen Y. Atomically Precise Colloidal Metal Nanoclusters and Nanoparticles: Fundamentals and Opportunities. *Chem Rev* [Internet]. 2016;116(18):10346–413. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00703>
50. de Mol NJ, Fischer MJE. Surface Plasmon Resonance: Methods and Protocols [Internet]. *Life Sciences*. 2010. 1–8 p. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-670-2>
51. Mody V V, Siwale R, Singh A, Mody HR. Introduction to metallic nanoparticles. *J Pharm Bioallied Sci* [Internet]. 2010 Oct;2(4):282–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21180459>
52. Uechi I, Yamada S. Photochemical and analytical applications of gold nanoparticles and nanorods utilizing surface plasmon resonance. *Anal Bioanal Chem*. 2008 Aug;391(7):2411–21.
53. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc* [Internet]. 1951;11(c):55. Available from: <https://doi.org/10.1039/df9511100055>
54. Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J Phys Chem B* [Internet]. 2006;110(32):15700–7. Available from: <https://doi.org/10.1021/jp061667w>
55. Minh Hiep H, Endo T, Kerman K, Chikae M, Kim DK, Yamamura S, et al. A localized surface plasmon resonance based immunosensor for the detection of casein in milk. *Sci Technol Adv Mater* [Internet]. 2007;8(4):331–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stam.2006.12.010>
56. Bae YM, Jin SO, Kim I, Shin KY, Heo D, Kang DG. Detection of Biomarkers Using LSPR Substrate with Gold Nanoparticle Array. *J Nanomater* [Internet]. 2015;2015. Available from: <https://doi.org/10.1155/2015/302816>
57. Oh S, Lee M, Heo N, Kim S, Oh J, Lee Y, et al. Cuvette-Type LSPR Sensor for Highly

- Sensitive Detection of Melamine in Infant Formulas. *Sensors* [Internet]. 2019 Sep 5;19(18):3839. Available from: <https://doi.org/10.3390/s19183839>
58. Chen JS, Chen PF, Lin HTH, Huang NT. A Localized surface plasmon resonance (LSPR) sensor integrated automated microfluidic system for multiplex inflammatory biomarker detection. *Analyst* [Internet]. 2020;145(23):7654–61. Available from: <https://doi.org/10.1039/d0an01201g>
 59. Makaraviciute A, Ramanaviciene A. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2013;50:460–71. Available from: <http://doi.org/10.1016/j.bios.2013.06.060>
 60. Bartczak D, Kanaras AG. Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/Sulfo-NHS coupling. *Langmuir* [Internet]. 2011;27(16):10119–23. Available from: <https://doi.org/10.1021/la2022177>
 61. Haiss W, Thanh NTK, Aveyard J, Fernig DG. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal Chem* [Internet]. 2007;79(11):4215–21. Available from: <https://doi.org/10.1021/ac0702084>
 62. Haiss W, Thanh NTK, Aveyard J, Fernig DG, Approach C, Aldrich S, et al. Supporting Information. *Scan Electron Microsc.* 2007;1–7.
 63. Gomes I, Reis A, Fortunato E, Prudêncio M, Franco R. Nanoimunoensaios para diagnóstico de malária. *An Inst Hig e Med Trop* [Internet]. 2015;14:21–30. Available from: <https://doi.org/10.25761/anaisihmt.141>
 64. Hanauer M, Pierrat S, Zins I, Lotz A, Sönnichsen C. Separation of nanoparticles by gel electrophoresis according to size and shape. *Nano Lett.* 2007;7(9):2881–5.
 65. Jimenez MS, Luque-Alled JM, Gomez T, Castillo JR. Evaluation of agarose gel electrophoresis for characterization of silver nanoparticles in industrial products. *Electrophoresis.* 2016;37(10):1376–83.

A. Anexos

I. Determinação da concentração da solução de AuNPs isoladas

As AuNPs comerciais já se encontravam muito diluídas e, como tal, não foi necessário diluir para traçar o respetivo espectro. As AuNPs sintetizadas no laboratório foram diluídas (FD=2) por se encontrarem ligeiramente mais concentradas. Os valores de transmitância obtidos foram então convertidos em absorvância através da *Equação A.1* para permitir o cálculo dos parâmetros de agregação, tamanho estimado, ϵ_{450} e concentração.

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) \quad \text{Equação A.1}$$

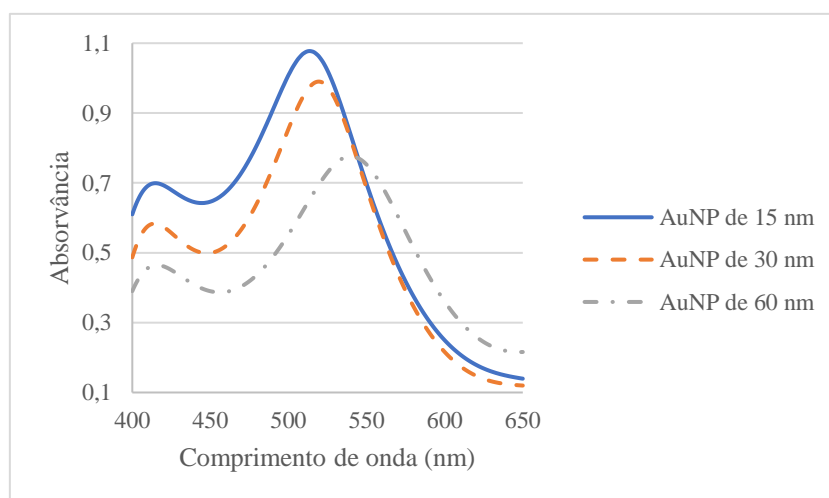


Figura A.1: Comparação dos espectros de absorvância das AuNPs comerciais (Cytodiagnosics) de diferentes tamanhos.

