



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química
Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia



GABRIELA CHAGAS CÂMARA

Genossensor eletroquímico para detecção de Hantavírus baseado em eletrodos de carbono impresso com nanopartículas de cobre

Uberlândia

2022

GABRIELA CHAGAS CÂMARA

**GENOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE HANTAVÍRUS
BASEADO EM ELETRODOS DE CARBONO IMPRESSO COM
NANOPARTÍCULAS DE COBRE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia como exigência para obtenção do Título de Mestre em Química.

Áreas de Concentração: Ciência dos Materiais: Química do Estado Sólido e Eletroquímica Aplicada

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Graci Brito Madurro

Co-orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

UBERLÂNDIA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C172g
2022

Câmara, Gabriela Chagas, 1998-

Genossensor eletroquímico para detecção de hantavírus baseado em eletrodos de carbono impresso com nanopartículas de cobre [recurso eletrônico] / Gabriela Chagas Câmara. - 2022.

Orientadora: Ana Graci Brito Madurro.

Coorientador: João Marcos Madurro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.5033>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Química. I. Madurro, Ana Graci Brito, 1967-, (Orient.). II. Madurro, João Marcos, 1961-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU:54

André Carlos Francisco
Bibliotecário - CRB-6/3408



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 342, PPGQUI				
Data:	Vinte e nove de abril de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	17:50
Matrícula do Discente:	11922QMI005				
Nome do Discente:	Gabriela Chagas Câmara				
Título do Trabalho:	Genossensor eletroquímico para detecção de Hantavírus baseado em eletrodos de carbono impresso com nanopartículas de cobre				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Ciência dos Materiais: Química do Estado Sólido				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de biossensores para detecção de doenças				

Reuniu-se por meio de webconferência, Plataforma Teams, link <https://teams.microsoft.com/l/team/19%3aa7c4aec42830464eaf91d865e5a1f5d%40thread.tacv2/conversations?groupId=2a53e31d-5957-410f-adb1-1dd8d3869133&tenantId=cd5e6d23-cb99-4189-88ab-1a9021a0c451>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores Luís Antônio da Silva, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro; Elaine Kikuti e Renata Cristina e Lima, da Universidade Federal de Uberlândia e Ana Graci de Brito Madurro, orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dr(a). Ana Graci de Brito Madurro, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Graci Brito Madurro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/04/2022, às 17:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Cristina de Lima, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/04/2022, às 17:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elaine Kikuti, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/04/2022, às 17:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luís Antônio da Silva, Usuário Externo**, em 02/05/2022, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3553585** e o código CRC **A401F34A**.

Dedico esta Dissertação aos meus amados pais
José Eilson e Adriana, a minha irmã Júlia, fontes
infinitas de amor, compreensão e sabedoria.

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos primeiramente a Deus, que me abençoou com força, sabedoria, coragem e saúde necessária para que eu pudesse desenvolver esse projeto e concluir esse grande desafio.

Aos meus pais, Adriana e José Eilson, obrigada pelo apoio e incentivo nas minhas decisões e no meu crescimento permitindo minha constante evolução. Obrigada mãe por todos os cuidados e por tudo que faz diariamente por mim. Obrigada pai pelas viagens diárias e incansáveis semanalmente a Uberlândia para que assim eu pudesse desenvolver a pesquisa. Sou e serei eternamente grata por tudo que fez e fazem por mim, tenho muito orgulho e admiração por vocês.

A minha irmã, Júlia, minha gêmea sete anos mais nova, obrigada pelos momentos de brincadeiras e descontração, você foi essencial ao longo da minha jornada e serei eternamente grata por sempre me apoiar ao longo do caminho.

Ao meu namorado Felipe, obrigada pelo amor, paciência e tranquilidade em todos os dias; pelo conforto em dias difíceis e incentivo em dias de desânimo.

A toda a minha família, minhas avós Divina (in memorian) e Neci (in memorian), meu avô Almir, minhas tias, meus tios, primos, cunhada e sogros que sempre vibraram comigo. Obrigada pela força, pela paciência e pelos momentos de descontração.

Aos amigos de laboratório, Dayane pela constante paciência nas explicações e nos ensinamentos diários de bancada. Obrigada por ser um anjo nessa trajetória. Agradeço ao José Manuel, Anna Clara, Luiz Fernando, Paula, Jéssica e José Augusto pela serenidade nas explicações e pela ajuda nos procedimentos experimentais. Obrigada por toda ajuda durante a realização deste trabalho, vocês foram fundamentais nessa construção. Obrigada a todos os colegas do LAFIP por compartilharmos alegrias e angústias, mas sempre trabalhando juntos deixando os dias mais leves e tranquilos.

A minha orientadora, Ana Graci e ao professor João Marcos, pela confiança depositada em mim para a concretização deste trabalho. Obrigada por me atenderem sempre com paciência e compreensão nos momentos de dúvidas e na vivência pandemia e pós-graduação. Obrigada pelas discussões e ensinamentos que possibilitaram visões detalhadas ao longo da minha pesquisa possibilitando um crescimento no meu aprendizado. Expresso meu profundo respeito e admiração por me permitiram a realização da pesquisa conciliando

a outro trabalho.

A equipe do Colégio F.A.S.; obrigada pelos incentivos e compreensão com algumas ausências para o desenvolvimento da pesquisa. Obrigada a coordenação pela organização dos meus horários para que eu pudesse estar em Uberlândia nas minhas atividades acadêmicas, minha eterna gratidão.

Aos grandes mestres do IFTM, obrigada pelo incentivo e inspiração durante o período da graduação e por todos os momentos que vivemos ao longo do processo de aprendizagem da faculdade.

Aos amigos e companheiros de jornada da graduação e também da pós-graduação, Bárbara, Poliana, Taynara, Fernando e Marcus Vinicius, obrigada pelas vivências diárias, pela confiança, viagens e momentos inesquecíveis que passamos juntos. Sou grata pelo carinho, preocupação que sempre foram recíprocos e nos permitiram crescer independente da distância. Agradeço em especial a Babi e a Taynara, pela estadia em Uberlândia, pelo carinho e solidariedade por sempre me acolheram como irmã de vocês, obrigada pela amizade, apoio e incentivo.

A minha querida amiga Cynthia, obrigada pela amizade leve e divertida que construímos desde a disciplina de eletroquímica até nossa convivência diária. Sou grata por ter conhecido você, obrigada pelos ensinamentos enriquecedores dentro do meu trabalho, pela tranquilidade, pelo amor e por ser pessoa iluminada em nossas vidas.

Aos professores do Instituto de Química – UFU, pelos ensinamentos e pela grande contribuição em minha formação. Obrigada a todos que sempre me ajudaram na solução de problemas com muita paciência e disposição.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite em participar e colaborar neste trabalho levantando questões que permitiram explicações fundamentais para o desenvolvimento do trabalho.

*Devo cumprir, ó Deus, os votos que vos fiz e
vosoferto um sacrificio de louvor, porque
da morte arrancastes minha vida e não
deixastes os meus pés escorregarem, para
que eu ande na presença do Senhor, na
presença do Senhor naluz da vida*

Salmo Responsorial 56: 12-13

RESUMO

Neste estudo foi desenvolvido um genossensor eletroquímico na construção de eletrodos impressos à base de tinta de carbono (PCE), com eletrodeposição de nanopartículas de cobre para detecção indireta da corrente de pico do azul de metileno sobre alvo Hant 2. Os genossensores são classificados como biossensores eletroquímicos de DNA ou RNA, sendo dispositivos que apresentam vantagens como alta sensibilidade, seletividade e curto tempo de resposta. A infecção por Hantavírus é causada pela inalação de aerossóis provenientes da saliva, urina e fezes na população dos roedores específicos e infectados. Nas regiões da Ásia e da Europa, denominadas regiões do Velho Mundo, apresenta-se uma taxa de letalidade de até 15%, ocasionando a Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR). Enquanto que nas regiões do Novo Mundo (Américas), responsáveis por causar infecções nos países do continente americano, inclusive no Brasil com uma taxa de letalidade de 60%, ocasionando a Síndrome Cardiopulmonar do Hantavírus (HCPS). Os métodos diagnósticos para o Hantavírus, tais como o ELISA, PCR, IFA, se baseiam em métodos de alto custo com manipuladores treinados e capacitados para o desenvolvimento do trabalho em laboratórios com nível de segurança específico. Por meio do desenvolvimento do trabalho pode-se avaliar a resposta eletroquímica do alvo Hant 2 na plataforma PCE|CuNps destacando a transferência eletrônica e um aumento na área superficial quando comparada ao PCE sem modificações com CuNps. A detecção do vírus ocorreu a partir da imobilização da sonda Hant1 na plataforma PCE|CuNps utilizando o indicador de hibridização azul de metileno (MB) utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial. A partir da construção da curva analítica, o limite de detecção de 4,56 pg/mL e o limite de quantificação de 15,22 pg/mL no período de estabilidade de 7, 15, 21 e 30 dias. Considerando o desvio padrão, a estabilidade se mantém em 100% em 30 dias. O tempo de detecção pelo biossensor é de 45 minutos. Portanto, a plataforma desenvolvida evidenciou detecção rápida, com baixos limites de detecção e quantificação, sendo promissor para utilização em *point of care*.

Palavras-chave: Eletrodos impressos à base de tinta de carbono (PCE); Genossensor eletroquímico; Hantavírus; Nanopartículas de cobre; Azul de metileno.

ABSTRACT

The objective of this study describes the development of an electrochemical genosensor in the construction of carbon ink-based printed electrodes (PCE), with electrodeposition of copper nanoparticles for indirect detection of methylene blue peak current on Hant 2 target. Genosensors are classified as DNA or RNA electrochemical biosensors, they are devices that have advantages such as high sensitivity, selectivity and short-response time. The Hantavirus infection is caused by inhalation of aerosols from the saliva, urine and feces of specific and infected rodent populations. In the regions of Asia and Europe, called regions of the Old World, there is a lethality rate is up to 15%, causing Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS). At the same time, in the regions of the New World (Americas), responsible for causing infections in the countries of the American continent, including Brazil with a fatality rate of 60%, causing Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome (HCPS). The diagnostic methods for Hantavirus, such as ELISA, PCR, IFA, are based on high-cost methods with trained and qualified handlers for the development of work in laboratories with a specific safety level. The work developed evaluated the electrochemical response of the Hant 2 target on the PCE|CuNps platform, highlighting the electronic transfer and an increase in the surface area when compared to PCE without modifications with CuNps. The detection of the virus occurred from the immobilization of the Hant 1 probe on the PCE|CuNps platform using the methylene blue (MB) hybridization indicator and the differential pulse voltammetry technique. From the construction of the analytical curve, the detection limit of 4.56 pg/mL and the quantification limit of 15.22 pg/mL in the stability period of 7, 15, 21 and 30 days. Considering the standard deviation, stability is maintained at 100% in 30 days. Therefore, the developed platform showed fast, effective and low-cost detection, with low detection and quantification limits, being promising for use in point of care.

Keywords: Printed electrodes based on carbon ink (PCE); Electrochemical genosensor; Hantavirus; Copper nanoparticles; Methylene blue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação geográfica da incidência aproximada das infecções por Hantavírus por ano nos países do globo (HPS – <i>Hantavirus Pulmonary Syndrome</i> , HFRS – <i>Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome</i> , NE – Nefropatia Epidêmica)	22
Figura 2 - Estrutura viral do Hantavírus: a) O genoma do hantavírus possui na sua composição três segmentos (S, M, L) de RNA com um revestimento de espículas de glicoproteínas; b) Partícula viral por microscopia crioeletrônica	27
Figura 3 - Representação da estrutura molecular da Ribavirina	32
Figura 4 – Representação da estrutura molecular da Favipiravir	32
Figura 5 – Esquema do biossensor proposto por Clark e Lyons em 1962. O modelo apresenta um eletrodo de referência (A) e um eletrodo de trabalho (B) no interior de um cilindro (C), com revestimento de uma membrana múltipla no fundo. No interior da célula contém um eletrólito de composição variada (D). Na base do biossensor tem uma camada concentrada de enzima (F) entre as membranas semipermeáveis (E) e (G).	36
Figura 6 – Esquema de diferentes analitos aplicados a composição básica de um biossensor	37
Figura 7 - Bases nitrogenadas que fazem parte da estrutura de DNA	39
Figura 8 – Bases nitrogenadas que fazem parte da estrutura de RNA	39
Figura 9 - Representação da estrutura do brometo de etídio	41
Figura 10 - Representação da estrutura do ferroceno	42
Figura 11 - Representação da estrutura do azul de metileno	43
Figura 12 - Perturbação do potencial em função ao tempo na VC (a), voltamograma cíclico corrente vs potencial aplicado (b).	46
Figura 13 - Programação da voltametria de pulso diferencial (a),	47
Figura 14 – Espectros obtidos por EIS: (a) Diagrama de Nyquist; (b) Diagrama de Bode, na forma $ Z $ vs. $\log(f/\text{Hz})$; e (c) Diagrama de Bode na forma ϕ vs. $\log(f/\text{Hz})$;	49
Figura 15 - Mecanismo de formação e crescimento do filme na superfície do eletrodo de trabalho	50
Figura 16 - Potenciostato Metrohm/Autolab PGSTAT302N (a), conector DropSens (b).....	55
Figura 17 – Equipamento de metalização (à esquerda) e microscópio eletrônico de varredura (à direita).....	56
Figura 18 – Microscópio de Força Atômica da Hitachi; modelo 5100N.....	56
Figura 19 – Eletrodos impressos com tinta de carbono e prata: (a) eletrodo de trabalho, (b) contra eletrodos, (c) eletrodo de referência.	57

Figura 20 - Construção e montagem do eletrodo de carbono impresso em tela PCE/Ag (a) Adesivo de vinil com molde das regiões dos eletrodos de trabalho, contra-eletrodo e eletrodo de referência. (b) Após a remoção dos adesivos, as tintas de carbono e prata são passadas. (c) O adesivo do molde é usado para isolar e delimitar a área eletroanalítica. (d) PCE / Ag final.	58
Figura 21 – Eletrodos confeccionados com PCE/Ag	59
Figura 22 – Esquema representativo da confecção da plataforma PCE/NpCu-Hant 1/Alvo Hant2/Azul de metileno	62
Figura 23 – Registro do último voltamograma cíclico do PCE/Ag em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , v = 100 mV/s	64
Figura 24 - (a) Cronopotenciograma do PCE em solução de CuSO ₄ .5H ₂ O e (b) Voltamograma cíclico da estabilização das nanopartículas de cobre na solução de NaOH 0,1mol L ⁻¹ no PCE	66
Figura 25 - Imagens por microscopia de força atômica em duas dimensões para PCEs (a) PCE sem modificações (b) PCE com nanopartículas de cobre.....	68
Figura 26 - Imagens por microscopia eletrônica de varredura da região de trabalho eletroquímica dos PCEs sem modificações. Na primeira linha ampliações de 5000X, na segunda 10000X, e na terceira 20000X.....	69
Figura 27 - Imagens por microscopia eletrônica de varredura da região de trabalho eletroquímica dos PCEs com nanopartículas de cobre. Na primeira linha ampliações de 5000X, na segunda 10000X, e na terceira, respectivamente 20000X e 30000X.	70
Figura 28 - Histograma do tamanho das CuNps.....	71
Figura 29- Imagens EDX da superfície do eletrodo após a eletrodeposição das nanopartículas de cobre.....	71
Figura 30 - Voltamogramas cíclicos na solução de K ₄ Fe(CN) ₆ /K ₃ Fe(CN) ₆ do eletrodo impresso de carbono sem modificações (PCE) e modificados com nanopartículas de cobre (PCE/CuNps)	74
Figura 31- (a) Diagrama de Nyquist referentes a análise de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS); (b) Gráfico de Bode com ângulo de fase obtidos K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ 5 mmol L ⁻¹ em meio de KCl 0,1 mol L ⁻¹	76
Figura 32- Diagrama de Nyquist referentes a análise de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) PCE CuNps sonda Hant 1, PCE CuNps sonda Hant 1 + alvo Hant 2	77
Figura 33 - Circuitos elétricos proposto para PCE e PCE NpCu (a) e os respectivos valores do R1 – Resistência a transferência de carga PCE (b) e PCE CuNp (c).....	78

Figura 34 - Voltamogramas de pulso diferencial em nanopartículas de cobre em sonda Hant 1, alvo negativo (HDV) com indicador azul de metileno e alvo positivo (Hant2) com indicador azul de metileno.	79
Figura 35 – Variação da resposta do biossensor para o controle em branco contendo a sonda Hant 1, biossensor com Alvo/Hant 2 e biossensor com HDV(negativo).	79
Figura 36 - Resposta linear e parâmetros da análise de variação da corrente de pico de redução da solução de azul de metileno 50 µM vs as concentrações do alvo Hant 2 da curva analítica.	81
Figura 37 - Estabilidade do genossensor durante 7, 15, 21 e 30 dias.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição geográfica e doença associada à cepa do Hantavírus do Velho e do Novo Mundo.....	23
Tabela 2 - Valores correspondentes aos voltamogramas cíclicos PCE sem modificações e PCE com nanopartículas de cobre	73
Tabela 3 - Dados do fit (x^2) do PCE sem nanopartículas e do PCE com nanopartículas	75

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Critérios definidos para construção de biossensores.....	34
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AFM – Microscopia de Força Atômica (*Atomic Force Microscopy*)
- ANDV – Vírus Andes
- DOBV – Vírus Dobrava
- CDC – Centros de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*)
- CP – Cronopotenciometria
- CuMOP – estrutura orgânica de metal à base de cobre
- CuNps – Nanopartículas de cobre (*Copper Nanoparticles*)
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- dsDNA – Dupla fita de ácido desoxirribonucleico (*double stranded deoxyribonucleic acid*)
- ELISA – Ensaio de Imunoabsorção de Ligação Enzimática
- EIS – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (*Electrochemical Impedance Spectroscopy*)
- FHSR – Febre Hemorrágica com Síndrome Renal
- HTNV – Vírus Hantaan
- HPS – *Hantavirus Pulmonary Syndrome*;
- IQ-UFU - Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
- IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)
- LAFIP - Laboratório de Filmes Poliméricos
- LD – Limite de Detecção
- LQ – Limite de Quantificação
- MB – Azul de Metileno (*Methylene Blue*)
- NE – Nefropatia Epidêmica

ONU – Organização das Nações Unidas

PBS – Tampão fosfato salino

PCE – Eletrodo impresso de tinta de carbono (*Printed Carbon Electrode*)

PUUV – Vírus Puumala

pH - Potencial hidrogeniônico

RT-PCR – Reação em Cadeia de Polimerase de Transcrição Reversa (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)

RNA – Ácido ribonucleico

SAAV – Vírus Saaremaa

SEOUL – Vírus Seul

SNV – Vírus Sin Nombre

SPCH – Síndrome Cardiopulmonar causada por Hantavírus

ssDNA – Fita simples de ácido desoxirribonucleico (*single stranded Deoxyribonucleic acid*)

VC - Voltametria Cíclica

VPD - Voltametria de Pulso Diferencial

LISTA DE SÍMBOLOS

Z' - impedância real

Z'' – impedância imaginária

v - velocidade da reação

r – razão de reatividade

R_q - rugosidade média quadrática

Q - carga

I - corrente

I_p - corrente de pico

I_{pa} - corrente de pico anódica

t - tempo

E_p - potencial de pico

kb – quilobase (kilobase) unidade de medida em biologia molecular significando 1 000 pares de bases de DNA ou RNA.

n - número de variáveis

R_s - resistência da solução eletrolítica

Q_{dl} - elemento de fase constante

R_{ct} - resistência à transferência de carga

W - impedância de Warburg

δ - desvio padrão do branco

S - coeficiente angular da curva de calibração

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
1.1	Hantavírus: histórico e agente etiológico.....	20
1.1.1	Epidemiologia.....	23
1.1.2	Características da estrutura viral do Hantavírus.....	26
1.1.3	Diagnóstico	27
1.1.4	Tratamento.....	31
1.2	Biossensores eletroquímicos.....	33
1.2.1	Genossensores eletroquímicos	38
1.2.2	Indicadores da hibridização do DNA.....	40
1.2.3	Azul de metileno.....	42
1.2.4	Eletrodos impressos	44
1.2.5	Técnicas eletroquímicas	44
1.3	Eletrodeposição	49
1.4	Nanopartículas	51
2.	OBJETIVO GERAL	53
2.1	Objetivos Específicos	53
3.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	54
3.1	Reagentes e soluções	54
3.2	Instrumentação	55
3.3	Preparação de tintas de carbono e de prata.....	56
3.4	Construção do PCE/Ag	57
3.5	Seleção e preparo dos eletrodos impressos PCE/Ag.....	58
3.6	Eletrodeposição de nanopartículas de cobre.....	59
3.7	Caracterização por microscopia das nanopartículas de cobre.....	60
3.8	Caracterização eletroquímica das nanopartículas de cobre.....	60
3.9	Imobilização da sonda DNA Hant 1 e detecção indireta do alvo Hant 2... 	61

3.10	Construção da curva analítica.....	62
3.11	Estudo de estabilidade.....	63
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
4.1	Seleção dos eletrodos impressos PCE/Ag	64
4.2	Análise do perfil característico das nanopartículas de cobre	65
4.3	Caracterização por microscopia dos PCEs modificados com CuNps.....	67
4.4	Caracterização eletroquímica dos PCEs modificados com CuNps.....	72
4.5	Imobilização da sonda DNA Hant 1 e detecção indireta do alvo Hant 2... 	78
4.6	Construção da curva analítica.....	80
4.7	Estabilidade.....	81
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
	REFERÊNCIAS.....	85

1. INTRODUÇÃO

Segundo Brasil (2020) a infecção causada por Hantavírus ocorre por um vírus de RNA pertencente à família *Bunyaviridae* sendo classificada como uma zoonose viral aguda. A transmissão em humanos ocorre pela inalação de aerossóis, a partir da urina, saliva ou fezes de alguns roedores naturais em reservatórios naturais. Os hospedeiros finais do Hantavírus são os seres humanos (VAHERI *et al.*, 2011; WELLS *et al.*, 1997). Nos países da América, a Hantavirose apresenta-se na forma de Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR) enquanto que no Brasil, ela se destaca como Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus (SPCH). Os dados de pacientes hospitalizados de 2010 são aproximadamente de 150.000 a 200.000 casos de Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR) a cada ano em todo o mundo, destacando a maioria dos casos em países em desenvolvimento (VAPALAHTI *et al.*, 2003; MIR, 2022). No Brasil, foram notificados 13.181 casos de Hantavirose durante o período de 2007 a 2015. A partir de um estudo realizado por Fonseca e colaboradores, a taxa de letalidade por Hantavirose foi de 39% variando alguns critérios como sexo, idade, mês e regiões de propagação em zonas urbana e rural (FONSECA *et al.*, 2018). Considerando o aumento do número de casos notificados da infecção por Hantavírus em vários países, significa que novas cepas de Hantavírus têm sido identificadas em todo o mundo, acarretando uma problemática crescente de saúde pública (BI *et al.*, 2008). Na região do Triângulo Mineiro, há um destaque de um padrão sazonal da Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus (SPCH) diagnosticados pelo método sorológico e imunohistoquímico na cidade de Uberlândia (LIMONGI *et al.*, 2007).

