



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

INSTITUTO KEIZO ASAMI (iLIKA)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE - CB

MARIA ANDRESSA NICÁCIO DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE GENOSENSOR IMPEDIMÉTRICO
PARA DETECÇÃO DO ZIKA VÍRUS**

Recife

2023

MARIA ANDRESSA NICÁCIO DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE GENOSENSOR IMPEDIMÉTRICO
PARA DETECÇÃO DO ZIKA VÍRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde

Orientador: José Luiz de Lima Filho

Coorientadora: Valeria Visani

Recife

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Lima, Maria Andressa Nicácio de
Desenvolvimento de genossensor impedimétrico para detecção de Zika Vírus/ Maria
Andressa Nicácio de Lima– 2023.

105 f. : il., fig., tab.

Orientador: José Luis de Lima Filho
Coorientadora: Valéria Visani

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à
Saúde, Recife, 2023.

Inclui referências e apêndices.

1. Zika Vírus 2. Biotecnologia 3. Diagnóstico I. Lima Filho, José Luis
de (orient.) II. Visani, Valéria (coorient.) III. Título

616.9185

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -188

MARIA ANDRESSA MICACIO DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE GENOSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO
DO ZIKA VÍRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde. Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovado em: 22 / 06 / 2023 .

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. José Luiz de Lima Filho (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Fabrício Oliveira Souto (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Carolina Ribeiro Córdula (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Ao meu misericordioso Deus, pela dádiva da vida.

“A tua graça me basta! ”, Paulo de Tarso.

Aos meus pais, Ailton e Adalvina. Obrigada por nunca desistirem de mim, vocês são meus exemplos de vida, meu alicerce, minha fonte de força e fé.

Todo esse esforço é por vocês e para vocês.

Aos meus irmãos, Ayla e Ariel Andersson. Obrigada por não me deixarem enlouquecer com os problemas da vida.

Ao amor da minha vida, meu esposo Michael. Obrigada por todo apoio e confiança. Seu amor foi meu impulso para concluir essa dissertação. Amo você, sempre e para sempre.

Dedico a vocês todo meu esforço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus

Por ser minha fonte de amor, sabedoria e fé. Obrigada por todas as pessoas que colocaste na minha vida, principalmente meu esposo, Michael. Tu és o meu porto seguro em todos os momentos, sem Ti nada seria.

Aos meus pais

Por fazerem o possível e o impossível para realizar os meus sonhos, a pessoa que sou hoje é fruto do esforço de vocês. Espero poder lhes dar muito orgulho. Tudo que faço é por vocês, pela nossa família.

Aos meus irmãos, Ayla e Ariel Andersson

Por serem minha válvula de escape em todos os momentos, pelas risadas e todos os momentos de conselho e desabafo.

Ao meu querido esposo, Michael Lopes

Por todo incentivo, paciência e amor. Você é minha calma em dias de tempestade, minha força nos momentos mais difíceis e o motivo do meu sorriso todo início de manhã e final de noite. Amo você, sempre e para sempre.

Ao meu orientador Prof^o Dr^o. José Luiz

Por toda orientação, paciência e ajuda durante o mestrado. Pelas breves conversas, as quais abriram meus olhos para o futuro.

A minha coorientadora Dr^a. Valeria Visani

Agradeço principalmente pela paciência durante todo o mestrado, pela ajuda e incentivo para finalização desta dissertação.

A todos meus colegas de laboratório,

Por todas as risadas, conselhos e momentos de desabafo. Obrigada Gabriela Oliveira, Beatriz, Victor, Eliza e Ian.

Aos servidores do ILIKA,

Principalmente aos guardas (vigias) pelas conversas e cafés em dias cansativos. As tias da limpeza pelos “Bom dia” acompanhados de um lindo sorriso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal em Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta para realização deste trabalho.

A todos vocês, o meu eterno agradecimento.

Gentileza gera gentileza!

RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) foi considerado uma "Emergência de Saúde Pública" em 2016 pela Organização Mundial de Saúde devido à sua associação com a epidemia de casos de microcefalia em recém-nascidos. Muitos países têm limitações em relação à detecção, notificação e monitoramento das doenças causadas pelo ZIKV, tornando necessário o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas de fácil manuseio, baixo custo e que apresentem resultados rápidos. Neste trabalho, apresenta-se um genossensor impedimétrico baseado no reconhecimento da fita simples de RNA do ZIKV, que detecta a hibridização entre uma sonda de oligonucleotídeos e sua sequência complementar, o alvo. Para a construção do genossensor impedimétrico, foram utilizados eletrodos impressos (SPEs), onde os eletrodos de trabalho e contra-eletrodos foram confeccionados com tinta de carbono e o eletrodo de referência com prata e cloreto de prata. A superfície do eletrodo de trabalho foi modificada por eletropolimerização da glutatona, e a sonda foi imobilizada por meio de ligações covalentes, empregando os reagentes EDC-NHS (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida e N-Hidrosuccinimida), tendo suas condições ótimas encontradas por meio de Voltametria de Pulso Diferencial (DPV). Para caracterizar o genossensor, foram utilizadas técnicas de DPV e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Todas as modificações feitas na superfície do eletrodo foram analisadas, tendo em vista a observação das alterações nas correntes de pico do azul de metileno (MB) por meio da análise de DPV e do ferrocianeto/ferricianeto por meio da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS). Todas as modificações realizadas na superfície do eletrodo de trabalho foram bem-sucedidas, como demonstrado pelas imagens de MEV. Na análise de EIS, a sequência complementar atingiu uma Resistência a Transferência de Cargas (R_{ct}) de $6,6k\Omega$, representando uma redução de aproximadamente 46% em comparação com o eletrodo contendo apenas a sonda imobilizada. A R_{ct} não foi afetada pela hibridização com alvo não complementar, demonstrando a especificidade da sonda selecionada. Os resultados apresentados são relevantes para o desenvolvimento de estudos futuros que permitirão a construção de biossensores portáteis e sensíveis para detecção de ZIKV.

Palavras-chaves: SPEs; Genossensor; Detecção; Hibridização; Zika Vírus.

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) was considered a "Public Health Emergency" in 2016 by the World Health Organization due to its association with the epidemic of cases of microcephaly in newborns. Numerous countries face limitations regarding the detection, notification, and monitoring of diseases caused by ZIKV. Hence, developing biotechnological tools that are easy to handle, cost-effective, and provide rapid results is crucial. In this study, we introduce an impedimetric genosensor based on the recognition of the single strand of ZIKV DNA, which enables the detection of hybridization between an oligonucleotide probe and its complementary sequence, the target. To construct the impedimetric genosensor, we employed printed electrodes (SPEs). Carbon ink was used for the working and counter electrodes, while silver/silver chloride was utilized for the reference electrode. The surface of the working electrode was modified through glutathione electropolymerization, and the probe was immobilized using covalent bonds facilitated by EDC-NHS reagents (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide and N-Hydroxysuccinimide). Differential Pulse Voltammetry (DPV) determined the optimal conditions for these modifications. To characterize the genosensor, DPV and Scanning Electron Microscopy (SEM) techniques were used. Changes in peak currents of methylene blue (MB) were observed via DPV analysis, and ferrocyanide/ferricyanide analysis was conducted through Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS). All modifications performed on the working electrode surface were successful, as confirmed by the SEM images. In the EIS analysis, the complementary sequence reached a Charge Transfer Resistance (R_{ct}) of $6.6\text{k}\Omega$, representing a reduction of approximately 46% compared to the electrode containing only the immobilized probe. The hybridization with a non-complementary target did not affect R_{ct} , demonstrating the specificity of the selected probe. These results have significant implications for future studies aiming to develop portable and sensitive biosensors for ZIKV detection.

Keywords: SPEs; Genosensor; Detection; Hybridization; Zika Virus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição dos casos e ou surtos do ZIKV em 2022.....	17
Figura 2 - Distribuição por região dos nascidos vivos confirmados com síndrome congênita associada à infecção pelo Zika vírus.....	18
Figura 3 - Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	19
Figura 4 - Diferentes formas de transmissão do Zika Vírus.....	20
Figura 5 - Unidades que compõem um biossensor.....	23
Figura 6 - Processo de modificação (ativação) dos grupos carboxílicos da Glutationa.....	36
Figura 7 - Estrutura da molécula de L-Glutationa.....	39
Figura 8 - Esquema da ancoragem da Glutationa no eletrodo de trabalho de Carbono Vítreo.....	39
Figura 9 - Esquema da leitura via DPV.....	41
Figura 10 - Esquema da leitura via CV.....	42
Figura 11 - Esquema de uma leitura via EIS.....	44
Figura 12 - Processo de fabricação dos SPES.....	54
Figura 13 - Esquema das etapas de preparo e detecção do genossensor impedimétrico.....	56
Figura 14 - Potenciostato utilizado para as modificações do eletrodo de trabalho e detecção do alvo do ZIKV.....	57
Figura 15 - MEV utilizado para captar as imagens das modificações realizadas sobre a superfície dos eletrodos.....	58
Figura 16 - Variação do pH e velocidade de varredura da eletropolimerização da PGSH.....	61
Figura 17 - Variação do pH e velocidade de varredura da eletropolimerização da PGSH e imobilização da sonda ZIKV.....	63
Figura 18 - Comparação entre as diferentes concentrações de EDC/NHS.....	64
Figura 19 - Comparação entre concentrações e tempo de ativação do EDC/NHS.....	66

Figura 20 - Variação da concentração da sonda do ZIKV.....	68
Figura 21 - Variação do tempo de imobilização da sonda do ZIKV.....	69
Figura 22 - Imagens MEV das modificações realizadas na superfície dos eletrodos.....	71
Figura 23 - Caracterização do genossensor impedimétrico.....	74
Figura 24 - Análise da especificidade do genossensor frente a diferentes alvos não complementares.....	78
Figura 25 - Eletroforese em gel.....	104

LISTA DE TABELA

Tabela 01 – Tipos de biossensores de acordo com biorreceptor e transdutor.....	24
Tabela 02 – Distribuição dos valores de p de todos os tratamentos realizados na superfície do eletrodo	76
Tabela 03 – Distribuição dos valores de p dos testes de especificidade do genossensor impedimétrico	80
Tabela 04 – Desing de todas as leituras realizadas no <i>bioanalyser</i>	105

LISTA DE ABREVIATURAS

-COOH	Grupo carboxílicos
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPV	Voltametria de Pulso Diferencial
dsDNA	DNA de fita dupla
EDC	Cloridrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
EIS	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
GSH	Glutationa
KB	Kilobases
KCl	Cloreto de Potássio
LoD	Limite de detecção
MB	Azul de Metileno
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIP	Polímero Molecularmente impressos
-NH₂	Grupo aminado
NHS	N-hidroxisuccinimida
PBS	Tampão Fosfato Salino
PGSH	Poli-glutationa
PGSH /Ativ	Poli-glutationa ativada
PGSH /Atv/Imob	Poli-glutationa com a sonda imobilizada
PGSH /Atv/Imob/Hib_AC	Hibridização com alvo complementar
PGSH /Atv/Imob/Hib_ANC	Hibridização com alvo não complementar
PVC	Policloreto de Vinila
Rct	Resistência à Transferência de cargas
RNA	Ácido Ribonucléico
SPE	Eletrodo Impresso
ssDNA	DNA de fita simples
VC	Voltametria Cíclica
ZIKA	Zika Vírus
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	Epidemiologia.....	16
2.1.1	Zika Vírus.....	18
2.1.2	Virologia e Detecção.....	20
2.2	Biossensores.....	22
2.2.1	Classificação dos biossensores.....	23
2.2.1.1	De acordo com o Transdutor.....	24
2.2.1.2	De acordo com o Biorreceptor.....	28
2.3	Elementos de biorreconhecimento nos genossensores.....	32
2.3.1	Principais métodos de detecção eletroquímica em genossensores.....	33
2.4	Principais técnicas de imobilização.....	35
2.5	Agentes modificadores.....	37
2.6	Principais técnicas eletroanalíticas.....	40
2.7	Caracterização morfológica.....	44
2.8	Eletroforese.....	46
2.9	Trabalhos relacionados.....	47
2.9.1	Biossensores para detecção do Zika Vírus.....	48
3	OBJETIVOS.....	51
3.1	Geral.....	51
3.2	Específicos.....	51
4	METODOLOGIA.....	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
6	CONCLUSÃO.....	80
7	PERSPECTIVAS.....	82
	REFERÊNCIAS.....	83
	APÊNDICES.....	104

1 INTRODUÇÃO

O Zika Virus (ZIKV) é um agente causador de zoonoses, um vírus de RNA de cadeia positiva pertencente à família Flaviviridae (gênero Flavivirus) (Yao *et al.*, 2021). Foi descoberto na Uganda em 1947 em macacos e detectado pela primeira vez em humanos na Nigéria em 1966. Em seguida causou surtos no Pacífico e na América entre 2007 a 2015. O primeiro caso de transmissão vertical notificado no Brasil ocorreu em 2015 (Magalhães *et al.*, 2022). Em 2016, o vírus da ZIKV foi declarado uma “Emergência de Saúde Pública” pela Organização Mundial de Saúde (do inglês, World Health Organization - WHO) logo após sua relação com a epidemia de casos de microcefalia em recém-nascidos. Isso ocorre devido a uma proteína encontrada em seu envelope viral que facilita o processo de fixação, fusão e entrada na célula hospedeira (Labibe and Chigbu, 2022). Logo, os flavivírus são hoje globalmente distribuídos, causando mais de 400 milhões de infecções anualmente (Pierson and Diamante, 2020).

Existem dois modos principais de transmissão: vetorial e não vetorial (Nelson *et al.*, 2019; Haddow *et al.*, 2020). A vetorial se dá, predominantemente, através da picada do mosquito fêmea *Aedes aegypti*. A não vetorial inclui formas verticais, de mãe para feto e horizontais, através de relações sexuais, transplantes de órgãos, entre outros. Os sintomas da infecção variam de erupções cutâneas, febre, conjuntivite, dores musculares e articulares. Além desses, o ZIKV ainda está associado a defeitos congênitos, parto prematuro, síndrome de Guillian-Barré, aborto espontâneo e microcefalias em recém-nascidos (Ali *et al.*, 2022). Mesmo sendo considerado um problema de saúde pública, a infecção pelo ZIKV não dispõe de terapia específica, vacina e medicamento (Pattnaik *et al.*, 2020; Ali *et al.*, 2022). Seu diagnóstico persiste em observação dos sintomas clínicos, circunstâncias epidemiológicas e exames laboratoriais. Esse problema ocorre devido à disponibilidade limitada de testes de diagnóstico e dificuldade para analisar os resultados, devido à sua semelhança com outros flavivírus circulantes patógenos aos seres humanos (WHO, 2022). À vista disso, novas tecnologias capazes de detectar essa infecção de maneira precoce e em tempo real tornam-se necessárias.

Os biossensores surgem como uma alternativa para auxiliar no diagnóstico, cuja metodologia apresenta alta especificidade, sensibilidade e segurança frente ao agente etiológico causador dessa infecção. Assim, o objetivo do presente estudo é desenvolver um genossensor eletroquímico para detecção rápida, sensível e específica do Zika Vírus.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia

O Zika Vírus foi descoberto em abril de 1947 em macacos Rhesus na floresta do Zika em Uganda, África, e apenas em 1954 foi associado a uma doença humana na Nigéria, África (Dick et al., 1952). Seu primeiro caso foi relatado em 1966 na Ásia, espalhando-se pela região Pacífica e América entre 2007 e 2015. Investigações filogenéticas sugerem que o Zika Vírus divergiu em duas linhagens: uma africana e outra asiática (Pettersson *et al.*, 2018). Todas as cepas epidêmicas identificadas na região do Pacífico e nas Américas desde 2007 pertencem à linhagem asiática (Liu *et al.*, 2019). Seu primeiro grande surto surgiu em 2007 na Ilha Yap, na Micronésia, enquanto o segundo ocorreu em 2013 na Polinésia Francesa, infectando cerca de 11% de toda a sua população (Souza, 2017; Ali *et al.*, 2022). Em seguida, o mundo viu um surto de infecções pelo Zika vírus, com milhares de casos espalhados pela França, Itália, Espanha, Honduras, Venezuela, El Salvador, Estados Unidos, Indonésia, Filipinas, Caribe e assim por diante. Em dezembro de 2021, cerca de 89 países e territórios tinham evidências documentadas de transmissão do vírus por mosquitos (WHO, 2022). É possível observar na **Figura 1** a distribuição dos casos e surtos do ZIKV em 2022, segundo o Centro de Prevenção e Controle de Doenças dos EUA (do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention - CDC*).

As infecções pelo Zika Vírus não foram documentadas na América do Sul até seu primeiro relato de transmissão no Brasil. Notificado na Bahia em março de 2015, relatos indicam que sua introdução no Brasil ocorreu durante a Copa das Confederações em 2013, causando uma grande epidemia no país (Campos *et al.*, 2015; Faria *et al.*, 2016). Em contrapartida, há relatos de que o vírus tenha sido introduzido no Brasil durante a Copa do Mundo em 2014 (Zanluca *et al.*, 2015). Entretanto, há relatos de que nenhum país do Pacífico com a infecção documentada pelo Zika Vírus havia participado da competição (Younger, 2016). Outras possibilidades da introdução do vírus no Brasil seriam através da participação de alguns países do Pacífico no campeonato de *Va'a World Sprints* que ocorreu no Rio de Janeiro em agosto de 2014 ou através de viajantes do Chile (Musso *et al.*, 2014; Salvador and Fujita, 2016).

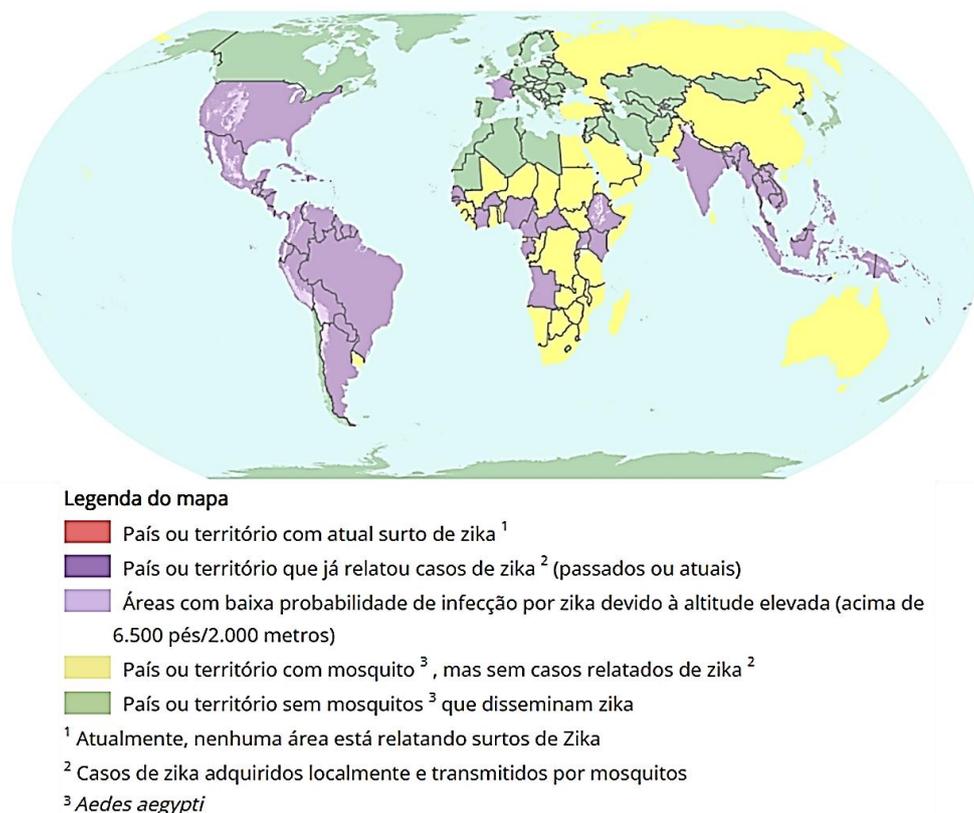


Figura 1. Distribuição dos casos e ou surtos do ZIKV em 2022. Fonte: Centro de Prevenção e Controle de Doenças dos EUA - CDC, 2022.

Independentemente de como o vírus foi introduzido no Brasil, surtos infecciosos foram observados em quase todo o país logo após seu primeiro caso confirmado. Em outubro de 2014, o vírus se espalhou por pelo menos 14 estados brasileiros e em dezembro, o Ministério da Saúde estimou mais de 1,3 milhão de casos suspeitos em todo o Brasil (Hennessey *et al.*, 2016; Petersen *et al.*, 2016). Entre 2015 e 2016, surtos de microcefalia atingiram predominantemente o Nordeste brasileiro, representando um problema sanitário de saúde internacional. É possível observar na **Figura 2** a situação epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo Zika vírus no Brasil entre 2015 e 2022, de acordo com o Boletim Epidemiológico publicado pela Vigilância em Saúde (2022). Neste mesmo período, mais de 4.000 bebês nasceram com microcefalia e mais de 10 mil casos de Síndrome Congênita do Zika vírus (SCZ) foram notificados no Brasil, e destes, 2.080 foram confirmados (Gulland, 2016; Lima and Iriart, 2021). Ainda em 2016, o Zika vírus foi declarado um “Problema de Saúde Pública e Global” pela

WHO. Atualmente, mesmo com políticas de saúde pública, é possível observar casos da infecção, principalmente em locais com baixa vulnerabilidade econômica.

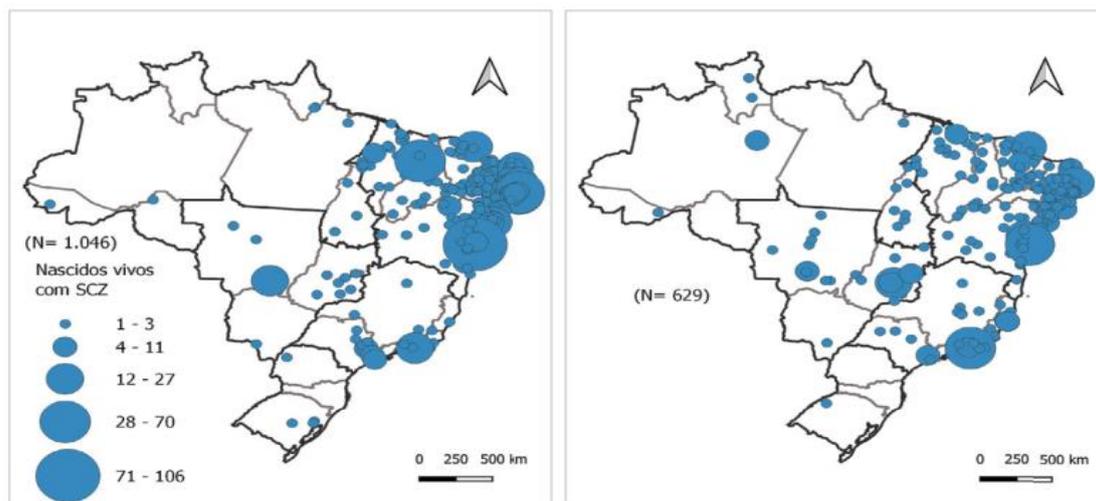


Figura 2. Distribuição por região no ano de 2015 (esquerda) e 2016 (direita) dos nascidos vivos confirmados com síndrome congênita associada à infecção pelo Zika vírus. Fonte: Boletim Epidemiológico publicado pela vigilância de Saúde (2022).

2.1.1 Zika Vírus

Pertencente ao gênero *Flavivirus*, o Zika vírus possui RNA de cadeia positiva, não segmentada, envelopada e fita simples (**Figura 3**). Seu envelope contém proteínas cujas ligações à superfície das células hospedeiras lhe proporciona e facilita o processo de fixação, fusão e entrada (Labibe and Chigbu, 2022). Outros vírus patogênicos aos seres humanos dispõem destas mesmas características, tais como o vírus da Dengue, Hepatite C, Febre Amarela, Encefalite Japonesa, e Nilo Ocidental (Liu *et al.*, 2019; Labibe and Chigbu, 2022). Possui tamanho aproximado entre 30 a 45 μm ; RNA com um comprimento de 10,8 kb; pode ser preservado até 6 meses em glicerol a 50% e até 30 meses após sua secagem; é susceptível ao éter anestésico e seu ponto de morte térmica é em 58°C por 30 minutos (Younger, 2016; Liu *et al.*, 2019).



Figura 3: Mosquito *Aedes aegypti*. Foto: Lauren Bishop, Fonte: Globo.com.

Contudo, mesmo apresentando muita similaridade na organização do genoma e estrutura do vírion entre o Zika vírus e os outros flavivírus, estudos atuais mostram evidências distintas, no qual o Zika vírus adquire algumas propriedades diferentes de outros flavivírus (Liu *et al.*, 2019). O ZIKV consegue atravessar a placenta e causar defeitos congênitos e neurológicos graves nos fetos, tal como a microcefalia (Mlakar *et al.*, 2016; Hoen *et al.*, 2018). As consequências de sua infecção vêm sendo estudadas há mais de 50 anos em modelos animais e humanos, principalmente após testes de infecção cruzada revelarem diferenças entre a Febre Amarela, Dengue e Encefalomielite (Dick *et al.*, 1952; Younger, 2016). Por meio dos esforços da comunidade científica, vários estudos *in vivo* e *in vitro* foram e estão sendo desenvolvidos para analisar as complicações dessa infecção viral.

Dentre os dois modos de transmissão, a vetorial se dá através da fêmea do mosquito *A. aegypti*, que pode ser encontrada em quase todos os países do hemisfério, com exceção do Canadá e Chile continental (Nelson *et al.*, 2019; Haddow *et al.*, 2020; WHO, 2022). Há relatos que além do *A. aegypti*, a infecção pode ocorrer por *A albopictus*, *A africanus*, *A luteocephalus*, *A vittatus*, *A furcifer*, *A hensilii* e *A apicoargenteus* (Younger, 2016). Por serem mosquitos predominantemente domésticos, podem se reproduzir facilmente em qualquer ambiente ou reservatório que retenha água parada. Como um arbovírus transmitido por mosquitos, ele entra na corrente sanguínea e se replica em vários órgãos (Wen *et al.*, 2009). Isto porque a fêmea do *A. aegypti* necessita

de sangue humano para o desenvolvimento dos seus ovos e para o seu metabolismo. Já, a transmissão não vetorial se dá por meio vertical, da mãe para os filhos via placenta ou amamentação, horizontal por transmissão sexual, ocular, transfusão sanguínea, transplante de órgãos e exposição laboratorial (**Figura 4**) (Gregory *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2017; Nelson *et al.*, 2019; Haddow *et al.*, 2020; Major *et al.*, 2021; Ali *et al.*, 2022; Labibe and Chigbu, 2022).

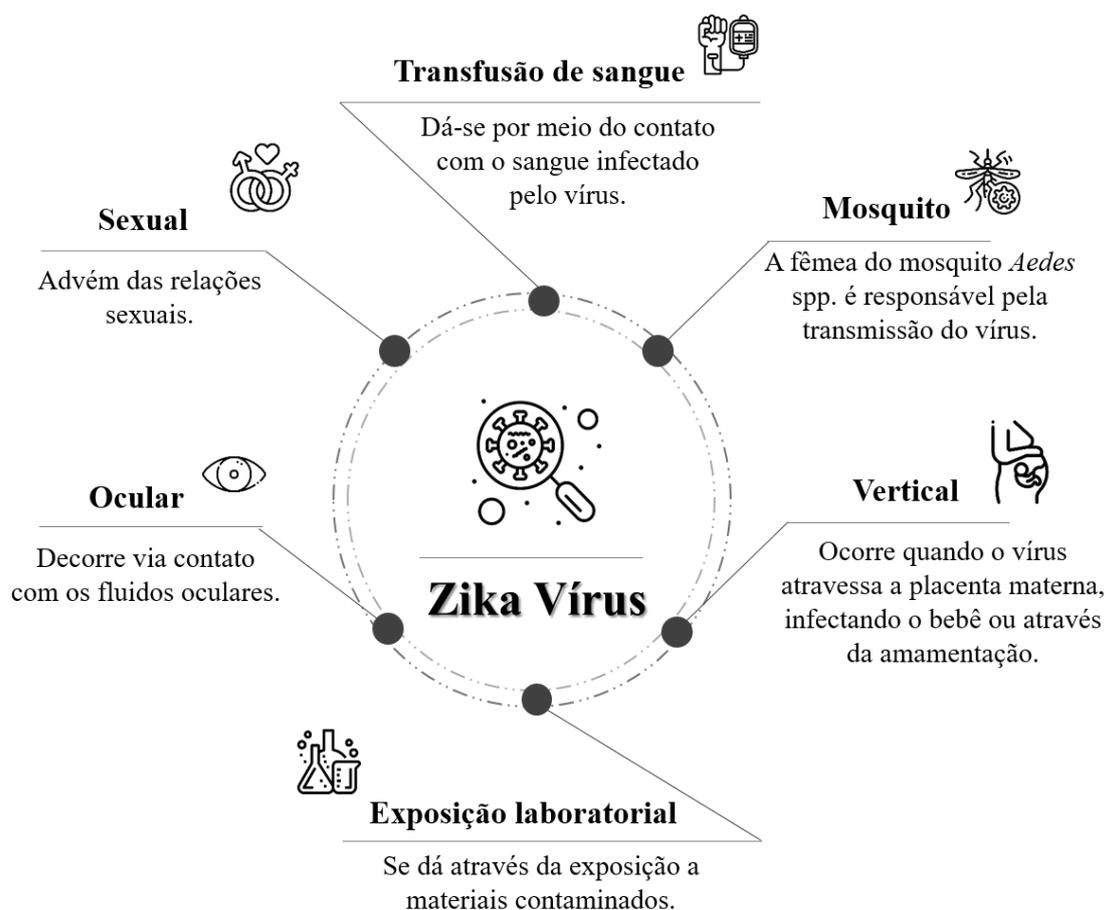


Figura 4. Diferentes formas de transmissão do Zika Vírus. Fonte: Autora, 2022.

