



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

MAYZA JENNIFER DA SILVA GOMES

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO
BASEADO EM FILME NANOESTRUTURADO DE
POLIPIRROL E NANOESTRUTURA METÁLICA PARA
DETECÇÃO DE ARBOVIROSES**

Recife
2024

MAYZA JENNIFER DA SILVA GOMES

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO
BASEADO EM FILME NANOESTRUTURADO DE
POLIPIRROL E NANOESTRUTURA METÁLICA PARA
DETECÇÃO DE ARBOVIROSES**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Maria Danielly de Lima Oliveira

Coorientador: César Augusto Souza de Andrade

Recife

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Gomes, Mayza Jennifer da Silva.

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO
BASEADO EM FILME NANOESTRUTURADO DE POLIPÍRROL E
NANOESTRUTURA METÁLICA PARA DETECÇÃO DE ARBOVIROSES /

Mayza Jennifer da Silva Gomes. - Recife, 2024.

53 : il., tab.

Orientador(a): Maria Danielly de Lima Oliveira

Coorientador(a): César Augusto Souza de Andrade

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

Inclui referências.

1. Biossensor. 2. Arboviroses. 3. Nanomateriais. 4. Técnicas
eletroquímicas. I. Oliveira, Maria Danielly de Lima. (Orientação). II. Andrade,
César Augusto Souza de. (Coorientação). IV. Título.

500 CDD (22.ed.)

MAYZA JENNIFER DA SILVA GOMES

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO
BASEADO EM FILME NANOESTRUTURADO DE POLIPIRROL E
NANOESTRUTURA METÁLICA PARA DETECÇÃO DE
ARBOVIROSES**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco/ Depto. De Bioquímica

Coorientador: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade
Universidade Federal de Pernambuco/ Depto. De Bioquímica

Prof^a. Ms. Raiza Pereira Santos de Lucena
Universidade Federal de Pernambuco/ Depto. De Bioquímica

Prof^a. Ms. Léony Soares de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco/ Depto. De Bioquímica

Dedico este trabalho aos meus pais,
familiares e amigos que, com confiança
e apoio constante, tornaram este sonho
realidade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por ser meu alicerce e esperança tanto nos melhores quanto nos piores dias.

À minha família que sempre me ofereceu amor e incentivo. Em especial, ao meu pai, Jailson, que é meu herói e meu porto seguro; à minha mãe, Magda, por sempre acreditar em mim e por ser meu exemplo de força; e à minha vó, Bilsa, por me inspirar com sua gentileza e resiliência.

Ao meu namorado, Ivano, sou imensamente grata por estar ao meu lado durante toda a jornada, me motivando, inspirando e lembrando-me de sorrir, tornando minha vida mais leve. Agradeço também à sua família, Maria Joana, Patrícia e Fernando, pelo carinho e acolhimento.

Às minhas melhores amigas, Lyandra, Louise, Laura e Maria Eduarda, um agradecimento especial por todos os anos de amizade e por me mostrar que família é mais do que compartilhar o mesmo sangue.

Às minhas queridas amigas da faculdade: Alice, Aline, Vivian, Júlia, Mariane, Mayara, Thamires, Ana Luiza e Laís, sou grata por terem tornado esses quatro anos tão especiais.

A Prof^a. Dra. Maria Danielly, minha orientadora, agradeço a confiança, oportunidade, aprendizado, paciência e carinho, além de ser um exemplo de profissionalismo. Ao meu orientador, Prof^o. Dr. César Andrade, pelo apoio e pelos ensinamentos compartilhados.

Aos meus colegas do Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, especialmente Raiza, Alberto, Sthefany, Brenda e Antônio pelo apoio durante minha Iniciação Científica.

Agradeço a Propesqi e ao CNPq pelo fomento na pesquisa.

E a todos que tive a alegria de conhecer ao longo dessa trajetória.

De coração, muito obrigada.

**“O que importa é a força do seu coração.”
(Harry Potter)**

DA SILVA GOMES, Mayza Jennifer. **Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico baseado em filme nanoestruturado de polipirrol e nanoestrutura metálica para detecção de arboviroses**. 2024. 53 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

As arboviroses são um grupo de patógenos transmitidos por artrópodes hematófagos, como mosquitos e carrapatos. Devido a similaridade dos sintomas clínicos, o diagnóstico diferencial só é possível através de técnicas laboratoriais. Entretanto, os métodos convencionais como ELISA, PCR e teste de neutralização por redução de placa (PRNT), enfrentam limitações como falsos-positivo, resultado demorado e custo elevado de equipamento e reagentes. Este trabalho, visa o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico nanoestruturado para a detecção de arboviroses, utilizando polipirrol (PPy), nanopartículas de ouro (AuNPs) e lectina *Bandeiraea simplicifolia* como biorreceptor. O biossensor foi caracterizado por voltametria cíclica (VC), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e microscopia de força atômica (AFM), permitindo a análise das interações com os vírus da dengue (DENV 1-4), Zika (ZIKV), Chikungunya (CHIKV) e febre amarela (YFV). Os resultados eletroquímicos indicaram uma detecção diferenciada entre os patógenos, sendo a interação com o YFV a mais expressiva. Os dados de EIE revelaram variações nos valores de resistência à transferência de carga (Rct), comprovando a especificidade da plataforma, com um aumento significativo nos valores de Rct para o YFV, que apresentou maior afinidade com a lectina. O padrão de resposta obtido do sistema sensor em termos de bioafinidade foi YFV > CHIKV > DENV1 > DENV2 > DENV3 > ZIKV > DENV4. O teste de seletividade com alfafetoproteína, glicogênio e lactose, confirmou a especificidade da lectina para os carboidratos: galactose e N-acetilgactosamina. Além disso, o teste com moléculas interferentes como ácido ascórbico, glicina e colesterol demonstraram uma mínima interação, destacando a precisão do biossensor. O biossensor proposto apresentou alta especificidade e capacidade de diagnóstico diferencial entre os arbovírus testados, com potencial para aplicação como método rápido e seguro. Como perspectiva, serão realizados estudos utilizando eletrodos descartáveis e flexíveis, além de testes com amostras humanas para validação.

Palavras-chave: Nanopartículas de ouro. Voltametria cíclica. Impedância eletroquímica. Microscopia de Força Atômica. Nanomateriais.

DA SILVA GOMES, Mayza Jennifer. **Development of an electrochemical biosensor based on a nanostructured polypyrrole film and metallic nanostructure for the detection of arboviral diseases**. 2024. 53 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

ABSTRACT

Arboviruses are a group of pathogens transmitted by hematophagous arthropods, such as mosquitoes and ticks. Due to the similarity of clinical symptoms, differential diagnosis is only possible through laboratory techniques. However, conventional methods such as ELISA, PCR, and the plaque reduction neutralization test (PRNT) face limitations such as false positives, long processing times, and the high cost of equipment and reagents. This study aims to develop a nano-structured electrochemical biosensor for the detection of arboviruses, using polypyrrole (PPy), gold nanoparticles (AuNPs), and *Bandeiraea simplicifolia* lectin as a bioreceptor. The biosensor was characterized by cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS), and atomic force microscopy (AFM), enabling the analysis of interactions with dengue virus (DENV 1-4), Zika virus (ZIKV), Chikungunya virus (CHIKV), and yellow fever virus (YFV). Electrochemical results indicated a differentiated detection among the pathogens, with the interaction with YFV being the most significant. EIS data revealed variations in charge transfer resistance (R_{ct}), confirming the platform's specificity, with a significant increase in R_{ct} values for YFV, which exhibited higher affinity with the lectin. The response pattern obtained from the sensor system, in terms of bioaffinity, was $YFV > CHIKV > DENV1 > DENV2 > DENV3 > ZIKV > DENV4$. The selectivity test with alpha-fetoprotein, glycogen, and lactose confirmed the lectin's specificity for galactose and N-acetylgalactosamine carbohydrates. Additionally, tests with interfering molecules such as ascorbic acid, glycine, and cholesterol showed minimal interaction, highlighting the biosensor's accuracy. The proposed biosensor demonstrated high specificity and differential diagnostic capability among the tested arboviruses, with potential for application as a rapid and reliable method. As a future perspective, studies will be conducted using disposable and flexible electrodes, along with tests on human samples for validation.

Key word: Gold nanoparticles. Cyclic voltammetry. Electrochemical impedance. Atomic Force Microscopy. Nanomaterials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura viral do gênero <i>Flavivirus</i>	19
Figura 2 – Estrutura viral do gênero <i>Alphavirus</i>	22
Figura 3 – Principais técnicas utilizadas para diagnóstico de arbovírus. a) ELISA, b) teste de neutralização por redução de placa (PRNT) e c) PCR.....	23
Figura 4 – Representação geral da operação de um biossensor.....	25
Figura 5 – Representação esquemática de uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos: eletrodo de trabalho (ET), eletrodo de referência (ER) e contra eletrodo (CE).....	26
Figura 6 – Versatilidade morfológica do polipirrol.....	28
Figura 7 – Extração da lectina <i>Bandeiraea simplicifolia</i>	29
Figura 8 – Representação esquemática de um voltamograma cíclico: I _{pa} (corrente de pico anódica), I _{pc} (corrente de pico catódica), E _{pa} (potencial de pico anódico) e E _{pc} (potencial de pico catódico).....	30
Figura 9 – a) Diagrama de Nyquist e b) Circuito equivalente de Randles.....	31
Figura 10 – Representação esquemática da microscopia de força atômica (AFM)	32
Figura 11 – Representação esquemática da construção da plataforma biossensora nanoestruturada.....	35
Figura 12 – Imagens tridimensionais referente a morfologia do biossensor obtidas pela AFM. a) PPy, b) PPy-AuNPs, c) PPy-AuNPs-Lectina, d) DENV1, e) DENV2, f) DENV3, g) DENV4, h) CHIKV, i) YFV e j) ZIKV.....	38
Figura 13 – Voltamograma cíclico obtido durante a eletropolimerização de 10 ciclos de polipirrol.....	39
Figura 14 – Análises de VC (a) e EIE (b) indicando a mudança do comportamento eletroquímico do biossensor.....	40
Figura 15 – Gráficos impedimétricos referentes a detecção dos diferentes arbovírus (a-g) e variação na resistência à transferência de cargas (R _{ct}) após detecção de diferentes arboviroses (h).....	41
Figura 16 – Resultados impedimétricos do teste de seletividade (a) e valores de R _{ct} referente à interação do biossensor com arbovírus e moléculas interferentes.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados dos elementos do circuito equivalente a partir dos resultados de impedância.....	43
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
AuNPs	Nanopartículas de ouro
BS - I	Lectina <i>Bandeiraea simplicifolia</i>
C	Proteína de capsídeo viral
CE	Contra eletrodo
Cdl	Capacitância de dupla camada
CHIKV	Vírus Chikungunya
Cys	Cisteamina
DENV	Vírus da Dengue
E	Proteína de envelope viral
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática
Epa	Potencial de pico anódico
Epc	Potencial de pico catódico
ER	Eletrodo de referência
ESPIN	Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional
ET	Eletrodo de trabalho
GLU	Glutaraldeído
HAuCl ₄	Ácido tetra-cloroáurico tri-hidratado
HCl	Ácido clorídrico
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
Ipa	Corrente de pico anódica
Ipc	Corrente de pico catódica
M	Proteína de membrana viral
NS	Proteínas não estruturais
PCs	Polímeros condutores
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PPy	Polipirrol
PRNT	Teste de neutralização por redução de placa
Rct	Resistência à transferência de cargas
Rs	Resistência de solução eletrolítica
SCZ	Síndrome Congênita do Zika

ssDNA	DNA de fita simples
TM	Proteína transframe
VC	Voltametria cíclica
YFV	Vírus da Febre Amarela
Zw	Impedância de Warburg
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	INTRODUÇÃO À ARBOVIROSES.....	17
2.1.1	CONTEXTO HISTÓRICO DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR ARBOVIROSES NO BRASIL	17
2.1.2	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E PRINCIPAIS VETORES DE TRANSMISSÃO	18
2.2	FAMÍLIA <i>FLAVIVIRIDAE</i>	19
2.2.1	DENGUE.....	20
2.2.2	ZIKA.....	20
2.2.3	FEBRE AMARELA.....	21
2.3	FAMÍLIA <i>TOGAVIRIDAE</i>	21
2.3.1	CHIKUNGUNYA.....	22
2.4	DETECÇÃO LABORATORIAL DAS ARBOVIROSES.....	22
2.5	BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS.....	24
2.5.1	ELEMENTO DE TRANSDUÇÃO ELETROQUÍMICA.....	25
2.6	NANOMATERIAIS.....	26
2.6.1	POLIPIRROL.....	26
2.6.2	NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	28
2.7	LECTINAS.....	28
2.8	TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS APLICADAS NA CARACTERIZAÇÃO DE UM BIOSSENSOR.....	29
2.8.1	VOLTAMETRIA CÍCLICA.....	30
2.8.2	ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA.....	31
2.9	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	32
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	METODOLOGIA.....	34

4.1	MATERIAIS.....	34
4.2	SÍNTESE DO FILME POLIMÉRICO DE POLIPIRROL.....	34
4.3	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	34
4.4	MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO ELETRODO PARA OBTENÇÃO DA PLATAFORMA NANOSENSORA	35
4.5	AValiação DA INTERAÇÃO COM ARBOVÍRUS.....	36
4.6	DESEMPENHO ANALÍTICO DO BIOSENSOR ATRAVÉS DE TESTE DE SELETIVIDADE E MOLÉCULAS INTERFERENTES.....	36
4.7	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E TOPOGRÁFICA.....	36
4.7.1	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	36
4.8	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA.....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	38
5.1	CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA OU MORFOLÓGICA.....	38
5.1.1	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	38
5.2	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO BIOSENSOR.....	39
5.2.1	ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO FILME POLIMÉRICO DE POLIPIRROL.....	39
5.2.2	CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR NANOESTRUTURADO.....	40
5.2.3	DESEMPENHO ANALÍTICO DO BIOSENSOR.....	41
5.2.4	TESTE DE SELETIVIDADE E MOLÉCULAS INTERFERENTES.....	44
6	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

Os arbovírus são vírus de RNA de fita simples, com destaque para os representantes dos gêneros *Flavivirus* – como os quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV 1-4), zika (ZIKV) e febre amarela (YFV) – e *Alphavirus*, como o vírus Chikungunya (CHIKV). A emergência das arboviroses no Brasil está diretamente associada às condições ambientais favoráveis à reprodução do principal vetor de transmissão, o mosquito do gênero *Aedes aegypti* (Magalhaes *et al.*, 2020; Mundim-Pombo *et al.*, 2021). Como resultado, as infecções causadas por esses vírus têm gerado uma crise de saúde pública significativa. Somente no primeiro semestre de 2024, o Ministério da Saúde notificou aproximadamente 6 milhões de casos prováveis de infecção por dengue (Ministério da Saúde, 2024).