Os resultados de absorvância obtidos permitiram completar a *Tabela A.1* e calcular as concentrações de cada uma das soluções.

Tabela A.1: Resultados obtidos através da absorvância das AuNPs comerciais (Cytodiagnosics) de diferentes tamanhos.

Tamanho das AuNP (nm)	Fator de diluição	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	$A_{\text{máxima}}$	A_{450}
15	1	514	1.027	0.596
30	1	519	0.940	0.450
60	1	540	0.726	0.340

AuNPs comerciais de 15 nm:

$$\text{Agregação} = \frac{A_{\text{Máxima}}}{A_{450}} = \frac{1.027}{0.596} = 1.7$$

$$C_{\text{AuNP}} = \frac{A_{450} \times l}{\epsilon_{450}} = \frac{0.596 \times 1}{2.18 \times 10^8} = 2.7 \times 10^{-9} \text{ M} = 2.7 \text{ nM}$$

AuNPs comerciais de 30 nm:

$$Agregação = \frac{A_{Máxima}}{A_{450}} = \frac{0.940}{0.450} = 2.1$$

$$C_{AuNP} = \frac{A_{450} \times l}{\epsilon_{450}} = \frac{0.450 \times 1}{1.96 \times 10^9} = 2.3 \times 10^{-10} M = 0.2 nM$$

AuNPs comerciais de 60 nm:

$$Agregação = \frac{A_{Máxima}}{A_{450}} = \frac{0.726}{0.340} = 2.1$$

$$C_{AuNP} = \frac{A_{450} \times l}{\epsilon_{450}} = \frac{0.340 \times 1}{1.73 \times 10^{10}} = 1.97 \times 10^{-11} M = 0.02 nM$$

Os valores de concentração das AuNPs comerciais de 15 e de 30 nm estavam dentro dos valores fornecidos pelo fabricante, mas as AuNPs de 60 nm estavam ligeiramente mais diluídas de acordo com os resultados obtidos.

II. Determinação do volume de tiol necessário

Para a funcionalização das AuNPs comerciais foram utilizados os valores fornecidos pelo fabricante. No entanto, a funcionalização das AuNPs sintetizadas teve como base os valores obtidos no ponto anterior. A proporção AuNPs:Tiol (*Tabela A.2*) utilizada teve em conta o tamanho das nanopartículas utilizadas assim como o volume que se pretendia funcionalizar.

Tabela A.2: Proporções AuNPs:Tiol utilizadas consoante o tamanho das AuNPs comerciais (Cytodiagnostics).

Tamanho das AuNPs (nm)	15	30	60
Proporção AuNPs:Tiol	1:5000	1:20000	1:80000

AuNPs comerciais de 15 nm:

$$n_{AuNPs} = C_{AuNPs} \times V_{AuNPs} = 2.70 \times 10^{-9} \times 0.002 = 5.40 \times 10^{-12} mol$$

$$n_{Tiol} = n_{AuNPs} \times \text{Proporção Tiol: AuNP} = 5.4 \times 10^{-12} \times 5000 = 2.70 \times 10^{-8} mol$$

$$V_{Tiol} = \frac{n_{Tiol}}{C_{Tiol}} = \frac{2.70 \times 10^{-8}}{0.005} = 5.4 \times 10^{-6} L = 5.4 \mu L$$

AuNPs comerciais de 30 nm:

$$n_{AuNPs} = C_{AuNPs} \times V_{AuNPs} = 2.98 \times 10^{-10} \times 0.005 = 1.49 \times 10^{-12} \text{ mol}$$

$$n_{Tiol} = n_{AuNPs} \times \text{Proporção Tiol: AuNP} = 1.49 \times 10^{-12} \times 20000 = 2.98 \times 10^{-8} \text{ mol}$$

$$V_{Tiol} = \frac{n_{Tiol}}{C_{Tiol}} = \frac{2.98 \times 10^{-8}}{0.005} = 5.96 \times 10^{-6} \text{ L} = 5.96 \mu\text{L} = 6.0 \mu\text{L}$$

AuNPs comerciais de 60 nm:

$$n_{AuNPs} = C_{AuNPs} \times V_{AuNPs} = 3.25 \times 10^{-11} \times 0.005 = 1.63 \times 10^{-13} \text{ mol}$$

$$n_{Tiol} = n_{AuNPs} \times \text{Proporção Tiol: AuNP} = 1.63 \times 10^{-13} \times 80000 = 1.30 \times 10^{-8} \text{ mol}$$

$$V_{Tiol} = \frac{n_{Tiol}}{C_{Tiol}} = \frac{1.30 \times 10^{-8}}{0.005} = 2.60 \times 10^{-6} \text{ L} = 2.6 \mu\text{L}$$

Após a funcionalização, as soluções AuNP-MUA preparadas foram centrifugadas e ressuspensas em tampão MES de acordo com a seguinte tabela:

Tabela A.3: Volumes utilizados para a funcionalização das AuNPs comerciais (Cytodiagnostics) e respectivas condições de centrifugação.