2.1.2 Virologia e Detecção

O Zika Vírus consegue se ligar aos receptores de superfície celular que suportam infecção e replicação, tais como células neurais, dendríticas, fibroblastos dérmicos, endoteliais, macrófagos, células epiteliais do pigmento da retina, queratinócitos epidérmicos e trofoblastos para causar infecção (Labibe and Chigbu, 2022). Após a proteína do envelope celular do Zika Vírus reconhecer e ligar-se às células alvos, ocorre

um processo de descamação para liberar o genoma do RNA viral no citoplasma da célula hospedeira (Atif *et al.*, 2016). Existem formas sintomáticas e assintomáticas, cuja variação depende da gravidade da infecção. As formas sintomáticas incluem conjuntivite, erupções cutâneas, dores de cabeça, febre, desconfortos musculares e articulares, persistindo de 2 a 7 dias (Ali *et al.*, 2022). Além desses, outros sintomas foram relatados tais como hemospermia, perda de audição, inchaços musculares nas mãos e cotovelos e sangramento subcutâneo (Tappe *et al.*, 2014; Musso *et al.*, 2015; Karimi *et al.*, 2016). Casos mais graves incluem a síndrome de Guillain-Barré, Síndrome Congênita do Zika e problemas neurológicos em fetos e lactantes, tal como a restrição de crescimento intrauterino, abortos espontâneos e microcefalia (Hoen *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019; Labibe and Chigbu, 2022).

Atualmente não existe nenhum medicamento ou vacina específica para seu tratamento (WHO, 2022). Seu diagnóstico persiste em observação dos sintomas clínicos, circunstâncias epidemiológicas e exames laboratoriais. Os dois procedimentos principais baseiam-se na detecção do RNA viral via Teste de Amplificação de Ácido Nucleico (do inglês, *Nucleic Acid Amplification Test - NAAT*), que consiste na Transcrição Reversa Seguida da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (do inglês, *Reverse Transcription Followed by Real Time Polymerase Chain Reaction - RT-PCR*), e detecção de anticorpos por meio de ensaios sorológicos (do inglês, *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay - ELIZA*) com confirmação por ensaios de Microneutralização ou Redução de Neutralização (do inglês, *Neutralization For Plaque Reduction - PRNT*). O RT-PCR é útil entre o 3º e 5º dia após o início dos sintomas, enquanto os anticorpos conseguem detectar o vírus após o 5º dia de infecção. Entretanto, ambas as formas de diagnóstico podem apresentar falhas quanto se trata da detecção do vírus de forma rápida e segura, ou seja, sem falsos negativos ou positivos para o paciente. Além disso, esse diagnóstico torna-se ainda mais dificultoso quando os casos são assintomáticos ou quando os mesmos apresentam coinfeções e comorbidades.

A observação dos sintomas pode resultar em conclusões equivocadas devido à grande semelhança do vírus com outros patógenos comentados anteriormente. Análises laboratoriais demandam tempo, um vilão para portadores da forma mais grave da infecção tais como gestantes, cujo diagnóstico de forma precoce pode favorecer o tratamento e intervenção, evitando abortos e má formação fetal. Atualmente, muitos países possuem sistemas limitados quando se trata da detecção, notificação e monitoramento das doenças

causadas pelo ZIKA (WHO, 2022). Esses fatores comprovam a necessidade de métodos alternativos para diagnóstico do agente etiológico causador da infecção viral. Dessa forma, pesquisas nesse ramo vêm despertando bastante interesse, uma vez que, tratando-se do monitoramento e diagnóstico terapêutico na saúde, a atenção precisa ser redobrada. Por consequência, investimentos em dispositivos analíticos visando a quantificação e detecção de analitos alvos são extremamente necessários nesse setor. Logo, os biossensores surgem como um método promissor para a detecção de um alvo de interesse médico.

2.2 Biossensores

Um biossensor é um sistema analítico que pode detectar um analito biológico, cujo elemento de reconhecimento é uma biomolécula, traduzindo as informações de presença e/ou concentração em dados analíticos, como sinais elétricos, ópticos e térmicos, usando uma operação simples, de baixo custo e com economia de tempo (Makvandi *et al.*, 2021; Mohankumar *et al.*, 2021; Presutti *et al.*, 2022). As pesquisas envolvendo biossensores começaram no ano de 1962, com o projeto envolvendo a detecção de oxigênio no sangue usando enzimas, introduzido por Clark e Lyons (Abid *et al.*, 2021). Mas, foi apenas depois do surgimento do primeiro biossensor para medição da glicose, desenvolvido por Updike e Hickes em 1967 que os estudos nesse ramo se intensificaram. Hoje é possível observar as variações dos biossensores para glicose encontrada no mercado farmacológico e, mesmo após 70 anos do seu lançamento, ainda é objeto de estudo nos dias atuais. Além do monitoramento da glicose, os biossensores são utilizados para detectar e medir baixas concentrações de patógenos específicos, produtos químicos, tóxicos e em diversos níveis de pH (Naresh and Lee, 2021). Esse emprego diverso é resultado da inovação de ferramentas de diagnóstico específicas por meio da integração de elementos de detecção biológica, cujo principal objetivo é a detecção de alvos específicos dispersos em uma amostra, de maneira rápida e econômica (Presutti *et al.*, 2022).

Os biossensores possuem diferentes formas, tamanhos e funções, cuja utilização está diretamente relacionada com o objetivo da análise. Devem possuir alta sensibilidade, seletividade, linearidade, reprodutibilidade, alto alcance e resolução, proporcionando baixo desvio e tempo de resposta (Dincer *et al.*, 2019; Naresh and Lee, 2021). São constituídos por um sistema de detecção composto por um receptor, um transdutor e um

sistema de leitura, cuja junção é capaz de medir diretamente um analito alvo disperso em uma amostra (Huang *et al.*, 2021). Após a detecção do sinal, o mesmo é registrado e transmitido para um display, podendo ser observado na **Figura 5** (Li *et al.*, 2021; Naresh and Lee, 2021). A interação específica do elemento biológico com o alvo resulta na alteração de uma ou mais propriedades físico-químicas, produzindo sinais proporcionais à concentração do analito (Li *et al.*, 2021). A resposta final é medida de forma qualitativa e/ou quantitativa de um analito (por exemplo, um patógeno) a partir da ligação específica do biorreceptor com o alvo.

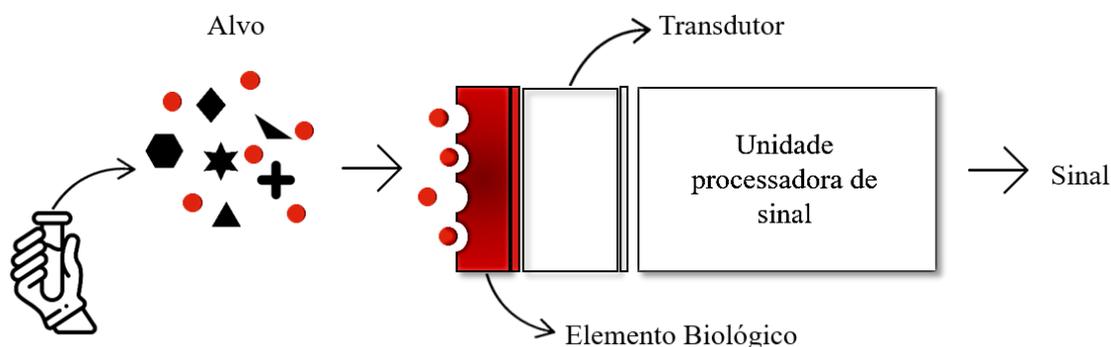


Figura 5. Unidades que compõem um biossensor. Fonte: Autora, 2022.

2.2.1 Classificação dos Biossensores

A classificação dos biossensores é realizada de acordo com os transdutores e biorreceptores utilizados em sua produção. Quanto aos transdutores, podem ser classificados em eletroquímicos, acústicos, calorimétricos e ópticos (Karunakaran *et al.*, 2015; Abid *et al.*, 2021; Ekrami *et al.*, 2021; Lopes *et al.*, 2022). De acordo com o elemento de reconhecimento biológico, os biossensores podem ser classificados como enzimáticos, imunossensores, genossensores, celulares e biomiméticos. Os tipos de biorreceptores e transdutores estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1: Tipos de biossensores de acordo com biorreceptor e transdutor.

Biossensor	Biorreceptor	Transdutor	Aplicações (alvo)
Eletroquímico	Enzimas, Anticorpos, Ácidos nucléicos (DNA, RNA),	Amperométrico	Medição via corrente de substratos enzimáticos
		Potenciométrico	Medição via voltagem de íons, espécies redox
		Condutimétrico	Medição via condutância de reações catalíticas
		Impedimétrico	Medição via impedância
Gravimétricos/ Acústico	Células, Biomiméticos	Piezoelétricos	Medição de massa de gases voláteis
Calorimétricos		Termistores, diodo	Medição via calor de organelas, vitaminas
Óptico		Fibras ópticas (fluorescente, SPR, Raman, SERS, FTIR)	Medição via luminosidade de enzimas

A seguir, serão abordadas de forma mais detalhada as classificações dos biossensores de acordo com o tipo de transdutor utilizado.

2.2.1.1 De acordo com o transdutor

Um transdutor é definido como um dispositivo que pode converter energia de uma forma para outra e são categorizados com base em métodos de transdução do sinal (Alhadrami, 2018; Naresh and Lee, 2021). O transdutor pode variar de acordo com sua forma e função, de modo que se adeque às medidas de interesse. O tipo de transdução de sinal segue a característica química e física da reação gerada pelo componente biológico. As perturbações da interação do alvo com o bioreceptor é recebida pelo transdutor e convertida em sinais mensuráveis e quantificáveis, que podem ser eletronicamente visualizados, amplificados e armazenados. De acordo com o seu princípio operacional, os transdutores são amplamente categorizados como gravimétricos, térmicos, ópticos e eletroquímicos (Abid *et al.*, 2021; Naresh and Lee, 2021).

a) Gravimétricos

São biossensores baseados em pequenas mudanças na massa do material de ligação, como proteínas ou anticorpos na superfície, o que resulta na geração de um sinal mensurável (Naresh and Lee, 2021). São empregados finos cristais de quartzo piezoelétricos, que vibram em uma frequência específica de acordo com a corrente aplicada e a massa do material detectado (Cali *et al.*, 2020). Assim, à medida que a massa aumenta, resultado do evento de biorrenhecimento, a frequência oscilante diminui e o sinal pode ser analisado (Antiochia, 2021). Os transdutores gravimétricos mais utilizados são sensores baseados em magnetoelásticos (MES), microbalança de cristal de quartzo (QCM) e piezoelétricos. Dentre esses, a abordagem piezoelétrica se destaca por apresentar várias características atraentes como a sensibilidade devido ao alto módulo de elasticidade, monitoramento em tempo real, custo-benefício, alto limite de detecção, frequência, estabilidade e linearidade (Lu *et al.*, 2020; H. Li *et al.*, 2022).

b) Calorimétricos ou Térmicos

Os biossensores que utilizam transdutores térmicos trabalham basicamente com a detecção do analito via variação de temperatura, ou seja, as mudanças no calor produzido ou consumido em uma reação química são medidas ao longo de um período específico de tempo. A energia liberada ou absorvida é proporcional à entalpia molar e ao número total de moléculas do produto criado na reação bioquímica (Eyvazi *et al.*, 2021). Essa alteração é diretamente proporcional à quantidade de reagentes consumidos ou produtos formados e, conseqüentemente, à quantidade de analito alvo. Entretanto, algumas informações dos sensores térmicos não são confiáveis devido a fatores como perda de calor (por radiação ou convecção), aquecimento do sensor (após aplicação de um campo elétrico gerado por uma fonte externa) e deformação do sensor (pressão mecânica) (Bordbar *et al.*, 2021). Os termopares, termistores e semicondutores são bastante empregados nessa forma de detecção.

c) Ópticos

Os transdutores ópticos são baseados nas modificações das propriedades ópticas, permitindo quantificar a concentração do analito alvo por meio de alterações na luz emitida por um sistema reacional, seja biológico ou químico (Ekrami *et al.*, 2021). Diversos fenômenos físico químicos podem ser observados como: absorção, índice de

refração, fluorescência, fosforescência e refletividade (Antiochia, 2021). Os biossensores ópticos mais comumente usados são baseados em fluorescência, quimioluminescência, ressonância de plasmon de superfície (SPR) e fibra óptica (Chen and Wang, 2020; Abid *et al.*, 2021). Dentre esses, a fluorescência e a SPR são, sem dúvida, as técnicas mais utilizadas (Antiochia, 2021). Os biossensores ópticos apresentam bom desempenho na detecção de sistemas biológicos, promovendo avanços significativos em diagnósticos clínicos, descoberta de medicamentos, controle de processos de alimentos e monitoramento ambiental (Chen and Wang, 2020).

d) Eletroquímicos

Os biossensores eletroquímicos são capazes de converter sinais biológicos em sinais elétricos quantificáveis, tendo as enzimas como componentes mais utilizados devido sua capacidade específica de ligação com o alvo e atividade biocatalítica (Ekrami *et al.*, 2021). Assim, à medida que ocorre o consumo ou geração de espécies eletroativas durante a reação química/biológica, o transdutor processa e mensura a concentração do analito presente na amostra. Essa resposta varia de acordo com a mudança de alguns fatores, tais como; corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga. Na interface eletrodo - solução ocorre a transferência de elétrons de uma espécie para o eletrodo ou vice-versa. Para que essa técnica seja utilizada é essencial a utilização de um potenciostato para controlar o potencial aplicado e medir as correntes do eletrodo de trabalho.

Os biossensores eletroquímicos são populares por seus princípios e funcionamento visando as propriedades eletroquímicas do conversor e do analito (Malecka-Baturo, 2022). Dentre suas vantagens, as mais observadas e discutidas são alta seletividade, condutividade, estabilidade, baixo custo (Farzim *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2020). Além disso, os biossensores eletroquímicos podem ser miniaturizados, apresentar respostas rápidas e em tempo real (principalmente de agentes nocivos à saúde) (Lakard *et al.*, 2021). Os biossensores eletroquímicos podem ser amperométricos, condutimétricos, impedimétricos, potenciométricos e voltamétricos (Lu *et al.*, 2020; Naresh and Lee, 2021).

Os **biossensores amperométricos** baseiam-se na aplicação de um potencial para gerar uma corrente elétrica, resultante de alterações de oxidação ou de redução de espécies eletroativas na superfície do eletrodo (Oliveira, 2017). Essa corrente é diretamente proporcional à concentração/quantidade do agente eletroativo (alvo) presente

na amostra analisada. Um pré-requisito para o desenvolvimento deste dispositivo é estabelecer uma transferência rápida de elétrons do componente biológico para o eletrodo. Pode ser utilizado no monitoramento de marcadores ambientais, industriais, fármacos no sangue e urina, biomarcadores para doenças e infecções, entre outros (Schachinger *et al.*, 2021). Apresentam alta estabilidade, sensibilidade e facilidade de construção.

Os **biossensores potenciométricos** conseguem detectar concentrações de íons dispersos em uma amostra. A diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência em condições de corrente elétrica constante é medida. Os biossensores potenciométricos mencionam a concentração e atividade de íons livres, função diferente dos outros métodos analíticos que fornecem concentrações totais de determinado alvo. Dentre suas vantagens, destacam-se tamanho reduzido, rápida resposta, facilidade de uso, baixo custo e resistentes a interferências (Ding and Qin, 2020).

Já os **biossensores condutimétricos** são baseados na mudança na condutividade da solução. Não necessita da utilização de eletrodo de referência, uma vez que a condutividade dos eletrólitos varia de acordo com a exposição a diferentes ambientes. Assim, o sinal obtido depende significativamente da temperatura (Xu *et al.*, 2017). São dificilmente manipulados, entretanto, quando utilizados permitem analisar alterações de condutância por meio de enzimas que consomem/produzem constituintes iônicos modificando o número de cargas do eletrólito (Villalonga *et al.*, 2022). Esses biossensores podem ser facilmente miniaturizados, produzidos em larga escala e com tecnologia de baixo custo. Esses dispositivos são facilmente utilizados para monitorar processos metabólicos em sistemas biológicos vivos (Radhakrishnan *et al.*, 2014; Naresh and Lee, 2021).

Os **impedimétricos** medem as mudanças na impedância na superfície do sensor à medida que ocorre a ligação seletiva do alvo (Kim *et al.*, 2019). O potencial/corrente pode ser detectado através de uma ampla faixa de frequências de corrente/potencial alternada. A razão entre o potencial senoidal e a corrente é definido como impedância (Z) e reflete as diferenças de fase e amplitude do potencial e da corrente, permitindo análises dos processos interfaciais do eletrodo, tais como transferência de cargas e difusão de espécies eletroativas (Wang *et al.*, 2021). A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) fornece uma análise não destrutiva de alguns parâmetros celulares e propriedades interfaciais do alvo presente na amostra. A interação entre o biorreceptor e o analito causa

mudanças na impedância da superfície do eletrodo de trabalho após cada modificação, podendo aumentar ou diminuir a resistência à transferência de cargas (Antiochia, 2022).

Por fim, os **biossensores voltamétricos** são semelhantes aos amperométricos baseando-se na medição da corrente-potencial, entretanto, a corrente resultante das interações do analito com o elemento de reconhecimento é medida durante variações controladas do potencial e não em um potencial fixo como ocorre na amperometria (Ferreira, 2014). Assim, os níveis de corrente são monitorados em função do potencial aplicado, tendo a faixa de varredura escolhida de acordo com o objetivo. As técnicas mais comuns para detecção voltamétrica são Voltametria Cíclica (CV), Voltametria de Pulso Diferencial (DPV) e Voltametria de Pulso de Onda Quadrada (SWV) (Liu *et al.*, 2022).

2.2.1.2 De acordo com o Biorreceptor

Os biorreceptores são elementos de reconhecimento biológico que reagem especificamente com um analito de interesse para produzir um sinal mensurável. Operam como sensores em função das suas propriedades bioquímicas, tornando-os sensíveis e seletivos para detecção de biomarcadores com mínima interferência de outros microrganismos ou moléculas presentes na amostra em análise (Abid *et al.*, 2021). Sua alta especificidade e forte interação das sondas biológicas com as moléculas alvo resultam em ligações mais eficientes do analito e/ou ligante (Farzim *et al.*, 2018). Vários biorreceptores vêm sendo desenvolvidos, estudados e descritos na literatura, com a finalidade de evitar ao máximo a interferência de agentes não específicos na análise e na interpretação dos dados. As enzimas, anticorpos e aptâmeros são as principais classes de biorreceptores que são mais utilizados em aplicações de biossensoriamento.

Os elementos de reconhecimento podem ser inseridos em três diferentes grupos: os de afinidade, que se baseiam na interação do ligante com o receptor; os catalíticos, cuja interação do biorreceptor com o alvo resulta na modificação do substrato em um produto detectável pelo transdutor e os biomiméticos, que utilizam elementos biológicos sintéticos ou modificados que possuem os mesmos princípios dos de afinidade e catalíticos naturais (Oliveira, 2017). Os biossensores catalíticos dispõem das enzimas (enzimáticos), organelas, células vegetais e animais e até fragmentos de tecidos, os quais são bastante utilizados na detecção clínica e ambiental (Mehrotra, 2016; Mohankumar *et*

al., 2021). Inseridos nos biossensores de afinidade podem ser encontrados os anticorpos e antígenos (imunossensores), e ácidos nucleicos (genossensores). Por fim, os sensores biomiméticos possuem sistemas similares aos ligantes naturais convencionais.

Diante disso, uma grande variedade de biorreceptores podem ser explorados. A seguir são descritos os principais biossensores classificados de acordo com a variedade de moléculas biológicas existentes.

a) Enzimáticos

Os biossensores enzimáticos são dispositivos analíticos que utilizam enzimas como elementos de reconhecimento biológico para detectar a presença de substâncias alvo. Eles funcionam através da conversão de uma reação química em um sinal elétrico ou óptico, permitindo a quantificação da substância alvo. As enzimas são biomoléculas que sempre atraíram a atenção dos pesquisadores devido às suas propriedades específicas em relação a substratos e sua capacidade de serem inibidas usando análogos de substratos (Kaur *et al.*, 2019). Essa grande atenção é consequência de sua excelente seletividade e alta atividade catalítica, motivos pelos quais tem atraído grande interesse em meio a outros receptores (Cavalcante *et al.*, 2021; Silvestri *et al.*, 2022). Podem ser utilizadas para detecção de biomarcadores como patógenos e doenças em estágios iniciais, mostrando alto desempenho e confiabilidade. É importante frisar que, apesar dos anticorpos e oligonucleotídeos serem amplamente empregados, as enzimas são os elementos mais utilizados na construção dos biossensores.

Tratando-se da detecção enzimática, duas classes são destacadas; na primeira classe, a enzima detecta a presença de um substrato, cosubstrato ou cofator (biossensor de glicose, por exemplo), já a segunda classe é baseada na detecção de inibidores na presença de um substrato (detecção de compostos usados como pesticidas, por exemplo) (Farzim *et al.*, 2018). Ambas apresentam alta sensibilidade e especificidade catalítica em relação às suas moléculas alvo. Tratando-se de condutividade, seu emprego vem ganhando cada vez mais destaque no mercado de biossensores. Por exemplo, enzimas oxirredutoras podem ser facilmente aplicadas na síntese de alguns polímeros condutores (Ramanavicius and Ramanavicius, 2021). Além destas, algumas enzimas geneticamente modificadas permitem melhorar a capacidade de desempenho dos biossensores atuais para detecção

de analitos alvos (Farzim *et al.*, 2018). Essa otimização é resultado dos avanços em pesquisas científicas e aplicações tecnológicas, especialmente no campo da nanotecnologia (Wang *et al.*, 2019). Dessa forma, quando trazidas para nanotecnologia, essas enzimas melhoram sua capacidade de imobilização, característica crucial na transdução dos biossensores, tais como: relação superfície-volume, resposta de sinal, sensibilidade e condutividade (Cavalcante *et al.*, 2021). Portanto, é cada vez mais evidente que a nanotecnologia está avançando rapidamente e os nanomateriais estão se tornando um importante pilar da pesquisa biomédica (Rinoldi *et al.*, 2021).

A utilização de enzimas apresenta algumas desvantagens que podem limitar sua aplicação. Elas geralmente são caras e sofrem com a falta de estabilidade química e térmica, além de uma baixa vida útil quando retiradas do seu ambiente nativo (Farzim *et al.*, 2018; Silvestri *et al.*, 2022). Vale frisar que alguns produtos químicos (agrotóxicos e pesticidas, por exemplo) podem interagir ou se ligar especificamente às enzimas imobilizadas, resultando em mudanças estruturais no sítio ativo das enzimas, inibindo sua bioatividade (Yang *et al.*, 2022). Porém, a utilização de matrizes, tal como polímeros condutores, minimiza essas desvantagens e, ao mesmo tempo, oferece uma estratégia eficaz para preservar a atividade enzimática. Ou seja, a matriz polimérica fornece um ambiente adequado para a imobilização da enzima, mantendo sua atividade a longo prazo, especialmente em medições eletroquímicas (Zhang *et al.*, 2018; Dinu e Apetrei, 2022).

b) Imunossensores

Esses dispositivos utilizam a interação específica entre um antígeno e um anticorpo (interação Ag-Ab) para detectar a presença ou quantificar a concentração de um determinado analito em uma amostra por meio da conversão de um sinal bioquímico em um sinal elétrico (Hassan *et al.*, 2022). O processo de detecção utilizando imunossensores começa com a preparação da superfície de detecção. Geralmente, essa superfície é constituída por um material sólido, como vidro ou sílica, que é funcionalizado com anticorpos específicos para o analito em questão. Esses anticorpos são imobilizados na superfície de detecção através de processos químicos ou físicos. Quando a amostra a ser analisada é aplicada na superfície de detecção, os analitos presentes na amostra irão se ligar aos anticorpos imobilizados, processo chamado de ligação antígeno-anticorpo e resulta na formação de complexos antígeno-anticorpo na superfície de detecção (Monošík *et al.*, 2012; Ali *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2022). Após a formação desses complexos, é

necessário detectá-los, isso pode ser feito de diversas maneiras, dependendo do tipo de imunossensor utilizado, em geral, as técnicas de detecção mais comuns incluem a espectroscopia, a eletroquímica e a impedância elétrica (Monošík *et al.*, 2012; Ali *et al.*, 2022).

Dentre as vantagens observadas nos imunossensores, destacam-se o baixo custo de produção, estabilidade, capacidade de regeneração, alta acurácia e sensibilidade (Makvandí *et al.*, 2021; Kumaran *et al.*, 2022). Outra vantagem comumente observada reside no fato do analito alvo e antígeno não precisarem ser purificados antes da detecção, o que otimiza o tempo de processamento da amostra (Lakard, 2020). Além disso, os imunossensores também podem ser miniaturizados, apresentando-se como dispositivos portáteis capazes de realizar rápidas análises, tornando-os ainda mais acessíveis e indicados para o biomonitoramento. Dessa forma, com foco nessas características, esses dispositivos fazem grande progresso no diagnóstico médico, controle de qualidade alimentar e ambiental, detecção de agentes biológicos e farmacêuticos, entre outras aplicações (Hadžić *et al.*, 2021; Yao *et al.*, 2022).

c) Celulares

Também conhecidos como microbiológicos, os biossensores celulares dispõem de estruturas celulares como elemento de reconhecimento. Em geral, todo tipo de célula pode ser manipulado para desenvolver esse tipo de biossensor, entretanto, as mais utilizadas são células bacterianas, algas, fúngicas, peixes, ratos e seres humanos (Brennan *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2019). Baseia-se na capacidade da célula em detectar as condições do microambiente intra e extracelular, além de parâmetros fisiológicos, gerando uma resposta quando interage com o alvo. Quando as células sentem os estímulos externos, o sinal gerado passa pelo transdutor que o converte e amplifica, tornando a existência e a concentração do alvo conhecido na amostra analisada (Zhang *et al.*, 2021). Mesmo apresentando resistência e adaptabilidade, as respostas físico-químicas das reações podem ser afetadas de acordo com o meio, temperatura, pH, entre outros, sendo necessário a padronização e otimização do sistema de detecção (Kim *et al.*, 2018). A vista disso, destaca-se a importância do manuseio correto das células que serão utilizadas, uma vez que apresentam um sistema cinético dinâmico com várias reações de oxirredução e mudanças na composição iônica nos diferentes processos biológicos.

Diferentes tipos de sistemas de transdução/detecção têm sido utilizados em biossensores microbianos, sendo os eletroquímicos e ópticos os mais destacados (Hicks *et al.*, 2020; Siontorou, 2022). São amplamente utilizados no monitoramento ambiental (metais pesados, por exemplo), bioprodução, aplicações biomédicas em diagnósticos e monitoramento em saúde (marcadores de doenças), identificar a presença de bactérias patogênicas em alimentos e bebidas (Watstein and Styczynski, 2018; Wan *et al.*, 2019; Hicks *et al.*, 2020; Siontorou, 2022). Tratando-se de aplicações médicas, os biossensores celulares oferecem diagnósticos mais rápidos do que os métodos tradicionais, onde a cultura do agente infeccioso é comumente necessária, bem como o transporte para um laboratório de testes (Hicks *et al.*, 2020). Todavia, apesar de suas notórias vantagens, esses dispositivos frequentemente apresentam baixa confiabilidade, podendo ter seu desempenho de detecção afetado devido sua baixa sensibilidade e limite de detecção (LoD) (Shemer *et al.*, 2017; Landry *et al.*, 2018). Deste modo, ainda são necessários esforços consideráveis para solucionar esses problemas relacionados ao processo de detecção desses dispositivos.

d) Genossensores

O princípio de funcionamento dos genossensores baseia-se na hibridação do oligonucleotídeo sonda com a sequência complementar presente na amostra, formando uma dupla hélice, o que resulta em uma mudança detectável no sinal do sensor (Paniel *et al.*, 2013; Zidarič *et al.*, 2022). Podem ser usados em diversas aplicações, tais como; diagnóstico de doenças, detectando a presença de agentes patogênicos em amostras biológicas, como sangue, urina e saliva; monitoramento ambiental, detectando organismos patogênicos em água e solo; testes de segurança alimentar, identificando a presença de bactérias patogênicas em alimentos e bebidas; identificação de espécies, detectando espécies de plantas, animais e microrganismos (Enter and Hauff, 2018; Romanholo *et al.*, 2021).

2.3 Elementos de biorreconhecimento dos genossensores

Os elementos de bioreconhecimento mais comuns utilizados nos genossensores são os ácidos nucleicos complementares, como o DNA ou RNA, que se ligam especificamente ao alvo de interesse, permitindo a detecção e quantificação precisa de sequências específicas de ácidos nucleicos. A detecção do alvo ocorre pelo processo de

hibridização entre a molécula imobilizada no transdutor (ssDNA) e sua sequência complementar (alvo), de modo que, ao adquirir a conformação de dupla hélice (dsDNA), um sinal é gerado proporcional à concentração do alvo na amostra analisada. Importante frisar que a detecção é altamente seletiva e resulta das propriedades específicas da interação das bases nitrogenadas presentes nos oligonucleotídeos. Contudo, a estabilidade da dupla hélice (ligação da sonda com o alvo) depende da sequência de nucleotídeos que compõe a sonda que será hibridizada, isto é, uma combinação perfeita na sequência de nucleotídeos da sonda produz uma fita dupla hibridizada altamente estável e facilmente detectada pelo transdutor (Zhang *et al.*, 2016; Oliveira, 2017).