As arboviroses apresentam desafios de diagnóstico clínico devido à similaridade dos sintomas entre as infecções. Portanto, o diagnóstico diferencial de arbovírus requer o uso de métodos convencionais sorológicos e técnicas moleculares (Sena *et al.*, 2024). Ensaio moleculares, como reação em cadeia de polimerase (PCR), são altamente sensíveis e específicos. Entretanto, apresentam limitações na diferenciação entre os sorotipos da DENV e podem gerar resultados falso-positivos durante o processo de amplificação de ácidos nucleicos (Ribeiro, Marisa O. *et al.*, 2021). O ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) é uma técnica sorológica confiável, com desempenho eficaz na detecção de anticorpos IgM e IgG anti-arbovírus. Embora apresente alta especificidade, seu elevado custo e o tempo prolongado para a obtenção de resultados limitam sua aplicação como teste de rotina (Pereira *et al.*, 2023). Nesse contexto, novos métodos de diagnósticos inovadores que permitam uma detecção rápida, sensível, e específica entre os arbovírus são necessários.

Os biossensores eletroquímicos têm ganhado destaque devido a sua capacidade de fornecer respostas precoces, precisas e sensíveis de maneira econômica. Este dispositivo analítico é constituído por materiais biológicos, como proteínas, ácidos nucleicos e anticorpos, imobilizados em um transdutor capaz de reconhecer o analito de interesse e amplificar o sinal de detecção (Kaya *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2021). Os métodos eletroanalíticos, como espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica (VC), permitem o estudo das

interações entre biomoléculas e plataformas de biossensoriamento (Singh *et al.*, 2021).

O avanço da nanotecnologia trouxe benefícios significativos para o campo dos biossensores, pois a aplicação de nanomateriais nesses dispositivos melhoram a sua performance ao amplificar a resposta elétrica (Naresh; Lee, 2021). O filme polimérico de polipirrol (PPy), é eficaz devido às suas excelentes características elétricas, termoestabilidade, biocompatibilidade e fácil processamento e funcionalização (Zhang *et al.*, 2023). Enquanto as nanopartículas de ouro (AuNps) são amplamente integradas aos biossensores por sua capacidade de proporcionar alta condutividade e possibilidade de interagir com moléculas biológicas apresentando biocompatibilidade (Siciliano *et al.*, 2024).

O desenvolvimento de biossensores baseados em lectinas como bioreceptores é frequentemente destacado na literatura devido a sua capacidade única de reconhecer carboidratos específicos. A lectina vegetal *Bandeiraea simplicifolia* (BS-I), por exemplo, é capaz de ligar-se especificamente aos carboidratos N-acetilgalactosamina e galactose que estão presentes em glicoproteínas estruturais dos arbovírus (Cavada *et al.*, 2020; Simão *et al.*, 2020).

O presente estudo apresenta o desenvolvimento de uma plataforma biossensora eletroquímica baseada em polipirrol, nanopartículas de ouro e lectina como elemento de biorreconhecimento. A avaliação do sistema sensor foi caracterizada pelas técnicas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica, tendo como objetivo obter uma nova alternativa diagnóstica rápida e sensível capaz de proporcionar uma detecção precoce e distinta entre amostras de diferentes arbovírus em diversas concentrações.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INTRODUÇÃO À ARBOVIROSES

As arboviroses são doenças infecciosas causadas por arbovírus, uma abreviação de *arthropod-borne virus*, que se refere a vírus transmitidos por artrópodes, como mosquitos e carrapatos (Goh; Mok; Chu, 2020). Esses vírus constituem um grupo grande e diversificado, transmitidos de hospedeiros infectados para hospedeiros suscetíveis por meio da picada de um artrópode vetor. Os principais arbovírus que causam doenças em humanos pertencem às famílias *Flaviviridae* e *Togaviridae*. Entre eles, destacam-se os vírus da dengue, zika, febre amarela e Chikungunya (Giménez-Richarte; Arbona Castaño; Ramos-Rincón, 2024; Ogunlade *et al.*, 2021).

2.1.1 CONTEXTO HISTÓRICO DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR ARBOVIROSES NO BRASIL

O Brasil enfrenta as arboviroses desde o período colonial, século XVII, quando foi relatada o primeiro surto de febre amarela no estado de Pernambuco, possivelmente introduzida das Antilhas pelos colonizadores europeus (Franco, 1969). Desde então, diversas epidemias foram documentadas. Na década de 1930, a vacina antiamarílica foi aplicada em larga escala, sob a liderança do sanitarista Oswaldo Cruz, que tornou obrigatória a vacinação de toda a população com o objetivo de erradicar a epidemia causada pela YFV (Diniz; Guedes Junior; Brandão, 2024).

Oswaldo Cruz também foi responsável pela criação de um programa de controle de mosquitos, que culminou na erradicação do *Aedes aegypti* em 1950. No entanto, na década de 1980, o crescimento desordenado das metrópoles devido à urbanização não planejada criou condições favoráveis para o retorno e disseminação do mosquito (Almeida; Cota; Rodrigues, 2020). Em 1982, ocorreu a primeira epidemia relatada de dengue no estado de Roraima, causada pelos quatro sorotipos do vírus. Posteriormente, o DENV1 rapidamente se espalhou pelo Brasil, com maior persistência na região Nordeste, onde sua incidência permanece significativa até os dias atuais (DengueMinistério da Saúde, 2024; Salles *et al.*, 2018).

Até 2015, o vírus Zika não era considerado uma preocupação significativa de saúde pública. No entanto, em agosto do mesmo ano, diversos municípios do Nordeste relataram um aumento incomum no número de bebês nascidos com microcefalia, associado a um crescimento nos casos de infecção por ZIKV. Em resposta, o Ministério da Saúde declarou Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN) (Coêlho *et al.*, 2022; Viegas; Ventura; Nunes, 2022). Os primeiros registros de CHIKV no país foram identificados nas regiões Norte e Nordeste em setembro de 2014. Apenas dois anos depois, foram notificados 236.287 casos suspeitos de infecções pelo vírus, dos quais 116.523 foram confirmados por testes sorológicos (Martins *et al.*, 2024).

2.1.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E PRINCIPAIS VETORES DE TRANSMISSÃO

O *Aedes aegypti* é um inseto hematófago pertencente à família *Culicidae*, originário do Egito. Acredita-se que a introdução desse vetor no Brasil ocorreu através do comércio de escravos africanos durante o período colonial. A epidemia de YFV urbana foi o principal fator que levou o mosquito a se tornar um problema de saúde pública. Entretanto, atualmente, o *A. aegypti* é responsável também pela transmissão de outros arbovírus, como DENV, ZIKV e CHIKV. A propagação do vírus é possível devido ciclo de transmissão humano – mosquito – humano, que ocorre durante a hematofagia (Almeida; Cota; Rodrigues, 2020; Ribeiro, Mário Sérgio *et al.*, 2021).

A condição climática está diretamente ligada à distribuição territorial de doenças transmitidas por vetores, como as arboviroses. O mosquito *Aedes aegypti* tem preferência por regiões de clima tropical, temperado e úmido, porque oferecem condições ideais para reprodução e maturação das larvas (Sousa *et al.*, 2023). Ademais, é importante considerar os fatores urbanos e antrópicos, como acúmulo de lixo e saneamento inadequado, que podem influenciar as condições de reprodução do mosquito, criando microclimas com temperaturas favoráveis em áreas que, de outra forma, não seriam propícias. Devido à sua adaptação ao ambiente urbano, esse mosquito utiliza diversos tipo de recipientes como *habitat* de reprodução, desde aquários abandonados até cascos de garrafas (Soek *et al.*, 2023).

Além disso, o gênero *Aedes albopictus* tem demonstrado adaptação a ambientes urbanos, apresentando um ciclo reprodutivo semelhante ao de *Ae. aegypti*

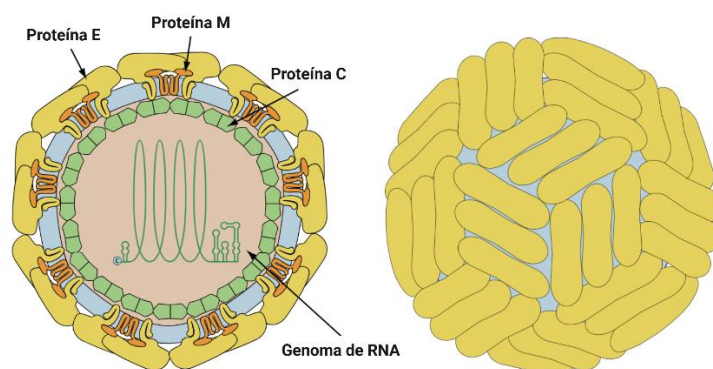
e mostrando-se eficaz na transmissão de CHIKV (MONTEIRO MOY *et al.*, 2024). Os mosquitos silvestres dos gêneros *Haemagogus spp.* e *Sabethes spp.* são vetores primários e secundários da YFV, onde seu contato com a população humana é facilitado por distúrbios ambientais (Li *et al.*, 2022).

Em vista disso, as regiões Norte e Nordeste são vítimas de casos emergentes causados por DENV (1-4), ZIKV e CHIKV, através da transmissão vetorial favorecida pelo clima quente e presença de água parada devido infraestrutura deficiente de saneamento (Oscar Júnior; de Assis Mendonça, 2021). Enquanto a YFV tem prevalência acentuada nas regiões Norte e Centro-Oeste, por causa da predominância dos mosquitos silvestres (de Oliveira Figueiredo *et al.*, 2020).

2.2 FAMÍLIA FLAVIVIRIDAE

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), a família *Flaviviridae* é caracterizada por vírions esféricos com diâmetro de 40 – 60 nm, possui envelope lipídico contendo duas ou três glicoproteínas e uma membrana que envolve o nucleocapsídeo, como mostrado na Figura 1. O gênero *Orthoflavivirus* ou *Flavivirus*, que engloba 53 espécies, se destaca dentro dessa família por incluir patógenos de interesse clínico transmitidos por artrópodes, como DENV, ZIKV e YFV (ICTV - Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, 2019).

Figura 1. Estrutura viral da família *Flaviviridae*..



Fonte: (ViralZone, 2024)

2.2.1 DENGUE

A dengue é uma doença viral causada pelos quatro sorotipos do vírus DENV (1-4). O vírion do DENV é composto por três proteínas estruturais localizadas no capsídeo (C), membrana (M) e envelope (E), além de sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), que participam da replicação do RNA viral (Harapan *et al.*, 2020). As proteínas C e M são importantes para formação e maturação da partícula viral, enquanto a proteína E, dividida em três domínios (I-III), possui glicanos que auxiliam na ligação do vírus à célula hospedeira (Malavige; Ogg, 2024).

Os quatro sorotipos do DENV podem circular simultaneamente na mesma região, são antigenicamente distintos e, apesar das diferenças genotípicas, todos podem causar desde os sintomas da dengue clássica até manifestações graves. No entanto, em casos de reinfeção por um sorotipo diferente, os anticorpos gerados na primeira infecção não são capazes de neutralizar o novo sorotipo, o que pode agravar a infecção e levar ao desenvolvimento de dengue hemorrágica (Gómez *et al.*, 2024). Ainda, em 2013, foi relatado o isolamento de um novo sorotipo (DENV5) em um agricultor residente da Malásia. No entanto, evidências sugerem que esse novo sorotipo apresenta uma baixa taxa de transmissão (Mustafa *et al.*, 2015).

A infecção pelo DENV é, na maioria dos casos, assintomática. No entanto, o vírus possui a predisposição a estimular monócitos e linfócitos a liberarem moléculas pró-inflamatórias, como as células T CD4+ e CD8+, responsáveis pelo aparecimento dos sintomas característicos da dengue. Os sintomas clássicos incluem febre alta (39 °C – 40 °C), cefaleia intensa e dores nas articulações e musculações. A doença pode progredir para a forma grave devido ao extravasamento de plasma, resultando em choque, derrame pleural, ascite e hemorragias intensas (Bona, 2022; Oliveira *et al.*, 2024).