Os métodos de diagnóstico da infecção por Hantavírus ocorrem por testes moleculares ou técnicas imunológicas (RABONI *et al.*, 2007). Técnicas como Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), Reação em Cadeia de Polimerase de Transcrição Reversa (RT-PCR), Ensaio Imunossorvente ligado a enzimas (ELISA) e Ensaio de Imunofluorescência (IFA) são comumente utilizadas. Entretanto, os métodos baseados na tecnologia biossensor vem sendo desenvolvidos, destacando somente o estudo de Yiwei e colaboradores (YIWEI, *et al.*, 2021). Neste estudo, Yiwei realiza a detecção eletroquímica do Hantavírus com a modificação de camadas até a plataforma final com nanopartículas de ouro usando uma estrutura orgânica de metal à base de Cu (CuMOF) como um marcador de sinal sintetizado com método solvotérmico usando ácido 2-aminotereftálico como ligante.

Os biossensores eletroquímicos vêm se destacando nos diagnósticos clínicos de vários analitos biológicos, já que apresentam baixo custo, fácil fabricação e sensibilidade significativa (NAWAZ *et al.*, 2018). No âmbito dos biossensores, há um destaque na fabricação de genossensores, biossensores eletroquímicos de DNA ou RNA, sendo um método de baixo custo para o diagnóstico clínico.

Nessa perspectiva, o Laboratório de Filmes Poliméricos (LAFIP), em 2018, desenvolveu uma metodologia de impressão de eletrodos utilizando tinta condutiva e deposição por *sputtering*, tratando-se de uma metodologia nova e fácil para a construção de eletrodos serigrafados à base de tinta de carbono (SPCE), proposto pela dissertação de (SILVA NETO, 2019) e aplicado para a construção de biossensores (MOÇO *et al.*, 2021). A partir disso, várias plataformas vêm sendo desenvolvidas e testadas com o uso de filmes poliméricos e síntese de nanopartículas para o monitoramento e diagnóstico de várias doenças.

A capacidade de detectar alterações mínimas no sinal analítico se relaciona a sensibilidade de um biossensor, à medida que o limite de detecção se relaciona a quantidade mínima que pode ser avaliada, já o limite de quantificação se relaciona com a quantidade mínima que pode ser quantificada (SEGATTO, 2021). Desse modo, a detecção em concentrações baixas do analito é necessária para a identificação do Hantavírus, considerando-se um limite de detecção já alcançado de $0,74 \times 10^{-15}$ mol/L por Yiwei e colaboradores (2021).

O presente estudo descreve o desenvolvimento de um genossensor eletroquímico com eletrodos impressos à base de tinta de carbono (PCE) para detecção de uma sequência de DNA de Hantavírus. A plataforma foi desenvolvida a partir da imobilização da sonda HANT 1 com a eletrodeposição de nanopartículas de cobre (CuNPs) usando o indicador de hibridização azul de metileno (MB) para detecção indireta. As caracterizações morfológicas realizadas foram a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e a Microscopia de Força Atômica (AFM) em diferentes configurações. As caracterizações eletroquímicas realizadas foram Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) e a Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) para a interação entre a fita simples (ssDNA) e a dupla fita (dsDNA) para a detecção Hantavírus.

1.1 Hantavírus: histórico e agente etiológico

Conforme descrito por Mohammed (2010), após o período da Guerra da Coreia (1951-1953), as tropas da Organização das Nações Unidas (ONU) relataram mais de 3.000 casos de febre hemorrágica coreana. Apesar dos estudos prévios, em 1978, o agente etiológico da febre hemorrágica coreana foi isolado a partir do tecido pulmonar do roedor silvestre *Apodemus agrarius*. A nomeação do vírus foi Hantaan devido a sua descoberta perto do rio Hantan, na Coreia do Sul. O Hantavírus foi estabelecido exclusivamente por uma infecção persistente na população de seus roedores específicos.

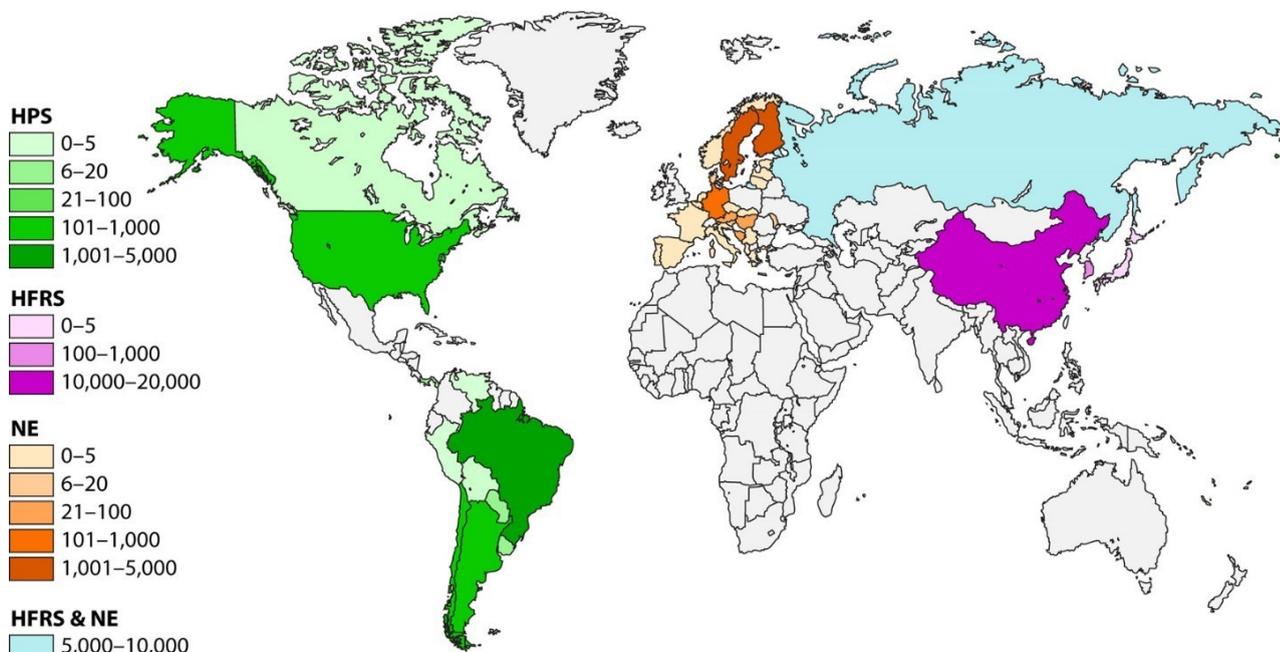
O Hantavírus é um vírus proveniente da família *Bunyaviridae* com o gênero *Orthohantavirus* apresentando 41 espécies definidas, sendo 20 espécies associadas a doenças em humanos (LAENEN, 2019).

Conforme as manifestações clínicas, a distribuição epidemiológica, a diversidade genética e os membros dessa família são sorológica e filogeneticamente relacionados, uma vez que podem ser subdivididos em genótipos cuja linhagem correspondem aos locais onde foram isolados e identificados (FERREIRA, 2000; SCHMALJOHN; HJELLE, 1997).

Após estudos específicos, os casos urbanos de febre hemorrágica foram causados pela transmissão do vírus Seoul, por ratos na Ásia e na Europa. A descoberta se remete a uma forma mais branda da propagação do vírus, a nefropatia epidêmica. A ocorrência da nefropatia epidêmica gera a ocorrência de trombocitopenia em pacientes infectados (KRAUTKRAMER *et al.*, 2013).

A infecção por hantavírus em humanos pode resultar em duas síndromes clínicas: Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR), causada pelo hantavírus do Velho Mundo, responsáveis por causar infecções na Europa e na Ásia, com uma taxa de letalidade de até 15% (MAES *et al.*, 2004; VAPALAHTI *et al.*, 2003); e Síndrome Cardiopulmonar do Hantavírus (SCPH), causada pelo hantavírus do Novo Mundo (Américas), responsável por causar infecções em diversos países do continente americano, inclusive no Brasil, com uma taxa de letalidade de 60% (FERREIRA, 2003; JONSSON *et al.*, 2010) sendo observada a taxa de propagação das infecções mostradas na Figura 1.

Figura 1- Representação geográfica da incidência aproximada das infecções por Hantavírus por ano nos países do globo (HPS – *Hantavirus Pulmonary Syndrome*, HFRS – *Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome*, NE – *Nefropatia Epidêmica*)



FONTE: JONSSON *et al.*, 2010

O contágio por hantavírus aos humanos ocorre pela inalação de aerossóis provenientes da saliva, urina e fezes de roedores infectados (SCHMALJOHN; HJELLE, 1997). A transmissão pode ocorrer por contato direto do vírus em pele lesada, escoriações ou pela mordida dos roedores. (HARDESTAM *et al.*, 2008; JONSSON *et al.*, 2010). Dentro do ciclo do vírus, os seres humanos são considerados os hospedeiros finais do hantavírus (VAHERI *et al.*, 2011; WELL *et al.*, 1997).

As infecções agudas por FHSR e SCPH afetam um conjunto de sistemas do organismo humano: renal, cardíaco, nervoso central e hormonal. É válido ressaltar que ambas doenças possuem complicações significativas na fase aguda e consequências a longo prazo (VAHERI *et al.*, 2013).

O quadro clínico é descrito pelos Centros de Controle de Prevenção de Doenças, no inglês, por *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), no qual os pacientes com SCPH geralmente possuem como precursor o período febril durante 3 a 5 dias. Os sintomas iniciais são definidos por dor de cabeça, tontura, calafrios, tosse, vômitos, náuseas e sintomas gastrointestinais. Aproximadamente metade dos pacientes relatam mal-estar, diarreia e tontura além da falta de ar, gerando insuficiência cardíaca e morte (MIR, MOHAMMED, 2010).

1.1.1 Epidemiologia

A epidemiologia da Hantavirose é caracterizada pela exposição peridoméstica de seres humanos a roedores em áreas endêmicas. É válido ressaltar que as alterações climáticas, o manejo inadequado do meio ambiente, o desmatamento para ocupação desordenada do solo e as alterações dos ecossistemas são fatores que contribuem para a propagação e disseminação do Hantavírus (MOURA *et al.*, 2021).

De acordo com a Tabela 1, nos países do Velho Mundo, a FHRS é causada pelas transmissões do Hantavírus por *Myodes*, *Rattus* e *Apodemus*, enquanto que nos países do Novo Mundo é destaque para a SCPH causada pela transmissão do Hantavírus *Sigmodontina*. Nessa perspectiva, é visto uma consequência da distribuição dos roedores (ou insetívoros) primários em seus hospedeiros a partir da distribuição geográfica e epidemiológica do Hantavírus. (JONSSON *et al.*, 2010).

Tabela 1 - Distribuição geográfica e doença associada à cepa do Hantavírus do Velho e do Novo Mundo

Grupo e Subfamília	Vírus isolado e variante do vírus	Abreviação	Distribuição geográfica	Hospedeiro roedor	Doenças associadas
Velho Mundo <i>Murinae</i>	Vírus Hantaan	HTNV	China, Coreia do Sul, Rússia	<i>Apodemus agrarius</i> ,	FHRS
	Vírus Dobrava-Belgrado	DOBV	Balcãs	<i>Apodemus flavicollis</i>	FHRS
	Vírus Seul	SEOV	Mundo todo	<i>Rattus</i>	FHRS
	Vírus Saaremaa	SAAV	Europa	<i>Apodemus agrarius</i> ,	FHRS
	Vírus Amur	AMRV	Extremo Oriente da Rússia	<i>Península de Apodemus</i>	FHRS
	Vírus Soochong	--	Coreia do Sul	<i>Península de Apodemus</i>	Desconhecido
<i>Arvicolinae</i>	Vírus Puumala	PUUV	Europa, Ásia e América	<i>Clethrionomys brithoolus</i>	FHRS/NE
	Vírus Khabarovsk	KHAV	Extremo Oriente da Rússia	<i>Microtus fortis</i>	Desconhecido

	Vírus Muju	MUJV	Coréia do Sul	<i>Myodes regulus</i>	Desconhecido
	Vírus Prospect Hill	PHV	Marilândia	<i>Microtus pennsylvanicus</i>	Desconhecido
	Vírus Tula	TULV	Rússia/Europa	<i>Microtus arvalis</i>	Desconhecido
	Vírus Isla Vista	ISLAV	América do Norte	<i>Microtus californicus</i>	Desconhecido
	Vírus Topografov	TOPV	Sibéria	<i>Lemmus sibericus</i>	Desconhecido
Novo Mundo <i>Sigmodontinae</i>	Vírus Sin Nombre	SNV	América do Norte	<i>Peromyscus maniculatus</i>	SCPH
	Vírus Monongahela	MGLV	América do Norte	<i>Peromyscus leucopus</i>	SCPH
	Vírus New York	NYV	América do Norte	<i>Peromyscus leucopus</i>	SCPH
	Vírus Black Creek Canal	BCCV	América do Norte	<i>Sigmodon hispidus</i>	SCPH
	Vírus Bayou	BAYV	América do Norte	<i>Oryzomys palustris</i>	SCPH
	Vírus Limestone Canyon	--	América do Norte	<i>Peromyscus boylii</i>	Desconhecido
	Vírus Playa de Oro	--	México	<i>Oryzomys couesi</i>	Desconhecido
	Vírus Catacamas	--	Honduras	<i>Oryzomys couesi</i>	Desconhecido
	Vírus Choclo	--	Panama	<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	SCPH
	Vírus Calabazo	--	Panama	<i>Zygodontomy brevicauda</i>	Desconhecido
	Vírus Rio Segundo	RIOSV	Costa Rica	<i>Reithrodontomys mexicanus</i>	Desconhecido
	Vírus Cano Delgadito	CADV	Venezuela	<i>Sigmodon alstoni</i>	Desconhecido
	Vírus Andes	ANDV	Argentina, Chile	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	SCPH
	Vírus Bermejo	BMJV	Argentina	<i>Oligoryzomys chocoensis</i>	SCPH

Vírus Pergamino	PRGV	Argentina	<i>Akodon azarae</i>	Desconhecido
Vírus Lechiguanas	LECV	Argentina	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	SCPH
Vírus Maciel	MCLV	Argentina	<i>Bolomys obscurus</i>	SCPH
Vírus Oran	ORNV	Argentina	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	SCPH
Vírus Laguna Negra	LANV	Paraguai, Bolívia e Argentina	<i>Calomys laucha</i>	SCPH
Vírus Alto Paraguay	--	Chaco paraguaio	<i>Holochilus chacoensis</i>	Desconhecido
Vírus Ape Aime	--	Leste do Paraguai	<i>Akodon montensis</i>	Desconhecido
Vírus Itapúa	--	Leste do Paraguai	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Desconhecido
Vírus Rio Mamore	--	Bolívia, Peru	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Desconhecido
Vírus Araraquara	--	Brasil	<i>Bolomys Lasiurus</i>	SCPH
Vírus Juquitiba	--	Brasil	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SCPH
Vírus Jaborá	--	Brasil, Paraguai	<i>Akodon montensis</i>	SCPH

FONTE: A global perspective on Hantavirus ecology, epidemiology, and disease (JONSSON *et al.*, 2010)

Os casos clínicos confirmados se destacam nas regiões da Europa, Alemanha, Finlândia, França, Rússia, China, Argentina, Bolívia, Venezuela, Brasil, Canadá, Chile, Panamá, Paraguai, Estados Unidos e Uruguai. (JONSSON *et al.*, 2010).

A infecção por hantavírus causada pela febre hemorrágica com síndrome renal (FHSR) é caracterizada pela disseminação do vírus Hantaan, Puumala e Seoul nas seguintes regiões: China, Península Coreana e Rússia, enquanto que na região norte e oeste da Europa, a disseminação é caracterizada pelo vírus *Puumala* e *Dobrava* (DEARING, M. D. *et al.*, 2010). A síndrome cardiopulmonar por Hantavírus (SCPH) é causada nas regiões do Chile, Argentina, Brasil, Canadá, Estados Unidos, Brasil e Panamá (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Conforme do Brasil (Boletim Epidemiológico da Hantavirose 2013), as infecções causadas pelo Hantavírus caracterizam um padrão de sazonalidade em função do

comportamento dos reservatórios de roedores. Considerando a alta letalidade e o elevado custo social e econômico, a Hantavirose é um problema de saúde pública de grande importância.

Segundo o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, durante o período de 2010 a 2020, no Brasil, 15.080 casos foram notificados, sendo 996 confirmados e 414 casos que evoluíram para óbitos. A taxa de letalidade média é de 41,5%; 91% dos pacientes necessitam de assistência hospitalar. Quando comparado a outros países, o Brasil possui a maior taxa de letalidade da infecção por Hantavírus, uma vez que no Chile a taxa é de (32%), na Argentina (12 a 40%) e no Paraguai (11,3%).

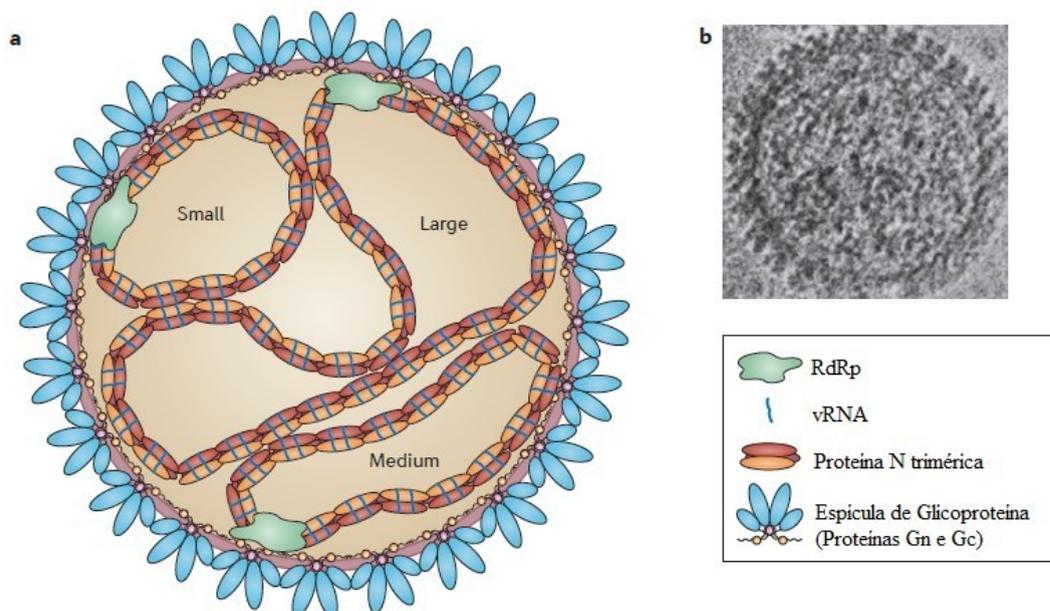
É válido ressaltar que, em muitas regiões e em vários países, as infecções por hantavírus não são detectadas e não são contabilizadas para a saúde pública acarretando a permanência de outras espécies de hantavírus. Desse modo, o estudo dos pesquisadores, a atenção das autoridades públicas fazem-se necessários para a compreensão do impacto da Hantavirose na saúde pública.

1.1.2 Características da estrutura viral do Hantavírus

De acordo com a Classificação de Baltimore, os Hantavírus são vírus envelopados com um genoma de RNA de fita simples e polaridade negativa, constituído de três segmentos: *Small* (S), *Medium* (M) e *Large* (L) conforme a Figura 2. Os tamanhos dos segmentos S, L e M possuem os respectivos pesos moleculares: 1,7 a 2,1 kb; 6,5 a 6,6 kb e 3,7 a 5,6 kb (HOOPER; SCHMALJOHN, 2001; JONSSON *et al.*, 2010; SCHMALJOHN *et al.*, 1985).

A composição de cada fragmento na estrutura genômica do Hantavírus apresenta sua função. O segmento S (pequeno) apresenta a função de codificar a proteína do nucleocapsídeo N sendo responsável por formar o nucleocapsídeo viral. O segmento L codifica a enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). O RNA, constituído por uma fita negativa, poderá permitir uma interação com a fita de sentido positivo complementar de RNA (cRNA) e RNA mensageiro (mRNA). O segmento M (médio) apresenta a função de codificar a glicoproteína a fim de produzir as glicoproteínas do envoltório da superfície: Gn e Gc, sendo anteriormente conhecidas como G1 e G2 com tamanhos respectivos de 1700 a 1430 pb (PEREIRA, 2013).