Além dos ácidos nucléicos, os genossensores podem utilizar aptâmeros como elementos de biorreconhecimento. Os aptâmeros são compostos por sequências de ácidos nucléicos artificiais que são gerados por meio de bibliotecas computacionais que contém diversas sequências de oligonucleotídeos. Sua síntese dar-se-á por meio do método de Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX). Quando interagem com o alvo, os aptâmeros se dobram em uma estrutura 3D permitindo a ligação apenas em locais específicos com alto grau de afinidade. A alta afinidade e especificidade dos aptâmeros reside na sua ligação e reconhecimento altamente organizado e estruturado com o alvo, permitindo múltiplas interações entre o aptâmero e o ligante sem interferências de contaminantes externos (Munzar and Juncker, 2019; Jamei *et al.*, 2021).

Esses elementos de biorreconhecimento são combinados com tecnologias de detecção de alta sensibilidade, como a amplificação de sinal por meio de nanopartículas de ouro ou prata, ou com tecnologias de detecção fluorescente, para permitir a detecção precisa e quantificação de ácidos nucleicos específicos em amostras biológicas, tornando a utilização dos genossensores uma tecnologia alternativa valiosa aos ensaios genéticos convencionais (Lu *et al.*, 2020).

2.3.1 Principais métodos de detecção eletroquímica em genossensores

Como citado anteriormente, o princípio básico de funcionamento de um biossensor de ácido nucléico é o reconhecimento de uma outra molécula alvo de ácido nucléico a partir do evento da hibridização (Ferreira, 2014). Os métodos de detecção eletroquímica são divididos em detecção direta e indireta. Assim, os genossensores eletroquímicos podem ser divididos em duas categorias: biossensores de reconhecimento

direto e biossensores de reconhecimento indireto (Zare and Shekari, 2019; Abedi *et al.*, 2022).

No método de detecção direta as medições são realizadas com base na interação biológica dos componentes e não há necessidade de moléculas-alvo marcadas (Zare and Shekari, 2019). Alterações físicas, como as alterações nas propriedades ópticas, mecânicas ou elétricas induzidas por interações biológicas, são medidas pelo transdutor. Isso pode ser feito usando técnicas como voltametria, impedância ou potenciometria. A mudança no sinal eletroquímico ocorre devido a uma mudança na capacidade de transferência de elétrons na interface eletrodo/solução, que é induzida pela hibridização da sonda com o alvo. A detecção direta é geralmente preferida quando a ligação de um analito produz uma resposta apropriada em uma ou mais faixas de concentração (Zare and Shekari, 2019). Esse método de detecção de hibridização consiste em medir o sinal eletroquímico gerado pela oxidação das bases nitrogenadas presentes no duplex formado entre a sonda e o DNA alvo. Essa detecção depende da eletrooxidação inerente de nucleobases de guanina e adenina em cadeias de DNA (Abedi *et al.*, 2022). A guanina é a base mais adequada para esse método devido à sua alta eletroatividade e facilidade de oxidação (Ferreira, 2014). A diferença de potencial de oxidação permite distinguir efetivamente o sinal gerado pela sonda e o sinal gerado pela hibridização com o DNA alvo.

Já a detecção indireta explora o comportamento eletroquímico de um indicador eletroativo/marcador para detecção de hibridação de DNA (Abedi *et al.*, 2022). Vários marcadores eletroativos podem ser utilizados na detecção indireta, tais como: enzimas, marcadores fluorescentes e marcadores redox (Zare and Shekari, 2019). O uso dessas moléculas com propriedades redox pode monitorar indiretamente a estrutura dos ácidos nucleicos na superfície do eletrodo. Por exemplo, o azul de metileno (MB, do inglês *Methylene Blue*) e o ferroceno (FC⁺) são dois compostos com atividade redox sensíveis à análise eletroquímica e extremamente utilizados nesse método (Ferreira, 2014). O MB apresenta alta afinidade pelas bases de guanina e é capaz de distinguir entre DNA de fita simples (ssDNA) e fita dupla (dsDNA) com base na diferença de sinal redox, já o FC⁺ e seus derivados interagem com as principais cavidades do dsDNA, apresentando uma maior afinidade para o híbrido (dsDNA) do que para a sonda (ssDNA) (Farjami *et al.*, 2010; Ferreira, 2014).

É importante destacar os diferentes comportamentos do MB na detecção eletroquímica indireta. O sinal das reações redox do MB pode variar de acordo com cada tipo de biossensor, ou seja, ele pode apresentar maior afinidade pela ssDNA (DNA de fita simples, do inglês *Single-stranded DNA*) ou pela dsDNA (DNA de fita dupla, do inglês *Double-stranded DNA*). Por exemplo, a maioria dos trabalhos relatam que o MB apresenta uma corrente mais alta em dispositivos contendo o ssDNA quando comparados aos que contém apenas o dsDNA (Chowdhury *et al.*, 2014; Santos, 2014; Silvestrini *et al.*, 2015). Nesse caso, onde o MB se liga ao ssDNA, é resultado da maior afinidade do mesmo pelas guaninas livres no ssDNA e menos acessível após o evento de hibridização, gerando conseqüentemente sinais diferentes (Rashid and Yusof, 2017). Em contrapartida, há relatos de que o MB pode se ligar à superfície do DNA hibridizado (dsDNA) via interação eletrostática com o grupo fosfato de carga negativa do DNA ou interação intercalada entre pares de bases (guanina-citosina) (Siddiquee *et al.*, 2010; Da *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018; Long *et al.*, 2019). Assim, a discriminação entre o ssDNA e o dsDNA se dá pela diferença do sinal redox do MB quando ligado as estruturas de DNA (Ferreira, 2014; Rashid and Yusof, 2017).

2.4 Principais técnicas de Imobilização

A imobilização é o método pelo qual um componente biológico se liga ao transdutor, mantendo sua atividade biológica natural. A detecção do alvo de interesse está diretamente ligada à imobilização adequada do bioreceptor. Essa etapa garante uma parte ativa e acessível para os alvos, proporcionando alta estabilidade conformacional e bioatividade (Asal *et al.*, 2019). Alguns parâmetros são considerados de extrema importância para uma imobilização eficiente, são eles: tamanho da biomolécula, área de trabalho, polaridade, forma, presença de grupos funcionais e condições de armazenamento (Asal *et al.*, 2019; Botewad *et al.*, 2021). Muitas formas de imobilização de um componente biológico são utilizadas, tais como: adsorção física e química, ligação covalente, aprisionamento, afinidade e assim por diante (Botewad *et al.*, 2021).

A **adsorção física** é uma das técnicas mais simples, entretanto, é pouco reprodutível e confiável devido a facilidade das biomoléculas de se liberarem do sensor (dessorção) uma vez que as ligações são fracas e pouco estáveis. Para realizar esse tipo de modificação, o elemento de reconhecimento pode ser imobilizado diretamente na

superfície do eletrodo sem nenhuma modificação ou já contendo um agente modificador, tal como polímero, nanomateriais ou nanocompósitos (Ferreira, 2014; Nemiwal *et al.*, 2022). A imobilização pode ocorrer por imersão do eletrodo ou deposição em sua superfície da solução contendo o elemento de reconhecimento, aguardar a evaporação do solvente e formação de filme. A força de adsorção depende da temperatura, pH, força iônica e as propriedades dos solventes (Nemiwal *et al.*, 2022).

A ligação por **adsorção química ou quimissorção** é uma forma de imobilização mais forte que a adsorção física e ocorre frequentemente com substâncias orgânicas hidrofóbicas. A abordagem mais amplamente utilizada na quimissorção são moléculas tioladas em ouro, devido à sua fácil preparação e forte afinidade dos átomos de tiol em relação às superfícies de ouro (Huertas *et al.*, 2019). A quimissorção de sondas de DNA modificadas com um ligante de tiol (ou seja, sondas SH-ssDNA) é o tratamento mais direto para o desenvolvimento de biossensores gerando monocamadas automontadas (SAMs) contendo diretamente a sequência da sonda que hibridiza com o alvo (Ferreira, 2014; Huertas *et al.*, 2019).

A **ligação covalente** ou reticulação ocorre entre o suporte e o biorreceptor, sendo esse o método de imobilização mais utilizado e geralmente irreversível devido à natureza estável das ligações (Fraas and Franzreb, 2017). As ligações covalentes são realizadas por meio de grupos funcionais que não são essenciais para sua atividade natural. Normalmente, os grupos funcionais utilizados para modificação estão presentes nas cadeias laterais de alguns aminoácidos, como os grupos hidroxila, amino, carboxílico e tiol (Liébana and Drago, 2016; Belgis, 2019). A ligação covalente pode permitir a imobilização de biomoléculas orientadas, fornecendo superfícies modificadas controladas, reprodutíveis e altamente ativas. Para que isso ocorra, os materiais de suporte precisam ser ativados ou modificados com algum agente de reticulação, como por exemplo glutaraldeído (acoplamento químico), e EDC-NHS (agente ativador) (Asal *et al.*, 2019; Purohit *et al.*, 2020) (**Figura 6**).

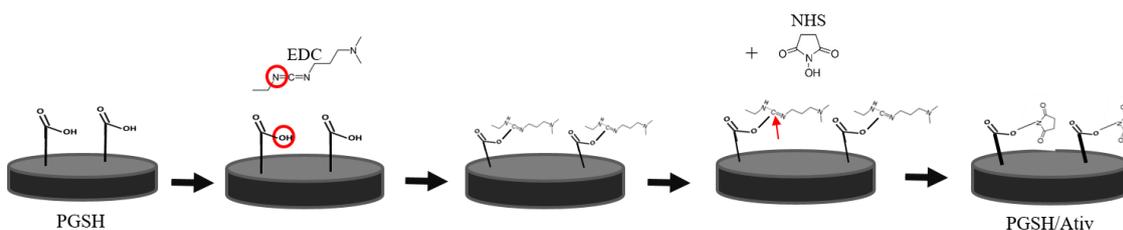


Figura 6: Processo de modificação (ativação) dos grupos carboxílicos da Glutationa. Fonte: Autora, 2023.

O processo de ativação dos grupos carboxílicos de um polímero por EDC-NHS envolve a ativação desses grupos com EDC, formando um intermediário reativo que reage com NHS, formando um éster estável e reativo. As moléculas de sondas podem ser acopladas ao NHS-éster por meio de uma reação de amina-éster, resultando na ligação covalente entre o polímero e as sondas (Kanagavalli *et al.*, 2021). Isso aumenta a estabilidade e eficiência do biossensor. A presença do NHS e do EDC aumenta a eficiência do acoplamento, permitindo que a sonda se ligue de forma mais estável ao substrato do sensor.

Na imobilização por **aprisionamento** o biorreceptor é encapsulado em matrizes tridimensionais, como eletropolímeros, fotopolímeros ou gel de sílica (Huertas *et al.*, 2019). Esta técnica se depara com um longo tempo de resposta e baixa estabilidade devido à ausência de interação entre a matriz de imobilização e a molécula utilizada. Esse método é usado principalmente com células e organelas, podendo ter as células aprisionadas nos poros de membranas (de celulose ou outros materiais sintéticos) ou mantidas próximas à superfície do transdutor usando uma membrana de diálise, ambas são as abordagens mais conhecidas (Asal *et al.*, 2019).

Por fim, a ligação por **afinidade** inclui interações não covalentes que dependem de ligações de afinidade entre o suporte ativado e um grupo específico da sequência de proteínas (Asal *et al.*, 2019). O procedimento mais conhecido neste método é a interação estreptavidina (ou avidina)-biotina que leva a uma das formações mais fortes, fornecendo imobilizações controladas e orientadas nos transdutores (Ferreira, 2014; Botewad *et al.*, 2021). Na presença de biotina, a avidina ou estreptavidina (imobilizada no eletrodo de trabalho) se liga a ela formando um complexo estável, permitindo que a molécula biotinilada seja capturada e detectada com alta especificidade (Carr, 2019). Essas interações fornecem um sistema ideal de ligações de afinidade com inúmeras áreas de aplicação, como imunologia e biologia celular/molecular (Asal *et al.*, 2019).

2.5 Agentes modificadores

Os polímeros condutores são uma classe importante de materiais funcionais que têm sido amplamente aplicados na fabricação de biossensores eletroquímicos, devido às suas propriedades químicas, elétricas e estruturais. Despertaram interesse depois dos estudos

de Shirakawa *et al.*, (1977) descrevendo que a dopagem do poliacetileno com hilogênio aumentou fortemente a condutividade do polímero. Graças a essa pesquisa revolucionária, Shirakawa, MacDiarmid e Heeger receberam o Prêmio Nobel de Química em 2000 e abriram caminho para o desenvolvimento de outros polímeros condutores combinando propriedades de polímeros orgânicos e propriedades eletrônicas de semicondutores (Guo, 2020). Após esses estudos pioneiros, inúmeros polímeros condutores foram preparados e utilizados em diversas aplicações, como poliacetileno, polipirrol (PPy), polianilina (PANI), polycarbazol, politiofeno (PTh), poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT), polifenileno, poli(fenileno vinileno), polililina, policisteína, poli(ácido glutâmico), entre outros (Chen *et al.*, 2018; Yi *et al.*, 2019; Guo, 2020; Spsychalska *et al.*, 2020; Julio *et al.*, 2022).

Além dos polímeros citados acima, a glutathiona (GSH) também pode ser utilizada como um agente modificador de eletrodos. A GSH é um tripeptídeo linear concentrado principalmente no fígado, composto pelos aminoácidos L-glutamato, L-cisteína e L-glicina. A GSH é o agente redutor de tiol mais importante envolvido na modulação de processos redox (Matuz-Mares *et al.*, 2021; Vairetti *et al.*, 2021; Saini and Sahoo, 2022). Sua síntese ocorre no interior das células de acordo com a biodisponibilidade dos aminoácidos que a constitui. A GSH é encontrada nas células animais, vegetais, em cianobactérias e proteobactérias, podendo auxiliar na inativação de compostos oxidantes, retardando os efeitos do envelhecimento por meio da redução do estresse oxidativo, armazenamento e transporte de cisteína (Dorion *et al.*, 2021; Saini and Sahoo, 2022). Nas células, a glutathiona pode ser encontrada sob forma conjugada, reduzida e oxidada. A forma utilizada no presente estudo foi a oxidada, também conhecida como GSSG, de fórmula $C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$ e massa 612,63g/mol, sua estrutura molecular pode ser observada na **Figura 7**. As vantagens proporcionadas pela glutathiona geraram vários trabalhos científicos visando sua detecção, principalmente por meio de biossensores e que podem ser encontrados facilmente descritos na literatura (Barman *et al.*, 2017, 2018; Sui *et al.*, 2018; Rawat *et al.*, 2020; Tian *et al.*, 2020; Keoingthong *et al.*, 2021; Asadpour and Mazloun-Ardakani, 2022; Wang *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022; Zhu *et al.*, 2022).

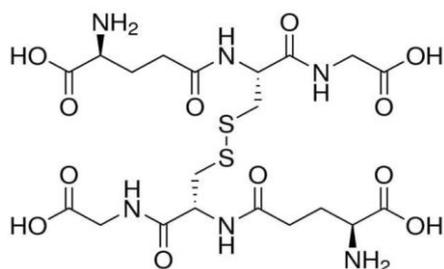


Figura 7. Estrutura da molécula de L-Glutationa (G4376-10G); Fonte: Sigma-Aldrich, 2022.

Sua estrutura morfológica possibilita a fixação sobre o eletrodo de trabalho que, conseqüentemente, fornece pontos de ancoragem ($-\text{COOH}$ e $-\text{NH}_2$) que proporcionam e facilitam a imobilização de biorreceptores para detecção de moléculas alvo. É possível observar na **Figura 8** como funciona a ligação da glutatona no eletrodo (essa ligação será abordada de forma mais detalhada na Sessão de Resultados) de Carbono Vítreo (Xia *et al.*, 2016).

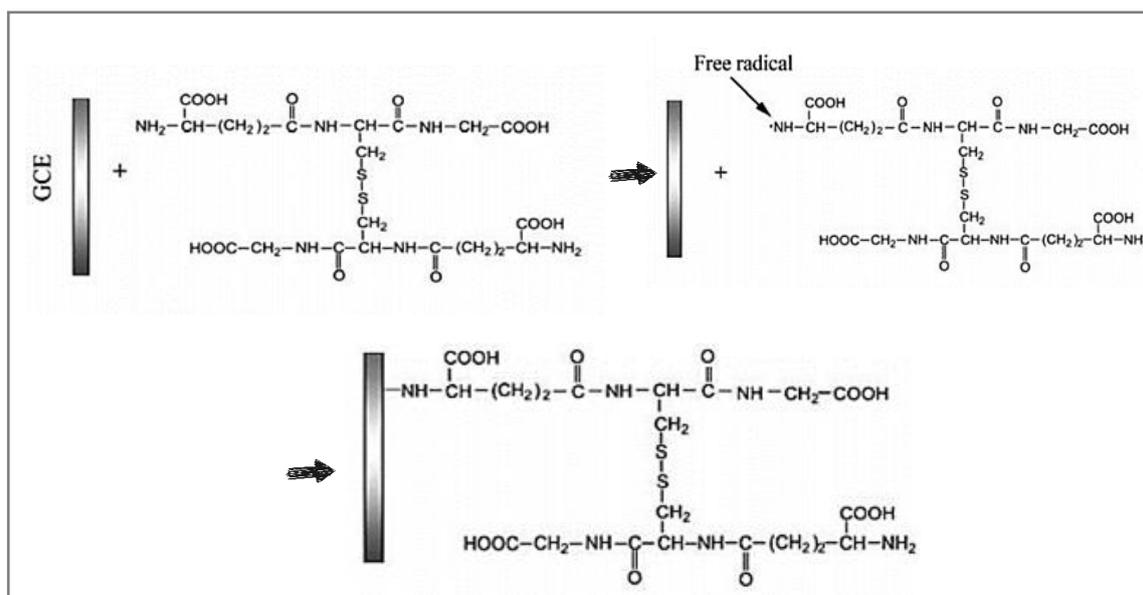


Figura 8. Esquema da ancoragem da Glutatona no eletrodo de trabalho de Carbono Vítreo. Fonte Xia *et al.*, 2016.

Dentre os estudos envolvendo a utilização da GSH, destaca-se o grupo de Cai *et al.*, (2021), por meio da construção de um biossensor de fluorescência buscando a determinação de furazolidona por meio de *nanoclusters* de cobre tendo a glutatona como agente protetor de ácido ascórbico como agente redutor. O dispositivo apresentou LoD de $0,012\mu\text{M}$ em amostras de soro bovino, apresentando-se como um método analítico

rápido, fácil e ultrasensível para detecção de furazolidona. Já o grupo de Xia *et al.*, (2016) focou em filmes multicamadas de poli(dissulfeto de glutationa)-poli(L-lisina) (PGSSG-PLY) preparados por eletropolimerização via VC para o reconhecimento de Ácido Ascórbico e Ácido Isoascórbico. Os resultados provaram que o filme PGSSG pode amplificar o sinal eletroquímico, enquanto o filme PLY pode fornecer mais locais de reconhecimento para discriminar o Ácido Ascórbico (AA) e Ácido Isoascórbico (IAA).

Vários estudos foram desenvolvidos utilizando a glutathione s-transferase para detecção e quantificação de agrotóxicos (pesticidas e herbicidas) e a própria molécula na sua forma reduzida ou oxidada (Andreou and Clonis, 2002; Borah *et al.*, 2016, 2018; Aksoy and Kıranşan, 2020; Ribeiro *et al.*, 2022). Entretanto, as pesquisas apenas com a glutathione como agente modificador da superfície de eletrodos são muito escassas, principalmente tratando-se de sua utilização para imobilização de biomoléculas. Sendo assim, torna-se necessário maiores investimentos em pesquisas utilizando esse tripeptídeo na construção de dispositivos de biossensoriamento.

2.6 Principais Técnicas Eletroanalíticas

O principal fundamento da eletroquímica é a análise dos processos químicos associados à separação e transferência de cargas. Nas últimas décadas, métodos eletroanalíticos têm sido propostos como alternativas viáveis e promissoras devido a seu baixo custo e, principalmente, por possibilitar o uso de eletrodos quimicamente modificados. Toda caracterização da superfície de um eletrodo é de extrema importância, uma vez que o mesmo está sendo modificado de modo a desempenhar uma função específica, seja ela detecção de um alvo, monitoramento ambiental ou médico. Essa detecção e/ou monitoramento ocorre por meio de análises detalhadas das reações envolvidas entre substrato-elemento biológico. Atualmente, dentre as técnicas eletroquímicas mais utilizadas, destacam-se a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS), Voltametria de Pulso Diferencial (DPV), Voltametria de Onda Quadrada (SWV), Voltametria Cíclica (CV), Voltametria de Corrente Alternada (ACV), Voltametria de Varredura Linear (LSV), Potenciometria (PM), Amperometria de Potencial Constante (CPA), Cronoamperometria (CA) e Cronocoulometria (CC) (Li *et al.*, 2019).

2.6.1 Voltametria de Pulso Diferencial

Essa técnica envolve a aplicação de pulsos de potencial crescente com amplitude fixa no eletrodo de trabalho. A DPV é derivada da LSV, no qual o efeito da corrente da carga é minimizado porque a corrente é mostrada imediatamente antes do potencial ser alterado (Li *et al.*, 2019). Isto é, pulsos curtos ($t=10-100\text{ms}$) com amplitude limitada ($\Delta E=1-100\text{mV}$) são sobrepostos de forma linear. A corrente é medida antes da aplicação de um pulso (I_1) e outra ao final do pulso (I_2). Assim, a corrente plotada no gráfico versus o potencial é a diferença da corrente capacitiva (I_1) e a corrente faradaica (I_2) reflete a corrente do pulso do potencial. O principal objetivo desse princípio é a obtenção de uma corrente final livre de ruído à medida que a corrente faradaica (desejável) é subtraída da corrente capacitiva (ruído). Os voltamogramas resultantes da corrente de pulso têm uma forma diferencial de modo que o valor máximo na diferença entre I_1 e I_2 será o ponto de inflexão da onda voltamétrica, sendo correspondente ao potencial de meia onda no qual o pico em DPV (pico de corrente livre de ruído = i_p) é idêntico ao potencial de meia onda das reações redox (**Figura 9**). Geralmente a EIS é mais sensível do que a voltametrias cíclicas, e com maior sensibilidade podendo detectar analitos de forma simultânea e com baixos Limites de Detecção (LoDs). Esses baixos valores de detecção tornam essa técnica uma das mais utilizadas na atualidade, sendo empregada na identificação de contaminantes em solo, água, alimentos e amostras biológicas.

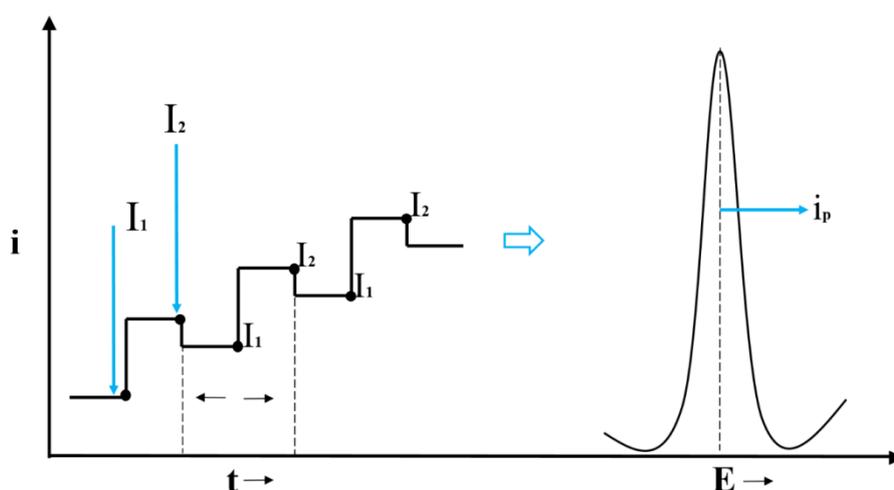


Figura 9. Esquema da leitura via DPV. Gráfico do potencial aplicado em função do tempo. Adaptado de Westbroek, 2005 e Nascimento, 2011.

Voltametria Cíclica

Trata-se de uma técnica de varrimento de potencial que consiste na aplicação de uma variação linear de potencial inicial e final. Nela, o potencial do eletrodo de trabalho é aumentado de forma linear em função do tempo, e depois que o potencial definido é atingido (E_{\max} e E_{\min}), a reação ocorre de forma oposta de modo a retornar ao potencial inicial (Li *et al.*, 2019). Ou seja, o potencial aplicado no eletrodo de trabalho tem forma triangular, pois o potencial é varrido no sentido direto e depois no sentido inverso compondo um ciclo, tendo o ponto onde ocorre a reversão chamado de potencial de inversão. Essa técnica pode ser utilizada nas modificações de transdutores por meio da eletropolimerização, cujo monômero conhecido é oxidado e as cargas resultantes dos processos anódicos incitam afinidade de moléculas iguais ou adjacentes presentes na solução, resultando em ligações covalentes entre essas moléculas e produção de um polímero que se adere ao eletrodo de trabalho (Ferreira, 2020).

Vale frisar que é de extrema importância a escolha ideal dos pontos que serão seguidos nesta leitura para facilitar a observação da oxidação e redução (processo que ocorre por difusão) de uma ou mais espécies de interesse sob a superfície do eletrodo. Assim, parâmetros importantes são fornecidos pela curva voltamétrica e são representados por I_{pa} = Corrente de Pico Anódico, I_{pc} = Corrente de Pico Catódico, E_{pa} = Potencial de Pico Anódico e E_{pc} = Potencial de Pico Catódico (**Figura 10**).

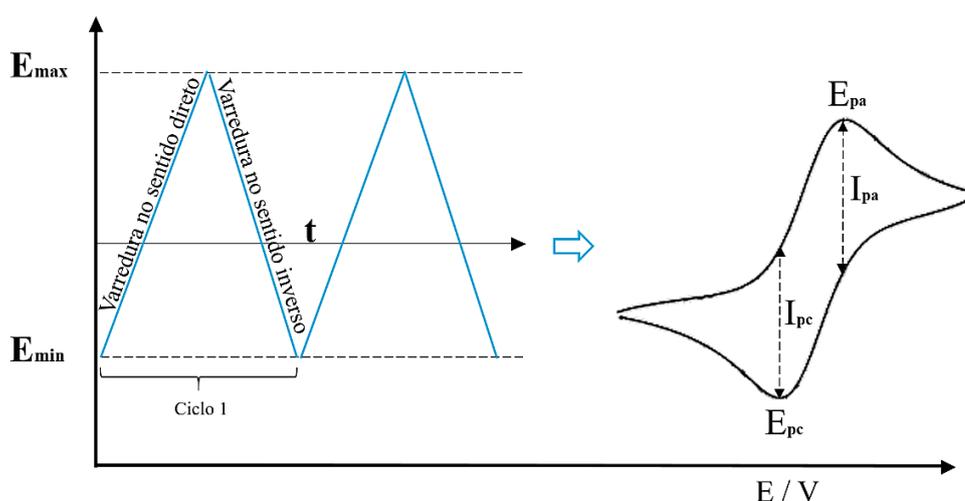


Figura 10. Esquema da leitura via CV. Gráfico do potencial aplicado em função da corrente. Adaptado de Westbroek, 2005 e Nascimento, 2011.

O analito precisa ser eletroativo para ser detectado, visto que sua oxidação e redução ocorrerá em uma região de potencial no qual a transferência de elétrons é favorecida criando um fluxo de elétrons na interface do eletrodo e solução (corrente elétrica). Ele pode ser usado para obter informações qualitativas sobre processos eletroquímicos sob várias condições, reversibilidade de uma reação, determinação estequiométrica eletroquímica de um sistema, coeficiente de difusão de um analito e o potencial formal (Li *et al.*, 2019). A VC também pode ser aplicada na determinação de área eletroativa de um eletrodo e determinação de constantes de velocidades por meio de estudos variando as velocidades de varredura. Para mais, essa técnica também é utilizada nos estudos envolvendo polímeros condutores, imobilização de biorreceptores, interações com alvos, entre outros, fornecendo vários parâmetros relacionados a interações e mecanismos de oxirredução.

Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A EIS é uma técnica poderosa e não destrutiva de caracterização amplamente utilizada e a única em meio aos sistemas eletroquímicos que mede a relação entre corrente e diferença de potencial aplicada no domínio da frequência (Ciucci, 2019). É analisada como uma combinação de elementos de circuitos elétricos passivos, tais como resistência, capacitância e indutância. A aplicação do potencial alternado com baixa amplitude em um eletrodo inserido em um eletrólito gera uma resposta de corrente senoidal (Δi) obtida usando a expressão geral da lei de Ohm, no entanto, possui uma diferença de fase em relação ao potencial aplicado (Φ) (no caso de indutância e capacitância). O estímulo elétrico é forçado a passar por uma interface altamente sensível à resistência de alteração de cargas, tendo sua medição (resposta impedimétrica) por meio de sondas redox conhecidas, tal como hexacianoferrato de potássio e ferroceno (Magar, Hassan and Mulchandani, 2021).

Assim, as informações resultantes a partir dos dados de impedância podem ser interpretadas com diferentes modelos de medida, seja por meio de circuitos equivalentes ou modelos matemáticos. A maneira mais utilizada é que relaciona a parte real da impedância (Z') com a parte imaginária (Z'') conhecida como diagrama de Nyquist, Argand-Gauss ou Sluyters (Z' versus Z'') (Santos, 2017). O circuito equivalente é uma

representação do sistema composto pelos capacitores e resistores, conhecido como Randles. Um diagrama ideal deve apresentar um semicírculo na região de altas frequências e uma variação linear em médias e baixas frequências. Quanto maior o arco, maior a resistência à transferência de cargas, enquanto a região linear corresponde ao processo de migração. Para sua medição, embora exija o uso de uma espécie redox dissolvida, a EIS não requer reagentes especiais, é passível de operação sem rótulos e a transferência de elétrons através de superfícies do eletrodo é expressa como corrente Faradaica (Li *et al.*, 2019; Magar *et al.*, 2021).