Solução	Volume (μL)			Condições de Centrifugação		
	AuNPs	MUA (5 mM)	Tampão MES	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Velocidade (rpm)	Tempo (minutos)
AuNP ₁₅	2000	5.4	200	4	11000 *	20
AuNP ₃₀	5000	6.0	125	4	11000	10
AuNP ₆₀	5000	2.6	125	4	3260	10

*a velocidade de centrifugação das AuNPs de 15 nm foi otimizada posteriormente

Numa fase posterior, a centrifugação das AuNPs de 15 nm foi otimizada de modo a manter a estabilidade das AuNPs e prevenir a sua agregação. As AuNPs de 15 nm passaram a ser centrifugadas a 4 $^{\circ}\text{C}$ e 9500 rpm durante 20 minutos em alíquotas de 500 μL , as AuNPs de 30 nm passaram a ser centrifugadas a 4 $^{\circ}\text{C}$ e 4000 rpm durante 10 minutos e as AuNPs de 60 nm a 4 $^{\circ}\text{C}$ e 2000 rpm durante 10 minutos.

Através dos espectros de absorvância obtiveram-se os dados necessários (Tabela A.4) para realizar os cálculos explicados anteriormente de modo a determinar as razões de agregação e as respectivas concentrações.

Tabela A.4: Dados obtidos através do espectro de absorvância das soluções AuNP-MUA preparadas com AuNPs comerciais (Cytodiagnosics).

Tamanho das AuNP (nm)	Fator de diluição	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	$A_{\text{máxima}}$	A_{450}
15	3.0	524	0.904	0.565
30	3.0	528	1.144	0.573
60	3.0	546	1.055	0.489

III. Determinação dos volumes dos agentes de acoplamento

Os agentes de acoplamento, EDC e NHS, foram adicionados às soluções AuNP-MUA. Numa fase inicial, os volumes de EDC e de NHS estavam a ser adaptados à concentração das AuNPs, utilizando como base os valores de 50 μL de EDC e de 100 μL de NHS utilizados para as AuNPs de 15 nm com uma concentração de 8 nM.

AuNPs comerciais de 15 nm:

$$C_{AuNPs} \cong 8 \text{ nM}$$

$$V_{EDC (1 \text{ mM})} = 50 \mu\text{L}$$

$$V_{NHS (1 \text{ mM})} = 100 \mu\text{L}$$

AuNPs comerciais de 30 nm:

$$C_{AuNPs} = 0.9 \text{ nM}$$

$$\text{EDC (1 mM): } C_i \times V_i = C_f \times V_f \leftrightarrow 0,9 \times 50 = 8 \times V_f \leftrightarrow V_f = 5.5 \mu\text{L} \cong 6 \mu\text{L}$$

$$\text{NHS (1 mM): } C_i \times V_i = C_f \times V_f \leftrightarrow 0,9 \times 100 = 8 \times V_f \leftrightarrow V_f = 11.0 \mu\text{L}$$

AuNPs comerciais de 60 nm:

$$C_{AuNPs} = 0.1 \text{ nM}$$

$$\text{EDC (1 mM): } C_i \times V_i = C_f \times V_f \leftrightarrow 0,1 \times 50 = 8 \times V_f \leftrightarrow V_f = 0,5 \mu\text{L}$$

$$\text{NHS (1 mM): } C_i \times V_i = C_f \times V_f \leftrightarrow 0,1 \times 100 = 8 \times V_f \leftrightarrow V_f = 1.1 \mu\text{L}$$

Após ter sido verificado que as AuNPs apresentavam alguma instabilidade quando eram utilizados volumes mais baixos, todos os ensaios foram realizados com 50 μL de EDC 1 mM e 100 μL de NHS 1 mM.

O volume de solução AuNP-MUA variou consoante a sua concentração apesar dos ensaios com as AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório terem sido realizadas com o volume equivalente a um número de moles de, aproximadamente, 1×10^{-12} moles. Contudo, nos ensaios onde se realizou uma comparação entre as AuNPs de 15 nm comerciais e sintetizadas no laboratório, o volume utilizado correspondeu ao mesmo número de moles nas duas soluções.

IV. Determinação do volume de anticorpo/antígeno

Foram utilizadas diferentes proporções AuNP-MUA:Ab ao longo dos vários ensaios de modo a perceber a influência desta parâmetros. Numa fase inicial foi utilizada uma proporção de 1:120 para todos os tamanhos de AuNPs. No entanto, no decorrer dos trabalhos foi possível concluir que esta proporção já levava a alguma saturação (no gel de agarose) e, como tal, estudaram-se proporções mais baixas.

Valores fornecidos pelo fabricante relativamente ao Anticorpo Spike S1 da GenScript:

$$C_{Ab} = 1 \text{ mg/mL} = 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

$$M_{Ab} = 150 \text{ kDa} = 150000 \text{ g/mol}$$

Através dos valores fornecidos, calculou-se o número de moles de anticorpo e a respetiva concentração molar.

$$\frac{m_1}{n_1} = \frac{m_2}{n_2} \Leftrightarrow \frac{150000}{1} = \frac{1 \times 10^{-3}}{n_2} \Leftrightarrow n_2 = \frac{1 \times 10^{-3}}{150000} = 6.7 \times 10^{-9} \text{ mol} = 6.7 \text{ nmol}$$

$$\frac{n_2}{V_2} = \frac{n_{Ab}}{V_{Ab}} \Leftrightarrow \frac{6.7}{1} = \frac{n_{Ab}}{1000} \Leftrightarrow 6.7 \times 1000 = n_{Ab} \Leftrightarrow n_{Ab} = 6700 \text{ nmol} \Rightarrow C_{Ab} = 6700 \text{ nM}$$

Tendo em conta a concentração e volume da solução AuNP-MUA utilizada e a proporção necessária, calculou-se o volume de anticorpo necessário. Estes cálculos foram repetidos para restantes proporções que foram sendo estudadas.