2.2.2 ZIKA

O ZIKV é um vírus de RNA de fita simples, polaridade positiva, com o capsídeo icosaedro envelopado, cujo genoma, assim como o do DENV, codifica três proteínas estruturais (C, M e E) e sete proteínas não estruturais (complexo NS), importantes

para replicação, patogenicidade e formação do vírus (Dahiya *et al.*, 2023). Além da transmissão por mosquitos, o ZIKV pode ser transmitido por contato sexual ou via vertical, de mulheres grávidas infectadas para os embriões (Polonio; Peron, 2021).

Geralmente, a infecção pelo vírus Zika se manifesta de maneira assintomática. No entanto, quando ocorrem sintomas, o quadro clínico é semelhante ao do DENV, apresentando mialgia, artralgia e febre intensa. Em mulheres grávidas, o vírus pode causar infecção intrauterina, resultando em danos congênitos ao feto, o que pode levar ao aborto espontâneo ou complicações neurológicas, como microcefalia, disfagia e epilepsia. Esses defeitos congênitos relacionados ao ZIKV é conhecida como síndrome congênita do Zika (SCZ) (Giraldo; Gonzalez-Orozco; Rajsbaum, 2023).

2.2.3 FEBRE AMARELA

A estrutura da partícula viral de YFV é definida por um nucleocapsídeo envelopado e seu genoma é composto por RNA de fita simples de sentido positivo, responsável pela codificação de dez proteínas, tanto estruturais quanto não estruturais, também presentes em outros arbovírus (Gianhecchi *et al.*, 2022).

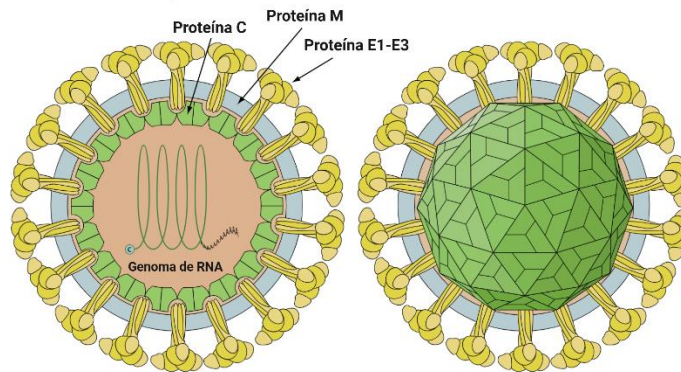
A patogênese da febre amarela é semelhante à de outras arboviroses, sendo geralmente assintomática ou manifestando-se com sintomas gerais como calafrios, febre, dores de cabeça e nas articulações, náuseas, língua avermelhada e conjuntivite. Cerca de 3 a 4 dias após o início dos sintomas, o paciente pode evoluir para recuperação ou para o período de remissão, caracterizado pelo retorno dos sintomas iniciais, acompanhados de manifestações clínicas graves, como icterícia, delírio, albuminúria, acidose metabólica, choque e hemorragia (Sacchetto *et al.*, 2020).

2.3 FAMÍLIA TOGAVIRIDAE

A família *Togaviridae* é definida como vírus esféricos pequenos com diâmetro de 65 – 70 nm, envoltos por um envelope lipídico com glicoproteínas divididas em três heterodímeros: E1, E2 e E3, como mostrado na Figura 2. O gênero *Alphavirus*, atualmente o único da família, inclui o vírus Chikungunya, que possui potencial

endêmico devido à sua capacidade de infectar humanos por meio de insetos hematófagos (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus - ICTV, 2019).

Figura 2. Estrutura viral da família *Togaviridae*.



Fonte: (ViralZone, 2024).

2.3.1 CHIKUNGUNYA

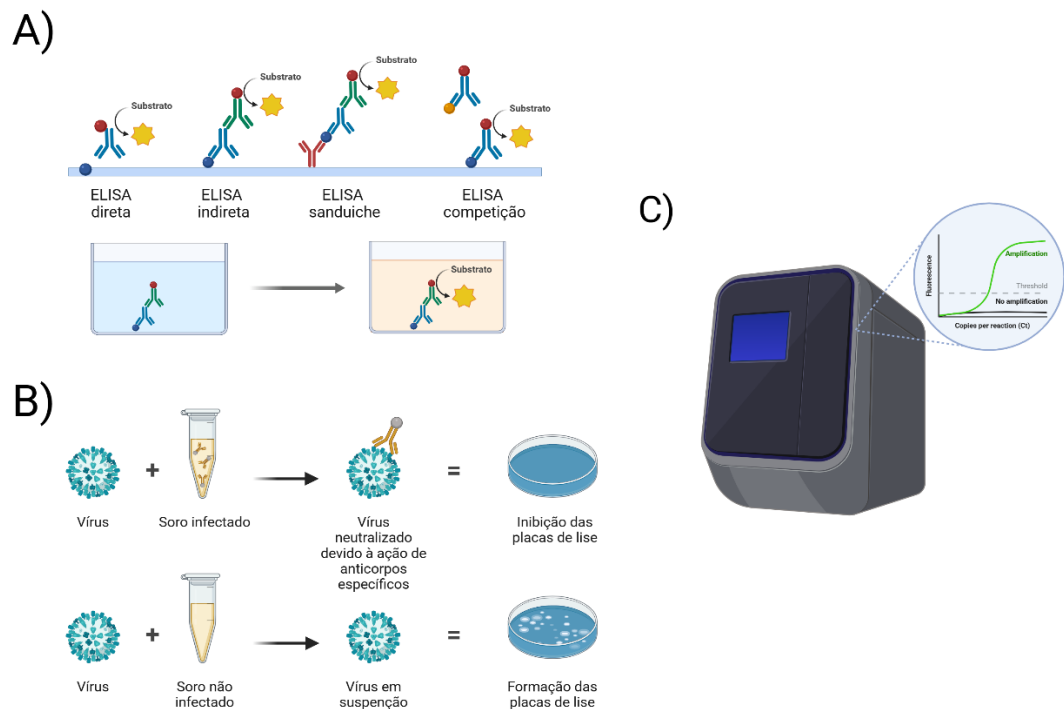
O vírion CHIKV possui um nucleocapsídeo icosaedro e um envelope viral composto por picos de glicoproteínas. Seu genoma de polaridade positiva codifica quatro proteínas não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3 e NSP4) e seis proteínas estruturais: nucleocapsídeo (C), proteínas de envelope (E1, E2, E3 e 6K) e proteína transframe (TM). As glicoproteínas E1/E2 são essenciais para a invasão da célula hospedeira, promovendo a fusão das membranas (Khongwichit *et al.*, 2021; Kril *et al.*, 2021).

A apresentação clínica do CHIKV inclui febre, dores articulares e musculares, podendo ser facilmente confundida com infecções causadas por outros arbovírus. No entanto, o vírus Chikungunya apresenta tropismo por líquidos sinoviais, causando intensa inflamação nas articulações. Assim, a artralgia simétrica e bilateral é uma manifestação característica dessa infecção. Além disso, o CHIKV pode resultar em sequelas cardiovasculares, como arritmia e miocardite, bem como consequências neurológicas, incluindo síndrome de Guillain-Barré, encefalite e neuropatia óptica (Chirathaworn; Chansaenroj; Poovorawan, 2020; Freppel *et al.*, 2024).

2.4 DETECÇÃO LABORATORIAL DAS ARBOVIROSES

Devido à similaridade dos sintomas entre as diferentes infecções causadas por arboviroses, torna-se indispensável o uso de análises laboratoriais para garantir um diagnóstico diferencial, preciso e seguro que auxilie a medicina clínica e a vigilância das doenças (Piantadosi; Kanjilal, 2020). A figura 3 apresenta os principais métodos utilizados na detecção de arbovírus, incluindo técnicas sorológicas e teste de biologia molecular.

Figura 3. Principais técnicas utilizadas para diagnóstico de arbovírus. a) ELISA, b) teste de neutralização por redução de placa (PRNT) e c) PCR.



Fonte: Próprio autor (2024).

O teste sorológico ELISA é amplamente usado para a detecção específica de anticorpos IgM, indicando infecção recente, ou IgG, relacionado com infecções anteriores. Este teste é baseado na ligação específica entre antígenos e anticorpos, seguida por uma reação colorimétrica, cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração da molécula alvo. Embora apresente alta especificidade, pode apresentar resultados falso-positivos devido à reatividade cruzada com outros vírus, o que exige a realização de testes confirmatórios adicionais. Além disso, o teste apresenta uma limitação relacionada à fase da infecção, pois os anticorpos não são detectáveis durante os estágios iniciais de viremia, dificultando o diagnóstico precoce (Morales *et al.*, 2021; Varghese; De Silva; Millar, 2023).

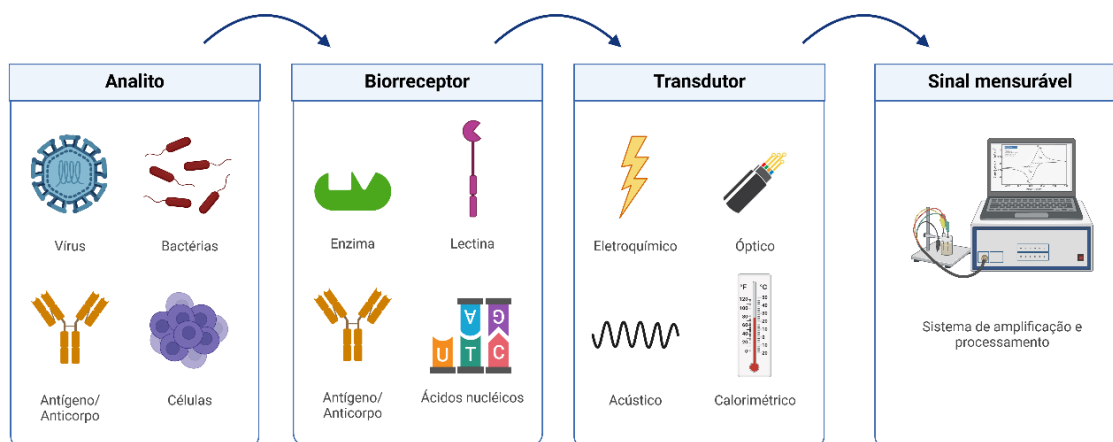
O teste de neutralização por redução de placa (PRNT) é um ensaio sorológico confirmatório, considerado o padrão ouro para a detecção de anticorpos neutralizantes contra arbovírus em amostras infectadas. Esse método oferece resultados confiáveis e precisos, sendo capaz de diferenciar os sorotipos de DENV e minimizar a ocorrência de reatividade cruzada. No entanto, o PRNT necessita da atuação de profissionais especializados, além de apresentar uma metodologia extensa e um tempo de resposta prolongado, variando de 4 a 10 dias (Fischer *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2024).

Os testes baseados na biologia molecular incluem o método PCR, que se fundamenta na capacidade da enzima DNA polimerase de sintetizar novas cadeias de DNA a partir de um molde de DNA de fita simples (ssDNA). Essa metodologia permite a amplificação do material genético e trouxe avanços significativos no diagnóstico de patógenos, permitindo a detecção precisa de DNA ou RNA viral. No entanto, esse método também apresenta algumas desvantagens, como o alto custo, a necessidade de equipamentos especializados e o risco de falso-positivos devido a amplificação de material genético residual (Licínio; Ayres, 2021).

2.5 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Diante das desvantagens dos métodos convencionais, torna-se crucial o desenvolvimento de novas metodologias inovadoras que garantam um diagnóstico rápido, seguro e diferencial entre as arbovirose. Os biossensores têm se destacado como uma alternativa promissora, oferecendo vantagens como alta sensibilidade e especificidade, baixo custo, resultados rápidos e capacidade de miniaturização (Duarte *et al.*, 2021). Conforme ilustrado na Figura 4, esses dispositivos são compostos por um receptor biológico que reconhece de forma específica o analito-alvo, um transdutor que converte essa interação em um sinal elétrico mensurável, e um sistema de processamento que registra o sinal (Campos *et al.*, 2020).

Figura 4. Representação geral da operação de um biossensor.



Fonte: Próprio autor (2024).

A interação da molécula-alvo com o biorreceptor provoca uma perturbação bioquímica que, dependendo do tipo de transdutor, pode gerar alterações como transferência de calor, variação de cargas elétricas, emissão de luz ou movimentação de elétrons. Essas mudanças são convertidas em um sinal elétrico mensurável. Nesse contexto, as moléculas biorreceptoras — que englobam enzimas, proteínas, DNA e células inteiras — desempenham um papel indispensável devido à sua capacidade seletiva de se ligar ao ligante específico (Singh *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2023)

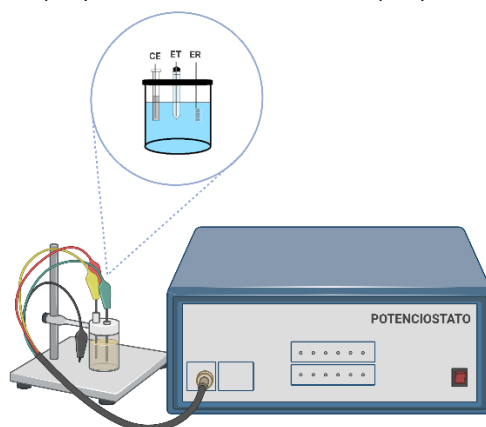
Os biossensores podem ser classificados conforme a natureza do receptor biológico: i) biossensores enzimáticos; ii) imunossensores; iii) genossensor; ou segundo o tipo de transdutor: i) eletroquímicos; ii) ópticos; iii) acústicos; iv) calorimétricos (Saylan *et al.*, 2019). Os biossensores eletroquímicos utilizam materiais condutores ou semicondutores, também chamados de eletrodo, como transdutor para converter as interações entre o elemento de biorreconhecimento e o analito-alvo em sinais elétricos mensuráveis convertidos através de um método eletroquímico, que pode ter caráter potenciométrico, amperométrico ou impedimétrico (Cesewski; Johnson, 2020).