Figura 2 - Estrutura viral do Hantavírus: a) O genoma do hantavírus possui na sua composição três segmentos (S, M, L) de RNA com um revestimento de espículas de glicoproteínas; b) Partícula viral por microscopia crioelétrica.



FONTE: adaptado de VAHERI *et al.*, 2013.

1.1.3 Diagnóstico

Diante das estatísticas dos casos da propagação do Hantavírus ao longo do Velho e Novo Mundo, o diagnóstico precoce do Hantavírus é fundamental para a diminuição das taxas de morbidade e mortalidade, para que assim o início do tratamento aconteça rapidamente.

Os exames laboratoriais para o diagnóstico específico de Hantavírus são realizados basicamente por meio de sorologia em laboratórios de referência; mas encontram desafios financeiros devido ao uso de equipamentos de alto custo. Entretanto, métodos mais rápidos de baixo custo de diagnóstico molecular do Hantavírus vêm sendo desenvolvidos (MARTINS *et al.*, 2019). O diagnóstico da infecção por Hantavírus pode ser realizado por várias formas: método de detecção envolvendo ácidos nucleicos virais, detecção de proteínas virais e métodos baseados na tecnologia biossensor.

As técnicas de diagnóstico baseadas em análise molecular são amplamente utilizadas devido a especificidade e a alta precisão. Um aspecto relevante dentro da técnica

(RT-PCR) em tempo real ou PCR quantitativo é a possibilidade de distinção entre os vírus causadores da infecção por (FHSR) e os vírus causadores da (SCPH), ambos causam sintomas parecidos e podem ser confundidos. A partir da determinação da carga viral determinada pela técnica, pode correlacionar com a evolução clínica e prognóstica contribuindo para a definição de estratégias terapêuticas necessárias. (PEREIRA, 2013).

O diagnóstico de Hantavírus causador da Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus (SCPH) e Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR) utilizam o método da reação em cadeia de polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) (FREEMAN *et al.*, 1999). A técnica usa uma enzima transcriptase reversa para transformar o RNA viral em DNA complementar (cDNA), que pode ser amplificado por PCR. Em um trabalho descrito por Moreli e colaboradores (2004), que utiliza a técnica (RT-PCR) para Hantavírus usando *primers* selecionados para a combinação de alta homologia de genomas de hantavírus detectados no sangue de pacientes com SCPH do Brasil, incluindo também o gene N na sequência de nucleotídeos da cepa Araraquara, isolada em São Paulo, permitindo assim a identificação e quantificação do Hantavírus usando sangue ou tecido de indivíduos infectados. Nos estudos de Raboni e colaboradores (2007), a cepa Araucária, isolada no Paraná, também realizou ensaios utilizando a proteína N recombinante.

Outra forma de detecção usando a técnica molecular é o *Pyrosequencing*, no qual ocorre a tecnologia de sequenciamento baseado no monitoramento em tempo real da síntese de DNA. O processo é definido por quatro enzimas que monitoram a síntese de DNA detectada pela bioluminescência (RONAGHI *et al.*, 1998). As características da técnica permitem o fornecimento de informações detalhadas sobre o vírus e sequências específicas do genoma do hantavírus amplificado para a confirmação de resultados RT-PCR (KRAMSKI, *et al.*, 2007).

Considerando os métodos de detecção do hantavírus à base de proteína, as estratégias utilizadas envolvem o ensaio ELISA, IFA, *Immunoblotting* e Teste de Neutralização. Nos laboratórios brasileiros de saúde pública, o diagnóstico sorológico das infecções por hantavírus utiliza como antígeno a nucleoproteína recombinante do hantavírus (PADULA *et al.*, 2000).

O ensaio ELISA (Ensaio Imunossorvente ligado à Enzima) é o teste baseado em três proteínas básicas do vírus (Gn, Gc e N) sendo frequentemente utilizado no diagnóstico do Hantavírus (MATTAR, *et al.*, 2015). A partir do aparecimento da infecção na fase aguda, as imunoglobulinas M (IgM) são detectáveis, aparecendo de 1 a 2 dias após os sintomas, indicando uma exposição recente ao vírus; enquanto que as imunoglobulinas

G (IgG) são produzidas 1 semana após o início dos sintomas que podem ter uma grande durabilidade ao longo da vida (MEISEL, *et al.*, 2006). De acordo com Zöller e colaboradores (1993 apud PEREIRA, 2013, p. 24), utilizaram proteínas recombinantes do nucleocapsídeo de hantavírus cepa Hantaan 76-118 (sorotipo Hantaan) e glicoproteínas 18-20 (sorotipo Puumala) como antígenos nos ensaios para detecção das infecções por Hantavírus.

Nas Américas, os testes ELISA são desenvolvidos com antígenos recombinantes do SNV (vírus Sin Nombre) e ANDV (vírus Andes) com base na alta prevalência desses sorotipos. Nas regiões da Europa Ocidental e Central e também na Rússia Ocidental, a variante *Puumala* Hantavírus apresentava para uso em testes diagnósticos, a proteína N em sua forma truncada (MATTAR, *et al.*, 2015; MEISEL, *et al.*, 2006; MAES, *et al.*, 2004).

Outro método sorológico é o ensaio de imunofluorescência (IFA). O método é baseado na detecção de anticorpos presentes no soro (IgM e/ou IgG). Segundo Groen e colaboradores (1991), células Vero E6 são utilizadas para se fixarem com os vírus expressos nas células usadas como antígenos, sendo infectadas com o sorotipo mais prevalente de Hantavírus. Um método clássico relativamente rápido, com alta sensibilidade e especificidade. Entretanto, a técnica apresenta alto custo, uma vez que ela necessita de manipuladores treinados e capacitados para o desenvolvimento do trabalho em laboratórios com nível de biossegurança 3 (BSL-3) (KORAKA, *et al.*, 2000). O IFA não é adequado para testar uma grande quantidade de amostras visto que há variações na quantidade de antígenos das células dos experimentos padronizados direcionando a resultados não confiáveis.

O ensaio multiparamétrico de imunofluorescência é uma variação do teste de imunofluorescência, no qual são realizados testes para diferentes sorotipos de Hantavírus. Em um mosaico de *biochips*, cada biochip representa uma lâmina referente ao ensaio de lâminas individuais. O mosaico desenvolvido por Lederer e colaboradores (2020) avaliou os seguintes tipos de vírus: Hantaan (HTNV), Puumala (PUUV), Seul (SEOV), Saaremaa (SAAV), Dobrava (DOBV), Sin Nombre (SNV) ou Andes (ANDV) (BRUMMER-KORVENKONTIO *et al.*, 2002).

O *Western blotting* ou *Western Blot* (WB) chamado também de *Immunoblotting* ou *Protein Blotting* é uma técnica utilizada em biologia molecular que realiza a imunodetecção de proteínas possibilitando a detecção de quantidades menores em determinadas amostras. (KURIEN e SCOFIELD, 2003). Na detecção de proteínas ocorre a

separação destas proteínas por peso molecular através de eletroforese em gel e transferência para membrana adsorvente (KURIEN e SCOFIELD, 2006). Conforme Németh e colaboradores (2011), a menor especificidade observada nos ensaios com dois ou mais sorotipos de Hantavírus foi devido às possíveis reações cruzadas causadas pela proteína nucleocapsídeo (N) para a detecção de dobrava (DOBV) na Hungria e no norte da Croácia. É válido ressaltar que, os testes que incluem diferentes antígenos em diferentes sorotipos de vírus não são indicados para as variantes do Hantavírus.

No estudo de Hjelle e colaboradores (1997), o *Strip Immunoblot Assay* (SIA) é um método utilizado para a detecção das cepas Sin Nombre (SNV) e Seul (SEOV) utilizando uma tira com dois controles de imunoglobulina humana G e tiras contendo antígenos recombinantes de proteínas N e G1 para testes. Nos testes, os anticorpos IgM e IgG são detectados, mas não são diferenciados acarretando um falso diagnóstico.

Os testes de redução/ neutralização em placas (PNRT) consistem na neutralização do vírus através do anticorpo neutralizante específico em diluições seriadas para análise quantitativa. Os fatores que podem ser analisados são a morte celular ou viabilidade celular. O isolamento viral em cultura celular do hantavírus é geralmente realizado por culturas de células Vero, clone E6, uma vez que possui resultados mais positivos (PÁDUA *et al.*, 2015 e VIAL *et al.*, 2020). Considerando que os procedimentos são realizados em laboratórios especiais de biossegurança nível três (Biosafety Level 3) com um tempo de espera maior, apresenta alto custo e alto risco de contaminação para a realização desses testes de neutralização.

Ainda nessa perspectiva de métodos de detecção, é válido ressaltar o uso de biossensores para a detecção do Hantavírus. Entretanto, há poucos estudos que utilizam sensores para detecção do Hantavírus, destacando-se as pesquisas com métodos RT-PCR e ELISA.

Os princípios fundamentais para o desenvolvimento de um biossensor necessitam de parâmetros a serem combinados para adequação da amostra para resultados significativos dentro dos limites de detecção. As técnicas eletroquímicas aplicadas nos sensores para detecção de Hantavírus foram: Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE), Voltametria Cíclica (CV) e Cronopotenciometria.

O estudo de Gogola e colaboradores (2019) permitiu o desenvolvimento de um imunossensor utilizando ácido-3-mercaptopropiônico (MPA) para detectar a presença de anticorpos contra hantavírus no soro humano. A superfície utilizada foi eletrodo de ouro automontado com monocamadas para se ligar a nucleoproteína da cepa do hantavírus

Araucária com processos paralelos de bloqueio da superfície. O dispositivo também se mostrou eficiente na detecção utilizando material de carbono como a superfície do eletrodo obtendo assim resultados satisfatórios quando comparados com os testes ELISA.

Segundo Vetcha e colaboradores (2002), desenvolveram um imunossensor amperométrico para detecção de forma rápida, sensível e quantitativa de hantavírus no sangue de camundongos. Os eletrodos tiveram a superfície modificada em um esquema sanduíche, no qual o naftol formado como resultado da hidrólise enzimática α -naftil fosfato na presença do marcador de fosfatase alcalina (AP) é quantificado amperometricamente apresentando adequação ao dispositivo com um tempo de 25 minutos de detecção.

Martins e colaboradores (2019), desenvolveu uma plataforma *biochar* utilizando a superfície de carbono modificada com biomassa pirolisada que possibilitou, sem a necessidade de biomarcadores, a ancoragem de biomoléculas. Os testes realizados usam um par de nucleoproteínas de anticorpos específicos do hantavírus.

Recentemente, o estudo de Xu Yiwei e colaboradores (2021) possibilitou o desenvolvimento de um genossensor eletroquímico usando composto de óxido de grafeno reduzido com nanopartículas de ouro utilizando um bloqueador 6 – mercapto-1-hexanol (MCH) e a síntese de uma estrutura orgânica de metal à base de cobre na superfície de ouro para detecção do Hantavírus.

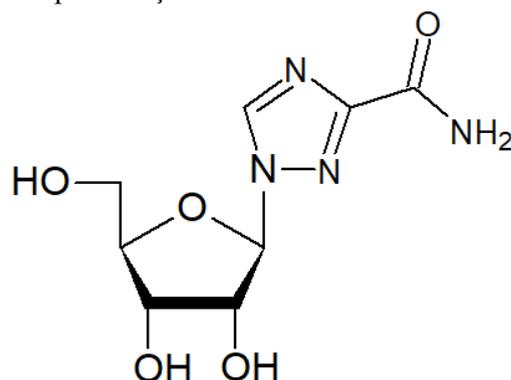
Considerando a diversidade e a variabilidade dos diversos métodos de detecção do Hantavírus, os quais são caros e requerem especialistas para o manuseio dos equipamentos, é essencial o desenvolvimento contínuo de métodos que buscam um diagnóstico rápido e acessível da detecção do Hantavírus, através dos biossensores é possível alcançar resultados confiáveis, ágeis e de baixo custo.

1.1.4 Tratamento

Ainda não possui uma terapia antiviral disponível para o tratamento de infecções por hantavírus. Os pacientes infectados pela SCPH apresentam um tratamento específico na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) com monitoramento de pressão arterial, oxigenação, balanço de fluídos. Outros cuidados como diálise, oxigenação extracorpórea são realizados para a completa eliminação do vírus no organismo (FIGUEIREDO *et al.*, 2001; MAES *et al.*, 2009; MURÁNYI *et al.*, 2005).

A ribavirina (RBV), observada na Figura 3, é um composto químico que apresenta uma boa eficácia na atividade antiviral tanto *in vitro* como *in vivo* (SIDWELL *et al.*, 1979). Os mecanismos de atividade antiviral baseiam-se na capacidade de inibição da inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH), a enzima responsável pela síntese de GTP (trifosfato de guanósina) (SZABÓ, 2017). Há uma diminuição nas taxas de morbidade e mortalidade em pacientes chineses com FHSR do Velho Mundo a partir dos ensaios clínicos realizados (HUGGINS *et al.*, 1991). Após a administração da medicação em pacientes com SCPH, nos EUA e no Brasil, resultados clínicos não se mostraram benéficos (CHAPMAN *et al.*, 1999; FIGUEIREDO *et al.*, 2001; MERTZ *et al.*, 2004).

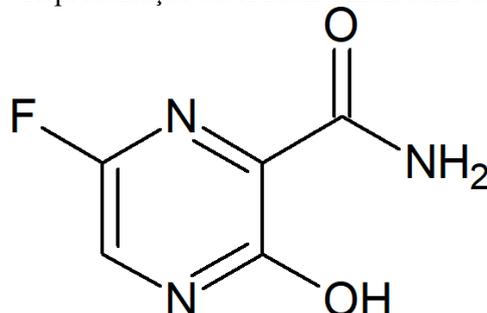
Figura 3 - Representação da estrutura molecular da Ribavirina



FONTE: elaborada pela autora, 2022.

Outro medicamento relatado nos estudos foi o Favipiravir (Avigan; T-705; 6-fluoro-3-hidroxi-2-pirazinecarboxamida), Figura 4, caracterizado pela atividade antiviral que inibe seletivamente a RNA polimerase. A ação medicamentosa ocorre na detecção do RNA viral apresentando a redução das cepas Sin Nombre (SNV) e Andes orthohantavirus (ANDV) das infecções causadas por Hantavírus (SZABÓ, 2017).

Figura 4 – Representação da estrutura molecular da Favipiravir



FONTE: elaborada pela autora, 2022.

Considerando um tratamento eficaz e duradouro, ainda não há uma vacina capaz de fornecer proteção a todas as infecções causadas pelas diferentes variantes do Hantavírus. Cho e colaboradores (2002) desenvolveram testes para avaliação das respostas dos anticorpos à vacina inativa com formalina HTNV (HantavaxTM). A vacina foi desenvolvida pelo *Rhein Biotech Group*, na Coréia e na China, contra o vírus Hantaan sendo derivada do cérebro de camundongo. Nos testes realizados em voluntários humanos, cerca de 97% dos vacinados, a partir da dose de reforço, apresentaram quantidades elevadas de anticorpos neutralizantes específicos. (CHO; HOWARD, 1999).

Choi e colaboradores (2003), desenvolveram uma vacina inativada derivada da cultura celular contra o vírus Hantaan para prevenção contra FHRS. O procedimento ocorreu a partir de uma cultura de micro transportadores de células Vero E6, possibilitando o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes em camundongos, destacando uma taxa cinco vezes mais elevada do que *HantavaxTM* (CHOI *et al.*, 2003). É importante ressaltar que a vacina não determina uma prevenção completa contra todas as variantes do Hantavírus, mas possui a capacidade de induzir uma forte resposta imune humoral por um curto período de tempo. (DONG *et al.*, 2005; CHOI *et al.*, 2003).

1.2 Biossensores Eletroquímicos

Os biossensores são definidos pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, *International Union of Pure and Applied Chemistry*), como “um dispositivo que usa reações bioquímicas específicas medidas por enzima, imunossistemas, tecidos, organelas ou células inteiras para detectar compostos químicos frequentemente por sinais elétricos, térmicos ou ópticos” (IUPAC, 1997).

Na literatura de Malhotra e Pandey (2017) estão descritos os princípios básicos da fabricação de um biossensor, sendo caracterizados por:

- Sob condições normais de armazenamento padrão, o analito desejado deve ser específico e estável.
- Para que o biossensor seja preciso e reprodutível com alta sensibilidade, ele deve ter linearidade alcançada em diferentes concentrações.
- Considerando a análise da amostra com o pré-tratamento, os parâmetros físicos como pH e temperatura devem ser otimizados.
- O biossensor fabricado deve ser portátil, econômico, de tamanho pequeno e utilizável

por operadores com qualificações.

- O biossensor deve ser biocompatível para que possa ser utilizado para monitoramento invasivo em diagnósticos clínicos.
- O biossensor deve fornecer análise em tempo real para que possa ser empregado para medições rápidas de analitos de amostras humanas.

Considerando o destaque dos biossensores eletroquímicos dentro do âmbito científico, alguns critérios podem ser definidos e observados para sua avaliação:

Quadro 1 - Critérios definidos para construção de biossensores

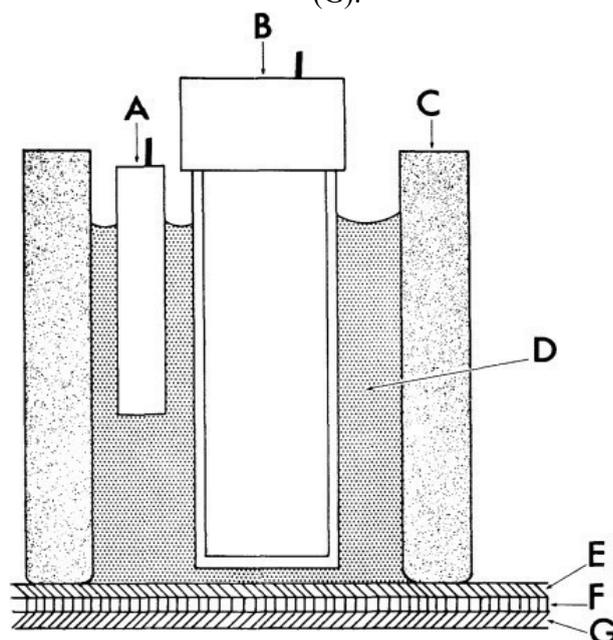
Parâmetros	Características:
Sensibilidade e Linearidade:	Linearidade é a resposta mensurável proporcional à concentração a partir da faixa de concentração da curva de calibração. A sensibilidade é definida pela inclinação da curva analítica, visto que, identifica o analito frente a variações com baixos limites de detecção.
Repetibilidade e Reprodutibilidade:	Repetibilidade: é quando o operador realiza a medição na mesma peça várias vezes, observa-se uma variação, definida como a variação devido ao equipamento de medição. Reprodutibilidade: é a variação que ocorre entre os operadores, definida pela variação devido ao método de medição.
Tempo de resposta:	Possibilita a aplicação na monitoração e detecção em tempo real da presença ou atividade de um determinado analito.
Especificidade:	Está relacionada a capacidade de distinguir/ diferenciar um analito de interesse presente em uma matriz de outros compostos químicos ou biológicos, possibilitando uma avaliação dos possíveis interferentes e falsos positivos.
Seletividade:	Possibilita a capacidade de detecção do analito alvo no qual a interferência de outros compostos químicos deve ser minimizada.

<i>Shelf life:</i>	Avaliação da estabilidade em função do tempo para determinação do tempo de prateleira possível para um biossensor (NETO,2019).
Custo:	Sistemas de baixo custo.
Portabilidade:	Dispositivos <i>point of care</i> , possibilitando a interface facilitada com maior visibilidade no mercado, descentralizando análises laboratoriais.

FONTE: elaborado pela autora, 2022.

Clark e Lyons (1962) desenvolveram o primeiro modelo de biossensor em 1962, a proposta foi a imobilização da enzima glicose oxidase. O sistema era composto por uma célula eletrolítica com um eletrodo de vidro de potencial de hidrogênio (pH) com uma fina camada da enzima glicose oxidase entre camadas de membranas semipermeáveis, visualizados na Figura 5 (SEGATTO, 2021). A quantidade de elétrons produzidos é proporcional à concentração de glicose no meio. A glicose é oxidada no ânodo até a formação de ácido glucônico onde o sensor distingue e permite acompanhar as alterações de glicose no sangue.

Figura 5 – Esquema do biossensor proposto por Clark e Lyons em 1962. O modelo apresenta um eletrodo de referência (A) e um eletrodo de trabalho (B) no interior de um cilindro (C), com revestimento de uma membrana múltipla no fundo. No interior da célula contém um eletrólito de composição variada (D). Na base do biossensor tem uma camada concentrada de enzima (F) entre as membranas semipermeáveis (E) e (G).