Para facilitar o entendimento, as siglas e seus significados estão expressos logo abaixo (**Figura 11**).

- Z = Impedância;
- W = Impedância de Warburg
- R_s = Resistência do Eletrólito e Eletrodo;
- R_{ct} ou $R\Omega$ = Resistência a Transferência de cargas;
- C_{dl} = Capacitância da Dupla camada Elétrica;

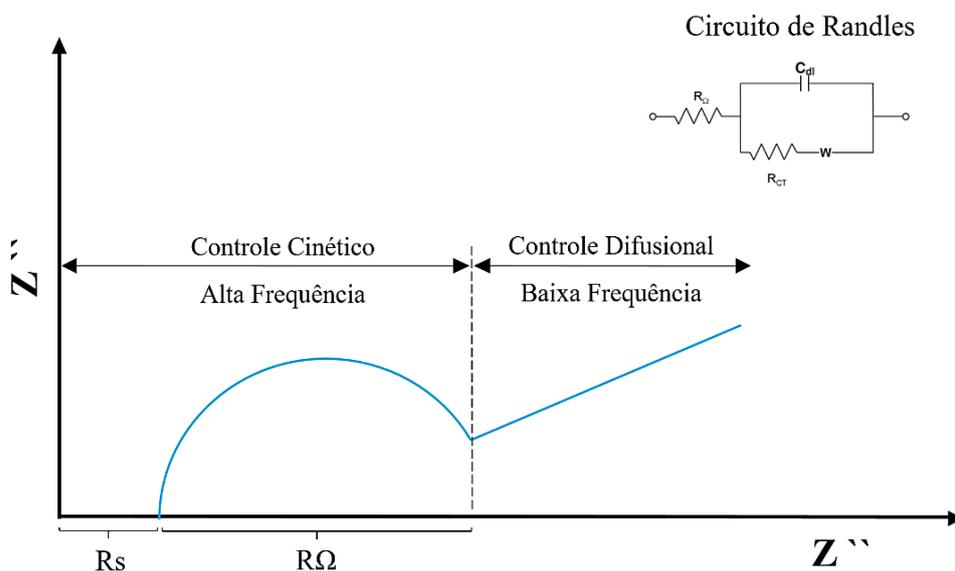


Figura 11. Esquema de uma leitura via EIS. Adaptado de Amorim, 2012 e Bezerra, 2017.

2.7 Técnica de caracterização morfológica

As técnicas de caracterização morfológicas são usadas para analisar a aparência e a forma da superfície dos biossensores. Essas técnicas permitem visualizar e medir a topografia da superfície do material com alta resolução e fornecer informações sobre sua composição química e estrutura molecular. Essas informações são importantes porque a superfície dos biossensores é onde ocorre a interação com o analito, e qualquer modificação na superfície pode afetar a sensibilidade e a seletividade do biossensor. Dentre as técnicas mais utilizadas de caracterização morfológica, destaca-se a Microscopia Eletrônica de Varredura.

Microscopia Eletrônica de Varredura

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma técnica utilizada para estudar diretamente a superfície de amostras sólidas. O equipamento é composto principalmente por uma fonte de elétrons, uma série de lentes de coluna, aberturas, bobinas de varredura, detectores e uma câmera para montagem de amostras. Para a análise ocorrer, as amostras precisam ser colocadas em suportes amostrais (*stub*) e revestidas em ouro, proporcionando uma camada protetora para as amostras sob alta tensão da varredura (Sun *et al.*, 2018). A MEV projeta e varre um fluxo focado de elétrons sobre uma superfície para criar uma imagem de um analito amostral. No entanto, a preparação da amostra deve ser simples, pois o feixe de elétrons pode causar degradação do material analisado (Khare *et al.*, 2019).

Durante a leitura realizada pela MEV, elétrons são emitidos a partir de um filamento aquecido e acelerados por meio de uma série de lentes eletromagnéticas em direção à amostra. Quando os elétrons atingem a superfície da amostra, interações com os átomos e moléculas presentes produzem sinais que são capturados por detectores e transformados em uma imagem de alta resolução da superfície analisada (Golinejad and Mirjalili, 2020). Na MEV, a imagem é formada através da interação dos elétrons primários com a superfície da amostra. Os elétrons primários são acelerados por um campo elétrico eletrostático e dirigidos para a amostra, onde podem gerar dois tipos de elétrons secundários: elétrons secundários e elétrons retroespalhados (Hamid, 2018). Os elétrons secundários são gerados quando os elétrons primários colidem com átomos da superfície da amostra e os deslocam da superfície. Esses elétrons secundários têm energia

relativamente baixa e são coletados pelo detector. Eles fornecem informações sobre a topografia e textura da superfície da amostra. Já os elétrons retroespalhados são gerados quando os elétrons primários colidem com átomos mais pesados da superfície da amostra e são refletidos em direção ao detector. Esses elétrons retroespalhados têm energia relativamente alta e fornecem informações sobre a composição química da superfície da amostra. Ambos os tipos de elétrons contribuem para a formação da imagem na microscopia eletrônica de varredura. Os elétrons secundários fornecem informações sobre a topografia e textura da superfície da amostra, enquanto os elétrons retroespalhados fornecem informações sobre a composição química da superfície da amostra. O contraste na imagem é produzido pela diferença de emissão de elétrons pelos diferentes tipos de materiais na amostra (Inkson et al., 2016)

A MEV é uma técnica vantajosa para caracterização morfológica na área de biossensoriamento, permitindo estudos relacionados às modificações de eletrodos. Dentre as suas vantagens no estudo de materiais sólidos, a técnica apresenta fácil manuseio, algumas amostras necessitam de preparação mínima, aquisição rápida de dados digitais, entre outros (Spurgeon *et al.*, 2021).

2.8 Eletroforese

A eletroforese é uma técnica utilizada para separar e analisar moléculas de diferentes tamanhos e cargas elétricas em uma solução. Na técnica em questão, a migração proteica é promovida por um potencial elétrico gerado entre os pólos positivo (ânodo) e negativo (cátodo) que utilizam forças eletroforéticas e eletroosmóticas, resultando na formação de diferentes bandas (Oliveira *et al.*, 2015). Ou seja, a eletroforese separa moléculas de acordo com suas propriedades elétricas e baseia-se no princípio de que partículas carregadas eletricamente movem-se através de um meio quando um campo elétrico é aplicado. Na eletroforese, uma amostra contendo as moléculas a serem separadas é aplicada em um suporte sólido, geralmente um gel de agarose ou poliacrilamida (Bernardo-bermejo *et al.*, 2020). Em seguida, é aplicado um campo elétrico através do gel, e as moléculas movem-se em direção ao pólo oposto ao de sua carga, portanto, moléculas com cargas opostas movem-se em direções opostas. A separação das moléculas é baseada em suas propriedades elétricas, moléculas com cargas mais intensas se movem

mais rapidamente, já as com cargas menores se movem com mais lentidão. Moléculas maiores movem-se mais lentamente através do gel, enquanto moléculas menores movem-se mais rapidamente.

A eletroforese utilizando o Bioanalisador (*Bioanalyser*) é uma técnica que utiliza microchips com canais capilares para separar, identificar e quantificar moléculas biológicas com base em seu tamanho e carga elétrica. As moléculas são misturadas com um corante fluorescente, aplicadas no chip e submetidas a uma carga elétrica. À medida que as moléculas se movem através do canal capilar, elas emitem luz fluorescente que é detectada pelo equipamento e convertida em sinais elétricos. Esses sinais elétricos são processados pelo software do Bioanalisador, que gera um eletroferograma, um gráfico que mostra a distribuição das moléculas de acordo com seu tamanho. Cada tipo de eletroforese tem suas próprias vantagens e limitações, e a escolha da técnica depende do tipo de molécula que se deseja analisar. A eletroforese é uma técnica muito útil para separar e quantificar moléculas biológicas, e é usada em muitas áreas da pesquisa, incluindo biologia molecular, bioquímica, genética, imunologia e outras (Neoh *et al.*, 2019). Alguns exemplos de aplicações da eletroforese incluem a análise de DNA para identificação de paternidade, a separação de proteínas para estudos de estrutura e função, e a detecção de biomarcadores em amostras clínicas para diagnóstico de doenças (Neoh *et al.*, 2019; Abe *et al.*, 2022).

2.9 Trabalhos relacionados

A detecção e monitoramento do vírus ZIKV tornou-se um desafio de saúde global nos últimos anos, resultado de sua rápida expansão geográfica associada ao crescente aumento de anomalias neurológicas. Atualmente, as técnicas de diagnóstico para o ZIKV requerem trabalho intenso, são caras, demoradas, necessário o uso de equipamentos sofisticados, além de proporcionarem resultados falsos positivos (Steinmetz, 2019). Além disso, o controle e monitoramento da infecção por ZIKV são limitados devido à indisponibilidade de drogas, vacinas e diagnóstico rápido (Moço *et al.*, 2019). Deste modo, torna-se importante o desenvolvimento de métodos de detecção do ZIKV de forma rápida, confiável e, principalmente, com menores custos de produção. A abordagem de combate ao ZIKV deve conter assistência técnica em áreas de risco, monitoramento do

mosquito, vigilância e controle da transmissão (Kaushik *et al.*, 2017, 2018). A próxima seção descreve vários sistemas de biossensoriamento para detecção dessa infecção viral.

2.9.1 Biossensores para detecção do Zika Vírus

Os biossensores podem ser construídos de diversas formas e com diferentes formas de detecção do alvo. Além disso, podem ser utilizados como uma ferramenta de Ponto de Atendimento (do inglês, *Point of Care* - POC), uma vez que a população está crescendo rapidamente assim como algumas epidemias, cuja materialização vem frequentemente se intensificando (Sobhanie *et al.*, 2022). Segundo Mungmunpantipantip and Wiwanitkit, (2022), os POCs baseados em papel para detecção do ZIKV podem solucionar problemas de refrigeração durante o transporte e armazenamento de amostras, o que permite a vigilância do vírus em ambientes com recursos limitados. Os autores também destacam que os biossensores baseados em papel são uma opção atraente para a detecção rápida e precisa de patógenos, devido à sua simplicidade, baixo custo e portabilidade. Esses garantem um monitoramento epidemiológico eficiente e consequentemente facilita o tratamento e intervenção de forma precoce.

Os POCs baseados em papel também podem ser chamados de eletrodos impressos, conhecidos como SPE (do inglês, *Screen-printed electrodes*). Silva *et al.*, (2021) trabalharam com a fabricação de SPEs para detecção do vírus Zika, baseado em nanotubos de carbono e Prussian Blue. O imunossensor foi produzido através da funcionalização de nanotubos de carbono com ácido 4-carboxifenilborônico, seguido pelo depósito de partículas de Azul de Prússia e ligação de anticorpos anti-NS2B do vírus Zika através de ligações covalentes. Quando o vírus Zika está presente na amostra, ele se liga aos anticorpos, formando um complexo imunológico que pode ser detectado por meio de amperometria. O imunossensor conseguiu detectar a proteína não estrutural NS2B do ZIKV via atividade catalítica redox do PB. Contudo, os autores afirmaram que o biossensor desenvolvido para a detecção do vírus Zika também foi capaz de detectar o vírus da dengue. Isso ocorreu porque a proteína NS2B é conservada em ambos os vírus, e os anticorpos anti-NS2B utilizados no biossensor reconhecem essa proteína. Ou seja, o trabalho não abordou diretamente o diagnóstico clínico de infecções por Zika ou Dengue em pacientes, tornando-se importante ressaltar que essa possibilidade de diagnóstico diferencial precisa ser avaliada em estudos adicionais para verificar sua eficácia clínica.

Além do PB, outras sondas redox também são bastante utilizadas na detecção do Zika, como o MB descrito no trabalho de Lynch *et al.*, (2019) e Saisuk *et al.*, (2022), Rutênio por Cajigas *et al.*, (2020), entre outros.

Além da detecção da proteína NS2B, existe outra que se destaca por sua ampla utilização em meio ao campo de biossensoriamento, conhecida como proteína não estrutural 1 (NS1). Trabalhos realizados por Afsahi *et al.*, (2018) descrevem a modificação de chips comerciais portáteis, de modo que a detecção da NS1 presente no Zika Vírus fosse mais sensível e seletiva. O imunossensor desenvolvido conseguiu identificar a NS1 em concentrações tão baixas quanto 0,45nM e não houve reatividade cruzada mensurável quando testado frente ao agente etiológico da encefalite japonesa (JEV). Trabalho semelhante foi realizado por Cabral-Miranda *et al.*, (2018), no qual o imunossensor desenvolvido foi baseado em formas recombinantes da NS1 e proteína envelopada (EDIII) no soro e na saliva. Utilizando EIS e SWV, os pesquisadores comprovaram uma alta detecção de anticorpos específicos para Zika sem interferências de anticorpos específicos do vírus da dengue.

Outra proteína envelopada do ZIKV (Zev-Abs) foi identificada por Kaushik *et al.*, (2018), em estudos com um imunossensor eletroquímico desenvolvido por meio de arranjos de microeletrodos de ouro interdigitados funcionalizados (IDE-Au), exibindo uma faixa de detecção de 10pM a 1nM. Ainda trabalhando com imunossensores, Hsu *et al.*, (2020) conseguiram combinar um smartphone com um aplicativo personalizado para análises de testes rápidos validado usando fluidos corporais enriquecido com o vírus da Zika. O dispositivo combinou nanoenzimas sintéticas que conseguiram simular a peroxidase à base de NPs de platina e ouro (NPs/Pt@Au) conseguindo atingir uma faixa de detecção de 1 pg/ml – 1000 pg/ml nas amostras de urina, soro e sangue total. Os autores também conseguiram observar a seletividade do dispositivo frente a vírus da Dengue (DENV), entretanto, frisaram a importância de mais estudos com amostras reais para confirmação da sua utilidade clínica.

Analisando sinais de fluorescência Takemura *et al.*, (2019) trabalharam com LSPR com nanopartículas de ouro (AuNPs) para amplificar o sinal de intensidade de fluorescência de Qdot dentro de um processo de detecção antígeno-anticorpo. O biossensor de imunofluorescência para NS1 exibiu excelente especificidade contra alvos negativos e pôde detectar o Zika em soro humano com LoD de 1,28 fg/mL. Ainda

trabalhando com biossensores fluorescentes, Nguyen *et al.*, (2022) descrevem um dispositivo rápido ligado a pares de aptâmeros peptídicos capazes de identificar as formas do ZIKV, dengue (DENV) e chikungunya (CHIKV). Esse, por sua vez, pode ser empregado como POC para detecção do Zika em amostras de soro e urina com LoD de 2×10^4 dose infecciosa de cultura de tecidos TCID₅₀/mL. Os autores afirmam que o foco principal do trabalho foi a detecção do Zika, por isso ele não foi testado com pares de peptídeos de outros vírus.

Por meio de análises eletroquímicas, Moço *et al.*, (2019) desenvolveram um genossensor para detecção do RNA genômico do ZIKV. A plataforma teve como base a utilização de eletrodos de grafite modificados com óxido de grafeno reduzido e politiramina, cujo LoD foi de 0,1fg/mL em apenas 20 minutos. Alves *et al.*, (2019) também modificaram de forma eletroquímica eletrodos de grafite com derivados do ácido 3-amino-4-hidroxibenzóico para detecção do Zika em amostras reais de soro. O biossensor de RNA apresentou um LoD de 25,4pM, precisão de 3,2% e pouca diferença na corrente observada frente ao vírus causador da dengue 2 e 3. Estudo semelhante foi realizado por Alzate *et al.*, (2020) para detecção diferencial do ZIKV de outros arbovírus como a DENV e a CHIKV. O genossensor tipo sanduíche foi projetado utilizando sondas marcadas com digoxigenina (Dig) para detecção em amostras de soro, urina e saliva em pacientes infectados com ZIKV, DENV e CHIKV. Embora os biossensores eletroquímicos sejam bem-sucedidos na detecção do Zika Virus, ainda são necessárias mais análises com amostras biológicas visando o aprimoramento do método e sua relevância clínica (Imran *et al.*, 2021). Uma vez que a reatividade cruzada é um problema na detecção e diferenciação do ZIKV, a atenção e investimento em métodos rápidos e eficazes tornam-se essenciais para o monitoramento e intervenção terapêutica.

3 OBJETIVOS

Geral

Desenvolver um genossensor impedimétrico baseado na imobilização de sequências sintéticas de oligonucleotídeos, capaz de reconhecer por complementaridade a sequência de RNA do ZIKV.

Específicos

- Caracterizar as sondas por eletroforese;
- Modificar a superfície do eletrodo de trabalho utilizando L-Glutationa, por meio de eletropolimerização;
- Promover a ligação covalente entre a sonda e o filme de poli-L-Glutationa utilizando EDC-NHS;
- Aprimorar a metodologia de eletropolimerização, ativação dos grupos – COOH e imobilização covalente da sonda sob a superfície modificada do eletrodo de trabalho;
- Caracterizar as modificações realizadas no eletrodo de trabalho utilizando as técnicas de Voltametria de Pulso Diferencial e Microscopia Eletrônica de Varredura;
- Analisar a hibridização por meio da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica;
- Realizar testes de especificidade do genossensor impedimétrico.

4 METODOLOGIA

O planejamento, organização e produção do trabalho experimental foram realizados nas instalações da divisão de Biotecnologia do Instituto Keizo Asami (iLIKA), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Nessa sessão, serão abordados os equipamentos, materiais, reagentes e os procedimentos experimentais envolvidos na construção do biossensor, assim como as técnicas eletroquímicas realizadas. Todos os ensaios relacionados com o desenvolvimento do genossensor impedimétrico foram realizados à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

4.1 Materiais e reagentes

Todas as soluções foram preparadas usando água ultrapura, obtida utilizando o sistema da *Human Corporation*, modelo *Human UP 900* - Coréia. As tintas condutivas foram adquiridas da SunChemical® - EUA, Ag/AgCl, e da Loctite Group® - Holanda, carbono, sendo armazenadas e utilizadas de acordo com as especificações dos fabricantes. A L- Glutationa, tampão Ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico (MES), Tris (hidroximetil) aminometano, Ferricianeto de potássio, Hexacianoferrato de potássio tri-hidratado, Cloridrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS) e azul de metileno (MB) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company® (EUA). O tampão fosfato salino - PBS (10X) foi obtido da Gibco Company® (Life technology - EUA). As sondas de DNA e suas sequências complementar e não-complementar foram obtidas da Exxtend Biotecnologia®, Brasil.

A sequência liofilizada de sonda do ZIKV contém 25 nucleotídeos, obtida por meio de estudos de bioinformática, não podendo ser expressa devido suas propriedades sigilosas e de carácter intelectual (não sendo de domínio público). As sequências dos alvos liofilizados foram o ZIKV, com sequência sigilosa, a DENG-2, tendo sequência de CTGTTACTGGCCCTTGTGGCG e a Tuberculose, com TGCCGTAGCCCAGCGCGTAGGTCT, ressuspendidos em Água MilliQ, e diluídas em Tris HCl 10mM pH 7,4 a partir da concentração mãe de 10mM, 10mM e 200uM, respectivamente.

4.2 Preparação dos agentes modificadores, sonda, alvo e outras soluções.

Uma solução de L-Glutationa reduzida (GSH) a 5mM foi preparada com solução tampão fosfato salino contendo 0,1M de KCl. Antes da sua utilização, o tubo contendo o agente modificador foi homogeneizado em vórtex e centrifugado por aproximadamente 30 segundos. O pH do eletrólito suporte variou entre 6, 7 e 8 para melhor observar os picos redox. A solução de GSH foi preparada todos os dias antes das modificações dos eletrodos. O EDC foi preparado na concentração de 50mM, enquanto o NHS em 80mM, ambos diluídos para concentração de 5mM e 2mM, respectivamente. A mistura dos dois reagentes foi preparada em solução tampão MES com pH 5,5 e utilizados imediatamente. A concentração e tempo de ativação dos grupos -COOH da solução de EDC-NHS variou em diferentes parâmetros utilizando o tampão MES com pH 5,5.

A sonda foi ressuspendida em Água MilliQ ultrapura na concentração de 10mM (sonda-mãe) e armazenada em freezer (-20 °C) até o momento do uso. As diluições foram realizadas em PBS 1x em pH 7,4, com a concentração e tempo de imobilização variadas. Antes da deposição sob o eletrodo de trabalho, o tubo contendo os alvos foram homogeneizados em vórtex e centrifugados por aproximadamente 30 segundos.

O tampão Tris-HCl foi preparado nas concentrações de 10mM e 20mM para utilização na diluição da sonda e alvo, enquanto a maior concentração para leituras na DPV. Para o preparo da GSH o PBS 1x foi diluído a partir da concentração inicial de 10x (pH 7,4), enquanto o MES foi preparado com pH 5,5. O MB foi preparado na concentração de 500uM, em água MilliQ. Todas as soluções foram feitas em água ultrapura. Já o ferrocianeto/ferricianeto ou ferri/ferro ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) foi preparado em Cloreto de Potássio (KCl) 0,1M. Todas as soluções preparadas foram armazenadas em geladeira (-4°C) até o momento do uso.

4.3 Preparo dos eletrodos impressos

Foi utilizado Policloreto de vinila (PVC) como substrato para a confecção dos SPEs. Para os eletrodos de trabalho e contra eletrodo, foi aplicada tinta de carbono, enquanto para o eletrodo de referência foi utilizada tinta de prata e cloreto de prata (Ag/AgCl). Antes da pintura, um molde (máscara) foi usado para delimitar a área de cada eletrodo, produzido por meio de uma impressora de corte e colado ao substrato de PVC.

O eletrodo de trabalho possui um diâmetro de superfície de cerca de 3mm^2 . Após a pintura com cada tinta, as cartelas de eletrodos foram mantidas em capela de exaustão por uma hora para secagem parcial da tinta. Posteriormente os eletrodos foram colocados em uma estufa para cura das tintas em temperaturas adequadas. Para a tinta de carbono a curou durou 1 hora e 30 minutos e 30 minutos para a tinta de Ag/AgCl, ambas a 60°C . Para isolar e delimitar a célula eletroquímica, um adesivo foi aplicado após a cura das tintas. Os eletrodos foram então submersos em ácido sulfúrico (1%) por 1 hora, lavados três vezes com Água MilliQ, postos para secar e armazenados em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. O procedimento pode ser visualizado na **Figura 12**.

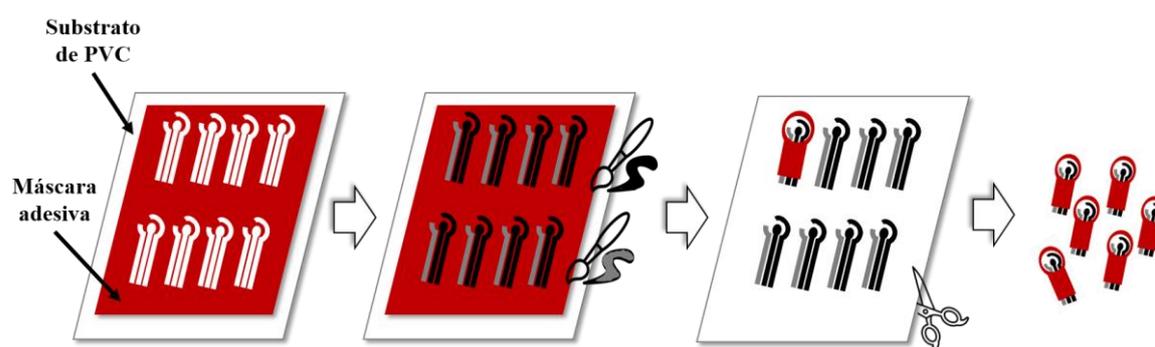


Figura 12. Processo de fabricação dos SPEs; pintura do eletrodo de trabalho e contra eletrodo com tinta de carbono e eletrodo de referência com Ag/AgCl. Fonte: Autora, 2022.

4.4 Modificação do eletrodo

A modificação do eletrodo de trabalho em biossensores é um processo que envolve a criação de uma camada de polimérica sobre a superfície do eletrodo. Esse é funcionalizado com grupos químicos específicos que permitem a ligação dos materiais biológicos, que pode então ser funcionalizada com o elemento biológico. Essa camada de polímero pode ser criada por meio de técnicas de polimerização eletroquímica ou por meio da deposição de uma solução polimérica na superfície do eletrodo. Nesse estudo, para realizar a eletropolimerização, depositou-se cerca de $50\mu\text{l}$ de uma solução de GSH a uma concentração de 5 mM em tampão PBS $0,1\text{M}$ (pH 7,4) e KCl $0,1\text{ M}$ sobre a superfície do eletrodo de trabalho. Foi investigada a melhor velocidade de varredura para a formação do filme polimérico via VC, bem como o pH do eletrólito suporte. Como parâmetro fixo, definiu-se o potencial de -1V à $+2,5\text{V}$ por 8 ciclos, uma vez que o intervalo de potencial já é extenso e não foi observada diferença nos ciclos do voltamograma da eletropolimerização após o quinto ciclo. Em seguida, os monômeros não ligados foram

removidos com 1mL de água MilliQ e os eletrodos com o filme de poli Glutaciona foram secos à temperatura ambiente, e denominados de PGSH.

4.5 Imobilização da sonda

Após a formação do filme polimérico, procedeu-se a ativação dos grupos carboxílicos por meio de uma solução de EDC-NHS, variando suas concentrações em diferentes proporções, (2mM/5mM, 5mM/2mM, 5mM/5mM, 5mM/8mM, 8mM/8mM, 8mM/5mM, 10mM/16mM, 50mM/80mM e 100mM/160mM), enquanto o tempo de ativação dos grupos –COOH variou entre 5min, 10min, 30min e 45min. Em seguida, os SPEs foram lavados com 0,5mL de tampão MES pH 5,5 e secos a temperatura ambiente. O eletrodo, modificado com o filme de PGSH e ativado com o EDC-NHS, foi chamado de PGSH/Ativ. Após a ativação dos grupos carboxílicos, depositou-se 5µl da solução da sonda na área do eletrodo de trabalho. Antes da deposição, o tubo contendo a sonda foi homogeneizado em um vórtex e centrifugado por cerca de 30 segundos. Foram avaliadas diferentes concentrações da sonda, (1uM, 5uM, 10uM, 15uM, 20uM e 25uM) e diferentes tempos de imobilização (1h, 4h, 8h, 16h, 20h e 24h) por meio de DPV. Os SPEs foram lavados com 1ml de Tris HCl 10mM para remover a sonda não ligada e deixados secar em temperatura ambiente. O eletrodo imobilizado com a sonda do ZIKV foi denominado de PGSH/Atv/Imob.

4.6 Processo de Hibridização

Para a detecção do alvo no genossensor impedimétrico já desenvolvido, foi depositada sobre a superfície do eletrodo de trabalho uma alíquota de 5µl da solução do alvo complementar sintético. A hibridização ocorreu em um agitador thermomixer (modelo COMBI-H12 da empresa FINEPCR) a uma temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos, seguindo as recomendações do fornecedor. Após a hibridização, os eletrodos foram lavados com 1mL de solução Tris HCl a 10mM e em seguida foram deixados para secar em temperatura ambiente. Para testar a especificidade do genossensor, foi utilizada uma sequência não complementar de DENG-2. O eletrodo hibridizado com o alvo complementar foi denominado PGSH/Atv/Imob/HibAC, enquanto os hibridizados com

os alvos não complementares foram denominados PGSH/Atv/Imob/Hib_ATB para tuberculose e PGSH/Atv/Imob/Hib_ADENG-2 para Dengue-2.

Todas as etapas de preparo do genossensor impedimétrico descritas nas seções 4.2 a 4.6 podem ser observadas na **Figura 13**.

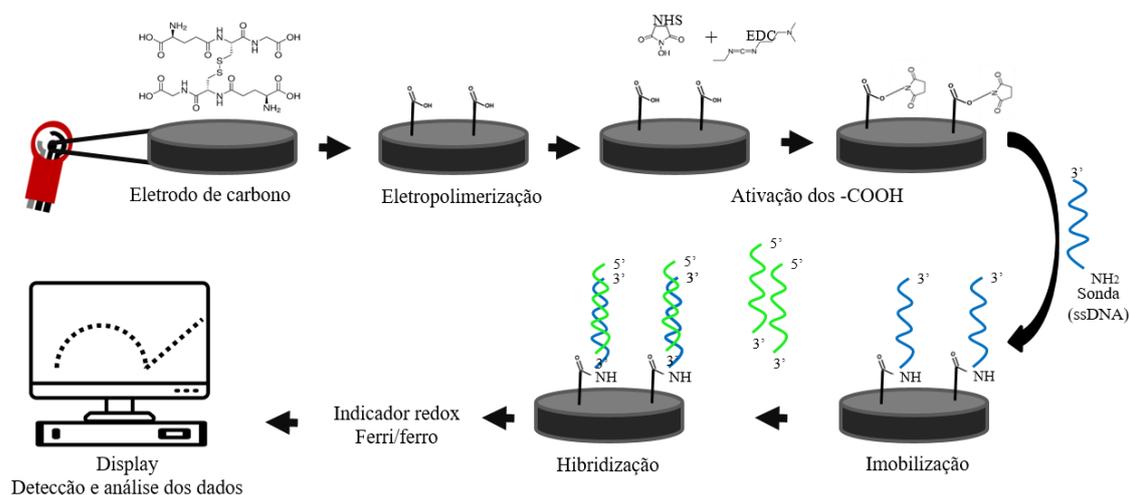


Figura 13. Esquema das etapas de preparo e detecção do genossensor impedimétrico. Fonte: Autora, 2022

4.1 Instrumentação e equipamentos

Todas as medidas eletroquímicas de DPV e EIS foram realizadas em um Potenciostato AUTOLAB® modelo AUT 85478 obtido da Metrohm - Brasil, apresentado na **Figura 14** (A), controlado por um computador contendo o *software* NOVA 2.1. Para a caracterização via EIS, uma Gaiola de Faraday foi acoplada ao Potenciostato/Galvanostato. O principal objetivo dessa estrutura é criar uma barreira de isolamento em dispositivos elétricos e eletrônicos, evitando interferências externas. Os experimentos eletroquímicos para geração e caracterização dos filmes poliméricos, eventos de ativação, imobilização e hibridização foram conduzidos em uma célula eletroquímica conectada ao potenciostato como pode ser observado na **Figura 14** (B).