2.5.1 ELEMENTOS DE TRANSDUÇÃO ELETROQUÍMICA

A eletroquímica estuda as reações químicas, como os processos de oxidação e redução, que ocorrem entre a interface de um eletrodo e uma solução eletrolítica. Essas reações são geradas dentro de uma célula eletroquímica e detectadas por um

circuito elétrico externo, como um potenciostato. A configuração mais comum é a célula eletroquímica de três eletrodos, conforme apresentado na Figura 5, amplamente utilizada no desenvolvimento de sistemas para detecção de patógenos. O principal componente é o eletrodo de trabalho (ET), onde são realizadas as modificações necessárias para montar a plataforma biossensora, seguido pelo eletrodo de referência (ER), responsável por fornecer um potencial estável e o contra eletrodo (CE), que completa o circuito elétrico (Rezaei; Irannejad, 2022). As técnicas eletroquímicas, como voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), permitem avaliar as modificações ocorridas nas diferentes camadas do biossensor, desde a plataforma sensora até a detecção de substâncias e biomoléculas, proporcionando respostas rápidas e sensíveis (Deebansok *et al.*, 2024).

Figura 5. Representação esquemática de uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos: eletrodo de trabalho (ET), eletrodo de referência (ER) e contra eletrodo (CE).



Fonte: Próprio autor (2024).

2.6 NANOMATERIAIS

A aplicação de nanomateriais em biossensores aprimora a performance desses dispositivos, uma vez que promovem a amplificação do sinal detectado e oferece excelente biocompatibilidade, seletividade e alta capacidade de adsorção. Dentre esses nanomateriais, destacam-se o polipirrol e as nanopartículas de ouro, devido às suas características eletroquímicas únicas, como por exemplo: elevação da condutividade e imobilização de biomoléculas (Naresh; Lee, 2021). O desenvolvimento de novos métodos diagnósticos baseados em nanotecnologia tem

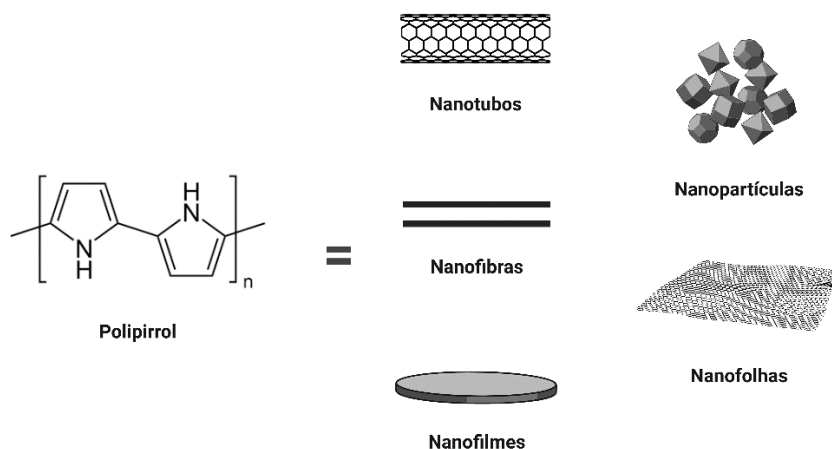
sido amplamente explorado para aprimorar o diagnóstico rápido e diferencial de arboviroses. Por exemplo, um estudo conduzido por Simão *et al.* (2020), demonstrou que a associação de nanopartículas metálicas aos biossensores eletroquímicos garantiu alta sensibilidade permitindo uma detecção precisa e diferencial entre diferentes arbovírus (Simão *et al.*, 2020).

2.6.1 POLIPIRROL

Os polímeros condutores (PCs), como o polipirrol, têm se destacado devido às suas notáveis propriedades elétricas, ópticas e magnéticas. O PPy é um polímero condutor heterocíclico que, na sua forma convencional, apresenta alta rigidez, baixa ductilidade e baixa solubilidade. No entanto, quando nanoestruturado, esse polímero adquire propriedades atrativas para a nanotecnologia, como excelente eletrocondutividade, flexibilidade, fácil processamento, estabilidade química e biocompatibilidade. O PPy ainda pode reagir com agente dopantes, como ácidos fortes, substâncias oxidantes ou redutoras, que promove modificação químicas ao polímero aumentando a sua condutividade (A. de Almeida; de F. Gimenez, 2022; Sumdani *et al.*, 2022).

A síntese do polipirrol pode ser realizada por polimerização eletroquímica, onde as variações no potencial aplicado, na corrente e na taxa de varredura permitem o controle da espessura e da condutividade do polímero (Zhang *et al.*, 2023). Conforme ilustrado na Figura 6, o PPy pode adotar diferentes morfologias, como nanotubos, nanofibras, filmes, nanopartículas e nanofolhas. Essa versatilidade, somada às suas excelentes propriedades, torna o polipirrol um material eficaz para aprimorar o desempenho de detecção em diversos biossensores (Hao *et al.*, 2022).

Figura 6. Versatilidade morfológica do polipirrol.



Fonte: Próprio autor (2024).

2.6.2 NANOPARTÍCULAS DE OURO

As nanopartículas de ouro pertencem à classe das nanopartículas plasmônicas, que inclui também nanocolóides de prata e cobre. A aplicabilidade das AuNPs tem ganhado destaque em diversas áreas de pesquisa e análise devido às suas propriedades elétricas distintas, que proporcionam vantagens como aumento da área de superfície, alta condutividade elétrica, baixa resistência e estabilidade química. O tamanho das AuNPs pode variar, além de apresentarem flexibilidade morfológica, podendo se mostrar como nanoesferas, nanobastões, nanocubos e estruturas ramificadas (Kumalasari; Alfanaar; Andreani, 2024; Siciliano *et al.*, 2024)

A variabilidade de tamanhos e morfologias das AuNPs, adicionado à sua biocompatibilidade, sensibilidade e facilidade de funcionalização de superfície com vários ligantes, as tornam ideais para ligação seletiva a moléculas e íons. Isso as torna fundamentais para a detecção de diferentes analitos biológicos (Hua *et al.*, 2021). Por exemplo, estudo de German *et al.* (2017), apresenta um biossensor amperométrico modificado com AuNPs eletrodepositadas e PPy para a determinação ultrasensível de glicose em soro humano (German; Ramanavicius; Ramanaviciene, 2017).

2.7 LECTINAS

As lectinas são proteínas que se ligam especificamente a carboidratos e

apresentam alta estabilidade físico-química, resistindo a variações de pH, temperatura e condições de desnaturação. Elas estão amplamente distribuídas na natureza, desempenhando papéis importantes na fisiologia de plantas, animais e microrganismos. Sua capacidade de interagir com polissacarídeos, devido ao domínio de ligação a carboidratos, é um fator determinante para suas propriedades biológicas e potenciais aplicações na biotecnologia (Gautam *et al.*, 2020; Katoch; Tripathi, 2021).

A lectinas vegetais, formam um grupo heterogêneo em termos de características bioquímicas, estrutura molecular e especificidade de carboidratos. Dentro desse grupo, as lectinas da família *Leguminosae* têm sido amplamente estudadas e investigadas para aplicações biomédicas. Por sua vez, a *Bandeiraea simplicifolia* ou *Griffonia simplicifolia*, é uma lectina leguminosa extraída das sementes do arbusto nativo da África, de mesmo nome, como ilustrado na Figura 7. A BS-I possui cinco isolectinas tetraméricas (A4, A3B, A2B2, AB3 e B4), que exibem alta especificidade com os carboidratos galactose e N-acetilgalactosamina (Cavada *et al.*, 2020; Lamb; Shibata; Goldstein, 1983). Dessa forma, através de ligações químicas, a aplicação de lectinas como moléculas de biorreconhecimento melhora significativamente a sensibilidade e o desempenho do biossensor (Abrantes-Coutinho *et al.*, 2021).

Figura 7. Extração da lectina *Bandeiraea simplicifolia*.



Sementes do arbusto *Griffonia/Bandeiraea simplicifolia*

Lectina *Griffonia/Bandeiraea simplicifolia*

Fonte: Próprio autor (2024).

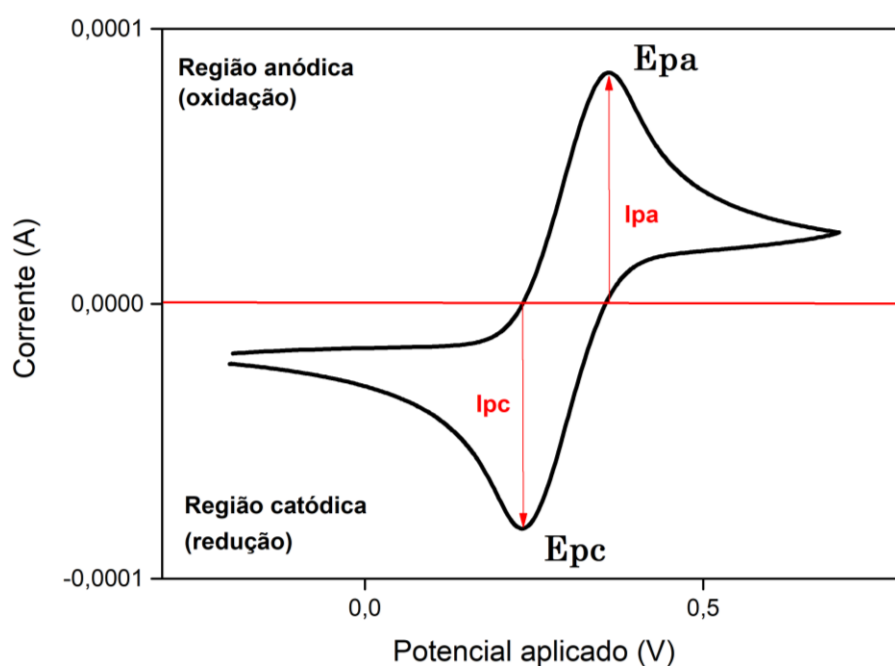
2.8 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS APLICADAS NA CARACTERIZAÇÃO DE UM BIOSSENSOR

2.8.1 VOLTAMETRIA CÍCLICA

A voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica bastante utilizada no desenvolvimento de biossensores, por causa da sua simplicidade, rapidez e baixo custo. Esta técnica identifica processos de oxi-redução ao medir as correntes de pico geradas, além de fornecer informações sobre a cinética de transferência de elétrons e as reações químicas que acontecem entre a interface do eletrodo e a solução. Com isso, é possível avaliar as propriedades das diferentes moléculas químicas presentes na solução. A velocidade de varredura, é um fator essencial dessa técnica que deve ser bem ajustada para garantir que as reações ocorram completamente (Gharbi *et al.*, 2020; Pilz; Kielb, 2023).

A Figura 8 ilustra o diagrama da VC, onde o potencial aplicado (eixo x) é correlacionado à corrente gerada (eixo y). Durante a varredura, na região catódica (negativa), as espécies químicas sofrem redução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração dessas moléculas. Na região anódica (positiva), o potencial é invertido, promovendo o processo de oxidação dessas espécies químicas (Elgrishi *et al.*, 2018).

Figura 8. Representação esquemática de um voltamograma cíclico: I_{pa} (corrente de pico anódica), I_{pc} (corrente de pico catódica), E_{pa} (potencial de pico anódico) e E_{pc} (potencial de pico catódico).



Fonte: Próprio autor (2024).

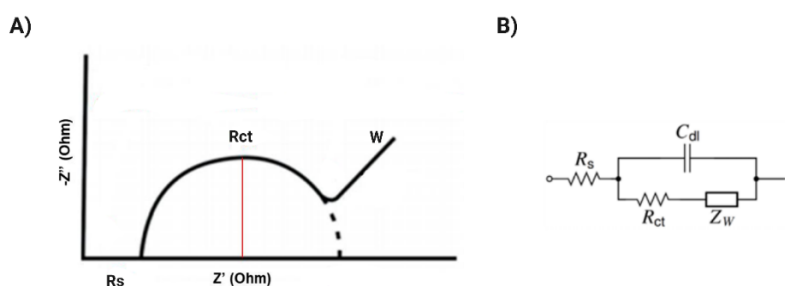
2.8.2 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA

A espectroscopia de impedância eletroquímica é amplamente utilizada em pesquisas para investigar o comportamento das interfaces eletroquímicas. Essa técnica se baseia na aplicação de uma corrente ou potencial alternado, que provoca uma perturbação no sistema por meio da variação de frequência. A EIE é valorizada por ser uma ferramenta rápida e eficaz, capaz de fornecer informações detalhadas sobre propriedades ímpares do processo eletroquímico, que podem afetar a condutividade, resistência ou capacitância de um sistema (Magar; Hassan; Mulchandani, 2021; Wang *et al.*, 2021).

O diagrama de Nyquist, mostrado na Figura 9a, é a representação gráfica padrão da EIE. O diagrama consiste em uma série de pontos que correspondem à grandeza e direção do vetor de impedância para diferentes frequências. Os espectros de impedância geralmente apresentam uma porção semicircular em frequências elevadas, refletindo o processo limitante da transferência de elétrons. O diagrama é dividido em dois eixos: o eixo real (x), que representa os termos resistivos, e o eixo imaginário (y), que indica os componentes capacitivos (Gharbi *et al.*, 2020).