AuNPs comerciais de 15 nm:

$$C_{AuNPs} \times V_{AuNPs} \times Proporção_{Ab:AuNP} = C_{Ab} \times V_{Ab} \leftrightarrow 8 \times 125 \times 120 = 6700 \times V_{Ab} \leftrightarrow V_{Ab} = 17.9 \mu L \cong 18 \mu L$$

AuNPs comerciais de 30 nm:

$$C_{AuNPs} \times V_{AuNPs} \times Proporção_{Ab:AuNP} = C_{Ab} \times V_{Ab} \leftrightarrow 0.9 \times 125 \times 120 = 6700 \times V_{Ab} \leftrightarrow V_{Ab} = 2 \mu L$$

AuNPs comerciais de 60 nm:

$$C_{AuNPs} \times V_{AuNPs} \times Proporção_{Ab:AuNP} = C_{Ab} \times V_{Ab} \leftrightarrow 0.1 \times 125 \times 120 = 6700 \times V_{Ab} \leftrightarrow V_{Ab} = 0.2 \mu L$$

Tabela A.5: Volumes utilizados ao longo da experiência.

Tamanho das AuNP (nm)	Volumes (μL)				
	AuNP	EDC (1 mM)	NHS (1 mM)	Ab Spike SI	Tampão PBS 5 mM
15	125	50	100	18	207
30	125	6	11	2	356
60	125	5 *	11 *	2 *	357

* devido aos volumes reduzidos, estas soluções foram diluídas de 1:10

Após a imobilização do anticorpo, as soluções foram centrifugadas utilizando as mesmas condições que foram utilizadas para a lavagem após a funcionalização e, de seguida, as soluções resultantes foram ressuspensas em 125 μL de tampão PBS 5 mM a pH 7.4 antes de traçar o respetivo gráfico de transmitância.

A determinação do volume dos restantes anticorpos e antígenos foi feita do mesmo modo ao longo do trabalho.

V. Influência do tipo de nanopartícula

O espectro de absorvância decorrente do estudo da influência do tipo de nanopartícula de 15 nm utilizado mostrou que as AuNP-MUA tinham uma banda plasmónica idêntica entre os 524 e os 525), mas as AuNPs comerciais tinham uma curva mais baixa e mais larga quando comparada com as AuNPs sintetizadas no laboratório o que indica que encontravam mais diluídas e ligeiramente agregadas. Para além da concentração das AuNPs comerciais ser mais baixa quando comparada com as AuNPs

sintetizadas no laboratório, também é possível que estas tenham sido ressuspensas numa maior quantidade de tampão MES.

Através da absorvância das AuNPs, obtiveram-se alguns parâmetros importantes para a determinação da razão de agregação, tamanho estimado e concentração da amostra que permitiram calcular a quantidade de MUA necessária para proceder à funcionalização das AuNPs (*Tabela A.6*). Após a funcionalização, as amostras foram ressuspensas em tampão MES 5 mM a pH 6.5 e traçou-se um novo espectro que permitiu obter os valores que constam na *Tabela A.7*.

Tabela A.6: Funcionalização das AuNPs de 15 nm (comerciais e sintetizadas) e condições de centrifugação utilizadas.

Solução	Volume (μL)			Condições de Centrifugação		
	AuNPs	MUA (10 mM)	Tampão MES	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Velocidade (rpm)	Tempo (minutos)
Comerciais	5000	6.8	125	4	9500	20
Sintetizadas	5000	11.6	125	4	9500	20

Tabela A.7: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância das AuNPs de 15 nm (comerciais e sintetizadas).

Solução	Fator de Diluição	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	$A_{\text{máxima}}$	A_{450}	
Comerciais	AuNP	1.0	514	1.027	0.596
	AuNP-MUA	2.0	524	0.314	0.198
Sintetizadas	AuNP	2.0	522	0.553	0.338
	AuNP-MUA	3.0	525	0.963	0.592

As AuNPs comerciais encontravam-se mais diluídas do que as AuNPs sintetizadas. De modo a igual a experiência, o volume de AuNP-MUA foi adaptado, mantendo a quantidade de EDC e de NHS.

Tabela A.8: Volumes utilizados ao longo do ensaio.

Tipo de AuNP (nm)	Volumes (μL)				
	AuNP	EDC (1 mM)	NHS (1 mM)	Ab Spike S1	Tampão PBS 5 mM
Comerciais	125	50	100	4	221.0
Sintetizadas	75	50	100	4	271.0

VI. Influência do tiol

O estudo da influência do tiol utilizado foi realizado com AuNPs comerciais de 15 nm e os tióis MUA, MPA e uma mistura de ambos (1:1).

Tabela A.9: Volumes utilizados para a funcionalização.

Tiol	Concentração das AuNP (nM)	Volume de AuNPs (µL)	Concentração de Tiol (nM)	Volume de Tiol (µL)
MUA	2.7	5000	10	6.8
MPA	2.7	2500	10	3.4
MUA:MPA (1:1)	2.7	2500	10	3.4

*A proporção AuNP:MUA utilizada foi de 1:5000 e os cálculos foram realizados do mesmo modo que os casos anteriores.