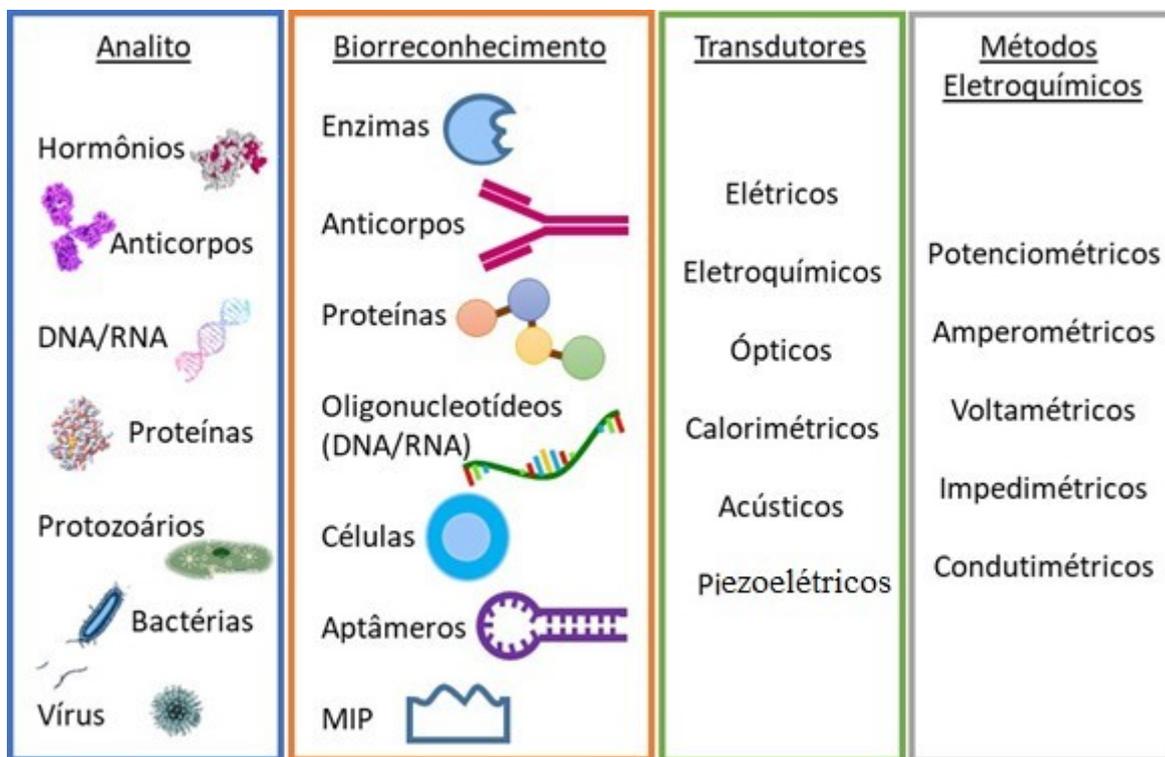
FONTE: CLARK JR e LYONS, 1962.

Um biossensor destaca-se pela leitura simples, rápida e seletiva e sensível. Nessa perspectiva, este dispositivo é composto por elementos fundamentais Figura 6. Inicialmente é necessário um transdutor, no qual tenha sido ancorado um elemento biológico de reconhecimento sobre a superfície, que por sua vez tenha afinidade por um analito em específico. A transdução do sinal de reconhecimento biológico para um sinal mensurável ocorre por meio da interação sobre o transdutor, no qual a resposta mensurada pode ser diretamente ou inversamente proporcional à concentração do analito.

Os elementos de reconhecimento se caracterizam dentro de dois grupos: biocatalíticos e biocomplexantes. Elementos biocatalíticos são baseados em uma reação catalisada por macromoléculas, presentes em seu ambiente biológico original, como enzimas, células e tecidos. Os elementos biocomplexantes são baseados na interação do analito com macromoléculas, presentes em seu ambiente biológico original, como anticorpos com antígenos, entre peptídeos e a interação com polímeros moleculares impressos (MIP, Molecularly Imprinted Polymer). (CESEWSKI e JOHNSON, 2020;

THEVENOT, *et al.*, 2013).

Figura 6 – Esquema de diferentes analitos aplicados a composição básica de um biossensor



FONTE: SEGATTO, 2021.

Os biossensores eletroquímicos apresentam um sinal eletroquímico proveniente de processos faradaicos devido a ocorrência a transferência de elétrons na interface eletrodo-solução (SILVA NETO, 2019). O sinal eletroquímico é acompanhado pelo monitoramento das mudanças na superfície do eletrodo através dos parâmetros como transferência de carga, transporte de massa ou resistência eletrolítica. (SEGATTO, 2017).

As células eletroquímicas são empregadas no sistema de três eletrodos convencionais: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e contra-eletrodo. O eletrodo de trabalho é a região em que ocorre as reações de oxirredução sendo polarizado mudando drasticamente na passagem de corrente. O potencial do eletrodo de trabalho possui um potencial de equilíbrio. O eletrodo de referência não pode ter mudança drástica de potencial e não é polarizável uma vez que, o potencial é estável ao longo do tempo e da temperatura não sendo alterado por pequenas perturbações. O contra-eletrodo ou eletrodo auxiliar é a região polarizável no qual ocorrem as reações paralelas ou secundárias.

Os biossensores eletroquímicos podem ser subdivididos em cinco categorias: potenciométricos, amperométricos, voltamétricos, condutimétricos e impedimétricos

(espectroscopia de impedância eletroquímica EIE):

- Sensores potenciométricos: é um sensor que apresenta aplicação em processos industriais com acompanhamento de um potencial gerado. O valor desse potencial corresponde ao logaritmo da concentração da espécie ativa no eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo de referência (BRETT, 1996).

- Sensores amperométricos e voltamétricos: Nos amperométricos, ocorre o monitoramento dos valores de corrente elétrica a partir de um potencial constante aplicado. Nos voltamétricos, ocorre o monitoramento dos valores de corrente gerada na superfície do eletrodo de trabalho variando o potencial no intervalo de tempo (BRETT, 1996; SEGATTO, 2017).

- Sensores condutimétricos: uma mudança na condutância medida entre um par de eletrodos. (BRETT, 1996). O número de íons presentes em solução, assim como as cargas influenciam na condutância da solução iônica. (LUCIANO, 2021).

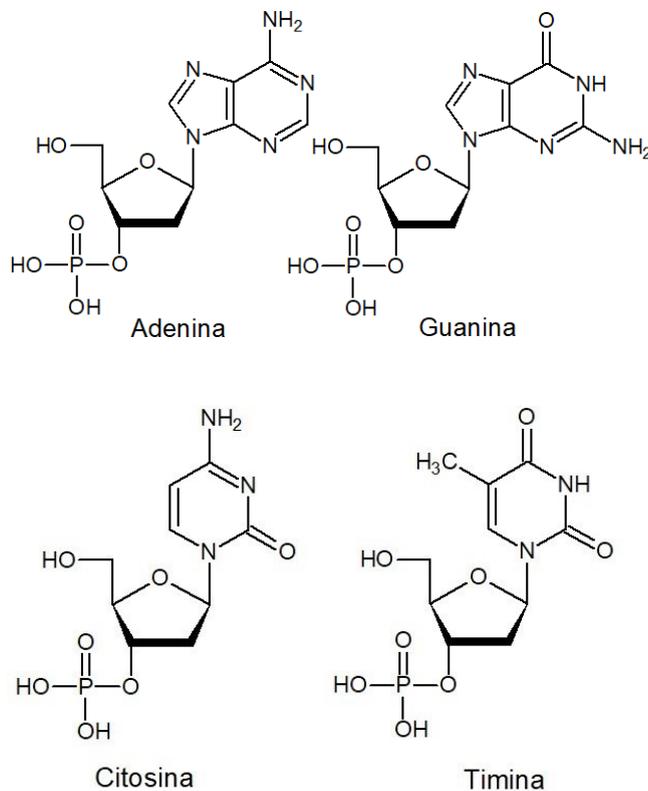
- Sensores impedimétricos: ocorre o monitoramento da mudança na impedância da interface eletrodo-solução. Após a perturbação de um sistema, as propriedades resistivas e capacitivas dos materiais são medidas (SEGATTO, 2017).

1.2.1 Genossensores eletroquímicos

Estudos recentes trazem o crescimento da fabricação de genossensores, conhecidos também por biossensores eletroquímicos de DNA ou RNA. São dispositivos que possuem alta sensibilidade e portabilidade com diferentes aplicações, tais como, detecção de doenças genéticas associadas a mutações pontuais, superexpressão de genes e drogas para o combate ao câncer (OZSOZ, 2012).

O DNA (Ácido Desoxirribonucleico) é o nome dado a molécula que carrega todas as informações genéticas e todos os seres vivos. A molécula de DNA apresenta uma dupla hélice que se entrelaçam em duas fitas. Cada fita possui uma estrutura composta por desoxirribose (grupos alternados de açúcar) e fosfato. Nas estruturas de desoxirribose estão as quatro bases nitrogenadas: adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T) com o pareamento perfeito entre (adenina ligando-se a timina, citosina ligando-se a guanina) com interação específica feita por empilhamento das bases Figura 7. (NIH, National Human Genome Research Institute, 2021).

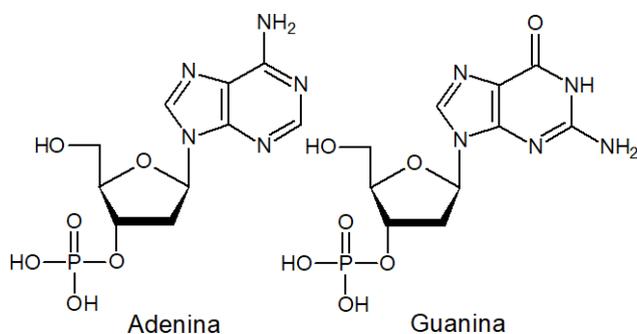
Figura 7 - Bases nitrogenadas que fazem parte da estrutura de DNA



FONTE:elaborada pela autora, 2022.

O RNA (Ácido Ribonucleico) é o nome dado à molécula que realiza a síntese de proteínas celulares substituindo o DNA como transportador de códigos genéticos em alguns vírus. É um polímero de fita simples que apresenta uma estrutura composta por ribose ligados por ligações fosfodiéster. Nas estruturas de ribose estão as quatro bases nitrogenadas: adenina (A), citosina (C), guanina (G) e uracila (U), sendo a uracila substituída pela timina do DNA conforme Figura 8. (CHATTERJEE e WAN, 2018).

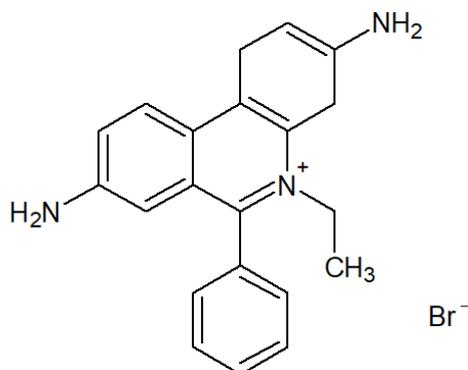
Figura 8 – Bases nitrogenadas que fazem parte da estrutura de RNA



geralmente ocorre durante a hibridização entre os pares de bases por ligação Watson-Crick, que pode ser monitorado por indicadores eletroativos, que são espécies eletroquímicas passíveis de oxidação ou redução, produzindo um sinal eletroquímico mensurável (AFONSO *et al.*, 2013; SERGEEV; HEROLD; RASOOLY 2008). A imobilização da sonda de DNA na superfície do sensor e o processo de hibridização de sequência específica convertem-se em um sinal eletrônico. O sinal eletrônico pode ser direto chamado também na literatura de *Label-free*, produzido pela oxidação de nucleotídeos, ou indireto, sendo necessário a utilização de um indicador eletroquímico para o processo de hibridização (AFONSO *et al.*, 2013). Na detecção indireta, possibilita o uso de intercalantes de DNA, complexos metálicos ou outras moléculas eletroativas incluindo nanopartículas metálicas para uma detecção específica (FLAUZINO *et al.*, 2022). O uso dos indicadores eletroativos comumente utilizados na literatura são brometo de etídio, ferroceno e o azul de metileno. (FLAUZINO *et al.*, 2022).

O estudo de Oliveira e colaboradores (2018) descreve metodologias para a detecção do DNA genômico do vírus da Hepatite B (HBV) utilizando uma metodologia indireta com o intercalante brometo de etídio, sendo a diferença nos valores de corrente um indicativo da presença do HBV. Nesse estudo, a formação da dupla fita de DNA foi detectada através do indicador eletroativo. A estrutura do brometo de etídio é planar, compondo-se de anéis aromáticos e grupamentos que possuem atividade eletroativa, Figura 9. (DE CASTRO *et al.*, 2018). Devido a alta capacidade de se intercalar entre os pares de bases na dupla fita de DNA, o brometo de etídio pode ocasionar alterações na estrutura do DNA, sendo assim um agente mutagênico e provavelmente carcinogênico.

Figura 9 - Representação da estrutura do brometo de etídio

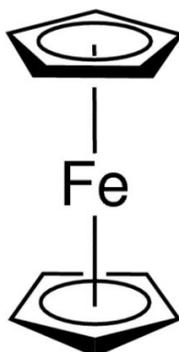


FONTE: elaborada pela autora, 2022.

O ferroceno é um complexo organometálico, que possui características

eletroquímicas atrativas e relevantes com rápida taxa de transferência eletrônica, baixo potencial de oxidação e estabilidade em seus estados redox (RABTI *et al.*, 2016).

Figura 10 - Representação da estrutura do ferroceno



FONTE: elaborada pela autora, 2022.

O ferricianeto e o ferrocianeto de potássio, $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$, também atua como marcador indireto de sondas redox. Segundo Oliveira e colaboradores (2018), um eletrodo modificado com a imobilização de um peptídeo M-12 possibilitou a detecção em solução de ferrocianeto/ferricianeto de potássio de um biomarcador de artrite reumatoide.

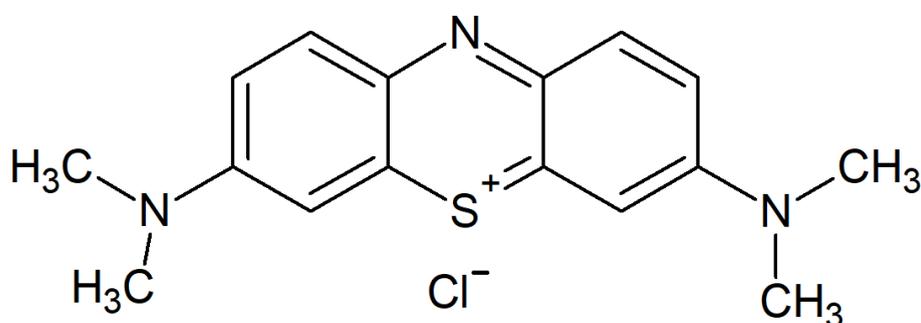
Ao detectar o analito ancorado a biomolécula, pode ocorrer pela detecção direta. A detecção direta, livre de marcadores e indicadores, não é relatada; entretanto adiciona-se uma molécula ao meio, desconsiderando o eletrólito, geralmente caracterizado por uma solução tampão ou solução ácida. Desse modo, o analito e a biomolécula imobilizada na superfície do transdutor, podem ser reconhecidos como um marcador. (FLAUZINO *et al.*, 2022).

Na detecção indireta, a resposta eletroquímica dos indicadores muda após o processo de hibridização do DNA. A ação dos indicadores de hibridização de DNA pode ocorrer pelo processo de interações eletrostáticas e intercalação. A intercalação é uma ligação forte que envolve a inserção de um ligante conjugado entre pares de bases nitrogenadas adjacentes em sonda (dsDNA) ocorrendo uma interação de empilhamento π (BURYA, 2009).

1.2.3 Azul de metileno

O azul de metileno (*Methylene Blue* - MB) é um corante orgânico redox que pertence à família fenotiazina. Devido às suas estruturas químicas, Figura 11, o azul de metileno vem se destacando na utilização como indicador de hibridização de DNA. Ao contrário de outros compostos utilizados para essa finalidade, o MB possui menor toxicidade, pois geralmente não se comporta como intercalante de bases DNA, possuindo afinidade pelo material genético por interações eletrostáticas superficiais. (LIU, 2012).

Figura 11 - Representação da estrutura do azul de metileno



FONTE: elaborada pela autora, 2022.

O azul de metileno interage de forma eletrostática com as cavidades da hélice da dupla fita de DNA, sendo inserido na dupla-fita de DNA (dsDNA ou duplêx). Os compostos que se unem às cavidades da dupla hélice apresentam maior afinidade pelo dsDNA do que pelo ssDNA (fitas simples), de modo que o sinal eletroquímico devido a oxidação do indicador aumenta no processo da hibridização (OZSOZ, 2012).

Os estudos de Millan e Mikkelsen (1993) foram trabalhos pioneiros na aplicação do azul de metileno como indicador de hibridização de DNA. Yang (2002), apresenta interação do azul de metileno com as bases de guanina presentes em um eletrodo modificado com DNA, alternando as sequências de bases de guanina e citosina. A eletroatividade do azul de metileno é detectada pela interação com as guaninas livres. Estudos espectroscópicos evidenciaram a interação eletrostática entre o azul de metileno catiônico e DNA aniônico (LIU, 2012).

Issa e colaboradores (2010) utilizaram o azul de metileno como indicador eletroativo no desenvolvimento de um biossensor eletroquímico na superfície do eletrodo de carbono impresso em tela (SPCE) para a detecção de ácido nucleico relacionado à Tuberculose. É válido ressaltar que o azul de metileno é muito usado devido à ligação não covalente e os potenciais facilmente monitoráveis na superfície do eletrodo de carbono

impresso em tela (SPCE).

1.2.4 Eletrodos impressos

Os eletrodos impressos agregam todos os eletrodos de uma célula eletroquímica convencional. Eles possuem diferentes tecnologias para sua construção, como *screen-printing* (serigrafia), no qual as tintas condutivas são transferidas para um substrato através de uma tela com aberturas. Tintas condutivas de carbono possuem baixo custo e são de fácil síntese, sendo assim os eletrodos de carbono impressos (PCEs) são acessíveis para a montagem dos biossensores, sendo também portáteis e de fácil produção em larga escala, (KILLARD, 2017). A modificação com biomoléculas específicas, os PCEs adquirem parâmetros analíticos como sensibilidade e seletividade, que podem ser aumentados com o uso de nanomateriais como polímeros condutores, nanopartículas metálicas e materiais derivados do grafeno (FLAUZINO 2022).

1.2.5 Técnicas eletroquímicas

1.2.5.1 Cronopotenciometria

A cronopotenciometria (CP) é uma técnica que realiza a aplicação de uma corrente fixa mantida em um nível constante durante um intervalo de tempo e o registro da variação do potencial, sendo caracterizado por ser um método galvanostático (BRETT e BRETT, 1996). Durante a aplicação da técnica de cronopotenciometria, uma pequena quantidade de carga é o suficiente para o carregamento da dupla camada elétrica na região do eletrodo não ocorrendo nenhuma reação. Entretanto, uma quantidade substancial de carga é consumida na reação do eletrodo, assim o potencial em um eletrodo varia apenas até o final do tempo de transcrição, correspondendo ao consumo total das espécies eletroativas na vizinhança do eletrodo. A teoria foi descrita por Sand: em uma solução sem agitação, quando a forma reduzida (R) não está inicialmente presente, a concentração da forma oxidada mudará com o tempo de acordo com a equação 1 (BRETT e BRETT, 1996):

$$c_o(0, t) = c_o^* - \frac{2It^{1/2}}{nFA D_o^{1/2} \pi^{1/2}} \quad \text{Equação 1}$$

c_o e c_o^* : correspondem à superfície do eletrodo e no seio da solução, respectivamente, as concentrações da forma oxidada.

I: corrente aplicada;

n: número de elétrons transferidos;

A: área do eletrodo;

F: constante de Faraday;

D_o : coeficiente de difusão das espécies oxidadas;

Quando c_o se torna zero, a equação 1 torna-se válida se transformando na equação 2:

$$\frac{It^{1/2}}{c_o^*} = \frac{nFA D_o^{1/2} \pi^{1/2}}{2} \quad \text{Equação 2}$$

A técnica é usada para o estudo de mecanismo e cinética das reações químicas, possíveis investigações do mecanismo redox e os fundamentos dos sistemas (reversível, quase-reversível e irreversível) a partir da relação entre potencial e concentração estabelecido na equação de Nernst (BRETT e BRETT, 1996).

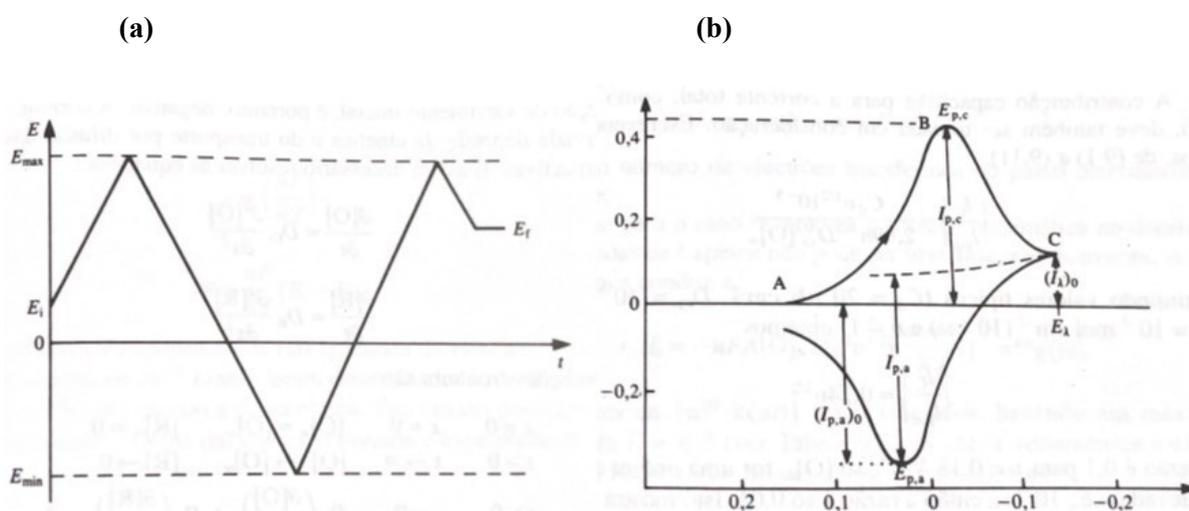
1.2.5.2 Voltametria Cíclica

A Voltametria Cíclica (VC) é uma técnica que proporciona informações sobre a termodinâmica dos processos redox devido a uma análise investigativa dos processos eletroquímicos. O estudo cinético das reações heterogêneas de transferência eletrônica é realizado fornecendo informações sobre a ocorrência de reações químicas acopladas a processos adsorptivos (PACHECO *et al.*, 2013).