As medições de impedância realizadas durante a formação do biossensor e nos testes de biorreconhecimento são geralmente interpretadas por meio do circuito elétrico equivalente, como por exemplo o circuito de Randles, apresentado na Figura 9b. Esse circuito inclui componentes principais como a resistência da solução eletrolítica (R_s), a resistência de transferência de carga (R_{ct}) no eletrodo, o elemento de capacitância de dupla camada (C_{dl}) e a impedância de Warburg (Z_w), que reflete os efeitos de baixas frequências sobre a transferência de massa das espécies eletrolíticas (Sun; Liu, 2019).

Figura 9. a) Diagrama de Nyquist e b) Circuito equivalente de Randles.

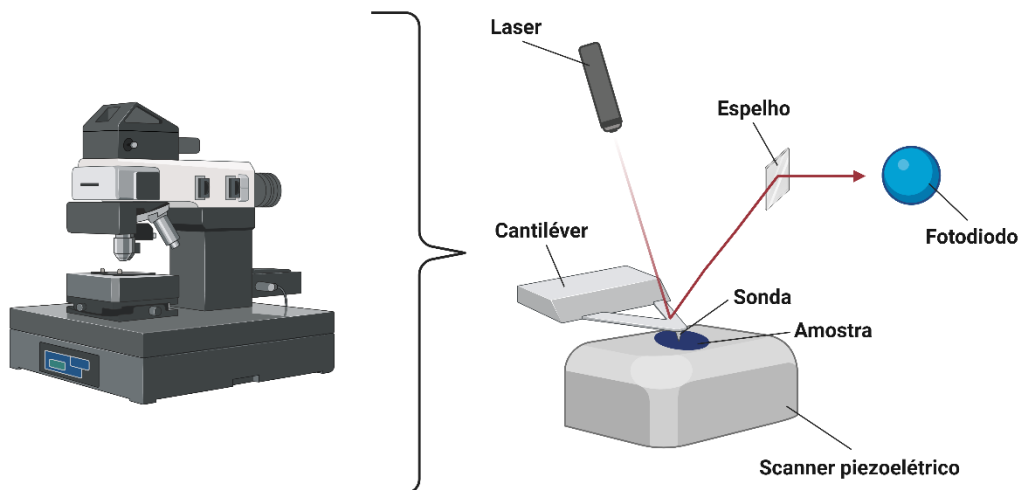


Fonte: Próprio autor (2024).

2.9 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica amplamente utilizada para a caracterização topográfica bidimensional ou tridimensional de superfícies em escala nanométrica. Essa ferramenta é valiosa no processo de caracterização de biossensores, permitindo a observação de alterações no relevo da superfície ao longo das diferentes etapas de montagem do sistema. Essa técnica é composta por um cantilever com uma ponta ou sonda integrada, que detecta as características da superfície; um fotodiodo, que recebe um feixe de laser refletido pelo cantilever; e um scanner piezoelétrico, responsável pelo posicionamento tridimensional da amostra, como ilustrado na Figura 10. Dessa maneira, a sonda integrada ao cantilêver escaneia a superfície da amostra por meio de forças interativas de atração ou repulsão e, ao final da varredura vertical e horizontal da superfície é processada uma imagem topográfica tridimensional (Cheong *et al.*, 2019; Zhou; Du, 2022).

Figura 10. Representação esquemática da microscopia de força atômica (AFM).



Fonte: Próprio autor (2024).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um biossensor nanoestruturado baseado em filme de polipirrol, nanopartículas de ouro e lectina para identificar diferentes tipos de arboviroses.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar as propriedades do filme de polipirrol, obtido diretamente sob superfície metálicas através de síntese eletroquímica, e de AuNps;
- Avaliar estratégias para ancoragem covalente, interação físico-química e função biológica da lectina (*Bandeiraea simplicifolia*) e vírus inativado;
- Caracterizar a plataforma biossensora por meio das técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE);
- Avaliar os diagramas de Nyquist e determinar o circuito equivalente de Randles, para obter o comportamento interfacial da resistência de transferência de cargas (R_{CT}), resistência da solução eletrolítica (R_S), impedância de Warburg (ZW) e capacitância da dupla camada elétrica (CDL);
- Avaliar o desempenho do biossensor em relação às amostras de diferentes tipos de arbovírus por meio de caracterização eletroquímica para obter dados estatísticos como reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade;
- Analisar a estrutura e morfologia do biossensor por meio de microscopia de força atômica (AFM).

4. METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

Pirrol, cisteamina (Cys), ácido tetra-cloroáurico tri-hidratado (HAuCl_4), colesterol, lactose, glicogênio, alfafetoproteína, ácido ascórbico e glutaraldeído (GLU) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich. Ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, glicina e ácido clorídrico (HCl) foram obtidos pela VETEC (Brasil). As amostras de vírus inativados foram fornecidos pelo Laboratório de Virologia e Terapia Experimental – Instituto Aggeu Magalhães (LAVITE – IAM). Em todas as etapas foi utilizada água deionizada ultrapura processada pelo sistema de purificação Milli-Q (Billerica, EUA).

4.2 SÍNTESE DO FILME POLIMÉRICO DE POLIPIRROL

O polipirrol foi sintetizado através do processo de dopagem utilizando ácido clorídrico. Inicialmente, uma solução aquosa de HCl (0,5 M) foi preparada. Em seguida, essa solução foi misturada com 31 μL de monômeros de pirrol para a síntese de PPy. A mistura foi submetida a um banho ultrassônico para assegurar completa homogeneização. Para deposição do filme de PPy na superfície metálica do eletrodo de trabalho, utilizou-se a técnica de voltametria cíclica (VC) em uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos, imersos em 15 mL da solução de PPy. A voltametria foi realizada em 10 ciclos, com potencial variando de -0,4 a +1 V e uma taxa de varredura de 100mV.s^{-1} (Avelino *et al.*, 2021).

4.3 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO

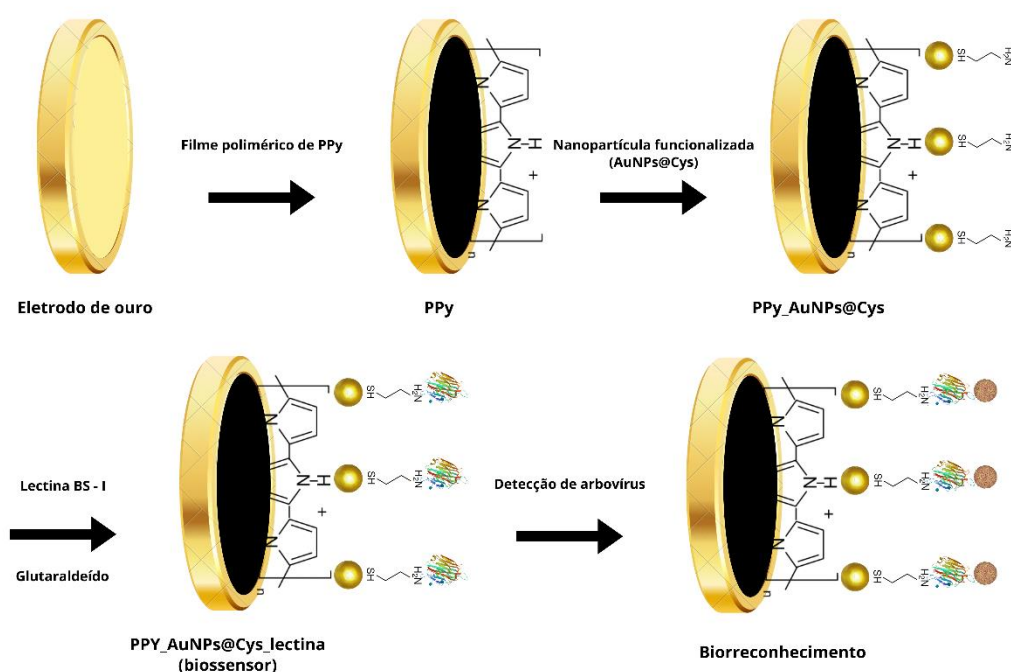
A síntese das nanopartículas de ouro (AuNps) foi realizada seguindo a metodologia de Lévy *et al.*, 2004. As AuNPs foram obtidas pela redução do HAuCl_4 (1 mM) em citrato tribásico (38,9 mM). Para obtenção das nanopartículas, 100 mL da solução de HAuCl_4 foram misturados com 10 mL da solução de citrato, e a mistura foi agitada por 10 minutos a 100 °C. Ao término desse período, o aquecimento foi

interrompido, e a solução continuou sob agitação até alcançar 24 °C (Lévy *et al.*, 2004).

4.4 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO ELETRODO PARA OBTENÇÃO DA PLATAFORMA BIOSSENSORA

Como representado na figura 11, um eletrodo de trabalho de disco de ouro ($\varnothing = 2\text{mm}$) foi utilizado para montagem do sistema sensor. A princípio, o eletrodo de trabalho foi suavemente polido em lixa à base de água e em feltro com suspensão de alumina seguido de banho ultrassônico. Em seguida, o eletrodo foi imerso na solução de pirrol para eletropolimerização do filme condutor na superfície metálica. Após a polimerização e obtenção do filme de PPy, as AuNPs foram aplicadas na interface do eletrodo até a completa secagem e depois, Cys na concentração de 50 mM foi adicionada para funcionalizar quimicamente as nanopartículas. Por fim, o agente conjugador glutaraldeído (5%) foi utilizado para a imobilização covalente da lectina *Bandeiraea simplicifolia* por meio de ligação amina-amina.

Figura 11. Representação esquemática da construção da plataforma biossensora nanoestruturada.



Fonte: Próprio autor (2024).

4.5 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO COM ARBOVÍRUS

A avaliação da plataforma nanoestruturada com amostras de vírus inativados de DENV (1-4), ZIKV, CHIKV e YFV foi preparada em diferentes diluições (1:10, 1:20, 1:30, 1:40 e 1:50). O eletrodo funcionalizado foi exposto a amostras de arbovírus durante 10 minutos, seguido de lavagem com água deionizada para remoção do analito não aderido e, por fim, submetido à análise eletroquímica em triplicata.

4.6 DESEMPENHO ANALÍTICO DO BIOSENSOR ATRAVÉS DE TESTE DE SELETIVIDADE E MOLÉCULAS INTERFERENTES

Para avaliar o desempenho analítico do biossensor em relação à seletividade, o eletrodo funcionalizado foi exposto a soluções de alfa-fetoproteína, lactose e glicogênio, todas na concentração de 1ng/mL. Além disso, para avaliar a especificidade, a plataforma biossensora foi testada com moléculas interferentes, como ácido ascórbico, colesterol e glicina, também na concentração de 1ng/mL.

4.7 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E TOPOGRÁFICA

4.7.1 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A análise topográfica do biossensor foi realizada antes e após a imobilização dos arbovírus, utilizando um microscópio de força atômica (AFM) SPM-9700 (Shimadzu, Japão). As imagens de AFM foram obtidas em modo não contato, empregando um cantiléver de silício, em uma área de varredura de 5 x 5 μm^2 , com resolução lateral de 512 x 512 pixels, e processadas pelo *software* Gwyddion. Todos os registros morfológicos foram realizados à temperatura ambiente (24 ± 1 °C).

4.8 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

As análises eletroquímicas foram realizadas por meio do potenciostato/galvanostato Autolab (PGSTAT 128N), controlado pelo *software* NOVA 1.11. O ferro-ferricianeto de potássio (10mM) foi utilizado como sonda redox na célula

eletroquímica convencional constituída por três eletrodos: um eletrodo de referência (ER) Ag/AgCl, um contra eletrodo (CE) de fio de platina e um eletrodo de trabalho (ET) de disco de ouro. A VC foi realizada com potencial entre -0,3 e +0,8 V com taxa de varredura de 50 mV.s⁻¹. E as caracterizações de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram registrados com uma faixa de frequência de 100 mHz a 100kHz e um potencial de amplitude de 10 mV. Todos os gráficos produzidos para as análises eletroanalíticas, foram processados pelo programa OriginPro8.

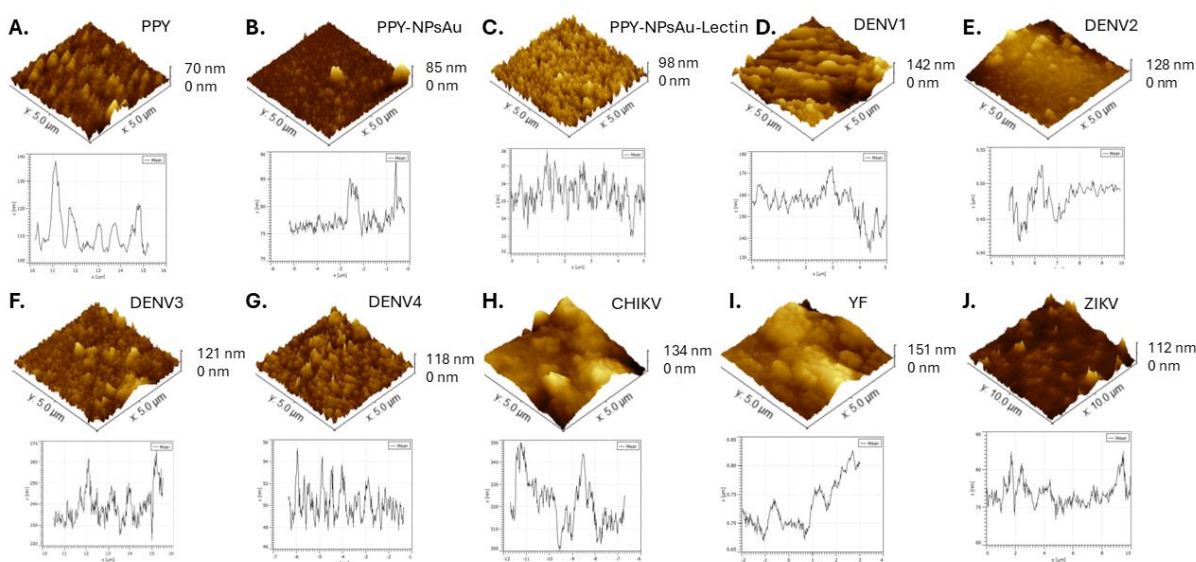
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA E MORFOLÓGICA

5.1.1 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

As características morfológicas do biossensor desenvolvido foi avaliada por meio de Microscopia de Força Atômica, como mostrado na Figura 12. Essa abordagem permitiu a avaliação de todas as etapas de construção da plataforma sensora e a sua interação com os arbovírus.