VII. Influência das condições de centrifugação

Ao longo das primeiras experiências, a centrifugação mostrou ter um papel importante na estabilidade das AuNPs e, como tal, estudou-se este parâmetro mais aprofundadamente de modo a encontrar as condições que permitissem uma melhor estabilização das AuNPs de 15 nm (comerciais e sintetizadas no laboratório).

As amostras foram preparadas de acordo com a *Tabela A.10*, divididas em alíquotas de 500 µL e então centrifugadas em simultâneo a diferentes velocidades de centrifugação durante 30 minutos a 4 °C.

Tabela A.10: Volumes utilizados para a funcionalização das AuNPs de 15 nm (comerciais e sintetizadas).

Tipo de AuNP	Concentração das AuNP (nM)	Volume de AuNPs (µL)	Concentração de Tiol (nM)	Volume de Tiol (µL)
Comerciais	2.7	5000	10	2.7
Sintetizadas	3.1	5000	10	3.1

AuNPs comerciais de 15 nm:

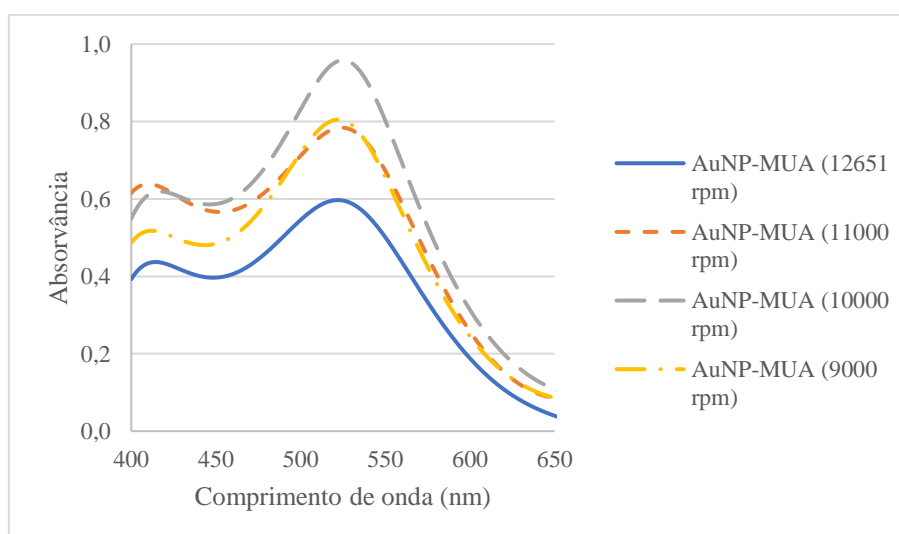


Figura A.2: Influência na velocidade de centrifugação no espectro de absorvância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).

Tabela A.11: Parâmetros utilizados para determinar a razão de agregação, tamanho estimado e concentração das soluções AuNP-MUA preparadas com AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics), centrifugadas a diferentes velocidades de centrifugação.

Solução	Velocidade de centrifugação (rpm)	Fator de diluição	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	$A_{\text{máxima}}$	A_{450}
AuNP-MUA	12651	2	522	0.597	0.397
	11000	2	524	0.784	0.567
	10000	2	525	0.959	0.587
	9000	2	522	0.805	0.484

AuNPs sintetizadas de 15 nm:

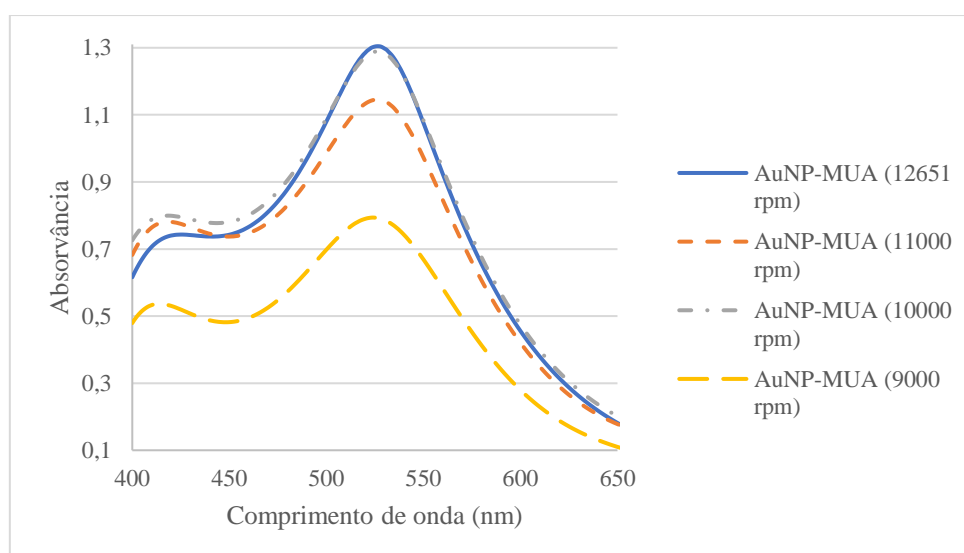


Figura A.3: Comparação entre as AuNPs de 15 nm sintetizadas centrifugadas a diferentes velocidades de centrifugação.