É uma técnica definida pela varredura linear do potencial em função do tempo em uma direção. O potencial é linearmente aplicado em uma direção; seja para valores mais positivos (anódicos) ou negativos (catódicos) até alcançar um potencial máximo ($E_{máx}$), em

seguida o potencial é invertido, retornando ao potencial inicial (E_i) ou a outro potencial mínimo (E_{\min}) gerando o primeiro ciclo Figura 12(a). A Figura 12(b) mostra o voltamograma cíclico da espécie eletroativa com as correntes de picos de oxidação e redução (BRETT, 1996; SEGATTO, 2017).

Figura 12 - Perturbação do potencial em função ao tempo na VC (a), voltamograma cíclico corrente vs potencial aplicado (b).

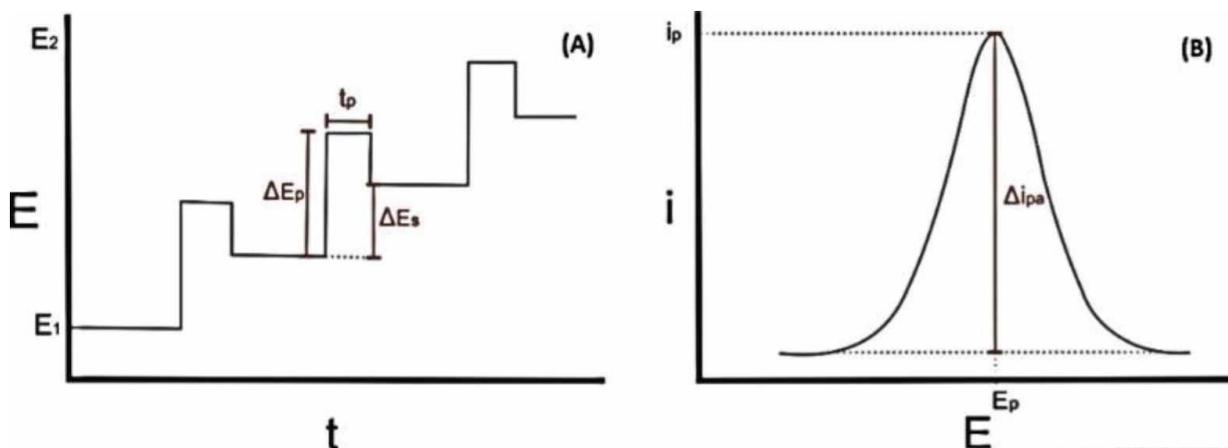


FONTE: BRETT, 1996

1.2.5.3 Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)

A Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) é uma técnica que consiste na aplicação de pulsos de potencial em função do tempo. A técnica ocorre a partir da sobreposição de pulsos com amplitude fixa à uma rampa de potencial crescente (Figura 13). A corrente é medida em dois instantes, o primeiro antes da aplicação do pulso e outra ao final do pulso, antes do decaimento completo do pico. A diferença de corrente ocorre entre os dois valores de corrente para cada pulso, obtendo uma resposta em função do aumento linear do potencial de excitação (ALVES, 2018 e SILVA NETO, 2019).

Figura 13 - Programação da voltametria de pulso diferencial (a), voltamograma de pulso diferencial com corrente elétrica em função do potencial (b).



FONTE: SILVA NETO, 2019.

A técnica apresenta algumas vantagens importantes tais como: aumento da corrente faradaica, corrente gerada pelos processos de oxidação e redução; e a minimização da corrente capacitiva, devido ao carregamento da dupla camada elétrica. A corrente observada é a diferença entre as correntes faradaica e capacitiva (SILVA NETO, 2019 BRETT, 1996).

1.2.5.4 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

A técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS, do inglês *Electrochemical Impedance Spectroscopy*) é utilizada na análise de processos eletroquímicos que ocorrem na interface eletrodo/ solução. O fundamento da técnica ocorre a partir da perturbação de natureza senoidal ao potencial de trabalho do sistema eletroquímico, que pode diferir em fase e amplitude do sinal aplicado (INSTRUMENTS, 2007). A medição dessa diferença possibilita observar que os sinais de baixa amplitude quando comparados com as técnicas de corrente contínua, permite com que as reações químicas ocorram na interface do estado estacionário. Além de fornecer informações em relação às contribuições de difusão, cinética, dupla camada, reações homogêneas acopladas, etc. (BRETT e BRETT, 1996).

Algumas vantagens definem a importância da técnica, uma vez que é uma técnica não-destrutiva e os modelos de circuitos eletrônicos simples podem ser usados para

representar os sistemas eletroquímicos.

A impedância total de um circuito pode ser calculada com base na Lei de Ohm (é a medida da resistência à passagem de corrente elétrica) sendo expressa pelas equações matemáticas:

$$R = \frac{V}{i} \quad \text{Equação 3}$$

R: resistência elétrica, unidade Ohm (Ω)

V: tensão ou potencial elétrico, medido em Volts (V)

i: corrente elétrica, medida em Amperes(A)

$$Z = \frac{V}{i} \quad \text{Equação 4}$$

Z: impedância

V: tensão ou potencial elétrico, medido em Volts (V)

i: corrente elétrica, medida em Amperes(A)

Os componentes elétricos obtidos com a impedância eletroquímica são:

R_s : resistência do eletrólito/ da solução (Ω)

R_{ct} : resistência a transferência de carga (Ω)

C_{dl} : capacitância da dupla camada elétrica (F)

Q/CPE: elemento de fase constante (F)

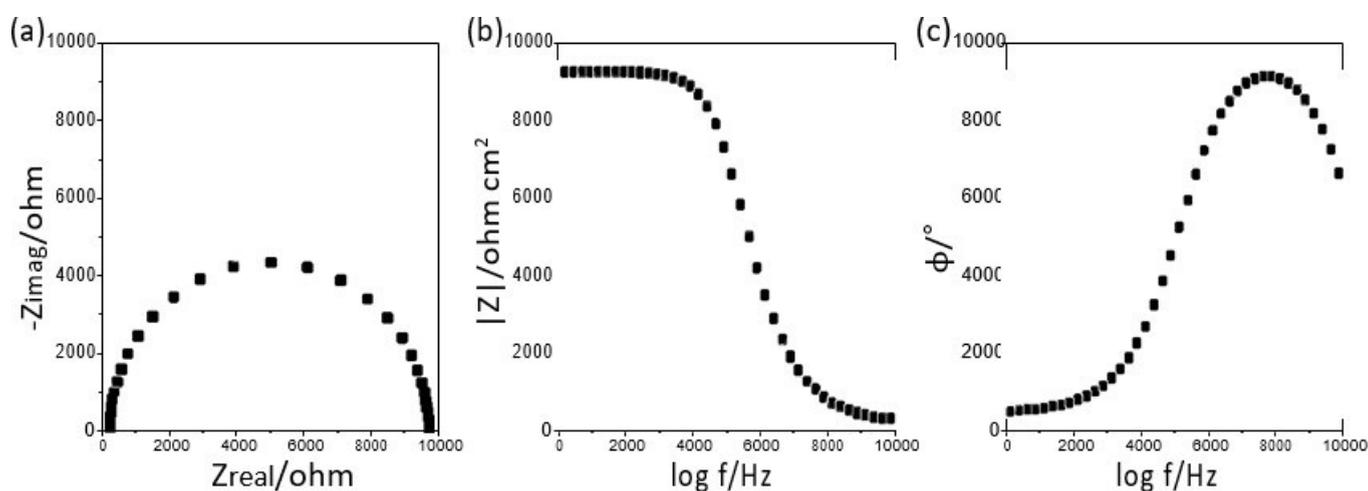
Os espectros de impedância obtidos são:

Diagrama de Nyquist: a representação ocorre com os dados da impedância real (Z') vs a impedância imaginária (Z'')(Figura 14a). A interpretação gráfica mostra o comportamento da superfície analisada do eletrodo. O valor de eixo Z' em altas frequências descreve a presença de uma resistência da solução eletrolítica, em regiões de baixa frequência no eixo Z'' descreve processos faradaicos. A predominância de um comportamento capacitivo tem-se uma linha perpendicular ao eixo real, um semicírculo descreve a presença dos componentes capacitivo e resistivo, um semicírculo negativo está relacionado com o efeito indutivo (RIBEIRO, 2020; SEGATTO, 2021).

Diagrama de Bode: a representação ocorre com o módulo da impedância versus o logaritmo da frequência (f/Hz)Figura 14(b), descrevendo características sobre magnitudes de resistência da solução e magnitude da impedância total do sistema ou o ângulo de fase

versus o logaritmo da frequência. Além disso, um circuito equivalente e apropriado para o sistema é construído na representação que pode ocorrer também com o ângulo de fase (ϕ) vs logaritmo da frequência (f/Hz) Figura 14(c), descrevendo características a respeito das diferentes constantes de tempo e como elas são relacionadas com a frequência.

Figura 14 – Espectros obtidos por EIS: (a) Diagrama de Nyquist; (b) Diagrama de Bode, na forma $|Z|$ vs. $\log(f/\text{Hz})$; e (c) Diagrama de Bode na forma ϕ vs. $\log(f/\text{Hz})$;



FONTE: SEGATTO, 2021.

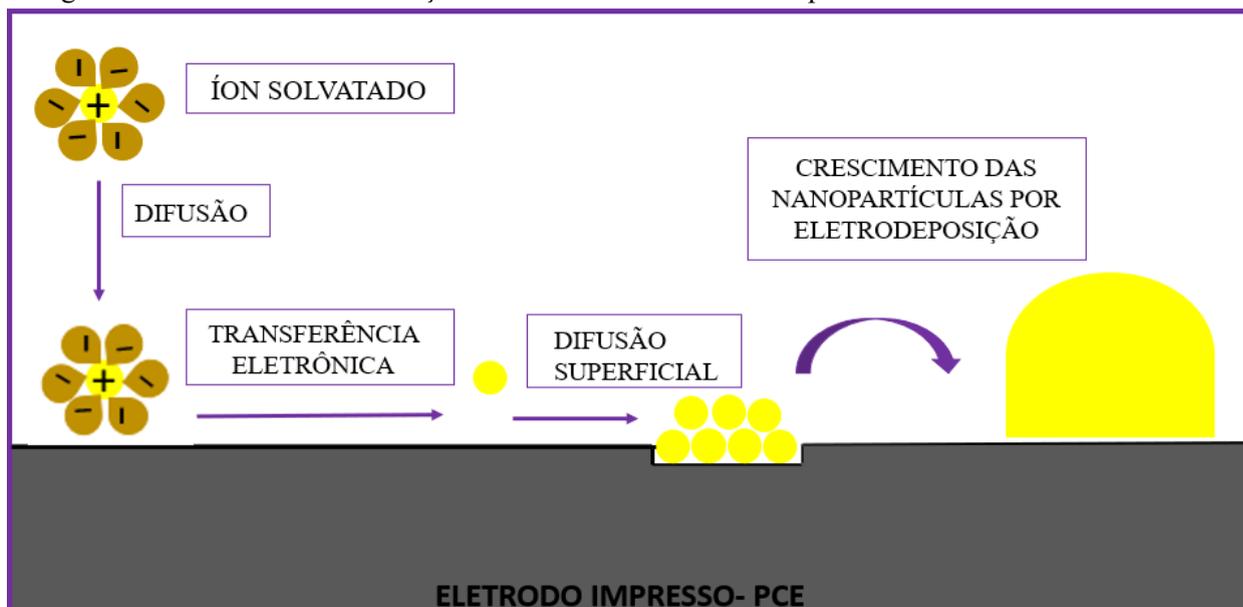
1.3 Eletrodeposição

A eletrodeposição é definida por um processo eletroquímico que prepara a deposição de filmes na superfície de materiais condutores. O material eletrodepositado é formado a partir da passagem de corrente elétrica dentro de uma célula eletroquímica, um dispositivo que consiste em dois eletrodos condutores ou semicondutores imersos em um eletrólito. Na célula eletroquímica, o eletrodo de trabalho é constituído pelo cátodo enquanto que o contra-eletrodo é constituído pelo ânodo. A região do eletrodo de trabalho apresenta o processo da eletrodeposição e a região do contra-eletrodo irá fechar o circuito elétrico. Os eletrólitos são normalmente soluções aquosas preparadas pela dissolução de sais metálicos contendo íons positivos e negativos (PASA e MUNFORD, 2002)

A passagem da corrente elétrica ocorre entre os eletrodos condutores a partir do potencial aplicado devido ao movimento de espécies carregadas, por meio da migração e

difusão. As reações de oxidação/ redução das espécies iônicas ocorridas na superfície do eletrodo são provenientes da ocorrência de reações eletroquímicas no processo de interface do eletrodo (PASA; MUNFORD, 2002).

Figura 15 - Mecanismo de formação e crescimento do filme na superfície do eletrodo de trabalho



FONTE: adaptado PASA e MUNFORD, 2002

O processo da eletrodeposição pode ser descrito pela Figura 15. Inicialmente um íon solvatado é transportado na superfície do eletrodo passando pela camada de difusão. No segundo momento ocorre o afrouxamento da esfera de solvatação pela transferência eletrônica sendo adsorvido no eletrodo. No terceiro momento, ocorre a perda das moléculas de água da camada de solvatação e o íon livre adsorve-se na superfície do eletrodo. Num quarto momento é observada a formação dos sítios de deposição conhecidos como sítios de nucleação. Os sítios de nucleação são formados por núcleos (ilhas) que se desenvolvem para grãos formando depósitos compactos que crescem no topo da superfície do eletrodo, possibilitando o crescimento das nanopartículas. (PASA; MUNFORD, 2002).

O processo de eletrodeposição, também conhecido como deposição eletroquímica, possibilita a movimentação dos íons saindo do seio da solução e reduzidos na superfície do eletrodo de trabalho. A eletrodeposição de filmes metálicos ou óxidos metálicos tem grande aplicação na eletrocatalise (LEITE, 2018).

1.4 Nanopartículas

O rápido avanço na área da nanotecnologia possibilitou a síntese e fabricação de nanopartículas (NPs) de diversos materiais, que possuem propriedades distintas de seus materiais de origem (*bulk*). A síntese de nanopartículas pode partir do material de origem, caracterizando uma metodologia *top-down*, ou partir de átomos e íons individuais, caracterizando uma síntese *bottom-up*. Essas nanopartículas, em geral, possuem maior área superficial e efeitos eletrocatalíticos e/ou ópticos superiores aos materiais de origem, possuindo dimensões na ordem de 1 a 100 nm (KHAN *et al.*, 2019). Desse modo, novos horizontes estão surgindo para aplicação de nanopartículas em biossensores e bioensaios (MALHOTRA e PANDEY, 2017).

As nanopartículas apresentam três camadas em sua composição. A primeira camada é a camada superficial, apresenta uma variedade de pequenas moléculas, íons metálicos, surfactantes e polímeros para a funcionalização. A segunda camada é composta pela casca, material quimicamente diferente do núcleo. A terceira camada é composta pelo núcleo, definido como a porção central das nanopartículas (KHAN *et al.*, 2019).

As propriedades físicas das nanopartículas são importantes e fundamentais para as diversas aplicações. Segundo Strambeanu e colaboradores (2015), as nanopartículas podem ser definidas pelas seguintes características:

- Área de superfície: as propriedades se modificam tanto no tamanho das partículas quanto na interação com os sistemas.
- Propriedades ópticas: as nanopartículas possuem propriedades ópticas específicas visto que suas dimensões limitam a espessura da camada de elétrons comum dos metais gerando efeitos quânticos.
- Uniformidade: os componentes que formam as nanopartículas (clusters, agregados, metais ou filamentos, etc) são definidos pela interação de forças entre as moléculas ou átomos de uma partícula e a relação entre as forças de interação presentes nas partículas.
- Funcionalização: interação existente entre os grupos funcionais presentes nas nanopartículas e os respectivos componentes de interação (moléculas, polímeros, enzimas, etc) de acordo com as características físico-químicas.

Considerando as diferentes composições e dimensões das nanopartículas, sua aplicabilidade vem se tornando importante, já que são usadas para a transdução eletrônica,

óptica e micro gravimétrica em diferentes eventos de reconhecimento biomolecular. O sinal proporcionado das nanopartículas fornecem base para detecção óptica e elétrica ultrasensível com sensibilidade semelhante ao PCR. As NPs permitem relacionar a interface dos eventos de reconhecimento de DNA com transdução do sinal eletroquímico com amplificação da resposta resultante (ZHANG *et al.*, 2008).

Na construção de sensores eletroquímicos, as NPs metálicas se destacam pois melhoram as propriedades elétricas e condutoras dos eletrodos, desenvolvendo assim biossensores mais sensíveis e seletivos. Metais nobres como ouro, platina e prata são muito utilizados para síntese de NPs, porém o alto custo limita sua utilização. Dessa forma, há uma procura de outros metais para síntese de nanopartículas, dentre eles o cobre, uma vez que trata-se de um material de custo mais baixo e com estabilidade semelhante aos metais nobres e superior a metais mais abundantes como ferro. (REGIART *et al.*, 2015). A eletrodeposição de nanopartículas metálicas diretamente na superfície de eletrodos proporciona um aumento da área superficial do transdutor, aumentando também a condutividade e características electrocatalíticas que propiciam o aumento do limite de detecção (REGIART *et al.*, 2015).

As nanopartículas de cobre se apresentam como um excelente electrocatalisador em reações de oxidação e redução devido ao sobrepotencial de hidrogênio relativamente alto. Os eletrodos modificados com nanopartículas de cobre são amplamente empregados como ânodo com a finalidade da oxidação electrocatalítica de vários compostos, como álcoois. Em contrapartida, elas têm sido usadas como cátodo na redução electrocatalítica de nitrato, dióxido de carbono assim como também compostos nitroaromáticos (ALLAHNOURI *et al.*, 2019).

Conforme Sundaresan e colaboradores (2015), o cobre é um material abundante e econômico em comparação com a prata e o ouro. Além disso, apresenta funcionalidade da superfície, caráter magnético avançado, atividade química e excelente condutividade elétrica.

2. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar um genossensor confeccionado usando a eletrodeposição de nanopartículas de cobre sobre eletrodos impressos à base de tinta de carbono (PCE) para a detecção do Hantavírus.

2.1 Objetivos Específicos

- a) Otimizar o pré-condicionamento dos eletrodos impressos;
- b) Depositar eletroquimicamente as nanopartículas de cobre;
- c) Detectar eletroquimicamente o alvo complementar (Hant 2);
- d) Avaliar a especificidade frente a sequências de oligonucleotídeos não complementares;
- e) Avaliar a seletividade na presença de componentes do soro;
- f) Avaliar o limite de detecção e o limite de quantificação;
- g) Avaliar a estabilidade do biossensor;

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados nos processos experimentais foram: ácido sulfúrico, Sigma Aldrich Chem.® (St. Louis, MO, USA) com grau de pureza (99%); A solução preparada com hidrogenofosfato dissódico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) com grau de pureza ($\geq 99\%$), hidrogenofosfato monossódico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) com grau de pureza ($\geq 98\%$) e cloreto de potássio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) obtidos da Neon (grau P.A.), constituiu o tampão fosfato salino; o hexacianoferrato (III) de potássio obtido da Acros Organics com grau de pureza ($\geq 99\%$); o hexacianoferrato (II) de potássio obtido da Fluka Analytical com grau de pureza ($\geq 99,5\%$); o acetato de butilglicol com grau de pureza ($\geq 98\%$) adquirido da Dinâmica; a resina vinisol H (grau P.A.) adquirido da Mexichem S/A; o metil isobutil cetona adquirido da Vetec com grau de pureza (99%); o grafite em flocos (325 mesh) adquirido da Sigma Aldrich® com grau de pureza ($>99\%$); o negro de fumo obtido do Arinos; o sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) foi obtido da Dinâmica ® (grau P.A.); o hidróxido de sódio (NaOH) obtido da Synth® (grau P.A.); o azul de metileno ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$) obtido da Synth® (grau P.A.). A sequência da sonda específica para o hantavírus e RNA genômico foram fornecidos pelo grupo de pesquisa em Microbiologia Aplicada do Centro de Biotecnologia de los Recursos Naturale, Universidad Católica del Maule, Talca, Chile. Os oligonucleotídeos sonda (Hant 1) e alvo (Hant 2) foram sintetizados e obtidos comercialmente. Os oligonucleotídeos foram adquiridos da Alpha DNA e preparados em uma solução de tampão fosfato salino ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$).

As massas dos reagentes foram pesadas em quantidades adequadas em uma balança analítica da *Shimadzu*, modelo AUW220D, as soluções foram pipetadas com micropipetas volumétricas e transferidas para balões volumétricos apropriados. O volume do balão volumétrico foi acertado com a adição de água deionizada (condutância $0,05 \mu\text{S}$) em sistema Master (Gehaka, Brazil).

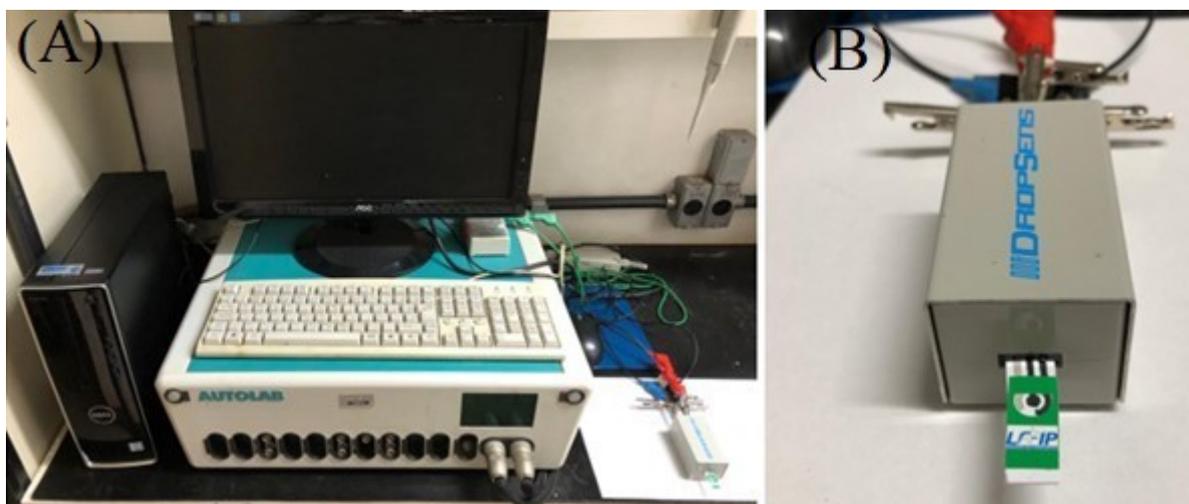
As soluções usadas no sistema eletroquímico com os eletrodos impressos foram preparadas no momento da utilização experimental sendo borbulhadas com nitrogênio ultrapuro sobre a superfície do eletrodo por 10 minutos antes de seu uso, para remoção do oxigênio dissolvido. Os oligonucleotídeos foram armazenados sob refrigeração em

temperatura abaixo de 0°C.