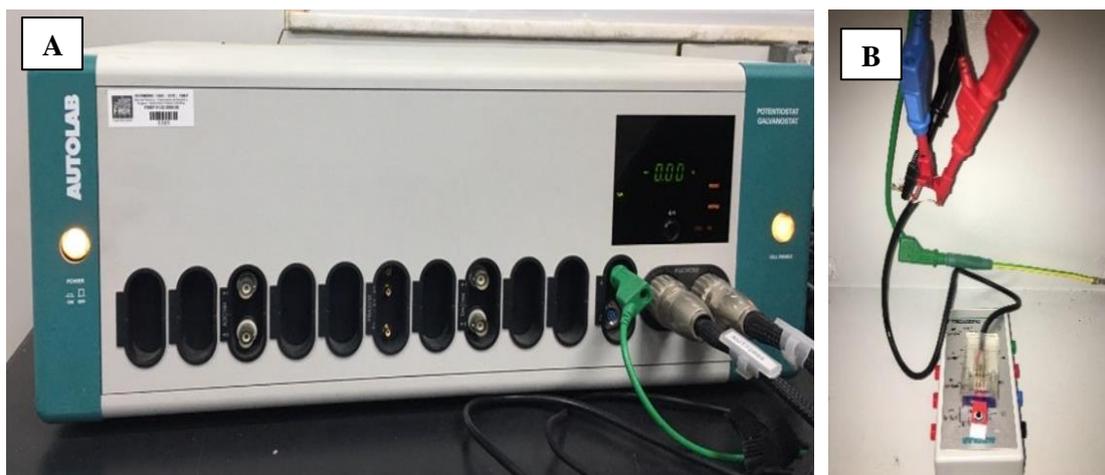


Figura 14. Potenciostato utilizado para as modificações do eletrodo de trabalho e detecção do alvo do ZIKV, sendo (A) Potenciostato e (B) célula eletroquímica conectada ao Potenciostato. Fonte: Autora, 2022.

A análise morfológica da superfície dos eletrodos modificados foi realizada através do Microscópio Eletrônico de Varredura, modelo Zeiss EVO/LS15® e representado na **Figura 15**. Os parâmetros para metalização dos eletrodos foram revestimento de ouro e paládio, 10mA, 1,2 KV por seis minutos. As magnificações para captura dos eletrodos modificados (Mag) variaram de 200X, 500 KX e 2000 KX, com alta tensão de elétrons de 10,00 kV (EHT).

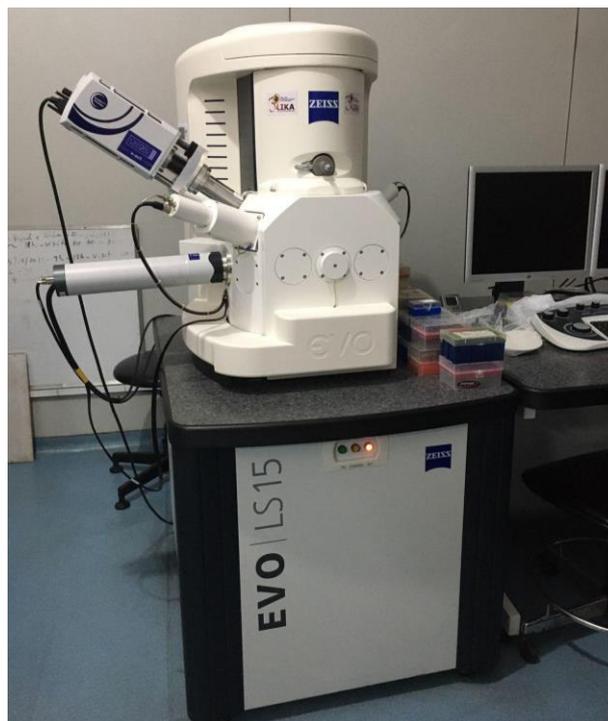


Figura 15. MEV utilizado para captar as imagens das modificações realizadas sobre a superfície dos eletrodos. Fonte: Autora, 2023.

A eletroforese foi realizada em um equipamento *Bioanalyzer Instrument* adquirido da Agilent®. Para a realização da leitura, a sonda (diluída em PBS 1x pH 7,4), alvo complementar e não complementar (ambos diluídos em Tris HCl pH 7,4 na concentração de 10mM) foram diluídos para concentração de 5uM a partir da sonda e alvo mãe. Foi utilizado o Kit da Agilent® para realização de todas as leituras de acordo com as especificações do manual de instruções do fabricante.

4.2 Parâmetros para as leituras eletroquímicas

Foram realizadas análises de DPV utilizando uma solução aquosa de MB na concentração de 500nM. Para isso, foi depositada uma quantidade de 5 μ L dessa solução sobre a área de trabalho após todas as etapas de modificação. Após uma interação de 5 minutos do MB com as estruturas formadas na superfície do eletrodo, utilizou-se 1 mL de solução Tris HCl (pH = 7,4) com uma concentração de 20 mM para lavar o SPE e retirar o MB não adsorvido. As análises foram conduzidas em tampão Tris HCl pH = 7,4, também com concentração de 20 mM, com o potencial variando de -0,6 V a 0 V,

amplitude de modulação de 50 mV e velocidade de varredura de 20 mV/s. As medições foram realizadas a temperatura ambiente, e os resultados foram tratados com as ferramentas "*moving average*" (subtração da linha de base usando o método de média móvel) e "*Smooth*" (suavização em nível 2) do *software* NOVA 2.1.

As análises de EIS foram realizadas utilizando 50 μ L de solução de ferrocianeto/ferricianeto na concentração de 5 mM em KCl 0,10 M, depositados sobre o eletrodo após todas as etapas de modificação. Para cada concentração de analito, foi calculada a R_{ct} (ou diâmetro do gráfico de Nyquist a partir do eixo Z') ajustando semicírculos aos traços de Nyquist, usando o *software* FRA (analisador de resposta de frequência) em um *hardware* da AUTOLAB. A primeira frequência aplicada foi de 105 Hz e a última frequência de 0,1 Hz, com amplitude de 0,01 VRMS (raiz média quadrática). Todas as medições foram realizadas a temperatura ambiente, e os resultados foram tratados com as ferramentas do *software* NOVA 2.1.

4.3 Análises Estatísticas Realizadas

Com o objetivo de identificar a significância entre cada etapa de construção do genossensor impedimétrico, serão aplicados uma série de testes estatísticos. Inicialmente, foi escolhido o teste de normalidade mais apropriado, considerando a quantidade de repetições dos tratamentos. Em seguida, foi selecionado o teste estatístico adequado, com base na normalidade ou não dos dados obtidos. Por fim, para avaliar a correlação entre cada um dos tratamentos, foi escolhido o teste post-hoc, de acordo com o teste estatístico realizado. Todo o processo foi realizado por meio de um programa desenvolvido em Python, utilizando a biblioteca SciPy, para uma melhor análise dos dados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Eletrólimerização

Durante o processo de eletrólimerização, é necessário controlar as condições eletroquímicas para obter um polímero que possua as características desejadas, como a espessura, aderência, resistência mecânica, estabilidade térmica e condutividade elétrica, entre outras propriedades. Para isso, é fundamental controlar uma série de parâmetros, incluindo a densidade de corrente, o tempo de eletrólise, a temperatura, a composição do eletrólito, o tipo de eletrodo e outros fatores. A primeira etapa do processo de modificação do eletrodo de trabalho é a formação do filme polimérico na superfície do eletrodo, permitindo a imobilização covalente da sonda. Para estudar a modificação utilizando a GSH, foram expressos os sinais eletroquímicos obtidos por DPV. Para essa análise, o reagente MB foi utilizado na concentração de 500nM em Água MilliQ, conforme descrito na seção 4.2. A escolha dessa sonda redox deve-se ao fato de que ela apresenta um comportamento eletroquímico bem definido e conhecido, sendo considerada um padrão eletroquímico. Esse par redox também tem sido empregado em análises de desempenho na detecção de diferentes alvos em leituras eletroquímicas (Cheng *et al.*, 2021).

Em solução aquosa, o monômero de L-Glutationa sofre oxidação e perde um hidrogênio anteriormente ligado a um nitrogênio do grupamento aminado, gerando um radical livre. Esse radical amina livre resulta em uma ligação carbono-nitrogênio na superfície do eletrodo de trabalho, ou seja, ocorre uma ancoragem do monômero GSH no eletrodo, formando o filme polimérico (Xia *et al.*, 2016). Os eletrodos feitos de pasta de carbono geralmente apresentam grupamentos como -OH e -COOH em sua superfície (Ferreira, 2020). Dessa forma, a formação do filme na superfície do eletrodo de trabalho pode ocorrer a partir da ancoragem dos terminais aminados da GSH que, quando oxidados em solução, ligam-se aos grupamentos -COOH provenientes do eletrodo. É importante destacar que a formação desse filme é crucial para permitir a imobilização covalente da sonda e, conseqüentemente, a detecção de diferentes alvos em leituras eletroquímicas.

Para entender qualitativamente a formação do polímero gerado pela ligação dos monômeros da PGSH, as magnitudes das correntes de pico após exposição em solução de MB nos eletrodos foram registradas por DPV. Com base nos parâmetros

metodológicos descritos na seção 4.2, os resultados das leituras podem ser observados nos gráficos da **Figura 16**.

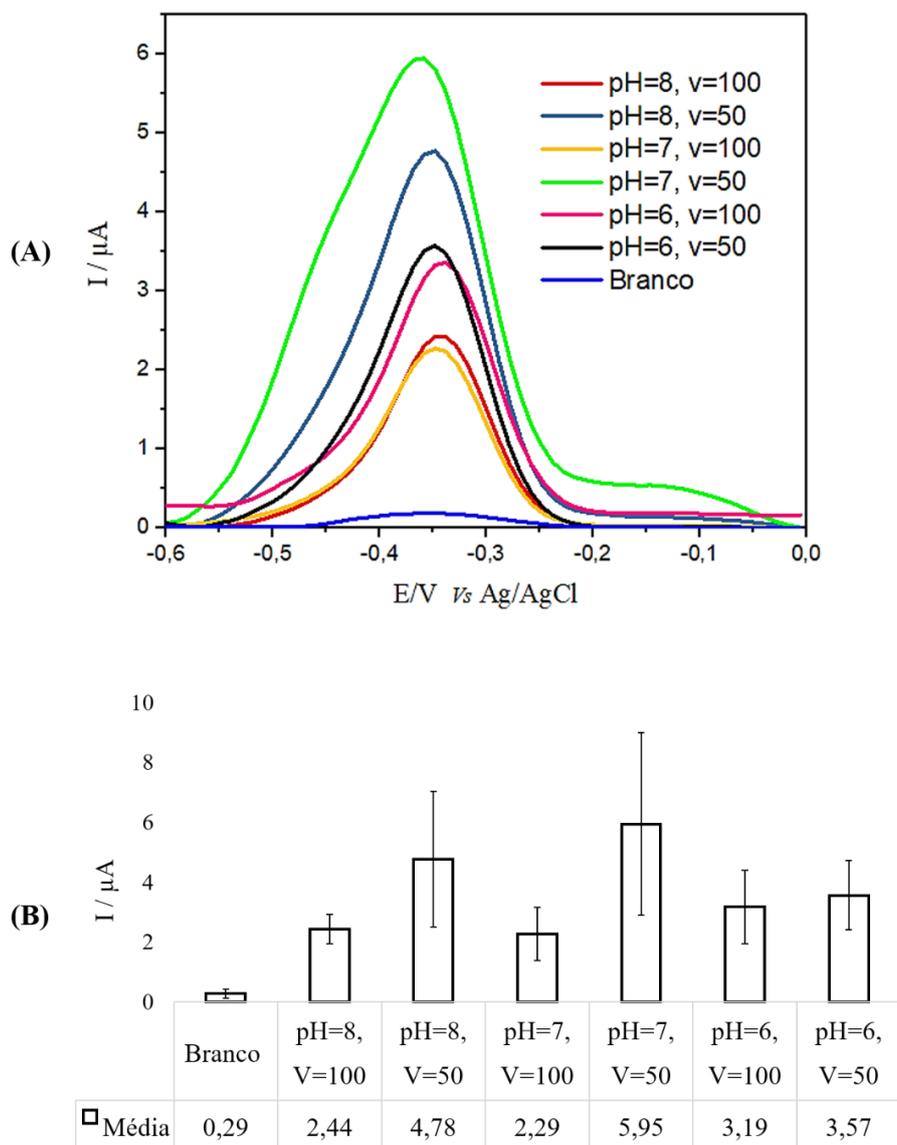


Figura 16. Variação do pH e velocidade de varredura da eletropolimerização da PGSH com concentração de 5mM em PBS 0,01M com KCl 0,1M, potencial -1,0 e +2,5V, 8 ciclos, lavagem com MilliQ; deposição de 5 μ l de MB por 5min; lavagem e leitura com

Com base nos resultados obtidos do voltamograma de DPV e gráficos de barras, foi possível confirmar a formação bem-sucedida dos filmes de PGSH. Isso foi evidenciado pela mudança na intensidade da corrente de pico após as modificações realizadas. A comparação com o eletrodo sem modificação (branco) mostrou um aumento na corrente após a polimerização, o que indica a interação do MB com a superfície

modificada com PGSH. Dentre os experimentos realizados, o parâmetro de pH=8 e V=100mV/s apresentou o melhor desvio padrão e foi selecionado para analisar a interação da sonda. Já os parâmetros de pH=8 e V=50mV/s e pH=7 e V=50mV/s apresentaram os maiores desvios.

Por outro lado, a eletropolimerização realizada em pH=6 e V=50mV/s mostrou-se equivalente à realizada em V=100mV/s, tanto em relação à corrente de pico quanto ao desvio. Entretanto, o parâmetro de menor velocidade, foi escolhido para seguir com as próximas análises, além da configuração anteriormente escolhida (pH 8 e V=100mV/s). Essa escolha baseou-se no fato de que a eletropolimerização pode atingir melhores resultados em velocidades de varredura menores, o que permite que os polímeros sejam formados de maneira mais uniforme e controlada. Além disso, a eletropolimerização em baixas velocidades de varredura também pode reduzir a formação de bolhas de gás e a deposição de produtos secundários, que podem interferir na detecção de moléculas-alvo (Wang, 2006; Sassolas *et al.*, 2012; Xia *et al.*, 2016).

Os parâmetros escolhidos de formação do filme polimérico (pH=8, V=100mV/s e pH=6, V=50mV/s) foram submetidos à análise preliminar de imobilização covalente da sonda do ZIKV. O principal objetivo dessa análise era observar se a sonda de ZIKV se ligaria covalentemente ao filme formado na superfície do eletrodo de trabalho e, em qual das duas configurações de polimerização se obteria o melhor resultado. Para isso, a imobilização da sonda foi realizada depositando uma alíquota de 5 μ l na concentração de 5 μ M em PBS 1x pH=7,4 por 16h, seguida de lavagem com 1mL de Tris HCl 10mM para remoção da sonda não ligada. A **Figura 17** apresenta os resultados obtidos da imobilização da sonda de ZIKV em função do estudo da variação de pH e velocidade de varredura para a formação do filme polimérico.

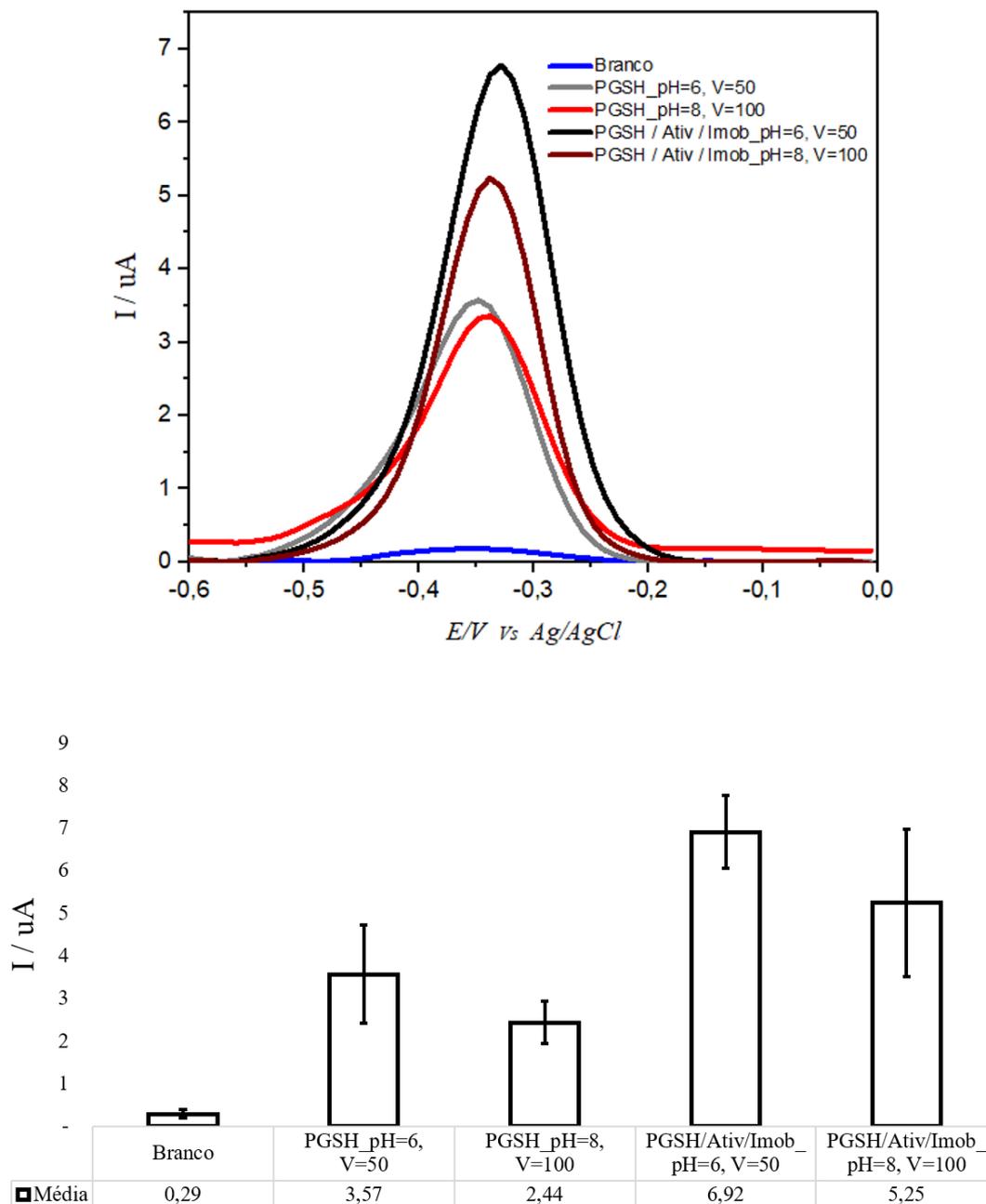


Figura 17. Variação do pH e velocidade de varredura da eletropolimerização da PGSH com concentração de 5mM em PBS 0,01M com KCl 0,1M, potencial -1,0 e +2,5V, 8 ciclos; imobilização da sonda ZIKV seguiu os parâmetros de ativação dos $-COOH$ com 5mM de EDC e 8mM de NHS por 1h em tampão MÊS pH=5,5, lavagem com 0,5mL do mesmo tampão de suspensão; deposição de 5 μ l de sonda na concentração de 5mM em PBS pH=7,4 por 16h seguida por lavagem com 1mL de Tris HCl 10mM; deposição de 5 μ l de MB por 5min; lavagem e leitura com Tris HCl 20mM, sendo (A) Voltamograma e (B) Gráficos de barras com os resultados resultante do voltamograma, com 5 repetições.

Como pode ser observado nos voltamogramas e gráficos de barras, a maior corrente e menor desvio padrão foi observada na imobilização da sonda que seguiu a

eletropolimerização utilizando pH=6 e velocidade de varredura 50mV/s. Desta forma, esses parâmetros foram selecionados para imobilizar covalentemente a sonda do ZIKV.

Estudo da ativação dos grupos carboxílicos do filme de PGSH

Após o processo de ativação dos grupos $-COOH$, o próximo passo para a construção do genossensor é a imobilização da sonda. Quando um filme polimérico apresenta mais de dois grupos funcionais para fixação/ligação com a sonda, é necessária uma imobilização orientada para manter a funcionalidade e a forma nativa da biomolécula (Asal *et al.*, 2019). A imobilização orientada pode superar a inativação de biomoléculas e contribuir para a ligação com os alvos, fornecendo sítios de ligação mais acessíveis (Liu and Yu, 2016). Dessa forma, uma vez que o filme de PGSH apresenta mais de dois grupos funcionais para fixação da sonda, os parâmetros para a ligação covalente polímero-sonda foram otimizados utilizando o EDC-NHS para ativar os grupos carboxílicos livres. As concentrações do EDC-NHS foram cuidadosamente otimizadas para uma melhor imobilização da sonda de ZIKV, com ligação da amina (proveniente da sonda) aos grupos $-COOH$ (proveniente do filme de PGSH). A **Figura 18** apresenta a variação da concentração do EDC-NHS e suas respectivas correntes de pico obtidas por DPV após a imobilização da sonda de ZIKV.

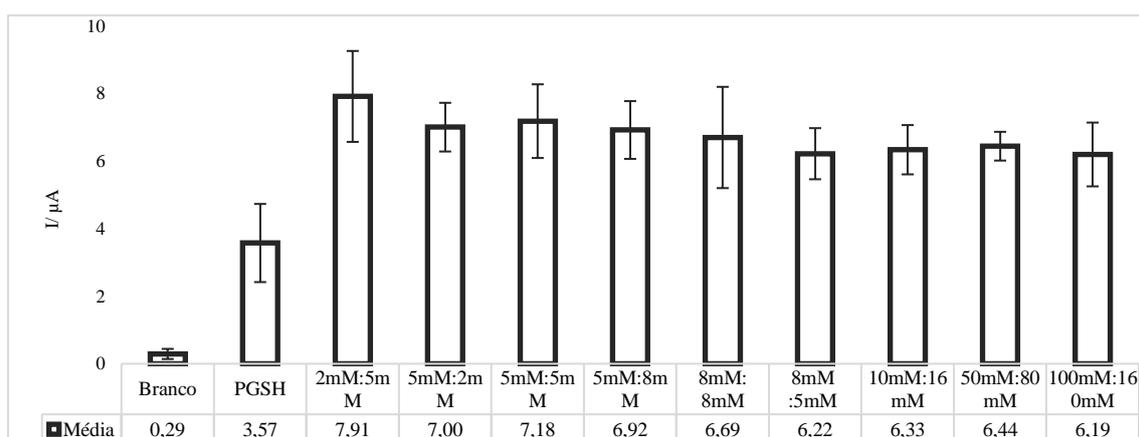


Figura 18. Comparação entre as diferentes concentrações de EDC:NHS em MES pH=5,5, com tempo de ativação de 1h, lavagem com 0,5mL do mesmo tampão de suspensão e imobilização depositando 5μl de sonda na concentração de 5mM em PBS pH = 7,4 por 16h seguida por lavagem com 1mL de Tris HCl 10mM; deposição de 5μl de MB por 5min; lavagem e leitura com Tris HCl 20mM; com 5 repetições.

A **Figura 18** revela que a imobilização da sonda resultou em maior acúmulo de MB e conseqüentemente, um aumento de corrente em todas as concentrações analisadas. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de o MB ser capaz de ligar-se às guaninas presentes na sonda (Ferreira, 2020). É possível constatar que as concentrações de 5mM de EDC:2mM de NHS e 50mM de EDC:80mM de NHS apresentaram menor desvio padrão, sendo mais reprodutíveis que as outras concentrações utilizadas. Supõe-se que a ativação dos grupos carboxílicos nessas concentrações tenha favorecido as ligações covalentes com a sonda. É importante frisar que, a ligação da sonda com os grupos $-COOH$ ativados do filme de PGSH é realizada através do seu terminal $-NH_2$, gerando ligações estáveis com o polímero (Rashid and Yusof, 2017; Ferreira, 2020).

Com as concentrações de EDC-NHS já estabelecidas, o próximo passo foi a variação do tempo de ativação. Embora a adição do NHS ao EDC melhore a estabilidade do intermediário ativo formado após a ativação dos grupos $-COOH$, estudos mostram que a reação com o grupo $-NH_2$, presente na sonda, ainda ocorre de forma relativamente lenta. Além disso, a reatividade do intermediário ativo diminui significativamente após uma hora de sua formação, comprometendo a eficiência do acoplamento. Essas informações foram relatadas em um estudo recente por Tvorynska *et al.*, (2022). Ou seja, se o grupo $-COOH$ ativado não encontrar o grupo $-NH_2$ alvo (sonda), ele se hidrolisa e o acoplamento necessário pode não ocorrer ou levar à uma menor quantidade de sonda imobilizada. Em vista disso, foi necessário otimizar o tempo de ativação do EDC-NHS nas concentrações escolhidas (5mM de EDC:2mM de NHS e 50mM de EDC:80mM de NHS). Os resultados obtidos foram representados no gráfico de barras construído a partir dos dados do voltamograma da DPV, mostrado na **Figura 19**.

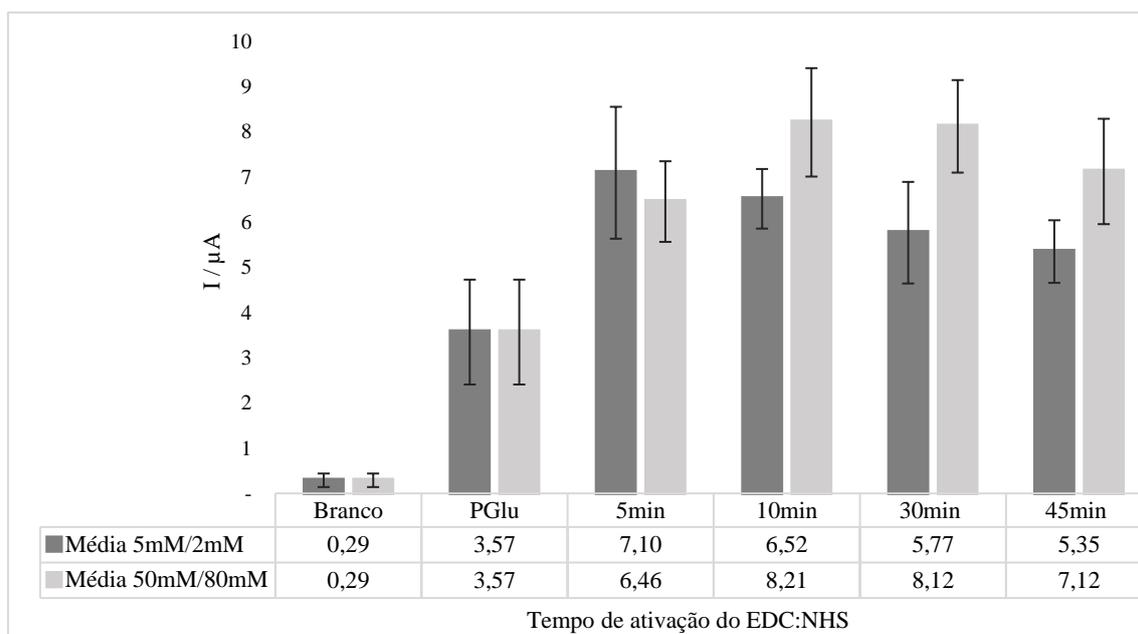


Figura 19. Comparação entre as diferentes concentrações e tempo de ativação do EDC/NHS, a cor mais escura representa a concentração de 5mM/2mM e a cor mais clara para concentração de 50mM/80mM, ambos suspensos em MES pH=5,5, lavagem com 0,5mL do mesmo tampão suspensão e imobilização depositando 5 μ l de sonda na concentração de 5mM em PBS pH = 7,4 por 16h seguida por lavagem com 1mL de Tris HCl 10mM; deposição de 5 μ l de MB por 5min; lavagem e leitura com Tris HCl 20mM; com 5 repetições.

Com base nos resultados obtidos a partir da ativação dos grupos $-\text{COOH}$ utilizando EDC-NHS, é possível afirmar que todos os parâmetros, tanto de concentração quanto de tempo de ativação, foram capazes de imobilizar a sonda covalentemente. Dessa forma, o grupo carboxílico presente no eletrodo modificado com o filme de PGSH foi capaz de interagir com a sonda aminada, resultando em um aumento da corrente em relação ao sinal expresso no eletrodo contendo apenas o filme polimérico de PGSH, como pode ser visto na **Figura 19**. Ainda analisando essa figura, é possível observar uma pequena queda na corrente após 10min de ativação e um maior desvio padrão nas concentrações de 50mM de EDC e 80mM de NHS, sendo acentuada em 45min. Analisando a menor concentração de 5mM de EDC e 2mM de NHS, é possível observar um aumento na corrente e no desvio no tempo de 5min em relação as demais variações nesse mesmo parâmetro, seguido por uma queda nas correntes com um aumento no desvio no tempo de ativação de 30min. Já em 10min de ativação apresentou uma maior corrente associado ao menor desvio padrão analisado. Dessa forma, analisando o tempo de ativação, correntes resultantes e os desvios, os parâmetros escolhidos para ativação dos grupos $-\text{COOH}$ foram a concentração de 5mM de EDC:2mM de NHS e 10min. Esses indicam melhor reprodutibilidade, sendo selecionados para o estudo de imobilização da

sonda do ZIKV. É importante ressaltar que essa decisão também foi baseada na busca pelo melhor custo-benefício, com um menor tempo de ativação, ou seja, com menor utilização de reagentes associada a um tempo otimizado.