Tabela A.12: Parâmetros utilizados para determinar a razão de agregação, tamanho estimado e concentração das soluções AuNP-MUA preparadas com AuNPs de 15 nm sintetizadas, centrifugadas a diferentes velocidades de centrifugação.

Solução	Velocidade de centrifugação (rpm)	Fator de diluição	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	$A_{\text{máxima}}$	A_{450}
AuNP-MUA	12651	3	1.305	527	0.743
	11000	3	1.146	527	0.737
	10000	3	1.289	527	0.781
	9000	3	0.793	524	0.482

VIII. Influência da etapa de *crosslinking*

Tal como referido anteriormente, realizaram-se alguns estudos relativamente à etapa de *crosslinking* de modo a melhorar a estabilidade das AuNPs. Nesta etapa foram realizados três estudos distintos:

- a. Lavagem;

- b. Volumes;
- c. Modo de preparação.

a. Lavagem: a lavagem das nanopartículas após a adição de EDC e de NHS pode ter alguma utilidade para diversas aplicações. Neste ponto procedeu-se à lavagem da solução de modo a remover o excesso de EDC e de NHS em solução.

Os parâmetros da *Tabela A.13* permitiram calcular a razão de agregação, tamanho estimado e concentração das AuNPs de 15 nm comerciais isoladas e funcionalizadas com MUA.

Tabela A.13: Parâmetros utilizados para o cálculo de alguns parâmetros como a razão de agregação e a concentração das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnostics).

Solução	Fator de diluição	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	$A_{\text{máxima}}$	A_{450}
AuNP	1	514	1.027	0.596
AuNP-MUA	2	523	0.940	0.498

Os parâmetros anteriores permitiram calcular a razão de agregação, tamanho estimado e concentração das AuNPs comerciais de 15 nm isoladas e funcionalizadas com MUA (*Tabela A.14*).

Tabela A.14: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnostics) ao longo do tempo.

Solução	Razão de Agregação	Tamanho estimado (nm)	ϵ_{450}	C (nM)
AuNP	1.7	19.6	2.18E+08	2.7
AuNP-MUA	1.9	32.2		4.6

b. Volumes: através do espectro de absorvância, obtiveram-se os valores que constam na *Tabela A.15* e que permitiram calcular os valores de razão de agregação, tamanho estimado e concentração (*Tabela A.16*).

Tabela A.15: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnostics).

Solução	Fator de diluição	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	$A_{\text{máxima}}$	A_{450}
AuNP	1	520	1.049	0.609
AuNP-MUA	2	524	0.952	0.563

Tabela A.16: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnostics) isoladas ou funcionalizadas com MUA.

Solução	Razão de Agregação	Tamanho estimado	ϵ_{450}	Concentração (nM)
---------	--------------------	------------------	------------------	-------------------

AuNP	1.7	19.6	1.96E+09	0.31
AuNP-MUA	1.7	17.8		0.57

A concentração obtida permitiu calcular o volume de EDC e de NHS necessário e foram realizados dois ensaios. No primeiro ensaio, utilizou-se o volume habitual de EDC e de NHS mM de 50 e de 100 μL , respectivamente. No segundo ensaio, este volume foi reduzido para manter a proporção uma vez que as AuNPs estavam mais diluídas.

Tabela A.17: Volumes utilizados ao longo da experiência.

Solução	Volumes (μL)				
	<i>AuNP-MUA</i>	<i>EDC (1 mM)</i>	<i>NHS (1 mM)</i>	<i>Ab Spike S1</i>	<i>Tampão PBS 5 mM</i>
Volume fixo	125	50	100	2	348
Volume adaptado	125	4	16	2	478

- c. Modo de preparação:** tanto o EDC como o NHS podem ser preparados com diferentes solventes como a água miliQ ou diferentes tampões. Neste ponto estudou-se a influência da utilização de soluções recém preparadas assim como a influência de soluções preparadas com água miliQ e com tampão MES 5 mM a pH 6.5 na estabilidade das AuNPs.

Tabela A.18: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).

Solução	Fator de diluição	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	$A_{\text{máxima}}$	A_{450}
AuNP	1	520	1.049	0.609
AuNP-MUA	2	524	0.952	0.563

Tabela A.19: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) isoladas ou funcionalizadas com MUA.

Solução	Razão de Agregação	Tamanho estimado	ϵ_{450}	Concentração (nM)
AuNP	1.7	19.6	1.96E+09	0.31
AuNP-MUA	1.7	17.8		0.57

Tabela A.20: Volumes utilizados ao longo da experiência.

Ensaio	Volumes (μL)				
	<i>AuNP-MUA</i>	<i>EDC (1 mM)</i>	<i>NHS (1 mM)</i>	<i>Ab Spike S1</i>	<i>Tampão PBS 5 mM</i>
Soluções¹	110	50	100	10*	230
Solvente usado²	150	50	100	10*	190

¹ soluções de EDC e NHS já preparadas e preparadas pouco antes da sua utilização;

² alteração do solvente utilizado para preparar o EDC e o NHS

IX. Influência do elemento de reconhecimento biológico

O elemento de reconhecimento biológico (ou ERB) é a molécula imobilizada em primeiro lugar e que vai determinar o tipo de teste (anticorpo ou antigénio). Este estudo teve como objetivo estudar a imobilização do anticorpo Spike S1 e do antigénio S1 da GenScript de forma a determinar o mais adequado para os trabalhos seguintes.