Figura 12. Imagens tridimensionais referente a morfologia do biossensor obtidas pela AFM. a) PPy, b) PPy-AuNPs, c) PPy-AuNPs-Lectina, d) DENV1, e) DENV2, f) DENV3, g) DENV4, h) CHIKV, i) YFV e j) ZIKV.



Fonte: Próprio autor (2024).

Uma cobertura heterogênea foi obtida para os sistemas PPy (Fig. 12a), PPy-AuNPs (Fig. 12b) e PPy-AuNPs-Lectina (Fig. 12c), com altura média de 70nm, 85nm e 95nm, respectivamente. A topografia que corresponde ao filme polimérico (Fig. 12a), apresenta pequenas saliências heterogêneas que indicam aglomerados de monômeros lineares de PPy (Marandi *et al.*, 2010). Após a imobilização da lectina, nota-se a acentuação da rugosidade na superfície, que corrobora com aumento de 18nm na altura (Sá *et al.*, 2020). A análise de performance do biossensor é demonstrada na Figura 12d-j. Os resultados de AFM mostram perfis de rugosidade diferentes para cada tipo de arbovírus, onde a lectina foi capaz de interagir com todos

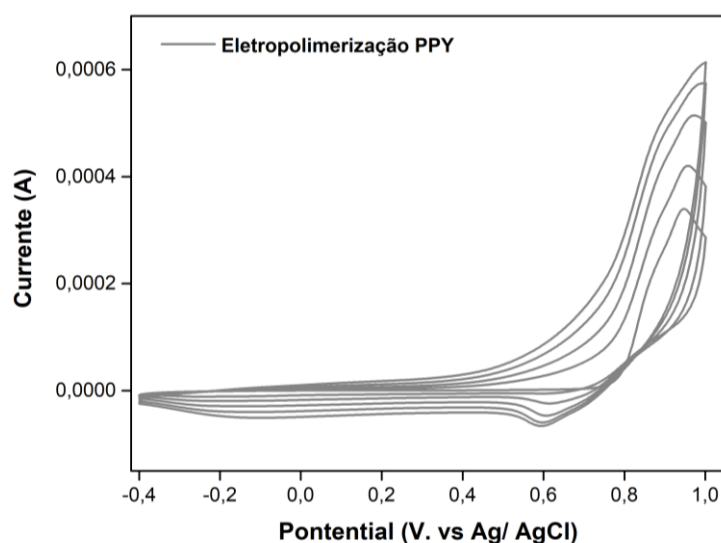
os analitos devido a sua especificidade para o reconhecimento de glicoproteínas virais (Simão *et al.*, 2020). Entretanto, observa-se interação mais intensa com YFV (151nm), por causa da maior disponibilidade de galactose presentes nos sítios glicosilados (Ishida *et al.*, 2023).

5.2 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO BIOSENSOR

5.2.1 ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO FILME POLIMÉRICO DE POLIPIRROL

A eletropolimerização é baseada na aplicação de um potencial elétrico variado, resultando na oxidação do monômero de pirrol e no acoplamento de cátions monoméricos e oligoméricos, ocasionando a formação de um filme polimérico sobre a superfície metálica. Essa técnica permite a variação de parâmetros como corrente, potencial e tempo de varredura, que vai influenciar na espessura do filme e, consequentemente, manipular as propriedades do biossensor de acordo com o analito de interesse (A. de Almeida; de F. Gimenez, 2022; Zhang *et al.*, 2023). A eletrossíntese de PPy foi ilustrada na Figura 13. A faixa de potencial fixa de -0,4 a +1 V, garantiu a formação de picos de redução e oxidação que, ao final de dez ciclos, culminou na formação de um filme de cor preta.

Figura 13. Voltamograma cíclico obtido durante a eletropolimerização de 10 ciclos de polipirrol.

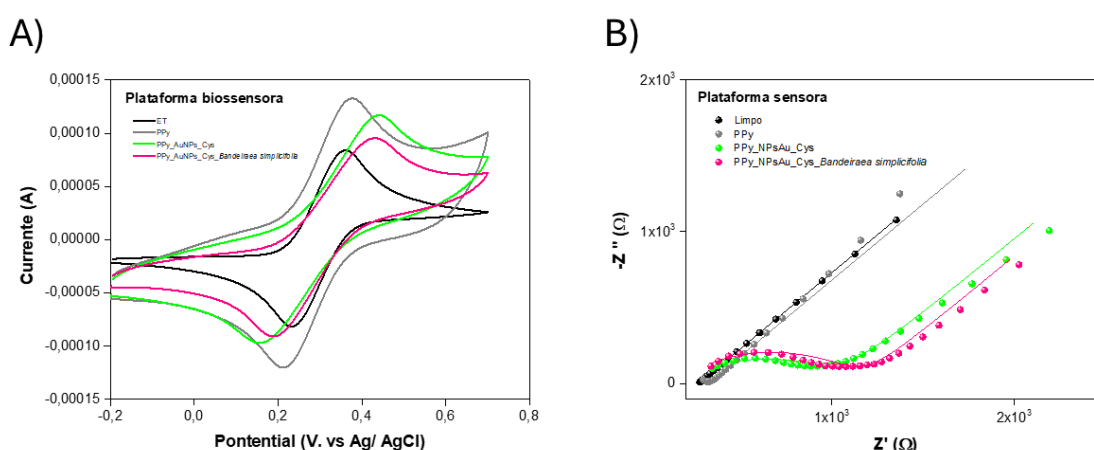


Fonte: Próprio autor (2024).

5.2.2 CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR NANOESTRUTURADO

Técnicas eletroquímicas voltamétricas e impedimétricas foram utilizadas para analisar cada etapa de modificação na superfície do eletrodo para a formação do sensor biológico, como demonstrado na Figura 14.

Figura 14. Análises de VC (a) e EIE (b) indicando a mudança do comportamento eletroquímico do biossensor.



Fonte: Próprio autor (2024).

Através do voltamograma (Fig. 14a), observa-se a alteração da resposta amperométrica total do eletrodo de ouro à medida que os materiais são adsorvidos. Em vista disso, é possível verificar uma redução ou aumento dos picos anódicos e catódicos, refletido pela perturbação da passagem de corrente referente ao processo de oxi-redução, o que confirma a imobilização dos componentes na superfície eletrolítica (Rafiee *et al.*, 2024). Em adição, o gráfico de Nyquist do estudo de impedância eletroquímica (Fig. 14b), demonstra a alteração do R_{ct} , que depende da propriedade eletrocondutora dos elementos do biossensor (Rahaie; Noroozi, 2019).

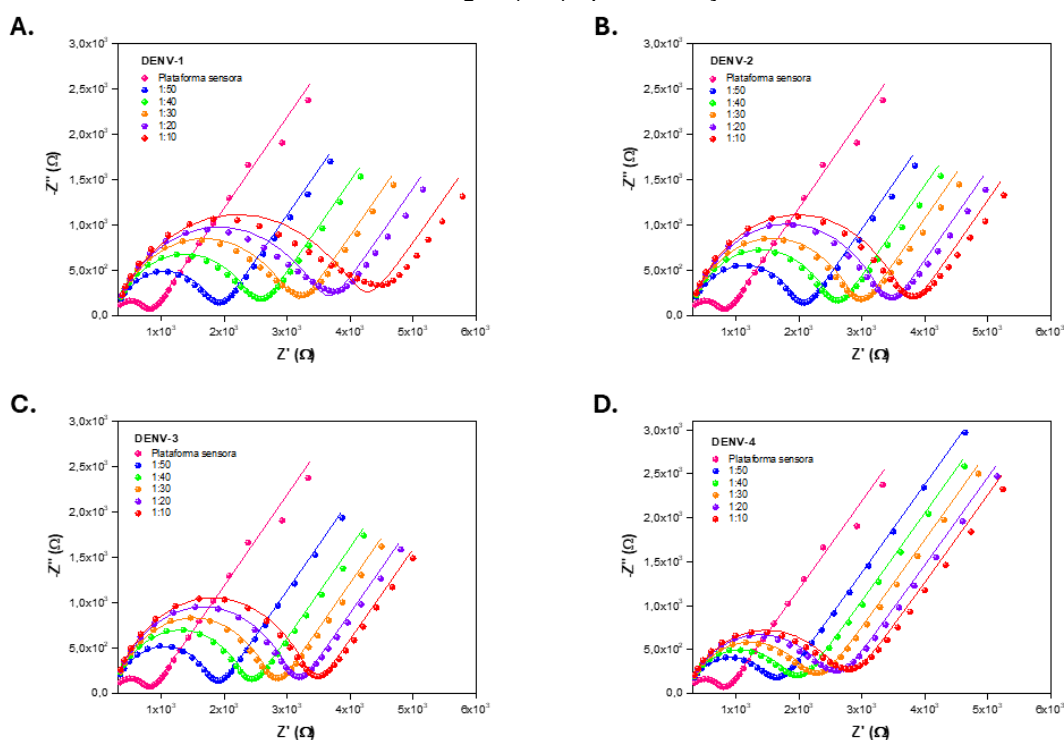
Após a eletropolimerização do PPy (linha cinza), houve a elevação da densidade da resposta amperométrica nos dados voltamétricos e a resposta impedimétrica não apresentou R_{ct} elevado devido ao aumento da condutividade proporcionada pela característica físico-química do polímero (Jain; Jadon; Pawaiya, 2017). As AuNPs funcionalizadas quimicamente com Cys (linha verde) através da ligação amina-tiol, após adsorção reduziu os picos de correntes na VC. Este processo revelou características resistivas correspondentes a sua propriedade semicondutora (Avelino *et al.*, 2021). A imobilização da lectina BS-I (linha rosa) no sistema

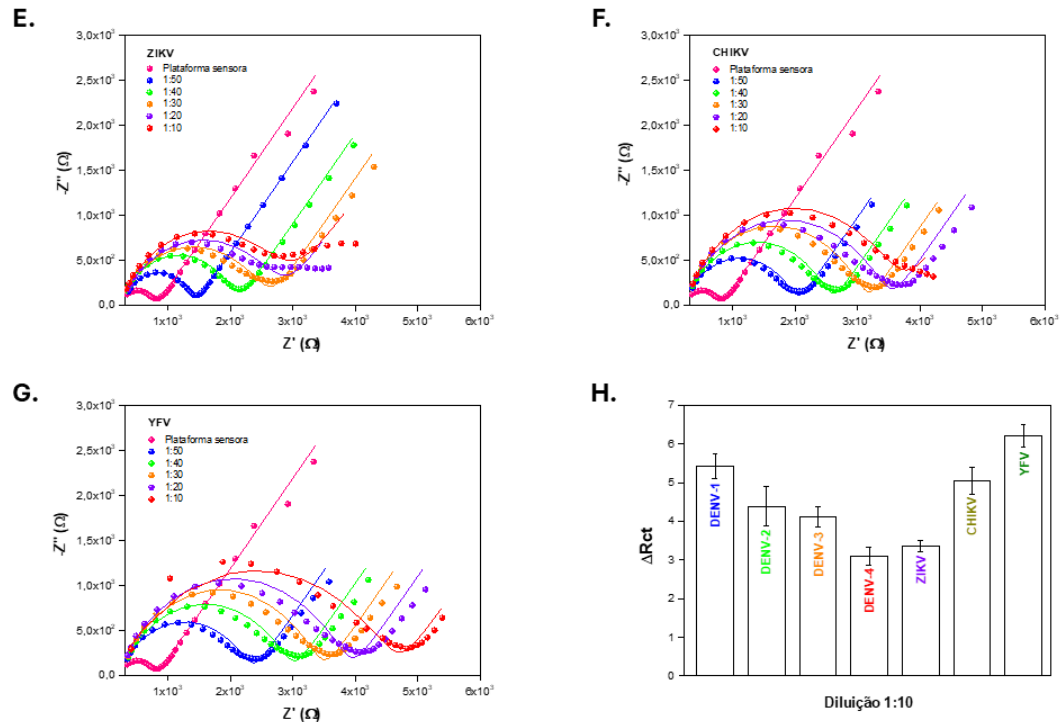
nanoestruturado PPy-AuNPs@Cys resultou na redução do sinal de corrente gerada nos dados voltamétricos. Para garantir o acoplamento da lectina na plataforma sensora, utilizou-se o agente bioconjugador glutaraldeído a fim de favorecer a ligação covalente intramolecular amina-amina via formação de base de Schiff entre o eletrodo modificado e a proteína (Ionescu, 2022).

5.2.3 DESEMPENHO ANALÍTICO DO BIOSENSOR

O desempenho do biossensor foi avaliado pela exposição da plataforma em diferentes amostras arbovirais, em diluições crescentes (1:50 – 1:10). Com o objetivo de manter a carga superficial da célula viral neutra, as espécies de arboviroses foram preparadas em PBS (10 mM, pH 7,4). A técnica de EIE foi empregada para investigar as interações interfaciais relacionadas com os eventos de biorreconhecimento. Os resultados são avaliados a partir da formação de um semicírculo característico, onde é possível explorar as alterações da resistência à transferência de cargas (Saxena; Srivastava, 2019). As respostas impedimétricas referente a determinação dos arbovírus está apresentada na Figura 15.