Estudo de imobilização da sonda de ZIKV

Após a otimização dos parâmetros para a ativação dos grupos -COOH , a próxima etapa na construção do genossensor foi a imobilização do elemento de biorreconhecimento, a sonda do ZIKV. Para obter melhores resultados experimentais, a concentração e o tempo de imobilização da sonda de ZIKV também foram otimizados. A primeira análise realizada foi a variação da concentração da sonda, cujos resultados podem ser vistos na **Figura 20**, obtidos por meio de DPV.

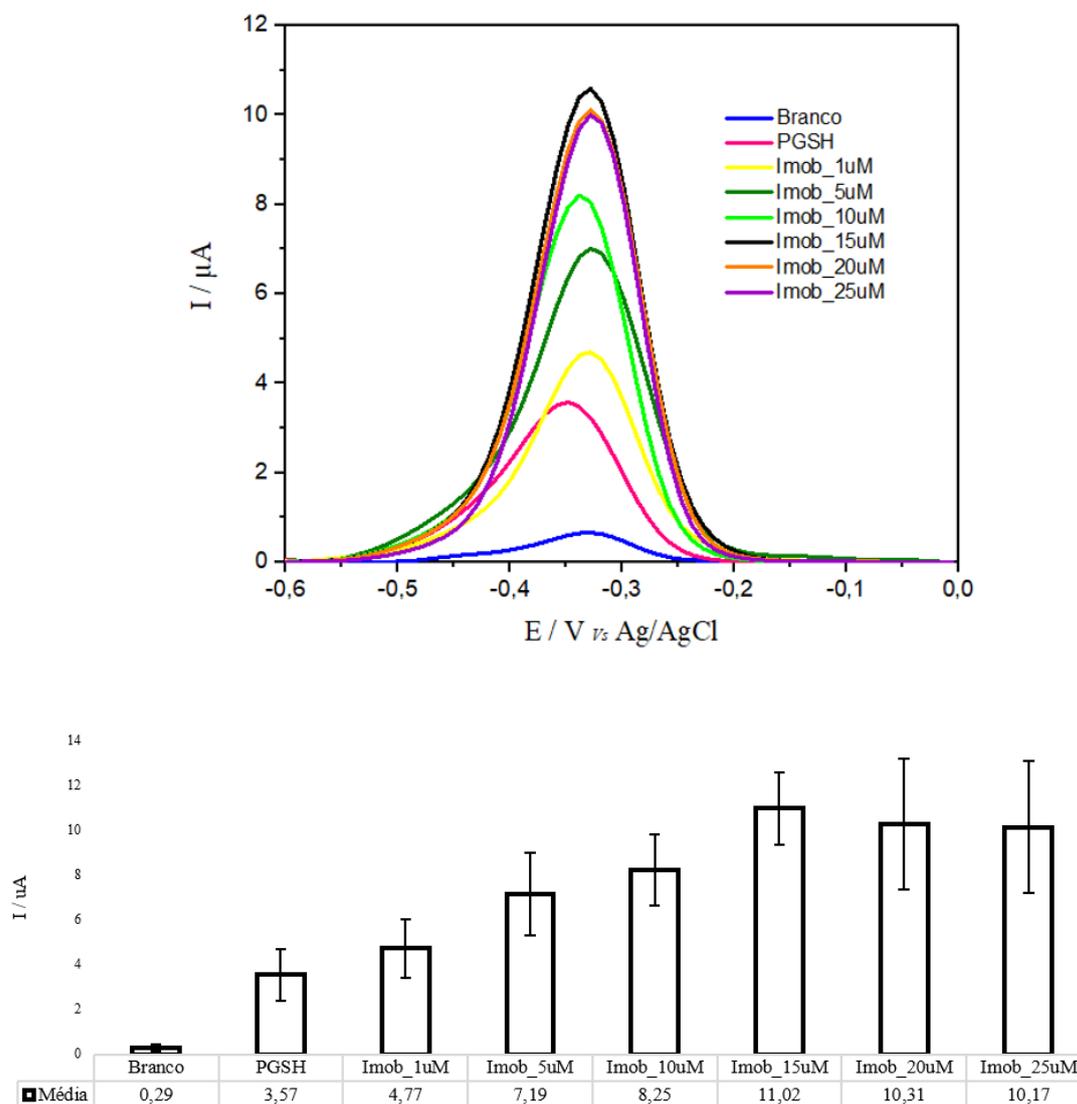


Figura 20. Variação da concentração da sonda do ZIKV, ativação dos grupos $-\text{COOH}$ com 5mM de EDC e 2mM de NHS suspensos em MES pH=5,5, lavagem com 0,5mL do mesmo tampão suspensão e imobilização depositando 5 μl de sonda por 16h seguida por lavagem com 1mL de Tris HCl 10mM; deposição de 5 μl de MB por 5min; lavagem e leitura com Tris HCl 20mM, sendo (A) Voltamograma e (B) Gráficos de Barras resultante das medições das correntes do voltamograma, com 5 repetições.

De acordo com a **Figura 20**, à medida que a concentração foi aumentando, houve um aumento gradual na corrente, alcançando um patamar a partir da concentração de 15uM e apresentando uma leve queda após esse ponto. Além de apresentar a maior corrente de pico, essa concentração também exibiu o melhor desvio padrão, razão pela qual foi escolhida para dar continuidade às otimizações. É importante frisar que a quantidade de sonda imobilizada na superfície do eletrodo pode favorecer a acessibilidade da interação com o alvo, aumentando assim o desempenho do biossensor. Essa

característica é fundamental em relação aos genossensores para o reconhecimento da hibridização (Malekzad *et al.*, 2017).

Tendo a concentração de 15uM definida, a próxima otimização foi realizada variando o tempo de imobilização, cujo resultado está descrito na **Figura 21**.

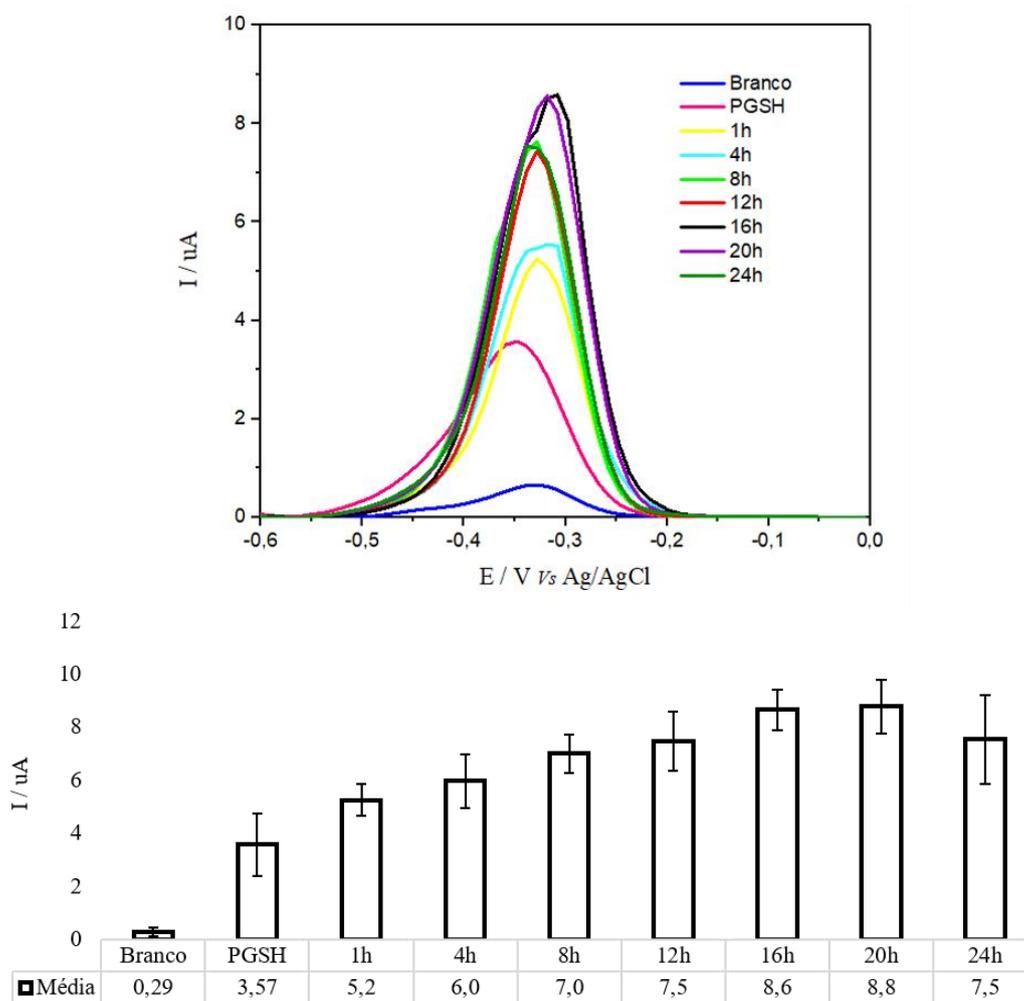


Figura 21. Variação do tempo de imobilização da sonda do ZIKV, ativação dos grupos $-\text{COOH}$ com 5mM de EDC e 2mM de NHS suspensos em MES pH=5,5, lavagem com 0,5mL do mesmo tampão suspensão e imobilização depositando 5 μ l de sonda na concentração de 15uM seguida por lavagem com 1mL de Tris HCl 10mM; deposição de 5 μ l de MB por 5min; lavagem e leitura com Tris HCl 20mM, sendo (A) Voltamograma e (B) Gráficos de Barras resultante das medições das correntes do voltamograma, com 5 repetições.

Com base na **Figura 21**, observa-se que os tempos de imobilização de 16h e 20h apresentaram praticamente a mesma intensidade de corrente. A partir de 16h de imobilização é possível observar um aumento no desvio padrão nos tempos de 20h e 24h,

e uma queda de corrente no maior tempo testado. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que, no tempo de 16h, todos os grupamentos carboxílicos ativados podem ter se ligado às sondas, levando em consideração o impedimento estérico. Portanto, o tempo de imobilização da sonda por 16h foi selecionado para a construção do genossensor e demais estudos de detecção do alvo.

Microscopia Eletrônica de Varredura

As alterações morfológicas na superfície de um biossensor podem ser observadas pela técnica de MEV (Özcan and Sezgintürk, 2021). Ao analisar a forma dos componentes formados na superfície do eletrodo em biossensores, a MEV pode fornecer informações importantes para entender a estrutura do eletrodo e sua relação com a detecção de moléculas específicas. Portanto, foram realizadas leituras em cada uma das etapas da construção do genossensor impedimétrico, a fim de melhor entender as estruturas formadas sob a superfície do eletrodo de trabalho. As imagens captadas de cada uma das modificações realizadas na superfície do eletrodo de trabalho durante a construção do genossensor podem ser observadas na **Figura 22**.

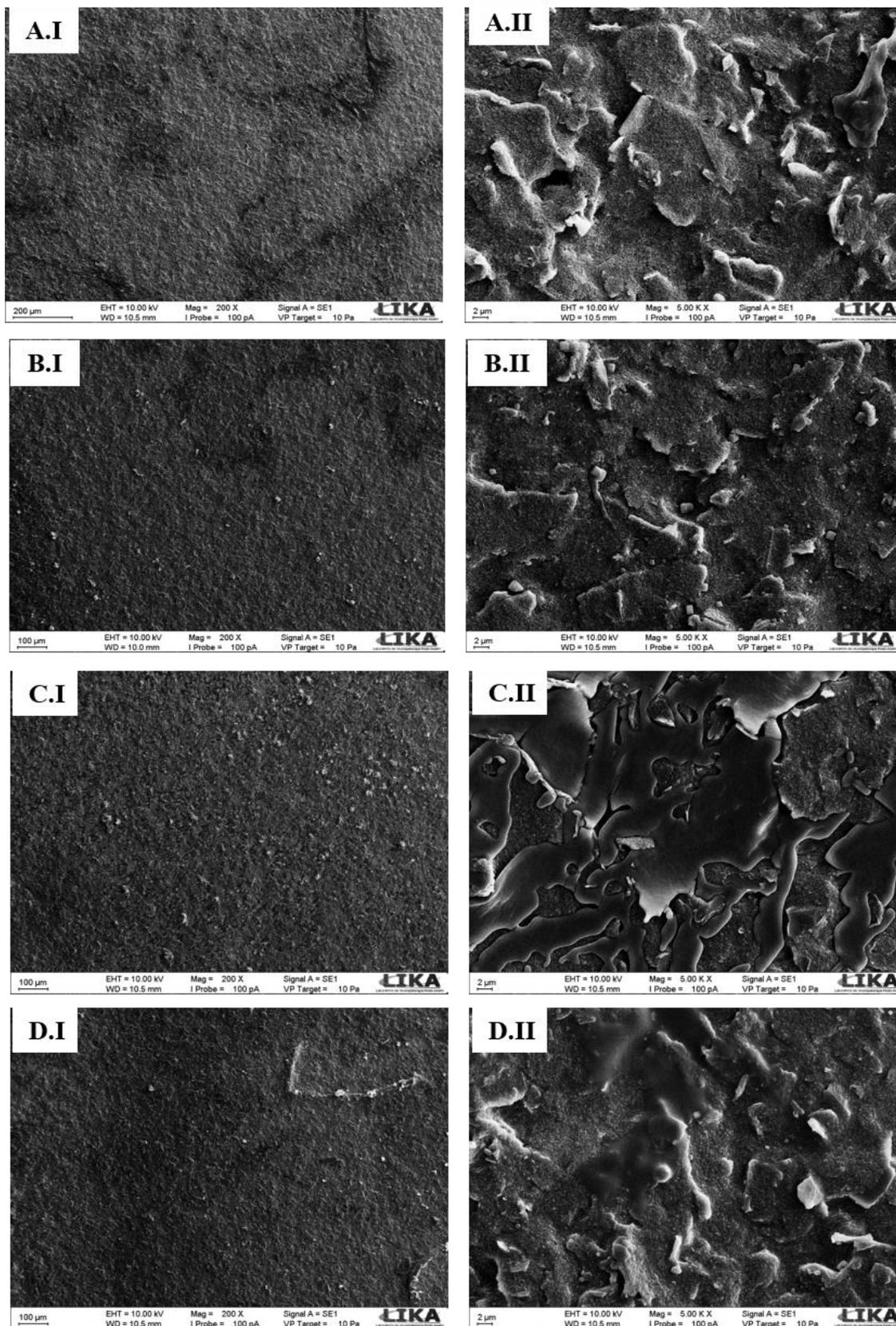


Figura 22. Imagens MEV das modificações realizadas na superfície dos eletrodos. Sendo linha (A), Eletrodo branco; (B) PGSH; (C) PGSH/Ativ e (D) PGSH/Ativ/Imob, tendo as colunas com magnificações de (I) 200X e (II) 500KX.

Nas imagens A.I e A.II presentes na **Figura 22**, é possível visualizar o eletrodo sem nenhuma modificação, também conhecido como "eletrodo branco". Devido à ausência de qualquer processo na superfície, é possível observar uma superfície sem características e com irregularidades. Por outro lado, nas imagens B.I e B.II, é perceptível uma alteração morfológica após a eletropolimerização com PGSH, em que as estruturas granulares foram formadas pelo processo de polimerização, evidenciando o sucesso da modificação do eletrodo. Um eletrodo modificado com um filme polimérico é um tipo de eletrodo que tem sua superfície revestida por uma película composta por uma camada fina de polímero depositada sobre sua superfície. Esse revestimento pode apresentar diferentes espessuras, composições e propriedades, dependendo do tipo de polímero utilizado e das condições de deposição do filme. No caso do filme de PGSH, as características morfológicas podem estar relacionadas à estrutura química da GSH. Por se tratar de um tipteptídeo, sua eletropolimerização pode resultar na formação de um filme com estruturas tridimensionais, conforme observado na imagem B.II. Esse filme desempenha um papel crucial na formação de uma matriz que possibilita a imobilização da biomolécula. Quando o eletrodo é ativado com EDC-NHS, nas imagens C.I e C.II pode-se observar uma camada lisa e homogênea formada em sua superfície, alterando sua morfologia em relação ao eletrodo polimerizado.

Por fim, após a imobilização da sonda de ZIKV nas áreas D.I e D.II da **Figura 22**, é possível observar uma mudança morfológica e revestimento de algumas áreas da superfície, indicando uma imobilização bem-sucedida. É perceptível que as bordas das estruturas formadas se tornaram menos nítidas e são preenchidas de maneira mais uniforme pela sonda. Além disso, é possível notar uma boa aderência da sonda à superfície do eletrodo, com uma formação de uma "película" mais homogênea e organizada quando comparada com a superfície do eletrodo ativado. A morfologia estrutural pode ser resultado da interação covalente entre a sonda e os terminais ativados dos polímeros utilizados. Vale ressaltar que a superfície de um eletrodo com uma biomolécula imobilizada deve apresentar uma morfologia uniforme e homogênea, sem sinais de aglomeração ou formação de cristais que possam prejudicar a sensibilidade e seletividade do biossensor (Egerton, 2005; Goldstein, 2017).

Interação do alvo de DNA com o genossensor e detecção por EIS

As análises de eletroforese foram realizadas utilizando o Bioanalyzer, o qual atestou a integridade de todos os alvos utilizados neste estudo, como indicado nos resultados apresentados nos apêndices A e B.

Uma vez confeccionado, o genossensor foi colocado em contato com soluções contendo sequências não complementares e complementares à sonda imobilizada para interação e conseqüente detecção. Essa interação, conhecida como hibridização, é específica e eficaz mesmo na presença de outras sequências não complementares. Mas, para que ocorra uma hibridização bem estruturada, é necessário seguir alguns parâmetros, como tempo e temperatura. Neste estudo, a hibridização foi realizada a $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, segundo as recomendações disponibilizadas pelos fornecedores do alvo do ZIKV, e sob agitação de 300 rpm por 10 min. Após a etapa de hibridização, realizou-se a detecção do alvo de ZIKV por EIS. O processo de detecção ocorre quando a amostra contendo a biomolécula-alvo é adicionada ao eletrodo de trabalho e liga-se seletivamente à camada de reconhecimento, alterando a impedância elétrica da superfície do sensor. Esse sinal foi medido por um circuito eletrônico, gerando uma saída proporcional à concentração do alvo presente na amostra. Os sinais analíticos obtidos da impedância foram utilizados como parâmetro para avaliar os eventos de hibridização nos experimentos subsequentes. Essa abordagem é importante, pois a hibridização altera a R_{ct} , gerando um sinal diferente daquele obtido na análise do genossensor apenas com a sonda de ZIKV imobilizada na superfície do eletrodo de trabalho.

Foram obtidos diagramas de Nyquist para analisar o genossensor, com o objetivo de verificar a polimerização, ativação dos grupos carboxílicos, imobilização e hibridização, avaliando a variação da resistência à transferência de cargas utilizando ferri/ferro como eletrólito suporte. Para observar o comportamento do dispositivo sem a presença de nenhum alvo na amostra analisada, foi utilizado o Tris HCl 10mM. As leituras de cada uma das modificações podem ser vistas na **Figura 23**.

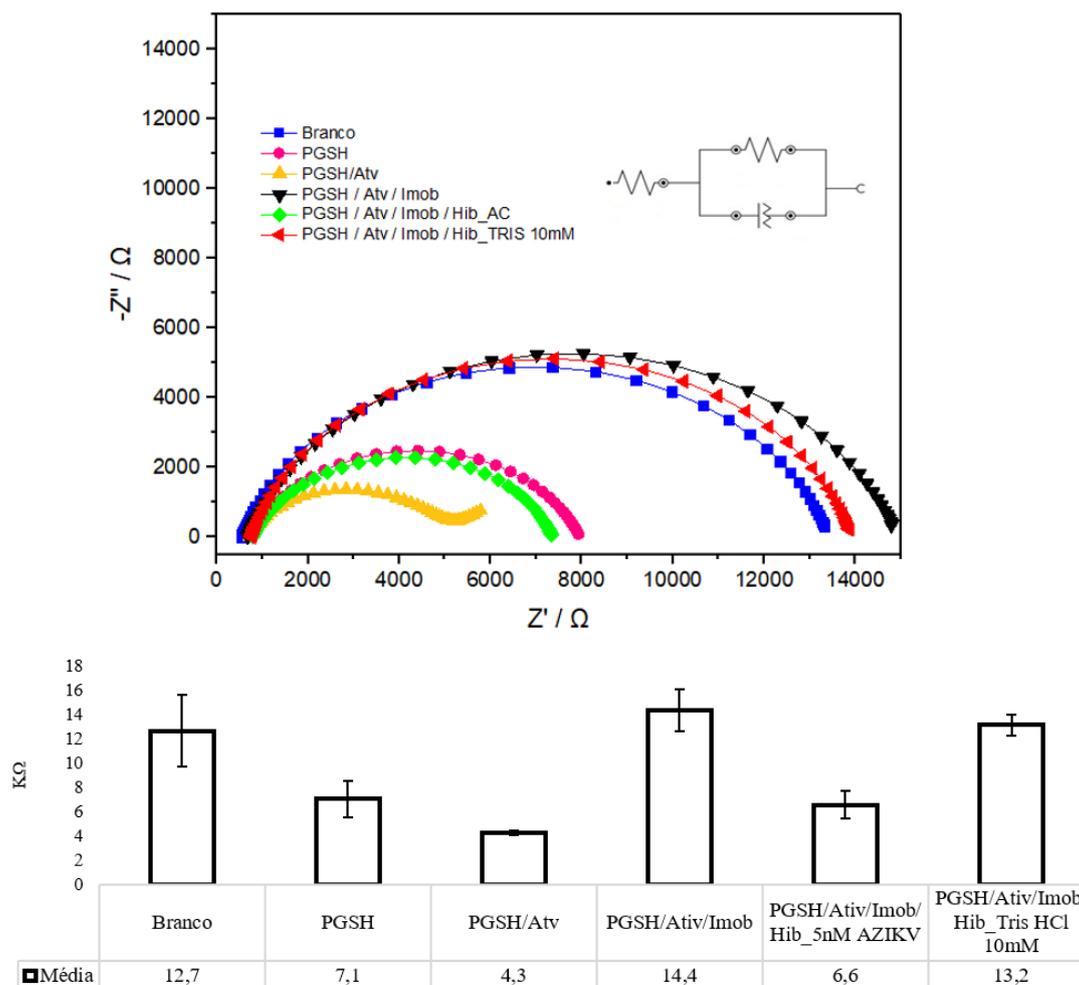


Figura 23. Caracterização do genossensor impedimétrico. Eletropolimerização da PGSH na concentração de 5mM em PBS 0,01M com KCl 0,1M (pH=6), potencial -1,0 e +2,5V, velocidade de varredura de 50mV/s, 8 ciclos, lavagem com MilliQ ativação dos grupos -COOH com 5mM de EDC e 2mM de NHS suspensos em MES pH=5,5, lavagem com 0,5mL do mesmo tampão suspensão e imobilização depositando 5 μ l de sonda na concentração de 15 μ M seguida por lavagem com 1mL de Tris HCl 10mM, tendo a hibridização à 60°C, 300 rpm por 10 min, lavagem com 1mL de Tris HCl 10mM e leitura utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como indicador redox preparada em KCl 0,1M, sendo (A) Diagramas de Nyquist para eletrodos modificados; (B) Gráfico de barras resultante do Diagramas de Nyquist, com 5 repetições

Os resultados da análise eletroquímica do genossensor foram expressos pelos gráficos de Nyquist das médias de R_{ct} dos SPEs em cada etapa de modificação, podendo ser visualizadas na **Figura 23**. A etapa de eletropolimerização da PGSH resultou na diminuição da R_{ct} para 7,1k Ω , indicando uma melhoria nas propriedades eletroquímicas do SPE modificado. Após a etapa de ativação com EDC-NHS, a R_{ct} apresentou outra queda para 4,3k Ω no PGSH/Ativ quando comparado ao PGSH, o que pode ser resultado da redução do número de grupos carboxílicos livres na superfície do eletrodo. Em seguida, quando a sonda foi imobilizada na superfície polimerizada já ativada pelo EDC-NHS, houve uma interação covalente entre os grupos carboxílicos ativados e os grupos

amina da estrutura da sonda, resultando em um aumento da R_{ct} para 14,4 k Ω no PGSH/Ativ/Imob. Esse aumento ocorre devido à formação de uma camada mais negativa na superfície do eletrodo advinda da sonda imobilizada, causando maior repulsão com o indicador redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ devido à interação repelente eletrostática com o esqueleto de fosfato carregado negativamente da molécula de DNA (Ilkhani and Farhad, 2018; Vizzini, Braidot and Vidic, 2019).

O aumento da impedância após a ligação do analito à superfície do biossensor é amplamente documentado (Millner *et al.*, 2012). Esse aumento é geralmente devido à deposição do analito na superfície do sensor, que aumenta a capacitância e a resistência da superfície. No entanto, neste estudo, foi observada uma queda na R_{ct} de 14,4 k Ω no PGSH/Ativ/Imob para 7,1 k Ω no PGSH/Ativ/Imob/Hib_AC após a hibridização com o alvo complementar. Esse comportamento pode ser resultado de uma menor repulsão do indicador com a dsDNA, atuando como mediador para a transferência de elétrons ao aumentar o fluxo de corrente através da superfície e as espécies eletroativas do indicador. Embora menos comum, a ligação de certos analitos a certos sistemas de biossensores pode diminuir a impedância da superfície (Zhang *et al.*, 2012; Rushworth *et al.*, 2014).

Após a hibridização, as fitas duplas de DNA recém-formadas adquirem maior rigidez devido à atração eletrostática, e até mesmo uma diminuição de R_{ct} pode ser observada (Faria and Zucolotto, 2019). Os primeiros estudos que descrevem a diminuição de R_{ct} durante a hibridização foram relatados pelo grupo de Pham nos trabalhos de Reisberg *et al.*, 2005, 2008 (Lien *et al.*, 2010). De acordo com os estudos realizados, a diminuição da R_{ct} durante a hibridização de DNA ocorre devido a mudanças na superfície do eletrodo do sensor que ocorrem quando a sonda de DNA se liga ao seu alvo complementar. No geral, quando uma sonda de DNA é imobilizada na superfície do eletrodo de um sensor eletroquímico, ela bloqueia a transferência de elétrons na superfície do eletrodo. Isso resulta em uma alta R_{ct} , o que limita a corrente elétrica que flui no sensor. Durante a hibridização, a sonda de DNA se liga ao seu alvo complementar, formando uma dupla hélice de DNA. Isso causa uma mudança na conformação da sonda de DNA e na sua orientação na superfície do eletrodo. Essa mudança pode permitir que as espécies redox (que são responsáveis pela transferência de elétrons) acessem a superfície do eletrodo, o que diminui a resistência de transferência de carga (R_{ct}) e aumenta a corrente elétrica que flui no sensor. Os estudos ainda afirmam que a magnitude

da diminuição de Rct depende de vários fatores, incluindo a natureza das sondas de DNA e de seus alvos, as condições de hibridização e as propriedades do sensor eletroquímico.

Por fim, na ausência de alvos, representada pelo PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM Tris HCl 10mM, observou-se que a medida de Rct não foi afetada, apresentando apenas 13,3kΩ. Para a análise estatística dos dados, foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk com o objetivo de identificar se os dados seguem uma distribuição normal ou não, devido ao tamanho da amostra ser inferior a 50. Os resultados indicaram que todas as variáveis apresentam distribuição normal com 95% de confiança. Com base no teste ANOVA, foi possível rejeitar a hipótese nula (H0) e aceitar que pelo menos uma das modificações é diferente das outras em termos de média de corrente, com uma estatística F calculada de 42,88 e um p-valor de 7,62-13. O teste de Tukey, um teste estatístico post-hoc, foi utilizado após a análise de variância para comparar as possíveis combinações de médias entre os grupos. Este teste permite identificar quais grupos apresentam médias significativamente diferentes entre si, comparando as diferenças entre as médias dos grupos duas a duas. Na Tabela 02, é possível observar a distribuição do p-valor de todos os tratamentos realizados na superfície do eletrodo.

Tabela 02. A tabela apresenta a distribuição dos valores de p de todos os tratamentos realizados na superfície do eletrodo, (*) indica a comparação do tratamento com ele mesmo e (**) valores de p inferiores a 0,05.

	Branco	PGSH	PGSH/Ativ	PGSH/Ativ/Imob	PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM AZIKV	PGSH/Ativ/Imob/hHib - Tris HCl 10mM
Branco	1,000*					
PGSH	0,001**	1,000*				
PGSH/Ativ	0,001**	0,081	1,000*			
PGSH/Ativ/Imob	0,522	0,001**	0,001**	1,000*		
PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM AZIKV	0,001**	0,900	0,255	0,001**	1,000*	
PGSH/Ativ/Imob/Hib - Tris HCl 10mM	0,900	0,001**	0,001**	0,787	0,001**	1,000*

Esses são resultados de análises estatísticas que comparam diferentes tratamentos. Cada tratamento é comparado com outros em termos de diferença significativa. Se o p-valor é menor do que 0,05 (ou seja, menor que 5%), então é considerado estatisticamente significativo e pode-se concluir que há uma diferença significativa entre os tratamentos. Se o p-valor é maior do que 0,05, então não há diferença significativa entre os tratamentos. Pode-se afirmar que há uma diferença significativa entre os tratamentos Branco e PGSH, Branco e PGSH/Ativ, PGSH/Ativ e PGSH/Ativ/Imob e PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM AZIKV com PGSH/Ativ/Imob/Hib_Trís HCl 10mM. Além disso, pode-se afirmar que não há diferença significativa entre PGSH e PGSH /Ativ.