O primeiro passo consistiu na obtenção dos parâmetros que constam na *Tabela A.21* de modo a calcular o volume de MUA 10 mM necessário para funcionalizar as AuNPs. Após a funcionalização, obtiveram-se os valores que permitiram calcular os volumes de ERB necessários (*Tabela A.23*).

Tabela A.21: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).

Solução	Fator de diluição	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	$A_{\text{máxima}}$	A_{450}
AuNP	1	514	1.027	0.565
AuNP-MUA	2	520	0.482	0.567

Tabela A.22: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) isoladas ou funcionalizadas com MUA.

Solução	Razão de Agregação	Tamanho estimado	ϵ_{450}	Concentração (nM)
AuNP	1.8	26.1	2.18E+08	2.6
AuNP-MUA	0.9	1.4		5.2

Tabela A.23: Volumes utilizados ao longo da experiência.

Solução	Volumes (μL)				
	AuNP-MUA	EDC (1 mM)	NHS (1 mM)	Ab Spike S1	Tampão PBS 5 mM
Ab Spike S1	125	50	100	11,7	338
Ag Spike S1	125	50	100	5,7	344

X. Influência do anticorpo

Foram realizados estudos relativamente ao anticorpo que permitiram concluir qual o anticorpo mais eficaz assim como a proporção a utilizar.

- a. **Anticorpo imobilizado:** o primeiro passo consistiu em determinar os parâmetros de agregação, tamanho e concentração de modo a calcular os volumes necessários nas restantes etapas do trabalho.

Tabela A.24: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).

Solução	Fator de diluição	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	$A_{\text{máxima}}$	A_{450}
AuNP	1	515	1.077	0.679
AuNP-MUA	2	525	0.925	0.572

Tabela A.25: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) isoladas ou funcionalizadas com MUA.

Solução	Razão de Agregação	Tamanho estimado	ϵ_{450}	Concentração (nM)
AuNP	1.6	13.0	2.18E+08	3.1
AuNP-MUA	1.6	14.3		5.2

Tabela A.26: Volumes utilizados ao longo da experiência.

Solução	Volumes (μL)				
	AuNP-MUA	EDC (1 mM)	NHS (1 mM)	Ab Spike S1	Tampão PBS 5 mM
Ab Spike S1	125	50	100	11.8	338
Ab RBD	125	50	100	5.5	344

- b. Proporção de Anticorpo:** num primeiro estudo, o anticorpo Spike S1 foi utilizado nas proporções 1:60 e 1:120 em AuNPs comerciais de 15 nm.

Tabela A.27: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).

Solução	Fator de diluição	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	$A_{\text{máxima}}$	A_{450}
AuNP	1	515	0,439	0,310
AuNP-MUA	2	523	0,474	0,300

Tabela A.28: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) isoladas ou funcionalizadas com MUA.

Solução	Razão de Agregação	Tamanho estimado	ϵ_{450}	Concentração (nM)
AuNP	1.4	7.8	2.18E+08	1.4
AuNP-MUA	1.6	12.8		2.8

Tabela A.29: Volumes utilizados ao longo da experiência.

Proporção	Volumes (μL)				
	AuNP-MUA	EDC (1 mM)	NHS (1 mM)	Ab Spike S1	Tampão PBS 5 mM
1:120	125	50	100	6,2	344
1:60	125	50	100	3,1	347

Após o estudo anterior, foram estudadas outras proporções do anticorpo Spike S1 da GenScript que permitiram concluir a possibilidade de utilizar volumes mais reduzidos sem desperdício de produto.

Tabela A.30: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório.

Solução	Fator de diluição	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	A _{máxima}	A ₄₅₀
AuNP	2	519	0.666	0.468
AuNP-MUA	3	525	1.009	0.658

Tabela A.31: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório isoladas ou funcionalizadas com MUA.

Solução	Razão de Agregação	Tamanho estimado	ϵ_{450}	Concentração (nM)
AuNP	1.4	8.0	2.18E+08	4.3
AuNP-MUA	1.5	11.1		9.1

Tabela A.32: Volumes utilizados ao longo da experiência.

Proporção	Volumes (μL)				
	AuNP-MUA	EDC (1 mM)	NHS (1 mM)	Ab Spike S1	Tampão PBS 5 mM
1:25	110	50	100	3.8	346
1:50	125	50	100	8.5	341
1:75	125	50	100	12.8	337
1:100	125	50	100	17.1	333

Foi ainda realizado um segundo estudo com as mesmas proporções.

Tabela A.33: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância das AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório.

Solução	Fator de diluição	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	A _{máxima}	A ₄₅₀
AuNP	2	522	0.553	0.338
AuNP-MUA	3	529	0.817	0.557

Tabela A.34: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs de 15 nm sintetizadas no laboratório isoladas ou funcionalizadas com MUA.

Solução	Razão de Agregação	Tamanho estimado	ϵ_{450}	Concentração (nM)
AuNP	1.6	15.2	2.18E+08	3.1
AuNP-MUA	1.5	9.1		7.7

Tabela A.35: Volumes utilizados ao longo da experiência.

Proporção	Volumes (μL)				
	AuNP-MUA	EDC (1 mM)	NHS (1 mM)	Ab Spike S1	Tampão PBS 5 mM

1:25	130	50	100	3,8	346
1:50	125	50	100	7,2	343
1:75	125	50	100	10,8	339
1:100	125	50	100	14,4	336

XI. Influência do antígeno

Neste ponto, utilizaram-se diferentes antígenos adquiridos de forma independente e fornecidos pelo iBET. Os estudos iniciais foram realizados com o antígeno Spike S1 da GenScript

a. Antígeno imobilizado:

Antígeno Spike S1 da GenScript:

Tabela A.36: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância das AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).