Figura 15. Gráficos impedimétricos referente a detecção dos diferentes arbovírus (a-g) e variação na resistência à transferência de cargas (Rct) após detecção de diferentes arboviroses (h).





Fonte: Próprio autor (2024).

Ao analisarmos os gráficos de impedância, nota-se que o biossensor detectou os tipos de arbovírus, apresentando pequenas diferenças nos perfis de biorreconhecimento, observado pela variação e aumento no diâmetro do semicírculo. As arboviroses compartilham o mesmo domínio de *N*-glicosilação que envolve a ligação de carboidratos à asparagina (Asn – 153). Este domínio é integrado pelos glicanos complexos de manose, galactose, ácido siálico e N-acetilglucosamina (Carbaugh; Lazear, 2020). Por esse motivo, a lectina BS-I foi capaz de identificar todos os arbovírus propostos. A partir dos dados de Rct, observados na Figura 15h, ressalta-se que o biossensor mostrou uma resposta mais significativa para o arbovírus da febre amarela. Além do domínio Asn – 153, a literatura afirma que algumas cepas de YFV possuem glicosilações nas posições Asn – 13 e Asn – 29 (Ishida *et al.*, 2023), que possivelmente aumenta a disponibilidade de unidades de galactose no envelope viral da YFV, consequentemente, aumentando sua interação com a lectina específica para galactose. O padrão de resposta obtido do sistema sensor (Fig. 15h), em termos de bioafinidade, foi YFV (6,21 kΩ) > CHIKV (5,06 kΩ) > DENV1 (5,43 kΩ) > DENV2 (4,39 kΩ) > DENV3 (4,11 kΩ) > ZIKV (3,37 kΩ) > DENV4 (3,10 kΩ).

O circuito de Randles foi utilizado para extrair os dados experimentais da impedância referente ao circuito da plataforma e das etapas de biorreconhecimento com os diferentes tipos de arbovírus, como está representado na tabela 1. Os resultados indicam que a plataforma desenvolvida é capaz de detectar todos os setes analitos em diferentes concentrações, seguindo o crescimento gradativo dos valores de R_{ct} .

Tabela 1: Dados dos elementos do circuito equivalente a partir dos resultados de impedância.

Eletrodo modificado	Diluição	CPE (μF)	R_{CT} ($K\Omega$)	$R_s(K\Omega)$	$W(\mu F)$
Plataforma	-	1.14	0.604	0.203	330
DENV-1	1:10	0.833	3.88	0.161	574
	1:20	0.733	3.23	0.177	558
	1:30	0.676	2.76	0.186	548
	1:40	0.690	2.16	0.195	519
	1:50	0.916	1.55	0.198	484
DENV-2	1:10	0.366	3.25	0.194	591
	1:20	0.377	2.91	0.191	525
	1:30	0.491	2.48	0.192	522
	1:40	0.742	2.18	0.187	505
	1:50	0.543	1.67	0.202	469
DENV-3	1:10	0.209	3.08	0.187	542
	1:20	0.219	2.81	0.187	514
	1:30	0.278	2.46	0.186	503
	1:40	0.392	2.03	0.179	464
	1:50	0.541	1.53	0.185	430
DENV-4	1:10	0.873	2.48	0.138	349
	1:20	0.849	2.26	0.148	337
	1:30	0.948	1.97	0.150	330
	1:40	1.13	1.68	0.148	326
	1:50	1.16	1.35	0.162	289
	1:10	0.409	2.7	0.154	265

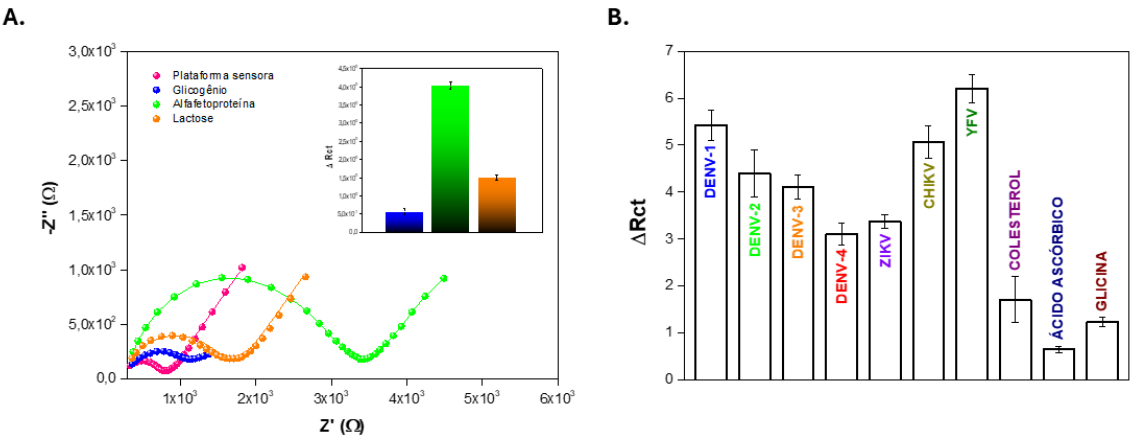
ZIKV	1:20	0.825	2.61	0.133	440
	1:30	0.923	2.29	0.161	518
	1:40	0.616	1.73	0.201	464
	1:50	0.564	1.03	0.256	387
CHIKV	1:10	0.604	3.66	0.149	523
	1:20	0.560	3.22	0.155	728
	1:30	0.386	2.89	170	768
	1:40	0.613	2.25	0.176	736
	1:50	0.857	1.73	0.170	733
YFV	1:10	0.664	4.36	0.128	690
	1:20	0.485	3.72	0.165	773
	1:30	0.459	3.07	0.170	740
	1:40	0.815	2.63	0.177	722
	1:50	1.04	2.04	0.168	716

5.2.4 TESTE DE SELETIVIDADE E MOLÉCULAS INTERFERENTES

Com o objetivo de avaliar a seletividade da lectina *Bandeiraea* para sítios glicosilados compostos por galactose e N-acetilgalactosamina, o biossensor foi testado com soluções de alfafetoproteína, glicogênio e lactose. Como esperado, o sensor apresentou acentuada afinidade por alfafetoproteína, conforme observado na Figura 16a, devido a *N*-glicosilação em Asn – 251 composta por resíduos de galactose expostos (Liu *et al.*, 2024).

A interferência de moléculas não-alvo é uma limitação dos biossensores, pois compromete a precisão da detecção (Su *et al.*, 2023). Com base nisso, a plataforma nanoestruturada foi submetida à exposição de moléculas interferentes, como ácido ascórbico, glicina e colesterol. Os valores de Rct, apresentados na Figura 16b, indicam que o biossensor exibiu uma interação mínima com essas moléculas interferentes em comparação com as respostas obtidas para as arboviroses, comprovando sua elevada especificidade.

Figura 16. Resultados impedimétricos do teste de seletividade (a) e valores de Rct referente a interação do biossensor com os arbovírus e moléculas interferentes (b).



Fonte: Próprio autor (2024).

6. CONCLUSÃO

Um biossensor nanoestruturado foi desenvolvido, composto por um filme polimérico de polipirrol, nanopartículas de ouro funcionalizadas com cisteamina e lectina. O revestimento do filme condutor, combinado com as nanopartículas, aprimorou a capacidade de detecção do sensor biológico devido à amplificação do sinal elétrico. A lectina *Bandeiraea simplicifolia* foi utilizada como molécula de biorreconhecimento, devido a sua habilidade em reconhecer carboidratos presentes nas estruturas virais. A imobilização da lectina na plataforma sensora foi realizada por meio de ligações amina-amina entre a proteína e as nanopartículas de ouro. A construção do biossensor e a avaliação de sua interação com os analitos de interesse foram confirmadas por análises topográficas, utilizando microscopia de força atômica, e por técnicas eletroquímicas, como voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. Os dados impedimétricos mostraram que o biossensor detectou, de forma diferenciada, concentrações crescentes de vírus inativados dos quatro sorotipos da dengue (DENV 1-4), zika (ZIKV), chikungunya (CHIKV) e febre amarela (YFV), com uma interação mais expressiva para o último patógeno. Testes de seletividade e com moléculas interferentes também foram realizados, demonstrando a precisão e especificidade do biossensor, que se apresentou como um método confiável. O biossensor proposto mostra-se promissor para diagnóstico precoce e diferencial entre arboviroses, podendo ser utilizado como uma ferramenta complementar às técnicas convencionais. Futuramente, tem-se como objetivo continuar o estudo para aprimorar o biossensor com o uso de eletrodos flexíveis e descartáveis, para garantir mais praticidade na sua aplicação, além de realizar testes com amostras humanas para validação dos resultados obtidos.

REFERÊNCIAS

- A. DE ALMEIDA, Yslaine; DE F. GIMENEZ, Iara. Recent Advances in Polypyrrole Hydrogels: A Brief Review. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 587–603, 2022.
- ABRANTES-COUTINHO, Vanessa E. *et al.* Systematic review on lectin-based electrochemical biosensors for clinically relevant carbohydrates and glycoconjugates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 208, p. 112148, 2021.
- ALMEIDA, Lorena Sampaio; COTA, Ana Lídia Soares; RODRIGUES, Diego Freitas. Saneamento, Arboviroses e Determinantes Ambientais: impactos na saúde urbana. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s. l.], v. 25, n. 10, p. 3857–3868, 2020.
- AVELINO-SILVA, Vivian lida; RAMOS, Jessica Fernandes. Arboviroses e políticas públicas no Brasil / Arboviruses and public policies in Brazil. **REVISTA CIÊNCIAS EM SAÚDE**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 1–2, 2017.
- AVELINO, Karen Y.P.S. *et al.* Flexible sensor based on conducting polymer and gold nanoparticles for electrochemical screening of HPV families in cervical specimens. **Talanta**, [s. l.], v. 226, p. 122118, 2021.
- BONA, Aida Pérez; *et al.* **El virus del dengue síntomas y cómo prevenirlo**. 1. ed. [S. l.]: Revista Sanitaria de Investigación, 2022. v. 3
- CAMPOS, Estefânia Vangelie Ramos *et al.* Recent Developments in Nanotechnology for Detection and Control of Aedes aegypti-Borne Diseases. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 8, 2020.
- CARBAUGH, Derek L.; LAZEAR, Helen M. Flavivirus Envelope Protein Glycosylation: Impacts on Viral Infection and Pathogenesis. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 94, n. 11, 2020.
- CAVADA, Benildo Sousa *et al.* Comprehensive review on Caelsalpinioideae lectins: From purification to biological activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 162, p. 333–348, 2020.
- CESEWSKI, Ellen; JOHNSON, Blake N. Electrochemical biosensors for pathogen detection. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 159, p. 112214, 2020.
- CHEONG, Ling-Zhi *et al.* Lab on a tip: Applications of functional atomic force microscopy for the study of electrical properties in biology. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 99, p. 33–52, 2019.
- CHIRATHAWORN, Chintana; CHANSAENROJ, Jira; POOVORAWAN, Yong. Cytokines and Chemokines in Chikungunya Virus Infection: Protection or Induction of Pathology. **Pathogens**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 415, 2020.
- COÊLHO, Bernadete Perez *et al.* Atenção primária no contexto da epidemia zika e da síndrome congênita da zika em Pernambuco, Brasil: contexto, vínculo e cuidado. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 861–870, 2022.

COMITÉ INTERNACIONAL DE TAXONOMIA DE VÍRUS - ICTV. **Família: Togaviridae.** [S. l.], 2019. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/togaviridae/togaviridae>. Acesso em: 31 ago. 2024.

DAHIYA, Nisha *et al.* ZIKV: Epidemiology, infection mechanism and current therapeutics. **Frontiers in Tropical Diseases**, [s. l.], v. 3, 2023.

DE OLIVEIRA FIGUEIREDO, Poliana *et al.* Re-Emergence of Yellow Fever in Brazil during 2016–2019: Challenges, Lessons Learned, and Perspectives. **Viruses**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 1233, 2020.

DEEBANSOK, Siraprapha *et al.* Capacitive tendency concept alongside supervised machine-learning toward classifying electrochemical behavior of battery and pseudocapacitor materials. **Nature Communications**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1133, 2024.

DINIZ, Vanessa Álvaro; GUEDES JUNIOR, Daniel Da Silva; BRANDÃO, Marcelo Luiz Lima. VACINA FEBRE AMARELA (ATENUADA): A EVOLUÇÃO DAS METODOLOGIAS DE DOSEAMENTO VIRAL PARA O CONTROLE DA QUALIDADE. **Revista Científica do UBM**, [s. l.], p. 1–17, 2024.

DUARTE, Jonatas Lobato *et al.* Nanotechnology as a tool for detection and treatment of arbovirus infections. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 216, p. 105848, 2021.

ELGRISHI, Noémie *et al.* A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, [s. l.], v. 95, n. 2, p. 197–206, 2018.

FISCHER, Carlo *et al.* Challenges towards serologic diagnostics of emerging arboviruses. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 27, n. 9, p. 1221–1229, 2021.

FRANCO, Odair. **Hitória da febre amarela no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Departamento Nacional de Endemias Rurais Ministério da Saúde, 1969.

FREPPEL, Wesley *et al.* Pathogenicity and virulence of chikungunya virus. **Virulence**, [s. l.], v. 15, n. 1, 2024.