Especificidade do genossensor impedimétrico

A EIS também foi utilizada para analisar a especificidade do genossensor impedimétrico proposto frente a diferentes alvos não complementares. Em análises com biossensores, o teste de especificidade refere-se à capacidade do biossensor de detectar seletivamente um analito específico em uma amostra, sem responder a outras substâncias presentes na amostra. Em outras palavras, um biossensor com alta especificidade será capaz de reconhecer e medir com precisão a presença e a quantidade de um determinado composto de interesse em uma amostra, sem ser influenciado por outras moléculas presentes na mesma. A fim de avaliar a especificidade do genossensor impedimétrico, sequências de alvo não complementares foram utilizadas. Dito isso, a **Figura 24** mostra as análises com os alvos ZIKV (Hib_AZIKV), Tuberculose (Hib_ATB) e Dengue-2 (Hib_ADENG-2), ambas na concentração de 5nM.

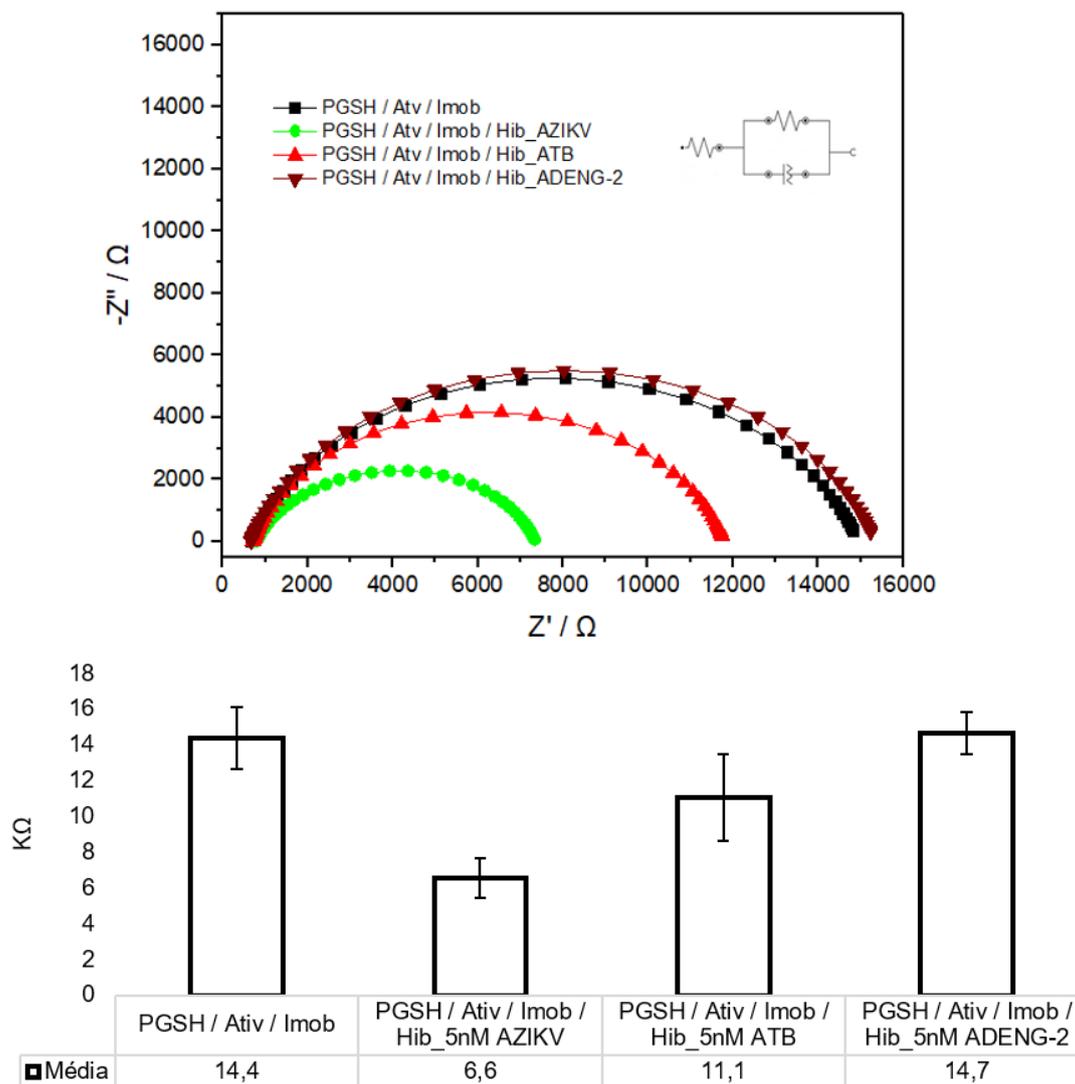


Figura 24. Análise da especificidade do genossensor frente a diferentes alvos não complementares. Eletropolimerização da PGSH na concentração de 5mM em PBS 0,01M com KCl 0,1M (pH=6), potencial -1,0 e +2,5V, velocidade de varredura de 50mV/s, 8 ciclos, lavagem com MilliQ ativação dos grupos –COOH com 5mM de EDC e 2mM de NHS suspensos em MES pH=5,5, lavagem com 0,5mL do mesmo tampão suspensão e imobilização depositando 5 μ l de sonda na concentração de 15 μ M seguida por lavagem com 1mL de Tris HCl 10mM, tendo a hibridização à 60°C, 300 rpm por 10 min, lavagem com 1mL de Tris HCl 10mM e leitura utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como indicador redox preparada em KCl 0,1M, sendo (A) Diagramas de Nyquist para eletrodos modificados; (B) Gráfico de barras resultante do Diagramas de Nyquist, com 5 repetições.

Com base na **Figura 24**, é possível observar que somente a sequência complementar (PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM AZIKV) é capaz de provocar uma diminuição considerável na R_{ct} , que chega a 6,6k Ω , representando uma redução de aproximadamente 46% da resistência em relação ao eletrodo que contém apenas a sonda de ZIKV imobilizada (PGSH/Ativ/Imob), cuja R_{ct} foi de 14,7k Ω . É possível notar que a

hibridização com o alvo não complementar (PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM ADENG-2) não afeta a Rct, o que comprova que somente o alvo complementar é capaz de provocar a diminuição na Rct. Neste caso, pode-se observar um comportamento semelhante ao do PGSH/Ativ/Imob, uma vez que não ocorreu hibridização e, portanto, houve repulsão com o indicador redox. É importante frisar que a reatividade cruzada entre a detecção do vírus Zika e outros vírus, como a dengue, pode levar a resultados falsos nos testes de diagnóstico, prejudicando a precisão e confiabilidade dos resultados. Isso pode resultar em erros no tratamento dos pacientes, pois os sintomas dessas doenças podem ser semelhantes, mas requerem abordagens de tratamento diferentes. Além disso, a reatividade cruzada dificulta a obtenção de dados epidemiológicos precisos sobre a incidência e disseminação de cada vírus, comprometendo a eficácia das medidas de saúde pública para controlar surtos e prevenir a propagação da doença. Em suma, evitar a reatividade cruzada é crucial para um diagnóstico correto, tratamento adequado e vigilância epidemiológica eficaz, a fim de proteger a saúde pública e melhorar os resultados clínicos dos pacientes. O genossensor impedimétrico desenvolvido não apresentou reatividade cruzada na detecção do ZIKV e da DENG-2, demonstrando segurança na detecção do ZIKV. Dessa forma, a diferença de Rct entre o alvo complementar e não complementar é suficiente para garantir a detecção da sequência alvo do ZIKV utilizada neste estudo. Adicionalmente, o genossensor impedimétrico desenvolvido pode gerar respostas simples de presença ou ausência do alvo, o que seria útil para sua utilização como teste rápido e econômico.

Foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para verificar se os dados seguem uma distribuição normal. Verificou-se que todas as variáveis apresentam distribuição normal com 95% de confiança. Foi realizado um teste ANOVA que indicou diferenças significativas entre pelo menos uma das modificações em relação à média de corrente, com um valor de estatística F calculada de 16,95 e um p-valor de $3,28^{-06}$. Em seguida, o teste de Tukey foi utilizado para comparar todas as possíveis combinações de médias entre grupos e identificar quais grupos apresentam médias significativamente diferentes entre si. A distribuição do p-valor de todos os tratamentos realizados na superfície do eletrodo pode ser observada na Tabela 03.

Tabela 03: A tabela apresenta a distribuição dos valores de p dos testes de especificidade do genossensor impedimétrico, (*) indica a comparação do tratamento com ele mesmo e (**) valores de p inferiores a 0,05.

	PGSH/Ativ/Imob	PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM AZIKV	PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM ATB	PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM ADENG-2
PGSH/Ativ/Imob	1,0000*			
PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM AZIKV	0,0010**	1,0000*		
PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM ATB	0,0964	0,0034**	1,0000*	
PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM ADENG-2	0,9000	0,0010**	0,0662	1,0000*

Os resultados baseados na Tabela 03 indicam que existe uma diferença significativa entre os tratamentos PGSH/Ativ/Imob e PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM AZIKV, PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM AZIKV e PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM ATB, e entre PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM AZIKV com a PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM ADENG-2. Não há diferença significativa entre PGSH/Ativ/Imob e PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM ATB, PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM ATB e PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM ADENG-2, PGSH/Ativ/Imob e PGSH/Ativ/Imob/Hib_5nM ADENG-2.

6 CONCLUSÃO

Todas as polimerizações, ativação dos grupos –COOH e imobilização da sonda do ZIKV foram eficazes para construção do genossensor impedimétrico. Foi possível constatar diferenças de sinais expressos após cada uma das modificações por meio da DPV e EIS. Já a MEV comprovou as mudanças morfológicas após cada uma das modificações utilizadas para a construção do genossensor. Foi possível observar a formação do filme polimérico, a extensa camada após a ativação dos –COOH, a nitidez e o preenchimento uniforme das bordas após a imobilização.

Na análise da EIS, a sequência complementar foi capaz de reduzir consideravelmente a R_{ct} , chegando a $6,6k\Omega$, representando uma diminuição de cerca de 46% da resistência em comparação com o eletrodo que contém apenas a PGSH/Ativ/Imob. A hibridização com alvo não complementar e a ausência de alvos não afetam a R_{ct} , o que comprova a especificidade do genossensor. A reatividade cruzada entre Zika e dengue em estudos com biossensores apresenta problemas como diagnósticos incorretos, dificuldade na diferenciação das doenças e comprometimento da vigilância epidemiológica. Biossensores sem reatividade cruzada são essenciais para diagnósticos precisos, tratamentos adequados e vigilância confiável, melhorando os resultados clínicos e fortalecendo as medidas de saúde pública. O genossensor impedimétrico desenvolvido não apresentou reatividade cruzada entre a detecção do ZIKV e a DENG-2, comprovando sua especificidade.

Estudos complementares são necessários para interpretar todos os valores de EIS, bem como entender o mecanismo de sinalização do sistema proposto analisando outras concentrações do alvo complementar. De maneira geral, todos os objetivos mencionados anteriormente foram concluídos, entretanto, mais experimentos são necessários para validação do genossensor e futuramente seu emprego clínico. Os resultados apresentados são relevantes para o desenvolvimento de estudos futuros que permitirão a construção de biossensores portáteis e sensíveis para detecção do ZIKV.

7 PERSPECTIVAS

De modo a melhorar a reprodutibilidade do genossensor desenvolvido, pretende-se otimizar as metodologias de pré-tratamento dos eletrodos, tornando-os mais condutores com superfícies mais padronizadas. Pretende-se, ainda, bloquear a superfície do eletrodo de trabalho para evitar possíveis ligações inespecíficas que possam ocorrer, visto a complexidade das amostras biológicas. Futuramente, tenciona-se analisar amostras biológicas e validar o genossensor impedimétrico desenvolvido neste trabalho. Tenciona-se realizar testes de estabilidade e determinação do limite de detecção (LoD) utilizando a curva de calibração do genossensor. Essas análises visam observar e analisar o coeficiente de correlação, ou seja, a relação entre o sinal emitido pelo dispositivo e a variação da concentração do alvo complementar do ZIKV.

Pretende-se substituir a tinta de carbono por uma tinta mais condutiva, o grafeno, com o objetivo de fornecer uma melhor transferência de elétrons, alta resistência mecânica, condutividade térmica, entre outros. Além da substituição da tinta, novos estudos estão sendo desenvolvidos para a produção dos SPEs em larga escala, por meio de uma impressora semi-automatizada adquirida por nosso grupo de pesquisa. Espera-se que esses eletrodos sejam confeccionados com a área superficial mais padronizada, de modo a proporcionar maior reprodutibilidade nas medidas.

Com a implementação de um potenciostato portátil e software para obtenção e tratamento dos dados, o genossensor desenvolvido poderá ser empregado para o diagnóstico em POC, de forma rápida e segura, para pacientes em áreas remotas.

8 REFERÊNCIAS

Abe, B.T. *et al.* (2022) 'Matters Arising Circular RNA migration in agarose gel electrophoresis II II Circular RNA migration in agarose gel electrophoresis', *Molecular Cell*, 82(9), pp. 1768-1777.e3. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.03.008>.

Abedi, R. *et al.* (2022) 'A novel genosensor based on - Fe₃O₄ @ SiO₂ / DABCO - modified screen - printed graphite electrode for detection of prostate cancer gene sequence hybridization', *Journal of the Iranian Chemical Society*, 19(6), pp. 2631–2640. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13738-021-02480-w>.

Abid, S.A. *et al.* (2021) 'Biosensors as a future diagnostic approach for COVID-19', *Life Sciences*, 273(January), p. 119117. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119117>.

Adegoke, O. *et al.* (2017) 'Localized surface plasmon resonance-mediated fluorescence signals in plasmonic nanoparticle-quantum dot hybrids for ultrasensitive Zika virus RNA detection via hairpin hybridization assays', *Biosensors and Bioelectronics*, 94(March), pp. 513–522. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.03.046>.

Afsahi, S. *et al.* (2018) 'Novel graphene-based biosensor for early detection of Zika virus infection', *Biosensors and Bioelectronics*, 100(June 2017), pp. 85–88. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.051>.

Aksoy, M. and Kıranşan, K.D. (2020) 'The Construction and Testing of an Amperometric Biosensor for Oxidized Glutathione with Glutathione Reductase Immobilized on Reduced Graphene Oxide Paper Modified with Cobalt Sulphur', *Chemistry Select*, 5(44), pp. 13925–13935.

Ali, A. *et al.* (2022) 'Dynamics of a fractional order Zika virus model with mutant', *Alexandria Engineering Journal*, 61(6), pp. 4821–4836. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aej.2021.10.031>.

Ali, J. *et al.* (2017) 'Biosensors & Bioelectronics Biosensors : Their Fundamentals , Designs , Types and Most Recent Impactful Applications : A Review', 8(1), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.4172/2155-6210.1000235>.

Alzate, D. *et al.* (2020a) 'Genosensors for differential detection of Zika virus', *Talanta*,

210(October 2019), p. 120648. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120648>.

Alzate, D. *et al.* (2020b) ‘Talanta Genosensors for differential detection of Zika virus’, *Talanta*, 210(October 2019), p. 120648. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120648>.

Andreou, V.G. and Clonis, Y.D. (2002) ‘Novel fiber-optic biosensor based on immobilized glutathione S-transferase and sol-gel entrapped bromocresol green for the determination of atrazine’, *Analytica Chimica Acta*, 460(2), pp. 151–161. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00250-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00250-7).

Antiochia, R. (2021) ‘Developments in biosensors for CoV detection and future trends’, *Biosensors and Bioelectronics*, 173(May 2020), p. 112777. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112777>.

Antiochia, R. (2022) ‘Electrochemical biosensors for SARS-CoV-2 detection: Voltametric or impedimetric transduction?’, *Bioelectrochemistry*, 147(April), p. 108190. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108190>.

Asadpour, F. and Mazloum-Ardakani, M. (2022) ‘Electro-assisted self-assembly of mesoporous silica thin films: application to electrochemical sensing of glutathione in the presence of copper’, *Journal of Solid State Electrochemistry*, 26(10), pp. 2329–2338.

Asal, M. *et al.* (2019) ‘An overview of biomolecules, immobilization methods and support materials of biosensors’, *Sensor Review*, 39(3), pp. 377–386. Available at: <https://doi.org/10.1108/SR-04-2018-0084>.

Atif, M. *et al.* (2016) ‘Zika virus disease: a current review of the literature’, *Infection*, 44, pp. 695–705.

Barman, U. *et al.* (2017) ‘Detection of Glutathione by’, 16(4), pp. 271–279.

Barman, U. *et al.* (2018) ‘Fabrication of FET Biosensor for Detection of Glutathione’, *2018 4th IEEE International Conference on Emerging Electronics, ICEE 2018*, II(5), pp. 5–8. Available at: <https://doi.org/10.1109/ICEE44586.2018.8937892>.

Belgis (2019) ‘Cholesterol biosensor based on polyaniline conducting chitosan film’, *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*, 15(17), pp. 1–6.

- Bernardo S., Elena, S. and Marina, M.L. (2020) 'Trends in Analytical Chemistry Chiral capillary electrophoresis', 124. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115807>.
- Borah, H. *et al.* (2016) 'Influence of methanol, ethanol and cypermethrin on the Glutathione S-transferase catalyzed reaction of Glutathione with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene: A method for detection and quantification of cypermethrin', *Electrochimica Acta*, 205, pp. 198–206. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.03.199>.
- Borah, H. *et al.* (2018) 'A broad spectrum amperometric pesticide biosensor based on glutathione S-transferase immobilized on graphene oxide-gelatin matrix', *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 828(September), pp. 116–123. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.09.047>.
- Bordbar, M.M. *et al.* (2021) 'Disposable paper-based biosensors for the point-of-care detection of hazardous contaminations—A review.', *Biosensors*, 11(9), p. 316.
- Botewad, S.N. *et al.* (2021) 'Urea biosensors: A comprehensive review', *Biotechnology and Applied Biochemistry*, (February), pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.1002/bab.2168>.
- Brennan, L.M. *et al.* (2016) 'Preparation and testing of impedance-based fluidic biochips with RTgill-W1 cells for rapid evaluation of drinking water samples for toxicity', *Journal of Visualized Experiments*, 2016(109), pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.3791/53555>.
- C, T.P. and Diamante, M.S. (2020) 'The continued threat of emerging flaviviruses', *Nature microbiology*, 5(6), pp. 796–812.
- Cabral-Miranda, G. *et al.* (2018) 'Biosensor-based selective detection of Zika virus specific antibodies in infected individuals', *Biosensors and Bioelectronics*, 113(January), pp. 101–107. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.04.058>.
- Cai, Z. *et al.* (2021) 'Blue-emitting glutathione-capped copper nanoclusters as fluorescent probes for the highly specific biosensing of furazolidone', *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 247, p. 119145. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119145>.
- Cajigas, S., Alzate, D. and Orozco, J. (2020) 'Gold nanoparticle/DNA-based

nanobioconjugate for electrochemical detection of Zika virus.’, *Microchimica Acta*, 187, pp. 1–10.

Cali, K., Tuccori, E. and Persaud, K.C. (2020) *Gravimetric biosensors*. 1st edn, *Methods in Enzymology*. 1st edn. Elsevier Inc. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.05.010>.

Campos, G.S., Bandeira, A.C. and Sardi, S.I. (2015) ‘Zika virus outbreak, Bahia, Brazil’, *Emerging Infectious Diseases*, 21(10), pp. 1885–1886. Available at: <https://doi.org/10.3201/eid2110.150847>.

Carr, O. (2019) ‘Desenvolvimento de genossensor para a detecção precoce de câncer de cabeça e pescoço’, p. 123.

Cavalcante, de F.T. *et al.* (2021) ‘Designing of nanomaterials-based enzymatic biosensors: Synthesis, properties, and applications.’, *Electrochem*, 2(1), pp. 149–184.

‘CDC, 2022.pdf’ (2022) *Centers for Disease Control and Prevention*, p. 1. Available at: <https://www.cdc.gov/arthritis/basics/arthritis-fast-facts.html#:~:text=Arthritis Statistics,usual activities because of arthritis>.

Chen, C. and Wang, J. (2020) ‘Optical biosensors: An exhaustive and comprehensive review’, *Analyst*, 145(5), pp. 1605–1628. Available at: <https://doi.org/10.1039/c9an01998g>.

Chen, Y.X. *et al.* (2018) ‘Tetrahedral DNA probe coupling with hybridization chain reaction for competitive thrombin aptasensor’, *Biosensors and Bioelectronics*, 100(July 2017), pp. 274–281. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.09.022>.

Cheng, Y.H., Liu, S.J. and Jiang, J.H. (2021) ‘Enzyme-free electrochemical biosensor based on amplification of proximity-dependent surface hybridization chain reaction for ultrasensitive mRNA detection’, *Talanta*, 222(June 2020), p. 121536. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121536>.

Chowdhury, A.D., Gangopadhyay, R. and De, A. (2014) ‘Highly sensitive electrochemical biosensor for glucose, DNA and protein using gold-polyaniline nanocomposites as a common matrix’, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 190, pp. 348–356. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.08.071>.

Ciucci, F. (2019) ‘Modeling electrochemical impedance spectroscopy’, *Current Opinion*

in *Electrochemistry*, 13, pp. 132–139. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2018.12.003>.

Da, H. *et al.* (2018) ‘A highly sensitive VEGF165 photoelectrochemical biosensor fabricated by assembly of aptamer bridged DNA networks’, *Biosensors and Bioelectronics*, 101(August 2017), pp. 213–218. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.10.032>.

Dick, G.W.A., Kitchen, S.F. and Haddow, A.J. (1952) ‘Zika virus (I). Isolations and serological specificity’, *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 46(5), pp. 509–520.

Dincer, C. *et al.* (2019) ‘Disposable Sensors in Diagnostics, Food, and Environmental Monitoring’, *Advanced Materials*, 31(30), p. 1806739.

Ding, J. and Qin, W. (2020) ‘Recent advances in potentiometric biosensors’, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 124, p. 115803. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115803>.

Dorion, S., Ouellet, J.C. and Rivoal, J. (2021) ‘Glutathione metabolism in plants under stress: Beyond reactive oxygen species detoxification.’, *Metabolites*, 11(9), p. 641.

Ekrami, E. *et al.* (2021) ‘A review on designing biosensors for the detection of trace metals’, *Applied Geochemistry*, 127(February), p. 104902. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2021.104902>.

Enter, B.J. van and Hauff, E. von (2018) ‘Challenges and perspectives in continuous glucose monitoring.’, *Chemical Communications*, 54(40), pp. 5032–5045.

Eyvazi, S. *et al.* (2021) ‘Recent advances on development of portable biosensors for monitoring of biological contaminants in foods’, *Trends in Food Science and Technology*, 114(April), pp. 712–721. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.024>.

Faria, H.A.M. and Zucolotto, V. (2019) ‘Label-free electrochemical DNA biosensor for zika virus identification’, *Biosensors and Bioelectronics*, 131(January), pp. 149–155. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.02.018>.

Faria, N.R. *et al.* (2016) ‘Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings’, *Science*, 352(6283), pp. 345–349. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aaf5036>.

Farjami, E. *et al.* (2010) ‘DNA interactions with a Methylene Blue redox indicator depend on the DNA length and are sequence specific †’, pp. 1443–1448. Available at: <https://doi.org/10.1039/c0an00049c>.

Farzim, L. *et al.* (2018) ‘Advances in the design of nanomaterial-based electrochemical affinity and enzymatic biosensors for metabolic biomarkers: A review.’, *Microchimica Acta*, 185, pp. 1–25.

Ferreira, D.S.C. (2014) ‘Desenvolvimento De Genossensores Para O Diagnóstico Do Papilomavírus Humano (Hpv)’, p. 120.

Alves F. R. *et al.* (2019) ‘Novel electrochemical genosensor for Zika virus based on a poly-(3-amino-4-hydroxybenzoic acid)-modified pencil carbon graphite electrode’, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 296(January), p. 126681. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126681>.

Fraas, R. and Franzreb, M. (2017) ‘Reversible covalent enzyme immobilization methods for reuse of carriers’, *Biocatalysis and Biotransformation*, 35(5), pp. 337–348. Available at: <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1344229>.

Golinejad, S. and Mirjalili, M.H. (2020) ‘Fast and cost-effective preparation of plant cells for scanning electron microscopy (SEM) analysis’, *Analytical Biochemistry*, 609(August), p. 113920. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113920>.

Gregory, C.J. *et al.* (2017) ‘Modes of Transmission of Zika Virus’, *Journal of Infectious Diseases*, 216(Suppl 10), pp. S875–S883. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/jix396>.

Gulland, A. (2016) ‘Zika virus is a global public health emergency, declares WHO.’

Guo, X. (2020) ‘Conducting polymers forward’, *Nature Materials*, 19(9), p. 921.

Haddow, A.D. *et al.* (2020) ‘Modeling mosquito-borne and sexual transmission of zika virus in an enzootic host, the African green monkey’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(6), pp. 1–23. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008107>.

Hadžić, S., Trkulja, A. and Alihodžić, I. (2021) ‘Immunosensors: Recent Advances and Applications’, *Proceedings of the International Conference on Medical and Biological Engineering*, pp. 138–151.

Hani A Alhadrami (2018) 'Biosensors: Classifications, medical applications, and future prospective', *Biotechnology and applied biochemistry*, 65(3), pp. 497–508.

Hassan, M.M. *et al.* (2022) 'Recent progress in chemometrics driven biosensors for food application', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 156. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116707>.

Hassine, A. Ben, Raouafi, N. and Moreira, F.T.C. (2021) 'Novel electrochemical molecularly imprinted polymer-based biosensor for tau protein detection', *Chemosensors*, 9(9), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.3390/chemosensors9090238>.

UL-HAMID, Anwar. A beginners' guide to scanning electron microscopy. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2018.

Hennessey, M., Fischer, M. and Staples, J.E. (2016) 'Zika virus spreads to new areas—region of the Americas, May 2015–January 2016.' *American Journal of Transplantation*, 16(3), pp. 1031–1034.

Hicks, M., Bachmann, T.T. and Wang, B. (2020) 'Synthetic Biology Enables Programmable Cell-Based Biosensors', *ChemPhysChem*, 21(2), pp. 132–144. Available at: <https://doi.org/10.1002/cphc.201900739>.

Hoen, B. *et al.* (2018) 'Pregnancy outcomes after ZIKV infection in French territories in the Americas', *New England Journal of Medicine*, 378(11), pp. 985–994.

Hsu, Y.P. *et al.* (2020) 'A serological point-of-care test for Zika virus detection and infection surveillance using an enzyme-free vial immunosensor with a smartphone', *Biosensors and Bioelectronics*, 151(December 2019), p. 111960. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111960>.

Huang, X., Zhu, Y. and Kianfar, E. (2021) 'Nano Biosensors: Properties, applications and electrochemical techniques', *Journal of Materials Research and Technology*, 12, pp. 1649–1672. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.03.048>.

Huertas, C.S. *et al.* (2019) 'Advanced Evanescent-Wave Optical Biosensors for the Detection of Nucleic Acids: An Analytic Perspective', *Frontiers in Chemistry*, 7(October), pp. 1–25. Available at: <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00724>.

Ilkhani, H. and Farhad, S. (2018) 'A novel electrochemical DNA biosensor for Ebola

virus detection’, *Analytical Biochemistry*, 557(June), pp. 151–155. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.06.010>.

Imran, S., Ahmadi, S. and Kerman, K. (2021) ‘Electrochemical biosensors for the detection of SARS-CoV-2 and other viruses.’, *Micromachines*, 12(2), p. 174.

INKSON, Beverley J. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. In: *Materials characterization using nondestructive evaluation (NDE) methods*. Woodhead publishing, 2016. p. 17-43.

Jamei, H.R., Rezaei, B. and Ensafi, A.A. (2021) ‘Ultra-sensitive and selective electrochemical biosensor with aptamer recognition surface based on polymer quantum dots and C60/MWCNTs- polyethylenimine nanocomposites for analysis of thrombin protein’, *Bioelectrochemistry*, 138, p. 107701. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107701>.

Jean Moisés Ferreira (2020) *Desenvolvimento De Plataformas Eletroquímicas De Biossensores Para Detecção Do Vírus Mayaro (Mayv) Baseadas Na Competição Entre O Azul De Metileno E Oligonucleotídeos*, Universidade Federal De Pernambuco.

Julio, J. *et al.* (2022) ‘Hydroxyapatite / L-Lysine Composite Coating as Glassy Carbon Electrode Modifier for the Analysis and Detection of Nile Blue A’.

Kanagavalli, P. *et al.* (2021) ‘In-situ redox-active hybrid graphene platform for label-free electrochemical biosensor: Insights from electrodeposition and electroless deposition’, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 143, p. 116413. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116413>.

Karimi, O. *et al.* (2016) ‘Thrombocytopenia and subcutaneous bleedings in a patient with Zika virus infection’, *The Lancet*, 387(10022), pp. 939–940. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00502-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00502-X).

Karunakaran, C., Rajkumar, R. and Bhargava, K. (2015) *Introduction to Biosensors, Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier Inc. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00001-3>.

Kaur, J. *et al.* (2019) *Enzyme-based biosensors, Bioelectronics and Medical Devices: From Materials to Devices - Fabrication, Applications and Reliability*. Elsevier Ltd. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102420-1.00013-3>.

Kaushik, A. *et al.* (2017) 'Electrochemical Biosensors for Early Stage Zika Diagnostics', *Trends in Biotechnology*, 35(4), pp. 308–317. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.10.001>.

Kaushik, A. *et al.* (2018) 'A sensitive electrochemical immunosensor for label-free detection of Zika-virus protein.', *Scientific reports*, 8(1), p. 9700.