Ensaio	Solução	Fator de diluição	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	$A_{\text{máxima}}$	A_{450}
1	AuNP	1	515	1.077	0.679
	AuNP-MUA	2	520	0.482	0.290
2	AuNP	1	515	1.077	0.679
	AuNP-MUA	2	524	0.938	0.620

Tabela A.37: Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) isoladas ou funcionalizadas com MUA.

Ensaio	Solução	Razão de Agregação	Tamanho estimado	ϵ_{450}	Concentração (nM)
1	AuNP	1.4	7.8	2.18E+08	1.4
	AuNP-MUA	1.6	12.8		2.8
2	AuNP	1.6	13.0		3.1
	AuNP-MUA	1.5	10.5		5.7

Tabela A.38: Volumes utilizados ao longo da experiência.

Ensaio	Volumes (μL)					
	AuNP-MUA	EDC (1 mM)	NHS (1 mM)	Ab Spike S1	Tampão PBS 5 mM	Ag Spike S1
1	125	50	100	6.0	344	2.9
2	125	50	100	12.8	337	3.1

Antígeno Spike S1 B02 do iBET:

Tabela A.39: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância para as AuNPs de 15 nm sintetizadas.

Ensaio	Solução	Fator de diluição	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	$A_{\text{máxima}}$	A_{450}
--------	---------	-------------------	--------------------------------	---------------------	-----------

1	AuNP	1	515	1.077	0.679
	AuNP-MUA	2	528	1.290	0.733
2	AuNP	2	522	0.403	0.262
	AuNP-MUA	3	525	1.217	0.772

Tabela A.40: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs sintetizadas de 15 nm isoladas ou funcionalizadas com MUA.

Ensaio	Solução	Razão de Agregação	Tamanho estimado	ϵ_{450}	Concentração (nM)
1	AuNP	1.6	13.0	2.18E+08	3.1
	AuNP-MUA	1.8	21.9		6.7
2	AuNP	1.5	11.2	2.18E+08	2.4
	AuNP-MUA	1.6	12.6		10

Tabela A.41: Volumes utilizados ao longo da experiência.

Ensaio	Volumes (μL)					
	AuNP-MUA	EDC (1 mM)	NHS (1 mM)	Ab Spike S1	Tampão PBS 5 mM	Ag Spike S1 B02
1	148	50	100	9,0	341	13.7
2	94	50	100	9,0	341	13.7

Antigénio Spike S1 CS+PP do iBET:

Tabela A.42: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância para as AuNPs de 15 nm sintetizadas.

Solução	Fator de diluição	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	$A_{\text{máxima}}$	A_{450}
AuNP	2	522	0.403	0.262
AuNP-MUA	3	525	1.217	0.772

Tabela A.43: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs sintetizadas de 15 nm isoladas ou funcionalizadas com MUA.

Solução	Razão de Agregação	Tamanho estimado	ϵ_{450}	Concentração (nM)
AuNP	1.5	11.2	2.18E+08	2.4
AuNP-MUA	1.6	12.6		10

Tabela A.44: Volumes utilizados ao longo da experiência.

Solução	AuNP-MUA	EDC (1 mM)	NHS (1 mM)	Ab Spike S1	Tampão PBS 5 mM	Ag Spike S1 CS+PP
Volume (μL)	94	50	100	9.0	341	21.0

Antigénio RBD do iBET:

Tabela A.45: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância para as AuNPs de 15 nm sintetizadas.

Solução	Fator de diluição	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	$A_{\text{máxima}}$	A_{450}
AuNP	2	522	0.551	0.340
AuNP-MUA	3	526	1.221	0.762

Tabela A.46: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs sintetizadas de 15 nm isoladas ou funcionalizadas com MUA.

Solução	Razão de Agregação	Tamanho estimado	ϵ_{450}	Concentração (nM)
AuNP	1.6	14.6	2.18E+08	3.1
AuNP-MUA	1.6	13.7		10

Tabela A.47: Volumes utilizados ao longo da experiência.

Solução	AuNP-MUA	EDC (1 mM)	NHS (1 mM)	Ab Spike S1	Tampão PBS 5 mM	Ag RBD
Volumes (μL)	95	50	100	17,9	332	10.5

Vírus SARS-CoV-2:

Tabela A.48: Parâmetros obtidos através do espectro de absorvância para as AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics).

Solução	Fator de diluição	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	$A_{\text{máxima}}$	A_{450}
AuNP	2	517	0.315	0.207
AuNP-MUA	3	520	1.121	0.645

Tabela A.49: Parâmetros de Razão de Agregação, Tamanho e Concentração estimados para as AuNPs de 15 nm comerciais (Cytodiagnosics) isoladas ou funcionalizadas com MUA.

Solução	Razão de Agregação	Tamanho estimado	ϵ_{450}	Concentração (nM)
AuNP	1.5	10.6	2.18E+08	1.9
AuNP-MUA	1.7	20.4		8.9

Tabela A.50: Volumes utilizados ao longo da experiência.

Experiência	Volumes (μL)					
	AuNP-MUA	EDC (1 mM)	NHS (1 mM)	Ab Spike S1	Tampão PBS 5 mM	Ag Spike S1
1	113	50	100	9.0	341	9.6
2	113	50	100	9.6	340	14.5