3.2 Instrumentação

Os eletrodos impressos com tinta de carbono (PCE), montados de forma artesanal, foram conectados a uma estação de trabalho eletroquímica. O adaptador de eletrodo impresso utilizado foi o DropSens, sendo necessário 80 μL de solução na superfície do eletrodo. As técnicas eletroquímicas, voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial, cronopotenciometria e impedância eletroquímica foram realizadas em um potenciostato/galvanostato da Metrohm/Autolab, modelo PGSTAT302N equipado com módulo FRA, Utecht, utilizando o *software* NOVA, para obtenção e tratamento dos dados experimentais Figura 16.

Figura 16 - Potenciostato Metrohm/Autolab PGSTAT302N (a), conector DropSens (b).



FONTE: elaborada pela autora, 2022.

As imagens de morfologia da superfície dos eletrodos impressos foram obtidas com um microscópio eletrônico de varredura da LMU, modelo Vega3, (TESCAN, Czech Republic) operado a 5,00 kV, do Laboratório de Multiusuários do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQ-UFU), Figura 17. O revestimento das superfícies das amostras com ouro (5nm de espessura) foi obtido por um pulverizador Quorum, modelo 150 R e corrente de 20 mA. O recobrimento tem como objetivo de melhorar a qualidade da imagem direcionando os elétrons de forma adequada para a análise da amostra.

Figura 17 – Equipamento de metalização (à esquerda) e microscópio eletrônico de varredura (à direita)



FONTE: elaborada pela autora, 2022.

As imagens morfológicas da superfície dos eletrodos foram realizadas com a técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM - *Atomic Force Microscope*) utilizando um microscópio de força atômica da Hitachi, modelo AFM5100N (Japão), com os dados de rugosidade média quadrática (R_q), Figura 18. O procedimento adotado foi o modo de contato intermitente, utilizando um cantilever comercial de silicone e as informações coletadas a temperatura ambiente.

Figura 18 – Microscópio de Força Atômica da Hitachi; modelo 5100N

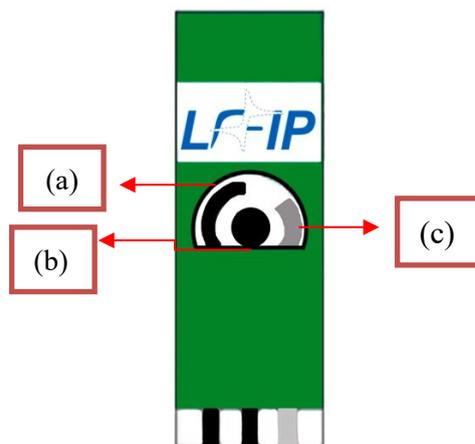


FONTE: adaptado SILVA NETO,2019.

3.3 Preparação de tintas de carbono e de prata

Considerando a composição de três eletrodos para a célula eletroquímica, utilizou-se a tinta de carbono para a impressão dos eletrodo de trabalho e contra-eletrodo, utilizou-se a tinta de prata para a impressão do eletrodo de referência, Figura 19.

Figura 19 – Eletrodos impressos com tinta de carbono e prata: (a) eletrodo de trabalho, (b) contra eletrodos, (c) eletrodo de referência.



FONTE: MOÇO *et al.*, 2021

Paula (2014); descreve o preparo da tinta de prata misturando duas soluções recém- preparadas. A primeira solução foi preparada com 10 g de flocos de prata e 1,9 mL de acetato de butilglicol. A segunda solução foi preparada com 10 mL de resina vinisol a 20% em metil isobutil cetona, sendo aquecida a 50°C e agitada até sua solubilização completa. Retirou-se uma alíquota de 1,022 g da solução preparada com resina vinisol para que fosse adicionada a solução de flocos de prata. A mistura foi mantida em aquecimento e em agitação constante para a homogeneização da tinta.

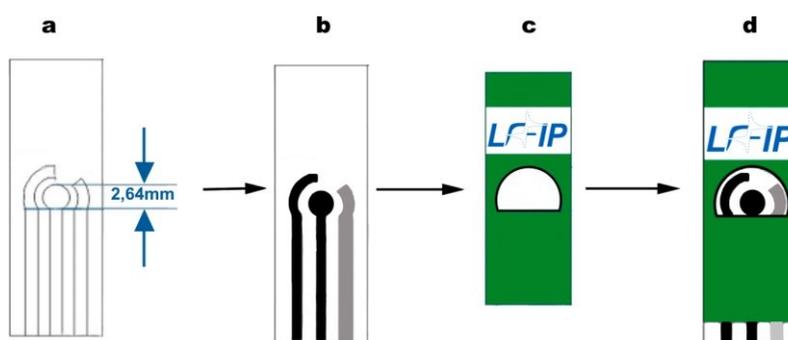
Moço e colaboradores (2021); prepararam a tinta de carbono misturando 1,6 g de resina vinisol H em 11,0 mL de metil isobutil cetona aqueceu a 50 °C sob agitação constante. Em seguida, adicionou-se à solução 7,3 g de flocos de grafite (325 mesh), 1,6 g de negro de fumo e 9,0 mL de acetato de butilglicol a solução. A mistura foi mantida a 50 °C sob agitação para a homogeneização da tinta.

3.4 Construção do PCE/Ag

O *design* do eletrodo de carbono impresso em tela de vinil foi criado no Corel Draw 2018, os moldes dos eletrodos foram feitos com um plotter Roland 540 com agulha Roland de 45°. O tempo de fabricação foi de 50 a 60 minutos para o desenvolvimento de todas as etapas. O adesivo de vinil apresenta dimensões 210 nm por 297 nm (dimensões compatíveis com uma folha A4). Essa dimensão comporta 63 recortes de eletrodos (MOÇO *et al.*, 2021). O substrato impresso para o PCE fabricado foi cloreto de polivinila (PVC).

A etapa inicial consiste na colagem do adesivo vinílico sobre a superfície de PVC Figura 20(a). A região delimitada pelo eletrodo de referência é retirada e, com um adesivo auxiliar, a trilha do contra eletrodo e do eletrodo de trabalho são protegidas. Em seguida, aplicou-se a tinta de prata com uma espátula retilínea no trajeto do eletrodo de referência Figura 20(b). O eletrodo foi aquecido a 55 °C por 25 minutos para a cura da tinta de prata, Figura 20(b). Os adesivos que cobriam as áreas do eletrodo de trabalho e o contra eletrodo são removidos e a área do eletrodo de referência é coberta com um adesivo. Em seguida, a tinta de carbono é aplicada nas regiões do eletrodo de trabalho e contra eletrodo utilizando a espátula retilínea Figura 20(b). Após esse processo, o eletrodo é levado ao aquecidos a 55 °C por 25 min para a cura da tinta de carbono. Após o processo, os eletrodos são recortados, os adesivos são retirados e os moldes colocados Figura 20(c), para determinar a área eletroanalítica do PCE, conforme as etapas descritas na Figura 20(d).

Figura 20 - Construção e montagem do eletrodo de carbono impresso em tela PCE/Ag (a) Adesivo de vinil com molde das regiões dos eletrodos de trabalho, contra-eletrodo e eletrodo de referência. (b) Após a remoção dos adesivos, as tintas de carbono e prata são passadas. (c) O adesivo do molde é usado para isolar e delimitar a área eletroanalítica. (d) PCE / Ag final.



FONTE: MOÇO *et al.*, 2021.

3.5 Preparo e seleção dos eletrodos impressos de PCE/Ag

Após a construção dos eletrodos impressos (Figura 21), os eletrodos foram pré-condicionados, como uma forma de limpeza química da superfície, conforme o procedimento padrão do laboratório. O pré-condicionamento baseou-se na varredura cíclica de potencial no intervalo de 0 até +1 V, primeiro em solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹, e depois em solução tampão fosfato (PBS 0,10 mol L⁻¹ pH = 7,4) que é o eletrólito suporte dos próximos experimentos. Em tampão fosfato foram feitos voltamogramas cíclicos em duas velocidades 25 ciclos a 500 mV/s e 6 ciclos a 100 mV/s. O último VC a 100 mV/s de cada eletrodo é comparado com os demais por se tratar do perfil capacitivo do eletrodo. Posteriormente ao condicionamento eletroquímico, os eletrodos são lavados com água deionizada e secos em fluxo de nitrogênio (NETO *et al.*; 2019; MOÇO *et al.*, 2021).

O principal objetivo do pré-condicionamento é a estabilização da corrente não-faradaica, gerando um perfil capacitivo ao sistema eletroquímico. Quando os VC apresentam corrente de pico de oxidação e redução ou uma grande variação nos valores de correntes não-faradaica, eles são descartados.

Figura 21 – Eletrodos confeccionados com PCE/Ag



FONTE: elaborada pela autora, 2022.

3.6 Eletrodeposição de nanopartículas de cobre

A eletrodeposição de nanopartículas de cobre ocorreu nos eletrodos impressos

pré-condicionados eletroquimicamente. As nanopartículas de cobre foram eletrodepositadas pela técnica galvanostática. Na primeira etapa, 80 μL da solução de sulfato de cobre pentahidratado 10 mmol L^{-1} foram adicionados sobre os eletrodos impressos de PCE/Ag, aplicou-se uma corrente de $-225 \mu\text{A}$ 60 s, reduzindo Cu^{2+} para Cu^0 , o que resultou no surgimento de um pico de redução.

Em seguida, observou-se a oxidação espontânea do cobre em contato com o oxigênio do ar, formando óxidos na superfície eletrodepositada. Para estabilizar as nanopartículas formadas, adicionou-se uma solução de hidróxido de sódio a 0,1 mol L^{-1} sobre o eletrodo e aplicou-se 20 ciclos de varredura a 100 mV/s no intervalo de potencial de 0 a +1 V (PÉREZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2017).

3.7 Caracterização das nanopartículas de cobre por MEV e AFM

Os eletrodos impressos (PCE) foram analisados morfológicamente por imagens de AFM e MEV. Os equipamentos e os parâmetros utilizados são aqueles descritos no tópico 3.2. As análises foram realizadas após pré-condicionamento e a eletrodeposição de nanopartículas de cobre sobre os eletrodos. Após os procedimentos experimentais usuais, os eletrodos impressos pré-condicionados foram secos sob fluxo de gás nitrogênio ultrapuro e juntamente com os eletrodos depositados com nanopartículas de cobre foram colocados em dessecador a vácuo, em temperatura ambiente, por 24 horas antes da análise de MEV e AFM. Durante o transporte do material para a realização do MEV e do AFM, os eletrodos foram mantidos em atmosfera de nitrogênio ultrapuro em sistemas fechados para evitar contaminação.

3.8 Caracterização eletroquímica das nanopartículas de cobre

O comportamento eletroquímico dos PCEs relacionado com a transferência de elétrons foi observado com as medidas de voltametria cíclica em solução de KCl 0,1 mol L^{-1} com $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol L^{-1} antes e após a eletrodeposição de nanopartículas de cobre para observar mudanças na área eletroativa do eletrodo. Os parâmetros

estabelecidos foram 5 voltamogramas cíclicos com velocidade de varredura de 100 mV/s, aplicados na faixa de -0,5 a +1,0 V. Os resultados foram analisados dentro da equação de Randles-Sevcik para reações reversíveis que apresentam corrente de pico relacionadas com a concentração da espécie eletroativa a 25°C:

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^2 C D^2 v^2 A \quad \text{Equação 5}$$

I_p = corrente de pico (A)

n = número de elétrons transferidos

C = concentração da espécie eletroativa (mol/cm^3)

D = coeficiente de difusão (cm^2/s)

v = velocidade da varredura (V/s)

A = área do eletrodo (cm^2)

Após estudo voltamétrico, caracterizou-se os eletrodos com a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). As medidas foram realizadas com os eletrodos antes e após o processo de eletrodeposição das nanopartículas de cobre. Os eletrodos com perfil eletroquímico diferente do padrão foram descartados.

3.9 Imobilização da sonda DNA Hant 1 e detecção indireta do alvo Hant 2

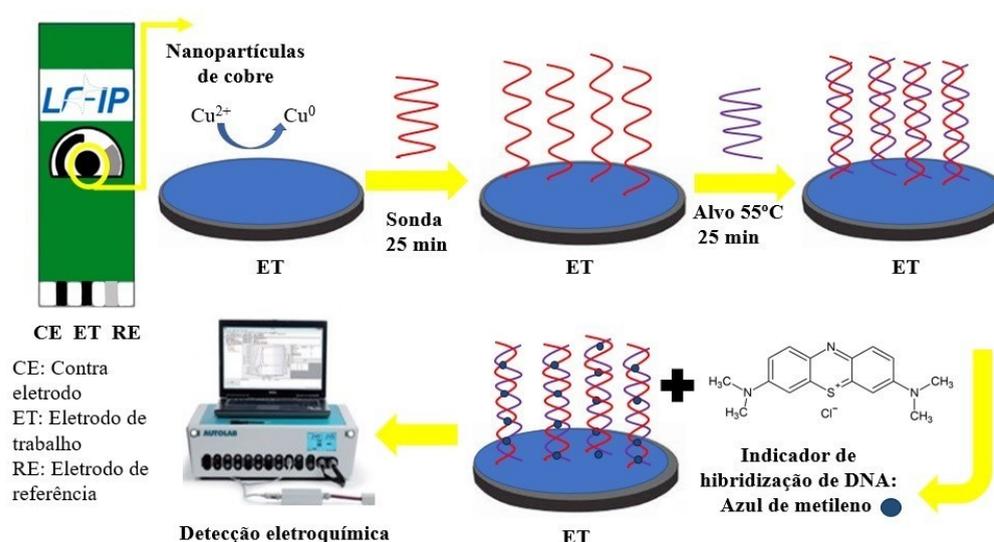
A imobilização da sonda específica de DNA Hant 1 (5'-GGATCAACTGGTTTTGTAGCCAATT-3') 0,1 mol L⁻¹ em tampão fosfato de sódio foi realizada na superfície do transdutor. Gotejou-se 5 µL de Hant 1 na região do eletrodo de trabalho dos PCEs e mantidos hermeticamente fechados por 25 minutos a 25 °C. Esse intervalo de tempo é necessário para que ocorra o processo de adsorção física da sonda a plataforma PCE/CuNp/Hant1. Posteriormente, os PCEs foram lavados por 5 segundos por imersão em tampão fosfato de sódio (0,1 mol L⁻¹ pH = 7,4) para que as sondas não-adsorvidas se lixiviassem da plataforma.

Em seguida, adicionou-se o alvo de DNA, Hant 2, sendo gotejados 5 µL dessa solução na região do eletrodo de trabalho para a avaliação da especificidade da sonda imobilizada. Os PCEs foram levados a uma temperatura de 55 °C por 25 minutos, para promover o anelamento entre sonda e alvo. Após a hibridização, os PCEs foram lavados por 5 segundos, por imersão em tampão fosfato de sódio (0,1 mol L⁻¹ pH = 7,4) com a

finalidade de remover biomoléculas que não se anelaram à sonda.

Gotejou-se 5 μL da solução de azul de metileno 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sobre a região do eletrodo de trabalho dos PCEs para a detecção indireta da hibridização do DNA. Os eletrodos foram mantidos hermeticamente fechados durante 25 minutos a 25°C. Em seguida, os eletrodos foram lavados em água deionizada por 5 segundos e caracterizados utilizando a técnica de Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) Figura 22.

Figura 22 – Esquema representativo da confecção da plataforma PCE/NpCu-Hant 1/Alvo Hant2/Azul de metileno



FONTE: elaborada pela autora, 2022.

3.10 Construção da curva analítica

A curva de calibração do biossensor foi obtida utilizando uma solução de DNA de fita simples complementar a sonda Hant 1 (5'AATTGGCTACAAAACCAGTTGATCC) nas concentrações de 0,03 $\mu\text{g/mL}$, 0,3 $\mu\text{g/mL}$, 3 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$ e 300 $\mu\text{g/mL}$. Utilizou-se o programa Origin® para fazer o gráfico da corrente de pico de redução do azul de metileno em função da concentração do alvo Hant 2. Para cada ponto da curva, foram realizadas medidas em triplicatas com eletrodos diferentes.

No cálculo da sensibilidade considerou-se o coeficiente angular da reta (S) e o desvio padrão do branco (δ). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados usando as equações (SHRIVASTAVA; GUPTA, 2011):

$$LD = \frac{3\delta}{S} \quad \text{Equação 6}$$

$$LQ = \frac{10\delta}{S} \quad \text{Equação 7}$$

3.11 Estudo de estabilidade dos PCEs

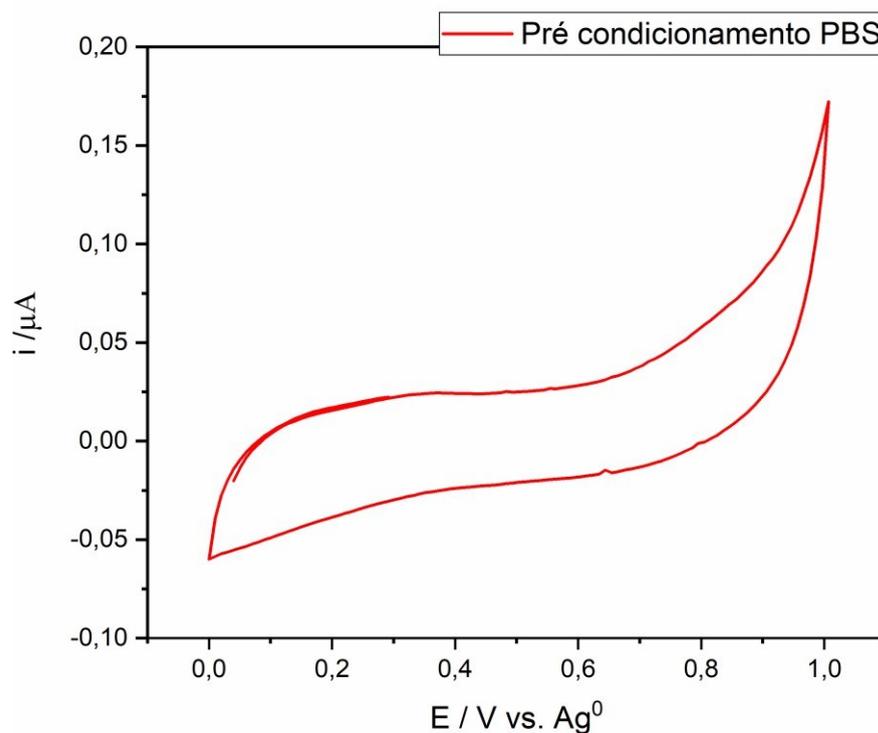
As estabilidades dos PCEs foram analisadas durante um intervalo de tempo de 7, 15, 21 e 30 dias. Os eletrodos modificados com a sonda na plataforma (PCE/CuNp-Hant1/Alvo Hant2/MB) foram armazenados em câmaras úmidas hermeticamente fechadas e sem a presença da luz a 8°C. Posteriormente, os eletrodos foram avaliados eletroquimicamente conforme o item 3.9.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção dos eletrodos impressos PCE/Ag

Os eletrodos impressos PCE/Ag foram selecionados após apresentarem um bom comportamento no pré-condicionamento eletroquímico. A seleção ocorreu a partir da análise de voltamogramas obtidos em solução de ácido sulfúrico de 0,5 M e tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH = 7,4) na faixa entre -50 nA a 150 nA. O objetivo é obter uma padronização e uma reprodutibilidade dos perfis eletroquímicos dos eletrodos antes da iniciação dos testes. Considerando que a construção dos eletrodos PCE/Ag não apresenta nenhum tipo de pré-tratamento físico, como polimento mecânico da superfície do eletrodo de trabalho, o condicionamento dos eletrodos impressos é uma forma eficaz de seleção dos mesmos. O resultado eficaz do pré-condicionamento eletroquímico é apresentado na Figura 23.

Figura 23 – Registro do último voltamograma cíclico do PCE/Ag em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, $v = 100$ mV/s



FONTE: elaborada pela autora, 2022.

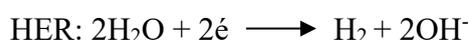
O pré-condicionamento possui a finalidade de remover os possíveis contaminantes interferentes adsorvidos na superfície. Portanto, os eletrodos que não apresentaram o perfil eletroquímico definido pelo grupo de pesquisa foram descartados.

4.2 Características das nanopartículas de cobre

As nanopartículas de cobre foram produzidas pelo processo de eletrodeposição. O mecanismo da eletrodeposição envolve inicialmente uma etapa de redução do cátion Cu(II) na superfície do eletrodo, essa redução ocorre a partir de um potencial ou corrente aplicada (BRETT, 1996). A eletrodeposição possibilita a produção de nanopartículas com características específicas, como o tamanho, a morfologia e a composição. É um processo único, simples, rápido e barato, com a vantagem da adsorção da nanopartícula na superfície do substrato (MOHANTY, 2011).