Keoingthong, P. *et al.* (2021) 'Graphene encapsulated Ru nanocrystal with highly-efficient peroxidase-like activity for glutathione detection at near-physiological pH', *Chemical Communications*, 57(62), pp. 7669–7672. Available at: <https://doi.org/10.1039/d1cc02953c>.

Khare, T. *et al.* (2019) *Biologically synthesized nanomaterials and their antimicrobial potentials*. 1st edn, *Comprehensive Analytical Chemistry*. 1st edn. Elsevier B.V. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.09.002>.

Kim, H.J., Jeong, H. and Lee, S.J. (2018) 'Synthetic biology for microbial heavy metal biosensors.', *Analytical and bioanalytical chemistry*, 410, pp. 1191–1203.

Kim, M. *et al.* (2019) 'Impedimetric biosensors for detecting vascular endothelial growth factor (VEGF) based on poly(3,4-ethylene dioxythiophene) (PEDOT)/gold nanoparticle (Au NP) composites', *Frontiers in Chemistry*, 7(MAR), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00234>.

Kumaran, A. *et al.* (2022) 'Biosensors for detection of organophosphate pesticides: Current technologies and future directives', *Microchemical Journal*, 178(March), p. 107420. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107420>.

Labibe, B.A. and Chigbu, D.I. (2022) 'Pathogenesis and manifestations of zika virus-associated ocular diseases.', *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 7(6), p. 106.

Lakard, B. (2020) 'Electrochemical Biosensors Based on Conducting Polymers: A Review', *Applied Sciences*, 10(18), p. 6614.

Lakard, S., Pavel, I.A. and Lakard, B. (2021) 'Electrochemical biosensing of dopamine neurotransmitter: A review', *Biosensors*, 11(6). Available at: <https://doi.org/10.3390/bios11060179>.

Landry, B.P. *et al.* (2018) 'Phosphatase activity tunes two-component system sensor detection threshold', *Nature Communications*, 9(1), pp. 1–10. Available at:

<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03929-y>.

Li, F. *et al.* (2019) 'Electrochemical aptamer-based sensors for food and water analysis: A review', *Analytica Chimica Acta*, 1051, pp. 1–23. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.058>.

Li, H. *et al.* (2022) 'Carboxymethyl chitosan assembled piezoelectric biosensor for rapid and label-free quantification of immunoglobulin Y', *Carbohydrate Polymers*, 290(April), p. 119482. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119482>.

Li, M. *et al.* (2018) 'Ultrasensitive Photoelectrochemical Biosensor Based on DNA Tetrahedron as Nanocarrier for Efficient Immobilization of CdTe QDs-Methylene Blue as Signal Probe with Near-Zero Background Noise', *Analytical Chemistry*, 90(13), pp. 8211–8216. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01641>.

Li, P. *et al.* (2021) 'From Diagnosis to Treatment: Recent Advances in Patient-Friendly Biosensors and Implantable Devices', *ACS Nano*, 15(2), pp. 1960–2004. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c06688>.

Li, Z. *et al.* (2022) 'Development of electroactive materials-based immunosensor towards early-stage cancer detection', *Coordination Chemistry Reviews*, 471, p. 214723. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214723>.

Liang, G.X. *et al.* (2022) 'A potent fluorescent biosensor integrating 3D DNA walker with localized catalytic hairpin assembly for highly sensitive and enzyme-free Zika virus detection', *Sensors and Actuators B: Chemical*, 354(July 2021), p. 131199. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131199>.

Liébana, S. and Drago, G.A. (2016) 'Bioconjugation and stabilisation of biomolecules in biosensors', *Essays in Biochemistry*, 60(1), pp. 59–68. Available at: <https://doi.org/10.1042/EBC20150007>.

Lien, T.T.N. *et al.* (2010) 'Multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs)-doped polypyrrole DNA biosensor for label-free detection of genetically modified organisms by QCM and EIS', *Talanta*, 80(3), pp. 1164–1169. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.09.002>.

Lima, F.M.D.S. and Iriart, J.A.B. (2021) 'Meanings, risk perceptions, and prevention strategies for pregnant women since the emergence of the Zika virus in Brazil', *Cadernos*

de Saude Publica, 37(2), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1590/0102-311x00145819>.

Liu, J. *et al.* (2022) ‘Application and Progress of Chemometrics in Voltammetric Biosensing’, *Biosensors*, 12(7), pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.3390/bios12070494>.

Liu, Y. and Yu, J. (2016) ‘Oriented immobilization of proteins on solid supports for use in biosensors and biochips: a review’, *Microchimica Acta*, 183(1), pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1623-4>.

Liu, Z.-Y., Shi, W.-F. and Qin, C.-F. (2019) ‘The evolution of Zika virus from Asia to the Americas.’, *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), pp. 131–139.

Long, D. *et al.* (2019) ‘A photoelectrochemical biosensor based on fullerene with methylene blue as a sensitizer for ultrasensitive DNA detection’, *Biosensors and Bioelectronics*, 142(July), p. 111579. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111579>.

Lopes, L.C., Santos, A. and Bueno, P.R. (2022) ‘An outlook on electrochemical approaches for molecular diagnostics assays and discussions on the limitations of miniaturized technologies for point-of-care devices’, *Sensors and Actuators Reports*, 4(January), p. 100087. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.snr.2022.100087>.

Lu, X. *et al.* (2020) ‘Detection of mutant genes with different types of biosensor methods’, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 126, p. 115860. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115860>.

Lynch, C.A. *et al.* (2019) ‘Rapid and Selective Determination of Zika Virus RNA using a Universal DNA-Hairpin probe’, *Analytical Chemistry* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02455>.

Magalhães, I.C.L. *et al.* (2022) ‘New insights into the recombinant proteins and monoclonal antibodies employed to immunodiagnosis and control of Zika virus infection: A review’, *International Journal of Biological Macromolecules*, 200(December 2021), pp. 139–150. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.196>.

Magar, H.S., Hassan, R.Y. and Mulchandani, A. (2021) ‘Electrochemical impedance spectroscopy (EIS): Principles, construction, and biosensing applications.’, *Sensors*,

21(19), p. 6578.

Major, C.G. *et al.* (2021) 'Risk Estimation of Sexual Transmission of Zika Virus-United States, 2016-2017', *The Journal of infectious diseases*, 224(10), pp. 1756–1764. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab173>.

Makvandi, P. *et al.* (2021) 'Non-spherical nanostructures in nanomedicine: From noble metal nanorods to transition metal dichalcogenide nanosheets', *Applied Materials Today*, 24, p. 101107. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.101107>.

Malecka-Baturo, K. (2022) 'Advances in Electrochemical Sensors and Biosensors', *Coatings*, 12(8), pp. 10–13. Available at: <https://doi.org/10.3390/coatings12081052>.

Malekzad, H. *et al.* (2017) 'Highly sensitive immunosensing of prostate specific antigen using poly cysteine capped by graphene quantum dots and gold nanoparticle: A novel signal amplification strategy', *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, pp. 522–532. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.069>.

Matuz-Mares, D. *et al.* (2021) 'Glutathione participation in the prevention of cardiovascular diseases.', *Antioxidants*, 10(8), p. 1220.

Mehrotra, P. (2016) 'Biosensors and their applications - A review', *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(2), pp. 153–159. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>.

Millner, P.A. *et al.* (2012) *Impedance interrogated affinity biosensors for medical applications: novel targets and mechanistic studies*, *Biosensors for Medical Applications*. Elsevier Masson SAS. Available at: <https://doi.org/10.1533/9780857097187.1.103>.

Mlakar, J. *et al.* (2016) 'Zika virus associated with microcephaly.', *New England Journal of Medicine*, 374(10), pp. 951–958.

Moço, A.C.R. *et al.* (2019) 'Electrochemical detection of zika virus in biological samples: a step for diagnosis point-of-care.', *Electroanalysis*, 31(8), pp. 1580–1587.

Mohammadi, S., Taher, M. and Beitollahi, H. (2020) 'Voltammetric mixture analysis of 6-thioguanine and folic acid using ionic liquid-carbon paste electrode modified by nano petal-like MoWS₂ and N-(ferrocenylmethylidene) fluoren-2-amine.', *Journal of The Electrochemical Society*, 167(4), p. 47520.

Mohankumar, P. *et al.* (2021) 'Recent developments in biosensors for healthcare and biomedical applications: A review', *Measurement: Journal of the International Measurement Confederation*, 167(May 2020), p. 108293. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2020.108293>.

Monošík, R., Stred'anský, M. and Šturdík, E. (2012) 'Biosensors — classification, characterization and new trends', 5(1), pp. 109–120. Available at: <https://doi.org/10.2478/v10188-012-0017-z>.

Mungmunpantipantip, R. and Wiwanitkit, V. (2022) 'Paper-Based Biosensors for Management of Emerging Infectious Disease: A Brief Review', *Journal of Sustainable Materials Processing and Management*, 2(1), pp. 32–39. Available at: <https://doi.org/10.30880/jsmpm.2022.02.01.004>.

Munzar, J.D., Ng, A. and Juncker, D. (2019) 'Duplexed aptamers: History, design, theory, and application to biosensing', *Chemical Society Reviews*, 48(5), pp. 1390–1419. Available at: <https://doi.org/10.1039/c8cs00880a>.

Musso, D. *et al.* (2015) 'Potential sexual transmission of Zika virus.', *Emerging infectious diseases*, 21(2), p. 359.

Musso, D., Nilles, E.J. and Cao-Lormeau, V.M. (2014) 'Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area', *Clinical Microbiology and Infection*, 20(10), pp. O595–O596. Available at: <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12707>.

Naresh, V. and Lee, N. (2021) 'A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors.', *Sensors*, 21(4), p. 1109.

Nelson, E.J. *et al.* (2019) 'Knowledge of the Sexual Transmission of Zika Virus and Preventive Practices Against Zika Virus Among U.S. Travelers', *Journal of Community Health*, 44(2), pp. 377–386. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10900-018-0594-x>.

Nemiwal, M., Zhang, T.C. and Kumar, D. (2022) 'Enzyme immobilized nanomaterials as electrochemical biosensors for detection of biomolecules', *Enzyme and Microbial Technology*, 156(November 2021), p. 110006. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110006>.

Neoh, H. *et al.* (2019) 'Infection, Genetics and Evolution Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives',

Infection, Genetics and Evolution, 74(March), p. 103935. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103935>.

Nguyen, A.T.V. *et al.* (2022) ‘Development of a peptide aptamer pair-linked rapid fluorescent diagnostic system for Zika virus detection’, *Biosensors and Bioelectronics*, 197(August 2021), p. 113768. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113768>.

Oliveira *et al.* (2015) ‘ELETROFORESE: CONCEITOS E APLICAÇÕES’, pp. 1129–1149.

Oliveira, N.C.L. (2017) *Desenvolvimento De Biossensores Para As Ciências Forenses*.

Paniel, N. *et al.* (2013) ‘Aptasensor and genosensor methods for detection of microbes in real world samples’, *Methods*, 64(3), pp. 229–240. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.07.001>.

Pattnaik, A., Sahoo, B.R. and Pattnaik, A.K. (2020) ‘Current status of Zika virus vaccines: successes and challenges.’, *Vaccines*, 2(8), p. 266.

Petersen, L.R. *et al.* (2016) ‘Zika Virus’, *The new England Journal of Medicine*, p. 12.

Pettersson, J.H.O. *et al.* (2018) ‘Erratum for Pettersson *et al.*, “How Did Zika Virus Emerge in the Pacific Islands and Latin America?”’, *American Society for Microbiology*, 9(2). Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.00386-18>.

Presutti, D. *et al.* (2022) ‘Transition Metal Dichalcogenides (TMDC)-Based Nanozymes for Biosensing and Therapeutic Applications’, *Materials*, 15(1), pp. 1–24. Available at: <https://doi.org/10.3390/ma15010337>.

Purohit, B. *et al.* (2020) ‘Biosensor nanoengineering: Design, operation, and implementation for biomolecular analysis’, *Sensors International*, 1(September), p. 100040. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2020.100040>.

Radhakrishnan, R. *et al.* (2014) ‘Impedance biosensors: Applications to sustainability and remaining technical challenges’, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2(7), pp. 1649–1655. Available at: <https://doi.org/10.1021/sc500106y>.

Ramanavicius, S. and Ramanavicius, A. (2021) ‘Charge transfer and biocompatibility aspects in conducting polymer-based enzymatic biosensors and biofuel cells.’, *Nanomaterials*, 11(2), p. 371.

Rashid, J.I.A. and Yusof, N.A. (2017) 'The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review', *Sensing and Bio-Sensing Research*, 16(April), pp. 19–31. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2017.09.001>.

Rawat, B. *et al.* (2020) 'Two-dimensional MoS₂-based electrochemical biosensor for highly selective detection of glutathione', *IEEE Sensors Journal*, 20(13), pp. 6937–6944.

Reisberg, S. *et al.* (2005) 'DNA electrochemical sensor based on conducting polymer: Dependence of the "signal-on" detection on the probe sequence localization', *Analytical Chemistry*, 77(10), pp. 3351–3356. Available at: <https://doi.org/10.1021/ac050080v>.

Reisberg, S. *et al.* (2008) 'Label-free DNA electrochemical sensor based on a PNA-functionalized conductive polymer', *Talanta*, 76(1), pp. 206–210. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.02.044>.

Ribeiro, E.B. *et al.* (2022) 'A novel glutathione-S-transferase-based biosensor for pyrethroid insecticides: From inhibition study to detection', *Sensors and Actuators Reports*, 4(November 2021). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.snr.2022.100093>.

Rinoldi, C. *et al.* (2021) 'Nanotechnology-Assisted RNA Delivery: From Nucleic Acid Therapeutics to COVID-19 Vaccines', *Small Methods*, 5(9). Available at: <https://doi.org/10.1002/smt.202100402>.

Rolim, T.V.C. (2013) 'Síntese E Funcionalização De Nanopartículas Com Oligonucleotídeo Para Aplicação Em Genossensores No Diagnóstico Avançado De Predisposição À Hipertensão Arterial', P. 131.

Romanholo, P.V.V. *et al.* (2021) 'Biomimetic electrochemical sensors: New horizons and challenges in biosensing applications', *Biosensors and Bioelectronics*, 185(January), p. 113242. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113242>.

Rushworth, J. V. *et al.* (2014) 'A label-free electrical impedimetric biosensor for the specific detection of Alzheimer's amyloid-beta oligomers', *Biosensors and Bioelectronics*, 56, pp. 83–90. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.12.036>.

Saini, A.K. and Sahoo, S.K. (2022) 'A copper(II) displacement approach for fluorescent turn-on sensing of glutathione using salicylaldehyde modified polydopamine nanoparticles', *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 430(April),

p. 113987. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2022.113987>.

Saisuk, W. *et al.* (2022) ‘A molecular beacon biosensor for viral RNA detection based on HyCaSD strategy’, *Analytica Chimica Acta*, 1221(June), p. 340134. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340134>.

Salvador, F.S. and Fujita, D.M. (2016) ‘Entry routes for Zika virus in Brazil after 2014 world cup: New possibilities’, *Travel Medicine and Infectious Disease*, 14(1), pp. 49–51. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2015.10.004>.

Sam, S. *et al.* (2010) ‘Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces’, *Langmuir*, 26(2), pp. 809–814. Available at: <https://doi.org/10.1021/la902220a>.

Santos, A.D.O.S. (2017) ‘Desenvolvimento de biossensor impedimétrico / capacitivo para detecção de biomarcadores de importância clínica’.

Santos, C.D.C. (2014) Desenvolvimento De Plataformas Eletroquímicas Funcionalizadas Com Ácido Poli(4-Aminobenzóico) Aplicadas Em Biossensores.

Sassolas, A., Blum, L.J. and Leca-bouvier, B.D. (2012) ‘Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors’, *Biotechnology Advances*, 30(3), pp. 489–511. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>.

Schachinger, F. *et al.* (2021) ‘Amperometric biosensors based on direct electron transfer enzymes.’, *Molecule*, 26(15), p. 4525.

Secretaria de V. em S. (2022) ‘Situação epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika: Brasil, 2015 a 2022, até a SE 31’, *Boletim Epidemiológico*, 53(35), pp. 1–11.

Shemer, B. *et al.* (2017) ‘Microbial bioreporters of trace explosives’, *Current Opinion in Biotechnology*, 45, pp. 113–119. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.03.003>.

Shirakawa, H. *et al.* (1977) ‘Synthesis of electrically conducting organic polymers: Halogen derivatives of polyacetylene, (CH)_x’, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (16), pp. 578–580. Available at: <https://doi.org/10.1039/C39770000578>.

Siddiquee, S. *et al.* (2010) 'DNA hybridization based on *Trichoderma harzianum* gene probe immobilization on self-assembled monolayers on a modified gold electrode', *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 147(1), pp. 198–205. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.02.014>.

Silva, B.V. *et al.* (2021) 'A label and probe-free zika virus immunosensor prussian blue@ carbon nanotube-based for amperometric detection of the ns2b protein.', *Biosensors*, 11(5), p. 157.

Silvestri, A. *et al.* (2022) 'Protein-based (bio) materials: a way toward high-performance graphene enzymatic biosensors.', *Journal of Materials Chemistry*, 10(14), pp. 5466–5473.

Silvestrini, M. *et al.* (2015) 'Detection of DNA hybridization by methylene blue electrochemistry at activated nanoelectrode ensembles', *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(5), pp. 3437–3442. Available at: <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.10214>.

Singhal, C., Pundir, C.S. and Narang, J. (2017) 'Biosensors and Bioelectronics A genosensor for detection of consensus DNA sequence of Dengue virus using ZnO / Pt-Pd nanocomposites', *Biosensors and Bioelectronic*, 97(May), pp. 75–82. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.05.047>.

Siontorou, C.G. (2022) 'University-industry relationships for the development and commercialization of biosensors.', *Handbook of Cell Biosensors*, pp. 707–722.

Sobhanie, E. *et al.* (2022) 'Recent trends and advancements in electrochemiluminescence biosensors for human virus detection', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 157, p. 116727. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116727>.

Song, B.H. *et al.* (2017) 'Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation', *Journal of Neuroimmunology*, 308, pp. 50–64. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.03.001>.

Souza, W.M.D.E. (2017) 'Caracterização genômica e evolutiva de vírus zoonóticos nas Américas Caracterização genômica e evolutiva de vírus zoonóticos das Américas Versão Original'.

Spurgeon, S.R. *et al.* (2021) 'Towards data-driven next-generation transmission electron

microscopy', *Nature materials*, 20(3), pp. 274–279.

Spychalska, K., Zając, D. and Cabaj, J. (2020) 'Electrochemical biosensor for detection of 17 β -estradiol using semi-conducting polymer and horseradish peroxidase', *RSC Advances*, 10(15), pp. 9079–9087. Available at: <https://doi.org/10.1039/c9ra09902f>.

Steinmetz, M. (2019) Desenvolvimento De Um Biossensor Impedimétrico De Dna Com Silsesquioxano Para Detecção Label-Free Do Vírus Zika.

Sui, M. *et al.* (2018) 'Photoelectrochemical performance and biosensor application for glutathione (GSH) of W-doped BiVO₄ thin films', *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 29, pp. 10109–10116.

Sun, D., Siddiqui, M.O.R. and Iqbal, K. (2018) *Specialty testing techniques for smart textiles, Smart Textile Coatings and Laminates*. Elsevier Ltd. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102428-7.00004-3>.

Takemura, K. *et al.* (2019) 'A localized surface plasmon resonance-amplified immunofluorescence biosensor for ultrasensitive and rapid detection of nonstructural protein 1 of Zika virus.', *Plos one*, 14(1), p. 211517.

Tappe *et al.* (2014) 'Acute Zika Virus Infection after Travel to Malaysian Borneo, September 2014', *Emerging infectious diseases*, 21(5), p. 911.

Tian, J. *et al.* (2020) 'Platinum and iridium oxide co-modified TiO₂ nanotubes array based photoelectrochemical sensors for glutathione.', *Nanomaterials*, 10(13), p. 522.

Tvorynska, S., Barek, J. and Josypcuk, B. (2022) 'Influence of different covalent immobilization protocols on electroanalytical performance of laccase-based biosensors', *Bioelectrochemistry*, 148.

Vairetti, M. *et al.* (2021) 'Changes in glutathione content in liver diseases: an update.', *Antioxidants*, 10(3), p. 364.

Villalonga, A. *et al.* (2022) 'Electrochemical biosensors for food bioprocess monitoring', *Current Opinion in Food Science*, 43, pp. 18–26. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.09.006>.

Vizzini, P., Braidot, M. and Vidic, J. (2019) 'Electrochemical and Optical Biosensors for the Detection of Campylobacter and Listeria: An Update Look'.

- Wan, X. *et al.* (2019) ‘Cascaded amplifying circuits enable ultrasensitive cellular sensors for toxic metals’, *Nature Chemical Biology*, 15(5), pp. 540–548. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0244-3>.
- Wang, H., Wan, K. and Shi, X. (2019) ‘Recent Advances in Nanozyme Research’, *Advanced Materials*, 31(45), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1002/adma.201805368>.
- Wang, J. (2006) ‘Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics’, 21(July 2005), pp. 1887–1892. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.10.027>.
- Wang, S. *et al.* (2021) ‘Electrochemical impedance spectroscopy’, *Nature Reviews Methods Primers*, 1(1), p. 41.
- Wang, W. *et al.* (2022) ‘Ultrasensitive and Selective Detection of Glutathione by Ammonium Carbamate–Gold Platinum Nanoparticles-Based Electrochemical Sensor.’, *Life*, 12(8), p. 1142.
- Watstein, D.M. and Styczynski, M.P. (2018) ‘Development of a Pigment-Based Whole-Cell Zinc Biosensor for Human Serum’, *ACS Synthetic Biology*, 7(1), pp. 267–275. Available at: <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00292>.
- Wen, C. *et al.* (2009) ‘Concomitant pyroptotic and apoptotic cell death triggered in macrophages infected by Zika virus’, *2022*, 17(4), p. 257408.
- Westbroek, P. (2005) ‘Electrochemical methods’, *Analytical Electrochemistry in Textiles*, pp. 37–69. Available at: <https://doi.org/10.1533/9781845690878.1.37>.
- WHO (2022) ‘Zika epidemiology update - February 2022’, (FEBRUARY), pp. 1–8. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/zika-epidemiology-update---february-2022>.
- Xia, J. *et al.* (2016) ‘Sensors and Actuators B: Chemical Molecularly imprinted electrochemical biosensor based on chitosan / ionic liquid – graphene composites modified electrode for determination of bovine serum albumin’, *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 225, pp. 305–311. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.11.060>.
- Xia, Q. *et al.* (2016) ‘The Application of Poly(Glutathione Disulfide)-poly(L-lysine) Multilayer Films for the Enantioselective Interaction with Ascorbic Acid and Isoascorbic Acid’, *Journal of The Electrochemical Society*, 163(14), pp. B744–B750. Available at:

<https://doi.org/10.1149/2.1251614jes>.

Xu, S. *et al.* (2017) 'Real-time reliable determination of binding kinetics of DNA hybridization using a multi-channel graphene biosensor.', *Nature communications*, 8(1), p. 14902.

Yang, S. *et al.* (2022) 'Molecular understanding of acetylcholinesterase adsorption on functionalized carbon nanotubes for enzymatic biosensors.', *Physical Chemistry Chemical Physics*, 24(5), pp. 2866–2878.

Yao, B. *et al.* (2022) 'Rapid Advances of Versatile MXenes for Electrochemical Enzyme-Based Biosensors, Immunosensors, and Nucleic Acid-Based Biosensors.', *ChemElectroChem*, 9(11), p. 202200103.

Yao, Z.W. *et al.* (2021) 'Non-volatile acylphloroglucinol components from *Eucalyptus robusta* inhibit Zika virus by impairing RdRp activity of NS5', *Bioorganic Chemistry*, 116(August), p. 105303. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105303>.

Ye, Y., Guo, H. and Sun, X. (2019) 'Recent progress on cell-based biosensors for analysis of food safety and quality control', *Biosensors and Bioelectronics*, 126(August 2018), pp. 389–404. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.039>.

Yi, W. *et al.* (2019) 'RSC Advances Sensitive electrochemical sensor based on poly (L - glutamic acid) / graphene oxide composite material for simultaneous detection of heavy metal ions †', pp. 17325–17334. Available at: <https://doi.org/10.1039/c9ra01891c>.

Younger, D.S. (2016) 'Epidemiology of Zika Virus', *Neurologic Clinics*, 34(4), pp. 1049–1056. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.008>.

Zanluca, C. *et al.* (2015) 'First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(4), pp. 569–572. Available at: <https://doi.org/10.1590/0074-02760150192>.

Zare, H.R. and Shekari, Z. (2019) *Chapter 6 - Types of monitoring biosensor signals, Electrochemical Biosensors*. Elsevier Inc. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816491-4.00006-1>.

Zhang, F.T. *et al.* (2016) 'Immobilization-free DNA-based homogeneous electrochemical biosensors', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 85, pp. 17–32. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.08.012>.

Zhang, J. *et al.* (2012) 'Label-Free Electrochemical Detection of Tetracycline by an Aptamer Nano-Biosensor', *Analytical Letters*, 45(9), pp. 986–992. Available at: <https://doi.org/10.1080/00032719.2012.670784>.

Zhang, J. *et al.* (2021) 'Electrochemical cell-based sensor for detection of food hazards.', *Micromachines*, 12(7), p. 837.

Zhang, J. *et al.* (2022) 'Construction of electrochemiluminescence biosensor for monitoring of glutathione released by living cancer cells', *Analytica Chimica Acta*, 1226, p. 340251. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340251>.

Zhu, Q. *et al.* (2022) 'Highly selective and sensitive detection of glutathione over cysteine and homocysteine with a turn-on fluorescent biosensor based on cysteamine-stabilized CdTe quantum dots', *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 267, p. 120492. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120492>.

Zidarič, T. *et al.* (2022) 'Artificial biomimetic electrochemical assemblies', *Biosensors*, 12(1), p. 44.

9 APÊNDICES

Apêndice - A

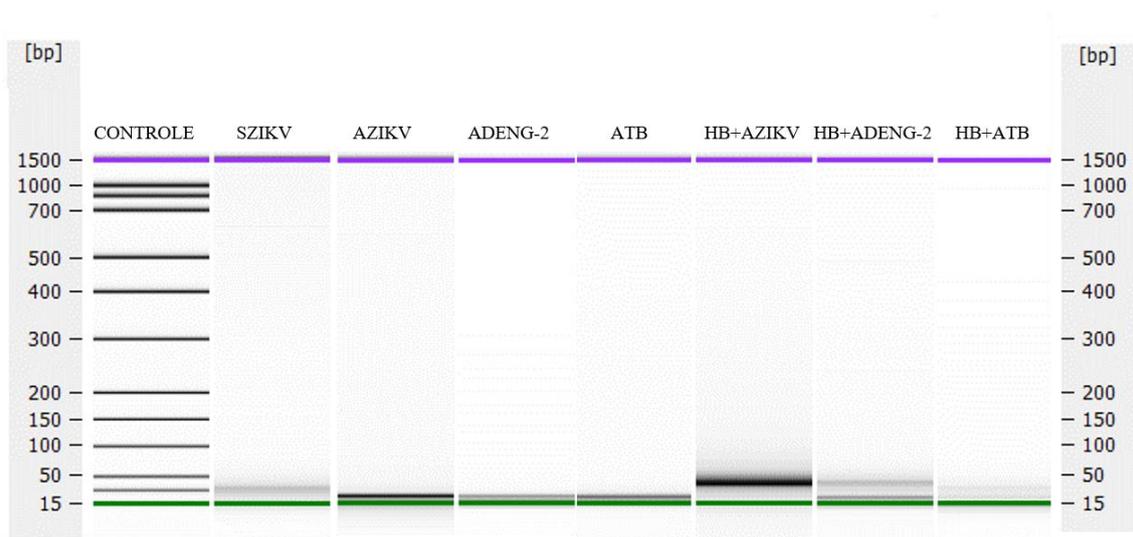


Figura 25. Eletroforese em gel. Resultados das leituras do alvo complementar, não complementar, da sonda e hibridizações.

Apêndice – B

Tabela 4: Resumo dos resultados da eletroforese em gel.

COMPONENTES	RESULTADOS
Controle	
Sonda ZIKV (ssDNA) (SZIKV)	Apresentou uma mancha na corrida, possivelmente devido a um erro de diluição (concentração muito baixa, por exemplo) logo, a banda não foi representada satisfatoriamente no gel.
Alvo ZIKV (AZIKV)	Observa-se a presença de uma banda correspondente ao tamanho de 25bp quando comparada ao controle (<i>ladder</i>), e a condensação da mesma mostra a integridade do alvo, ou seja, não há sinais de degradação.
Alvo DENG-2 (ADENG-2)	Presença de uma banda uniforme e condensada, não apresentou tanta intensidade como as outras corridas (AZIKV e ADENG-2, por exemplo), mas pode ser explicado pelo menor número de pares de bases presentes na amostra em comparação com as anteriores.
Alvo Tuberculose (ATB)	Apresentou o número de bases e a comparação com o controle semelhante às especificações da sonda.
Hibridização Sonda ZIKV + alvo ZIKV (dsDNA) (Hib + AZIKV)	Ocorreu hibridização, formando a dsDNA, formando uma banda espessa e condensada, de coloração preta. Com isso, infere-se que a fita dupla foi formada já que as moléculas de DNA foram arrastadas juntas durante a corrida.
Hibridização Sonda ZIKV + alvo DENG-2 (Hib + ADENG-2)	Presença tanto da sonda quanto do alvo, pois é possível observar a mesma quantidade de pares de bases provenientes da SZIKV e ADENG-2.
Hibridização Sonda ZIKV + alvo Tuberculose (Hib + ATB)	Não foi possível constatar a formação de uma banda específica, indicando que não houve interação com a SZIKV.