GAUTAM, Ajay Kumar *et al.* Legume lectins: Potential use as a diagnostics and therapeutics against the cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 142, p. 474–483, 2020.

GERMAN, Natalija; RAMANAVICIUS, Arunas; RAMANAVICIENE, Almira. Amperometric Glucose Biosensor Based on Electrochemically Deposited Gold Nanoparticles Covered by Polypyrrole. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 1267–1277, 2017.

GHARBI, Oumaïma *et al.* Revisiting cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy analysis for capacitance measurements. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 343, p. 136109, 2020.

GIANCIECCHI, Elena *et al.* Yellow Fever: Origin, Epidemiology, Preventive Strategies and Future Prospects. **Vaccines**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 372, 2022.

GIMÉNEZ-RICHARTE, Ángel; ARBONA CASTAÑO, Cristina; RAMOS-RINCÓN, José-Manuel. Arbovirus - A threat to transfusion safety in Spain: A narrative review. **Medicina Clínica (English Edition)**, [s. l.], v. 163, n. 3, p. 134–142, 2024.

GIRALDO, Maria I.; GONZALEZ-OROZCO, Maria; RAJSBAUM, Ricardo. Pathogenesis of Zika Virus Infection. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 181–203, 2023.

GOH, Vanessa Shi Li; MOK, Chee-Keng; CHU, Justin Jang Hann. Antiviral Natural Products for Arbovirus Infections. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 12, p. 2796, 2020.

GÓMEZ, Marcela *et al.* Influence of dengue virus serotypes on the abundance of *Aedes aegypti* insect-specific viruses (ISVs). **Journal of Virology**, [s. l.], v. 98, n. 1, 2024.

HAO, Lu *et al.* Polypyrrole Nanomaterials: Structure, Preparation and Application. **Polymers**, [s. l.], v. 14, n. 23, p. 5139, 2022.

HARAPAN, Harapan *et al.* Dengue: A Minireview. **Viruses**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 829, 2020.

HUA, Zheng *et al.* Recent advances in gold nanoparticles-based biosensors for food safety detection. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 179, p. 113076, 2021.

ICTV - COMITÉ INTERNACIONAL DE TAXONOMIA DE VÍRUS. **Família: Flaviviridae**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/flaviviridae/flaviviridae>. Acesso em: 1 set. 2024.

IONESCU, Rodica Elena. Use of Cysteamine and Glutaraldehyde Chemicals for Robust Functionalization of Substrates with Protein Biomarkers—An Overview on the Construction of Biosensors with Different Transductions. **Biosensors**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 581, 2022.

ISHIDA, Kotaro *et al.* N-linked glycosylation of flavivirus E protein contributes to viral particle formation. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 19, n. 10, p. e1011681, 2023.

JAIN, Rajeev; JADON, Nimisha; PAWAIYA, Archana. Polypyrrole based next generation electrochemical sensors and biosensors: A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 97, p. 363–373, 2017.

KATOCH, Rajan; TRIPATHI, Ankur. Research advances and prospects of legume lectins. **Journal of Biosciences**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 104, 2021.

KAYA, Hüseyin Oğuzhan *et al.* Pathogen detection with electrochemical biosensors: Advantages, challenges and future perspectives. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 882, p. 114989, 2021.

KHONGWICHIT, Sarawut *et al.* Chikungunya virus infection: molecular biology, clinical characteristics, and epidemiology in Asian countries. **Journal of Biomedical Science**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 84, 2021.

KRIL, Vasiliya *et al.* New Insights into Chikungunya Virus Infection and Pathogenesis.

Annual Review of Virology, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 327–347, 2021.

KUMALASARI, Meiyanti Ratna; ALFANAAR, Roki; ANDREANI, Agustina Sus. Gold nanoparticles (AuNPs): A versatile material for biosensor application. **Talanta Open**, [s. l.], v. 9, p. 100327, 2024.

LAMB, Jamie E.; SHIBATA, Satoaki; GOLDSTEIN, Irwin J. Purification and Characterization of *Griffonia simplicifolia* Leaf Lectins. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 879–887, 1983.

LÉVY, Raphaël *et al.* Rational and Combinatorial Design of Peptide Capping Ligands for Gold Nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 126, n. 32, p. 10076–10084, 2004.

LI, Sabrina L. *et al.* Mapping environmental suitability of Haemagogus and Sabethes spp. mosquitoes to understand sylvatic transmission risk of yellow fever virus in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. e0010019, 2022.

LICÍNIO, Christiane O. L.; AYRES, Flávio M. The use of real time PCR for arboviruses diagnostics: integrative review. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s. l.], v. 57, 2021.

LIU, Kun *et al.* Structural characteristics of alpha-fetoprotein, including N-glycosylation, metal ion and fatty acid binding sites. **Communications Biology**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 505, 2024.

MA, Ziting *et al.* Lateral flow immunoassay (LFIA) for dengue diagnosis: Recent progress and prospect. **Talanta**, [s. l.], v. 267, p. 125268, 2024.

MAGALHAES, Tereza *et al.* The Endless Challenges of Arboviral Diseases in Brazil. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 75, 2020.

MAGAR, Hend S.; HASSAN, Rabeay Y. A.; MULCHANDANI, Ashok. Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications. **Sensors**, [s. l.], v. 21, n. 19, p. 6578, 2021.

MALAVIGE, Gathsaurie Neelika; OGG, Graham S. Molecular mechanisms in the pathogenesis of dengue infections. **Trends in Molecular Medicine**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 484–498, 2024.

MARANDI, M. *et al.* AFM study of the adsorption of pyrrole and formation of the polypyrrole film on gold surface. **Electrochemistry Communications**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 854–858, 2010.

MARTINS, Clara Fernanda Ribeiro *et al.* ANÁLISE DA HISTÓRIA NATURAL DA CHIKUNGUNYA E ABORDAGEM DA DOENÇA NA ATENÇÃO PRIMÁRIA À SAÚDE. **Centro de Pesquisas Avançadas em Qualidade de Vida**, [s. l.], v. 16, n. V16N1, p. 1, 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue**. [S. l.], 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dengue>. Acesso em: 1 set.

2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Painel de Monitoramento das Arboviroses - Dengue**. [S. l.], 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti/monitoramento-das-arboviroses>. Acesso em: 19 ago. 2024.

MONTEIRO MOY, Karen *et al.* *Aedes albopictus* Skuse, 1884 (Diptera: Culicidae) and associated culicidae in anthropised areas of Belém-PA (Brazil), a municipality in eastern Amazonia. **Anales de Biología**, [s. l.], n. 46, p. 7–17, 2024.

MORALES, Ivonne *et al.* Diagnostic performance of anti-Zika virus IgM, IgAM and IgG ELISAs during co-circulation of Zika, dengue, and chikungunya viruses in Brazil and Venezuela. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. e0009336, 2021.

MUNDIM-POMBO, Ana Paula Miranda *et al.* *Aedes aegypti*: egg morphology and embryonic development. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 531, 2021.

MUSTAFA, M.S. *et al.* Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 67–70, 2015.

NARESH, Varnakavi.; LEE, Nohyun. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. **Sensors**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 1109, 2021.

OGUNLADE, Samson T. *et al.* A Review: Aedes-Borne Arboviral Infections, Controls and Wolbachia-Based Strategies. **Vaccines**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 32, 2021.

OLIVEIRA, GEL *et al.* DENGUE: UMA VISÃO DO PANORÂMA ATUAL. *In: DOENÇAS EMERGENTES E REEMERGENTES: HISTÓRICO, CONCEITOS E CUIDADOS EM PESQUISA - VOLUME 1*. [S. l.]: Editora Científica Digital, 2024. p. 17–29.

OSCAR JÚNIOR, Antonio Carlos; DE ASSIS MENDONÇA, Francisco. Climate change and risk of arboviral diseases in the state of Rio de Janeiro (Brazil). **Theoretical and Applied Climatology**, [s. l.], v. 145, n. 1–2, p. 731–745, 2021.

PEREIRA, Geovana M. *et al.* Performance Evaluation of VIDAS® Diagnostic Assays Detecting Anti-Chikungunya Virus IgM and IgG Antibodies: An International Study. **Diagnostics**, [s. l.], v. 13, n. 13, p. 2306, 2023.

PIANTADOSI, Anne; KANJILAL, Sanjat. Diagnostic Approach for Arboviral Infections in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 58, n. 12, 2020.

PILZ, F.H.; KIELB, P. Cyclic voltammetry, square wave voltammetry or electrochemical impedance spectroscopy? Interrogating electrochemical approaches for the determination of electron transfer rates of immobilized redox proteins. **BBA Advances**, [s. l.], v. 4, p. 100095, 2023.

POLONIO, Carolina Manganeli; PERON, Jean Pierre Schatzmann. ZIKV Infection and miRNA Network in Pathogenesis and Immune Response. **Viruses**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 1992, 2021.

RAFIEE, Mohammad *et al.* Cyclic voltammetry and chronoamperometry: mechanistic tools for organic electrosynthesis. **Chemical Society Reviews**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 566–585, 2024.

RAHAIE, Mahdi; NOROOZI, Saman Khayat. A nanobiosensor based on graphene oxide and DNA binding dye for multi-microRNAs detection. **Bioscience Reports**, [s. l.], v. 39, n. 12, 2019.

REZAEI, Behzad; IRANNEJAD, Neda. Metal-based electrodes. *In*: **ELECTROCHEMICAL SENSORS**. [S. l.]: Elsevier, 2022. p. 51–78.

RIBEIRO, Marisa O. *et al.* Analytical and clinical performance of molecular assay used by the Brazilian public laboratory network to detect and discriminate Zika, Dengue and Chikungunya viruses in blood. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 101542, 2021.

RIBEIRO, Mário Sérgio *et al.* Índices larvais de *Aedes aegypti* e incidência de dengue: um estudo ecológico no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 37, n. 7, 2021.

SÁ, Sandra R. *et al.* Lectin-based impedimetric biosensor for differentiation of pathogenic candida species. **Talanta**, [s. l.], v. 220, p. 121375, 2020.

SACCHETTO, Livia *et al.* Re-emergence of yellow fever in the neotropics — quo vadis?. **Emerging Topics in Life Sciences**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 411–422, 2020.

SALLES, Tiago Souza *et al.* History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 264, 2018.

SAXENA, Rahul; SRIVASTAVA, Sudha. An insight into impedimetric immunosensor and its electrical equivalent circuit. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [s. l.], v. 297, p. 126780, 2019.

SAYLAN, Yeşeren *et al.* An Alternative Medical Diagnosis Method: Biosensors for Virus Detection. **Biosensors**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 65, 2019.

SENA, Brena F. *et al.* Advancing arbovirus diagnosis in Brazil: strengthening diagnostic strategies and public health data collection. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 103766, 2024.

SHARMA, Atul *et al.* Wearable Biosensors: An Alternative and Practical Approach in Healthcare and Disease Monitoring. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 748, 2021.

SICILIANO, Giulia *et al.* Beyond traditional biosensors: Recent advances in gold nanoparticles modified electrodes for biosensing applications. **Talanta**, [s. l.], v. 268, p. 125280, 2024.

SIMÃO, Estefani P. *et al.* Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection. **Talanta**, [s. l.], v. 208, p. 120338, 2020.

SINGH, Anoop *et al.* Recent Advances in Electrochemical Biosensors: Applications,

Challenges, and Future Scope. **Biosensors**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 336, 2021.

SOEK, Felipe José *et al.* Mudanças Climáticas e Infestação por *Aedes Aegypti* na Região Sul do Brasil. **Geo UERJ**, [s. l.], n. 42, 2023.

SOUSA, Sêmilly Suélen da Silva *et al.* Características clínicas e epidemiológicas das arboviroses epidêmicas no Brasil: Dengue, Chikungunya e Zika. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. e13518, 2023.

SU, Jiapeng *et al.* Highly Sensitive Multi-Channel Biosensor for Low-Interference Simultaneous Detection. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 246, 2023.

SUMDANI, Md Gulam *et al.* Recent advancements in synthesis, properties, and applications of conductive polymers for electrochemical energy storage devices: A review. **Polymer Engineering & Science**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 269–303, 2022.

SUN, Jianbo; LIU, Yuxin. Unique Constant Phase Element Behavior of the Electrolyte–Graphene Interface. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 923, 2019.

VARGHESE, Jano; DE SILVA, Imesh; MILLAR, Douglas S. Latest Advances in Arbovirus Diagnostics. **Microorganisms**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 1159, 2023.

VIEGAS, Leandro Luiz; VENTURA, Deisy de Freitas Lima; NUNES, João. Uma leitura crítica das emergências em saúde global: o caso da epidemia de zika de 2016. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s. l.], v. 27, n. 11, p. 4075–4084, 2022.

VIRALZONE. **Alphavirus**. [S. l.], 2024. Disponível em: https://viralzone.expasy.org/625?outline=all_by_species. Acesso em: 15 set. 2024.

VIRALZONE. **Orthoflavivirus**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: https://viralzone.expasy.org/24?outline=all_by_species. Acesso em: 15 set. 2024.

WANG, Shangshang *et al.* Electrochemical impedance spectroscopy. **Nature Reviews Methods Primers**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 41, 2021.

WU, Jie *et al.* Device integration of electrochemical biosensors. **Nature Reviews Bioengineering**, [s. l.], v. 1, n. 5, p. 346–360, 2023.

ZHANG, Xindan *et al.* Application of Polypyrrole-Based Electrochemical Biosensor for the Early Diagnosis of Colorectal Cancer. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 674, 2023.

ZHOU, Yuxiao; DU, Jing. Atomic force microscopy (AFM) and its applications to bone-related research. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 176, p. 52–66, 2022.