Para a formação das nanopartículas de cobre, o uso da técnica galvanostática, ocorre a aplicação de uma corrente constante entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo, medindo-se o valor da tensão entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência em função do tempo (cronopotenciometria) (MACDONALD, 1977). Nesse processo, há um pseudo referência no qual a aplicação da corrente elétrica induz ao processo de redução facilitando a formação das nanopartículas de cobre. Os processos catódicos encontrados em PCEs possibilitam a redução do cobre Cu^{2+} a Cu^0 em um potencial mais negativo, visto que é observado a reação de redução de oxigênio (ORR) (Figura 24A). A reação de redução de oxigênio (ORR) caracteriza a redução do gás oxigênio em água. A transferência eletrônica ocorre na solução de cobre permitindo a redução do composto. Após isso, o hidróxido de sódio irá protonar a superfície possibilitando a adsorção da superfície catalítica (Figura 24B) (WU *et al.*, 2017).

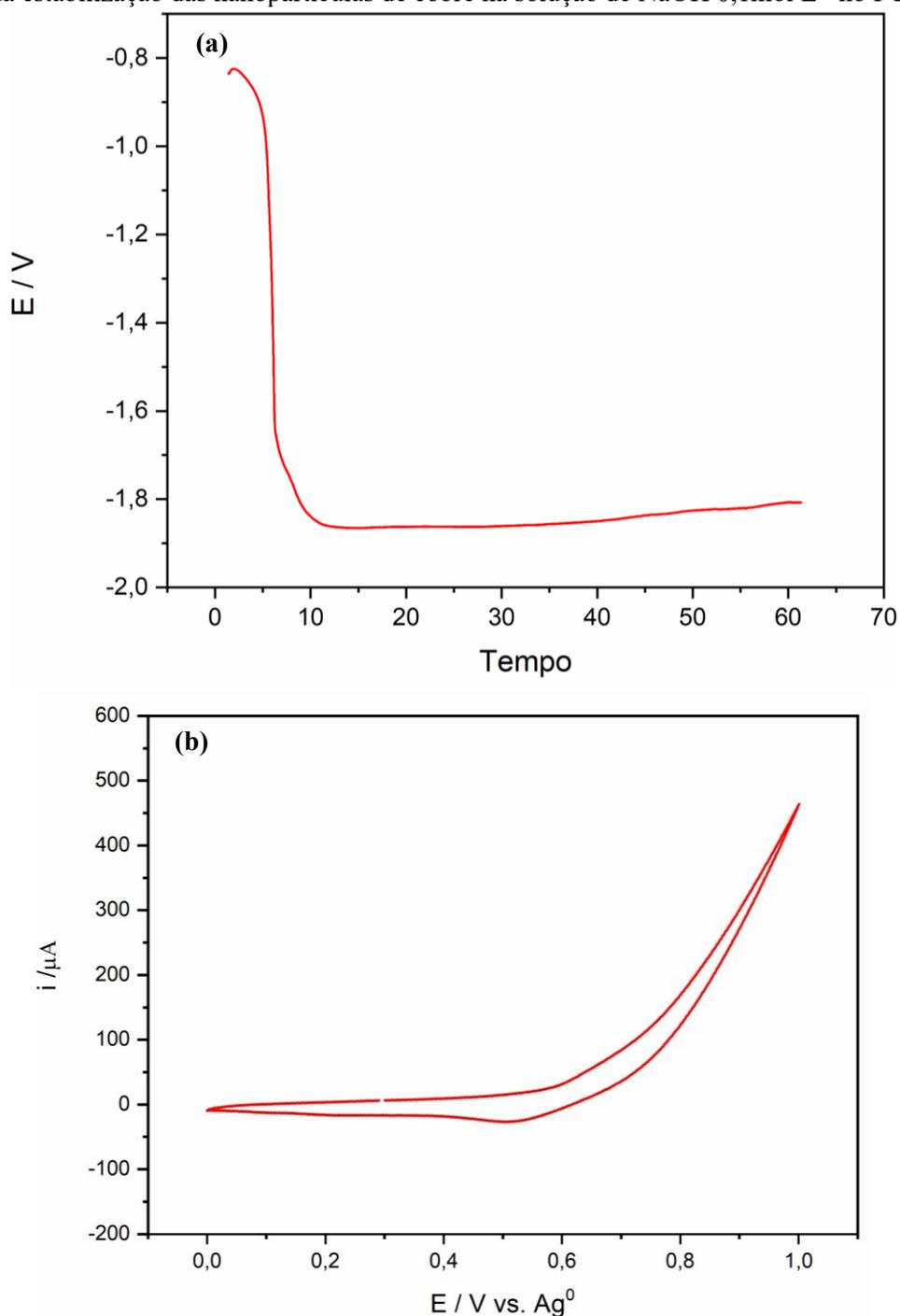
É válido ressaltar que a eletrodeposição possibilita a catálise da reação de evolução de hidrogênio (HER) (PÉREZ-FERNÁNDEZ, 2017). Segundo Wu e colaboradores, a reação pode ocorrer em meio ácido ou meio alcalino, considerando em meio alcalino:



Equação 8

As nanopartículas depositadas na superfície dos PCEs gera um aumento da atividade catalítica. O tamanho reduzido das nanopartículas produz um aumento da área superficial ativa (WU *et al.*, 2017).

Figura 24 - (a) Cronopotenciograma do PCE em solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e (b) Voltamograma cíclico da estabilização das nanopartículas de cobre na solução de NaOH $0,1\text{mol L}^{-1}$ no PCE



FONTE: elaborada pela autora, 2022.

A deposição das nanopartículas de cobre ocorre *in situ*, ou seja, diretamente na

superfície do eletrodo de trabalho, permitindo que não ocorra perdas e diferenças quantitativas das nanopartículas formadas. Esse método é mais vantajoso do que a deposição de nanopartículas de cobre por *drop casting*, que pode ocasionar a perda da estabilidade das nanopartículas, uma vez que a solução de nanopartículas é preparada em meio aquoso, eletrodepositada e seca sobre o eletrodo. Dessa forma, a técnica de eletrodeposição é mais simples, rápida e fácil, podendo ser utilizada para o preparo de superfícies de eletrodos quimicamente modificados com nanopartículas (KUMAR, *et al.*, 2020).

Os fundamentos que permeiam o desenvolvimento das nanopartículas de cobre são alta condutividade e características eletrocatalíticas (REGIART, *et al.*, 2014). A eletrocatalise é definida como a catálise heterogênea de reações eletroquímicas que ocorrem na interface eletrodo/ eletrólito, resultando na modificação da velocidade de uma reação eletroquímica. Além disso, as propriedades podem variar de acordo com as diferentes dependências das taxas do potencial elétrico (LÉGER e HAHN, 2007).

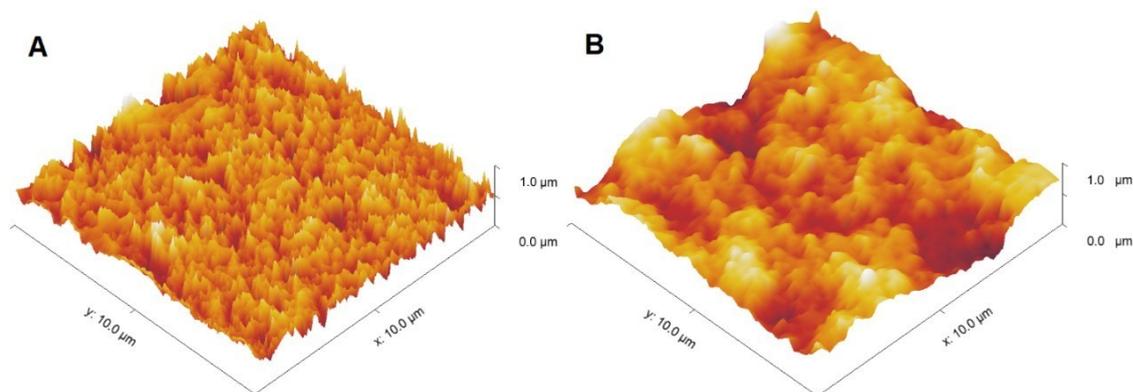
4.3 Caracterização por microscopia dos PCEs modificados com CuNps

A caracterização por meio da Microscopia de Força Atômica (AFM) possibilitou a obtenção de uma imagem topográfica com resolução atômica, fundamentando-se na varredura da amostra por uma ponteira piramidal, de 100 a 200 μm de comprimento, aderido a um cantilever. No mecanismo de funcionamento do AFM, o cantilever sofre uma deflexão devido a aproximação e o afastamento entre a ponteira e a amostra devido a força de interação. A técnica traz o mapeamento de certas propriedades mecânicas e físico-químicas dos materiais que as compõem (SILVA NETO, 2019).

A microscopia dos eletrodos de PCEs e PCEs/CuNps foi realizada por meio de medidas de AFM e MEV, Figuras 25 e 26. A rugosidade dos eletrodos impressos variou-se com o tempo eletrodeposição das nanopartículas. Nos eletrodos PCEs sem eletrodeposição de nanopartículas de Cu^0 observou-se uma estrutura muito irregular com alto coeficiente de rugosidade média ($R_q = 238,9 \pm 16,7 \text{ nm}$) Figura 25(a). Após a modificação com as nanopartículas de Cu^0 observou-se regiões do eletrodo mais globulares, aliado a uma queda da rugosidade média ($R_q = 154,9 \pm 12,3 \text{ nm}$) Figura 25(b), podendo ser justificado pelo recobrimento da superfície irregular do eletrodo, principalmente os vales, tornando a

superfície mais plana.

Figura 25 - Imagens por microscopia de força atômica em duas dimensões para PCEs (a) PCE sem modificações (b) PCE com nanopartículas de cobre



FONTE: elaborada pela autora, 2022.

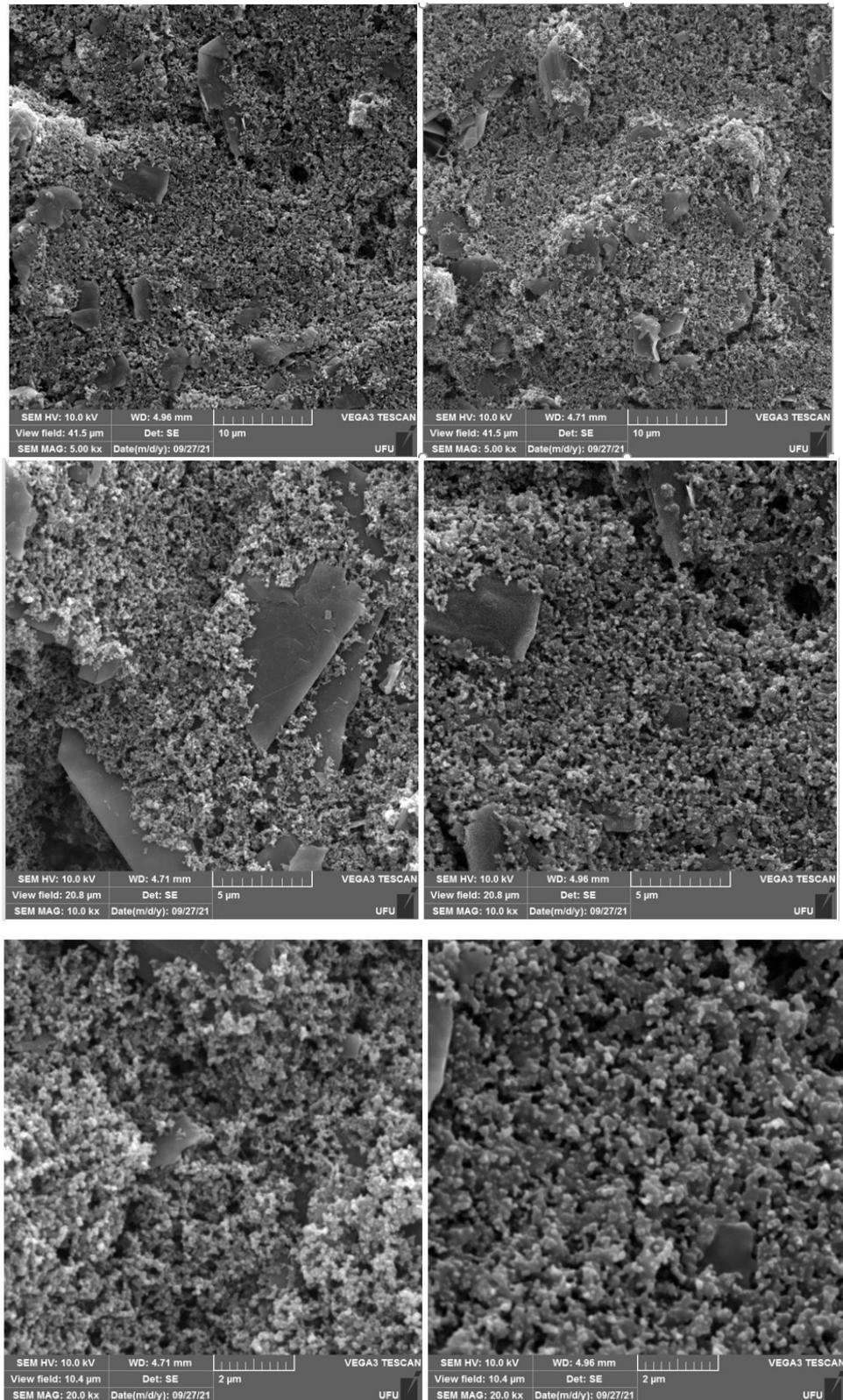
O coeficiente de rugosidade média é calculado a partir de uma média quadrática dos valores de vales e picos. Considerando esses valores elevados ao quadrado, os mínimos valores que se diferem da média são mais impactantes nos resultados da rugosidade (SILVA NETO, 2019).

Observou-se que nanopartículas de cobre interagem com os eletrodos impressos. Resultando numa superfície mais homogênea e regular, sendo evidenciado pelo decréscimo da rugosidade dos eletrodos PCEs/CuNps.

A morfologia observada na Figura 25(a) mostra as características da tinta de carbono na superfície do eletrodo de trabalho, evidenciando uma região com irregularidade e porosidade devido ao carbono, sendo corroborado com o trabalho de NETO (2019), indicando a presença de sulcos, aglomerados e placas (carbon flake) recobertas com material de maior granulação (carbon black/ negro de fumo).

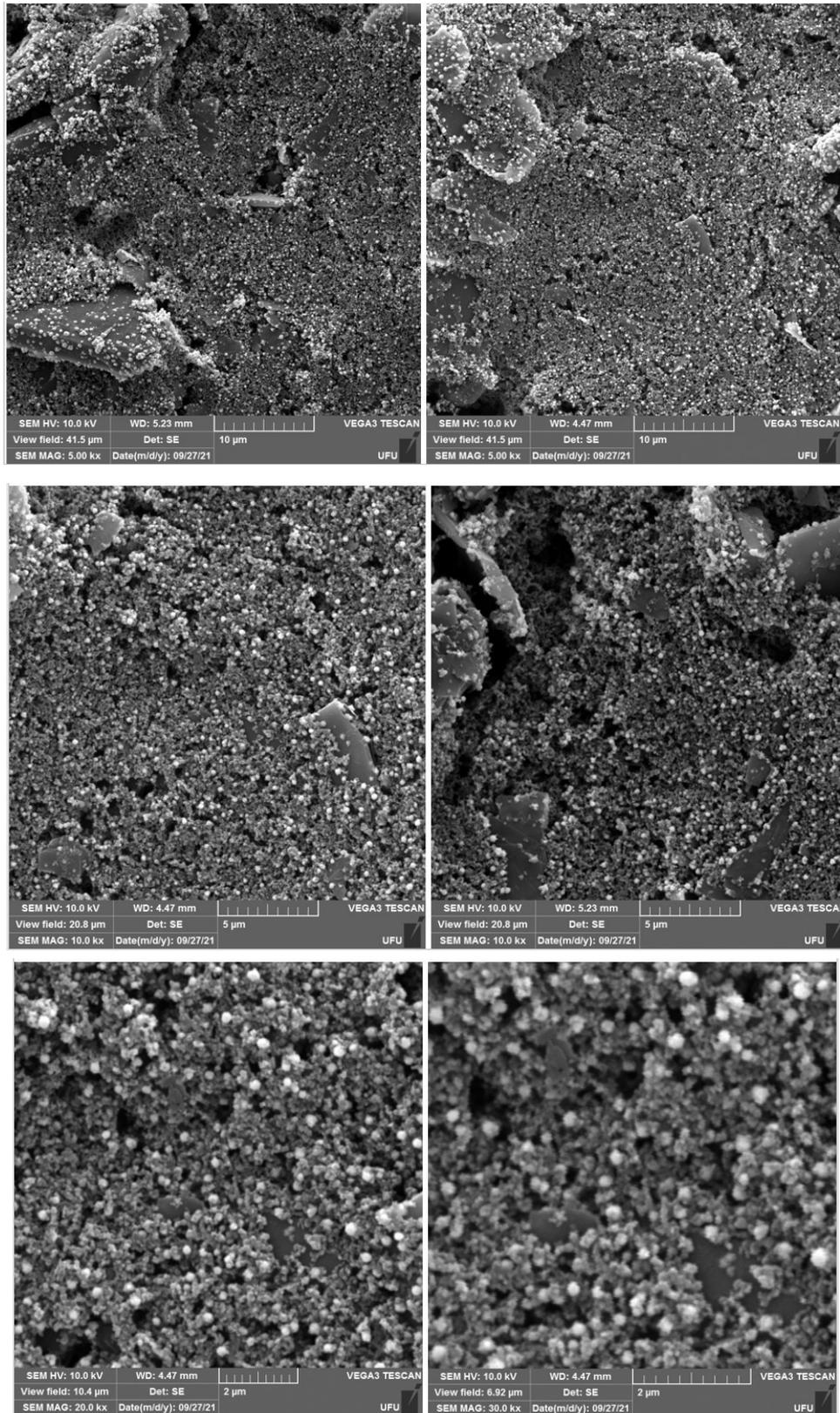
Observou-se com o MEV uma diferenciação mais pronunciada da rugosidade com a formação das nanopartículas de cobre, principalmente nas imagens com ampliações 20000X e 30000X, visto que há maior uniformidade da superfície, com a formação de pequenos grânulos distribuídos ao longo das nanoestruturas formadas, Figuras 26 e 27. A superfície do eletrodo PCEs/CuNps ficou mais homogênea em comparação com os eletrodos de tinta de carbono.

Figura 26 - Imagens por microscopia eletrônica de varredura da região de trabalho eletroquímica dos PCEs sem modificações. Na primeira linha ampliações de 5000X, na segunda 10000X, e na terceira 20000X.



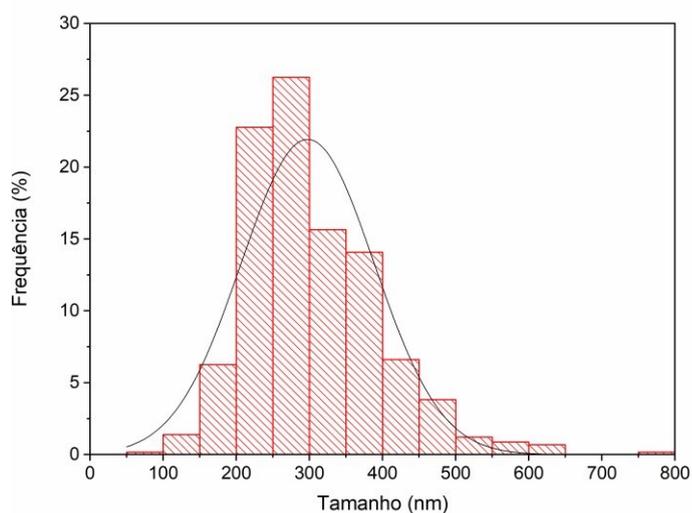
FONTE: elaborada pela autora, 2022.

Figura 27 - Imagens por microscopia eletrônica de varredura da região de trabalho eletroquímica dos PCEs com nanopartículas de cobre. Na primeira linha ampliações de 5000X, na segunda 10000X, e na terceira, respectivamente 20000X e 30000X.



FONTE: elaborada pela autora, 2022.

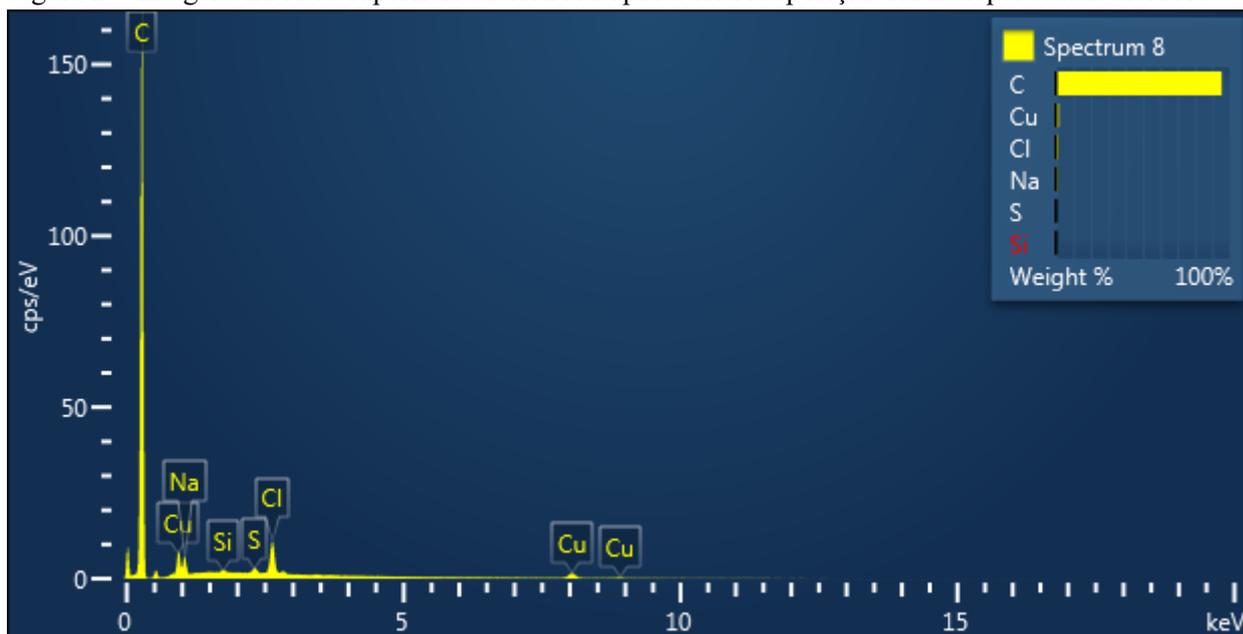
Figura 28 - Histograma do tamanho das CuNps

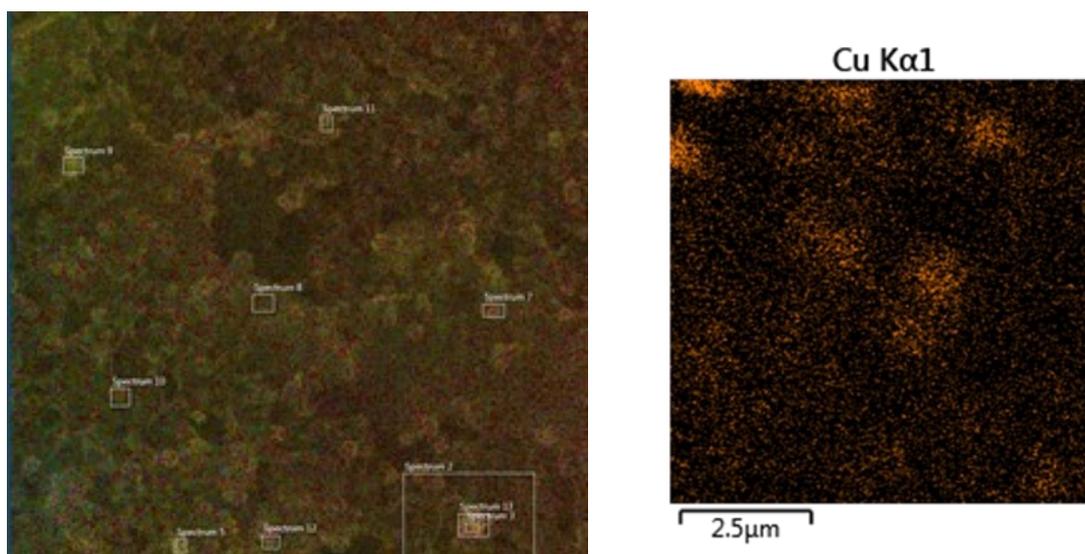


FONTE: elaborada pela autora, 2022.

A identificação e a quantificação da composição das nanopartículas de cobre na superfície dos eletrodos foi realizada com a espectroscopia dispersiva de energia de raios X (EDS, EDX ou XEDS) acoplada ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os átomos que estão na superfície são excitados pelo feixe de elétrons, emitindo comprimentos de onda específicos de raios X que são característicos da estrutura atômica dos elementos (EBNESAJJAD, 2013).

Figura 29- Imagens EDX da superfície do eletrodo após a eletrodeposição das nanopartículas de cobre





FONTE: elaborada pela autora, 2022.

Análises de EDX confirmam a presença de cobre, grande quantidade de carbono devido a tinta de carbono e sódio proveniente da estabilização das nanopartículas, Figura 29. Tanto na microscopia eletrônica de varredura como no espectro EDX, as nanopartículas esféricas de cobre são observadas sobre a superfície do eletrodo.

4.4 Caracterização eletroquímica dos PCEs modificados com CuNps

A equação de Randles-Sevcik possibilita determinar a área eletroativa dos eletrodos. Parâmetros eletroquímicos obtidos nos voltamogramas cíclicos mostraram características distintas dos eletrodos de PCE na ausência e na presença de nanopartículas de Cu^0 .

Os parâmetros eletroquímicos obtidos nos voltamogramas cíclicos estão reunidos na Tabela 2. Os valores obtidos foram usados para calcular a área eletroquimicamente ativa dos eletrodos.

Tabela 2 - Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de PCE sem modificações e de PCE com nanopartículas de cobre

Eletrodos impressos	I_{pa} (μA)	I_{pc} (μA)	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE_p
PCE	54,770	-41,140	0,460	-0,070	0,530
PCE + CuNps	87,020	-87,980	0,300	-0,010	0,310

FONTE: elaborado pela autora, 2022.

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{\frac{3}{2}} C D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} A$$

$$54,77 \times 10^{-6} = (2,69 \times 10^5) \cdot 1^{\frac{3}{2}} (5 \times 10^{-6}) \cdot 0,717^{\frac{1}{2}} \cdot 0,1^{\frac{1}{2}} A$$

$$54,77 \times 10^{-6} = (2,69 \times 10^5) \cdot 1^{\frac{3}{2}} (5 \times 10^{-6}) \cdot 0,717^{\frac{1}{2}} \cdot 0,1^{\frac{1}{2}} A$$

$$54,77 \times 10^{-6} = (2,69 \times 10^5) \cdot \sqrt{1^3} \cdot (5 \times 10^{-6}) \cdot \sqrt{0,717 \times 10^{-5}} \cdot \sqrt{0,1} A$$

$$54,77 \times 10^{-6} = 1,345 \cdot 2,677 \times 10^{-3} \cdot 0,31622 A$$

$$\frac{1}{A} = \frac{1,1384 \times 10^{-3}}{54,77 \times 10^{-6}}$$

$$A = 0,0484 \text{ cm}^2$$

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{\frac{3}{2}} C D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} A$$

$$84,02 \times 10^{-6} = (2,69 \times 10^5) \cdot 1^{\frac{3}{2}} (5 \times 10^{-6}) \cdot 0,717^{\frac{1}{2}} \cdot 0,1^{\frac{1}{2}} A$$

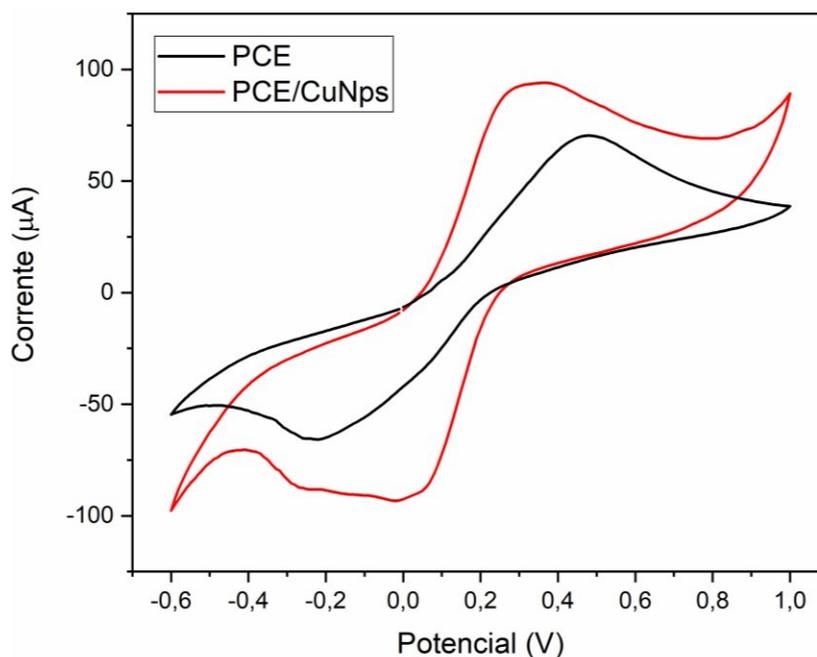
$$84,02 \times 10^{-6} = (2,69 \times 10^5) \cdot \sqrt{1^3} \cdot (5 \times 10^{-6}) \cdot \sqrt{0,717 \times 10^{-5}} \cdot \sqrt{0,1} A$$

$$84,02 \times 10^{-6} = 1,345 \cdot 2,677 \times 10^{-3} \cdot 0,31622 A$$

$$\frac{1}{A} = \frac{1,1384 \times 10^{-3}}{84,02 \times 10^{-6}}$$

$$A = 0,0743 \text{ cm}^2$$

Figura 30 - Voltamogramas cíclicos na solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ do eletrodo impresso de carbono sem modificações (PCE) e modificados com nanopartículas de cobre (PCE/CuNps)



FONTE: elaborada pela autora, 2022.

Cálculo do valor padrão do PCE, considerando que o diâmetro vale 2,64mm:

$$A = \pi r^2$$

$$A = (3,141) \cdot (0,132^2)$$

$$A = 0,0547$$

A área geométrica do eletrodo de trabalho (com diâmetro de 2,64mm) é 0,0547 cm^2 . Enquanto a área eletroquimicamente ativa do PCE sem modificações é 0,0484 cm^2 e a área eletroquimicamente ativa do PCE modificado com nanopartículas de cobre é 0,0743 cm^2 . A maior área eletroquimicamente ativa do PCE|CuNp evidencia a existência de mais sítios ativos na superfície do eletrodo com nanopartículas. Outro aspecto relevante é o comportamento eletrocatalítico das nanopartículas de cobre que resultou no decréscimo do valor de (ΔE_p) da solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ refletindo num aumento da velocidade da reação Figura 30. Esse aumento pode ser observado tanto pelo aumento da área superficial quanto pela deposição de um material mais condutor na superfície do eletrodo.

Estudou-se os eletrodos de PCE com e sem modificações com a solução contendo o par redox Fe^{2+}/Fe^{3+} . Na ausência das nanopartículas, a corrente elétrica foi menor e a separação entre os potenciais de pico anódico e catódico foi maior (ΔE_p). Quanto

maior a distância entre os potenciais de picos anódico e catódico (ΔE_p) mais resistivos e menos eletrocatalíticos são os eletrodos de PCE (WU *et al.*, 2017). Quanto mais próximos os potenciais de picos redox, melhor é a reversibilidade da reação eletroquímica, facilitando a difusão das espécies eletroativas para a superfície dos eletrodos de PCE. Observou-se para os eletrodos de PCE/Cu⁰ uma maior difusão. (WU *et al.*, 2017). As nanopartículas de cobre favorecem também um aumento da corrente elétrica, estando relacionada com o processo eletrocatalítico do par redox, uma vez que o aumento da superfície favoreceu uma maior imobilização do (dsDNA) contribuindo para a melhoria no sinal eletroquímico (FLAUZINO *et al.*, 2022).

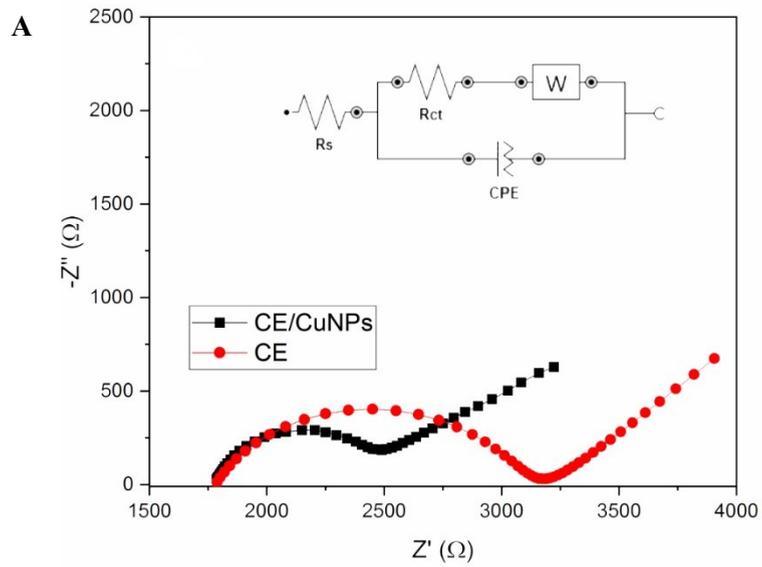
Os eletrodos com e sem nanopartículas foram submetidos à análise de EIS para estudo do comportamento da plataforma do genossensor. O gráfico de Nyquist obtido é mostrado na Figura 31. Os valores (χ^2) correspondentes às análises dos eletrodos sem nanopartículas e com nanopartículas podem ser observados na Tabela 3, os valores (menores do que 0,01) indica que os parâmetros obtidos com a simulação dos espectros de espectroscopia de impedância eletroquímica estão de acordo com o resultado experimental.

Tabela 3 - Dados do fit (χ^2) do PCE sem nanopartículas e do PCE com nanopartículas

PCE sem modificações	0,0038707
PCE CuNps com modificações	0,0042423

FONTE: elaborada pela autora, 2022.

Figura 31- (a) Diagrama de Nyquist referentes a análise de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS); (b) Gráfico de Bode com ângulo de fase obtidos $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5 $mmol L^{-1}$ em meio de KCl 0,1 $mol L^{-1}$.



B



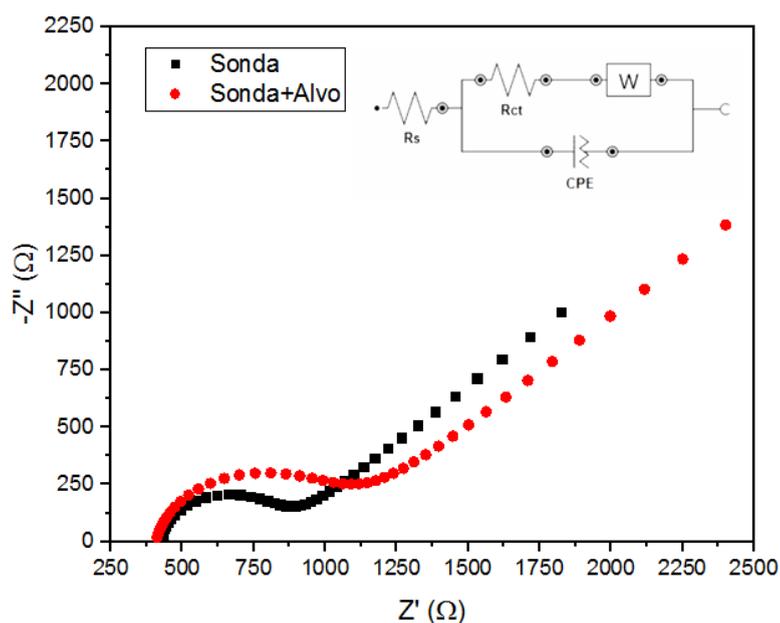
FONTE: elaborada pela autora, 2022.

Considerando os resultados da Figura 31(a), na reação sem nanopartículas prevalece o processo difusional, com inclinação próxima a 45° na região de menor frequência e a presença de um semicírculo definindo em altas frequências está relacionado com o controle cinético no limite (BRETT, BRETT, 1996).

Considerando os valores dos ângulos de fase, a Figura 31(b) observou-se que a a superfície sem nanopartículas acontece o processo de transferência de massa enquanto que a superfície com nanopartículas acontece o processo de transferência de carga (BRETT; BRETT, 1996; BARD, 2000).

A Figura 32 apresenta, a análise de espectroscopia de impedância eletroquímica com a plataforma desenvolvida (nanopartículas de cobre) com a presença da sonda Hant 1 na superfície, e também o experimento com a mesma plataforma contendo sonda (Hant 1) + alvo (Hant 2). Observou-se um aumento na resistência a transferência de carga do eletrodo com a sonda + alvo ($R_{ct} = 637 \Omega$) quando comparado com a plataforma somente com a sonda ($R_{ct} = 405 \Omega$).

Figura 32- Diagrama de Nyquist referentes a análise de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) PCE|CuNps|sonda Hant 1, PCE|CuNps|sonda Hant 1 + alvo Hant 2

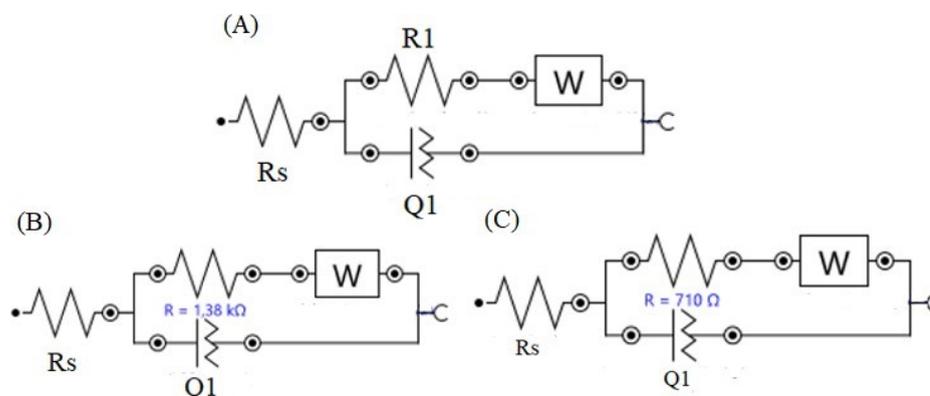


FONTE: elaborada pela autora, 2022.

A partir dos dados obtidos foi possível a comparação com um circuito elétrico equivalente, Figura 33. Os dados experimentais podem ser descritos como, o R_s representando a resistência da solução eletrolítica, Q_1 representando o carregamento da dupla camada elétrica do PCE e do PCE|CuNp, R_1 representando a resistência a

transferência de carga e W a impedância de Warburg, associada ao processo difusional dos íons. O elemento de fase constante (CPE) é representado pelo efeito capacitivo, substituindo um capacitor puro, devido a não homogeneidade da superfície (BRETT, BRETT, 1996; SEGATTO, 2017).

Figura 33 - Circuitos elétricos proposto para PCE e PCE|NpCu (a) e os respectivos valores do R_1 – Resistência a transferência de carga PCE (b) e PCE|CuNp (c)



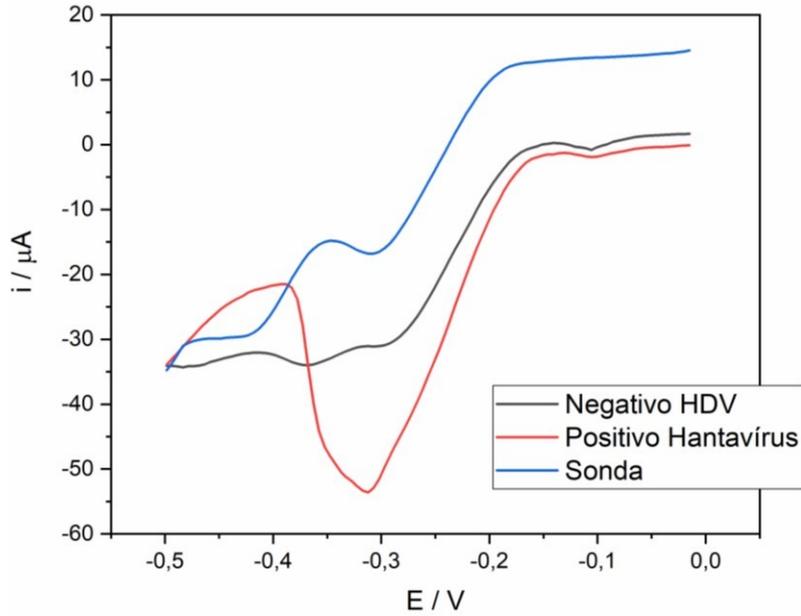
FONTE: elaborada pela autora, 2022.

Os resultados observados na Figura 33, mostrou que a resistência à transferência de carga do sistema com nanopartículas ($R_{ct} = 710 \Omega$) é menor que a resistência a transferência de carga do sistema sem nanopartículas ($R_{ct} = 1,38 \text{ k}\Omega$). Os valores de resistência de transferência de carga obtidos por esse método (EIS) comprovam os resultados obtidos pelos outros métodos, maior área eletroativa com as nanopartículas, maiores picos de corrente elétrica e menor resistência de transferência de carga do eletrodo.

4.5 Imobilização da sonda Hant 1 e detecção indireta do alvo Hant 2

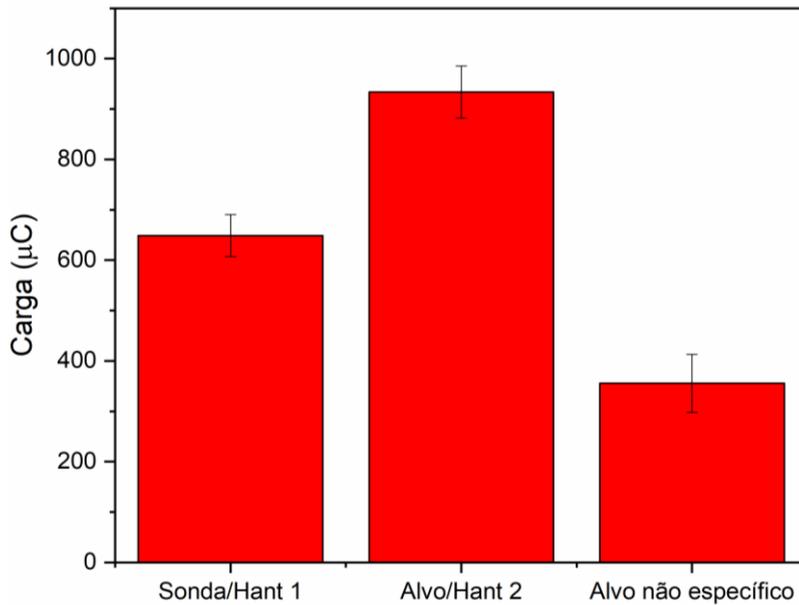
A voltametria de pulso diferencial foi utilizada como técnica de detecção indireta da concentração do alvo Hant 2, relacionando com a variação da corrente de pico de redução do azul de metileno. Os experimentos foram feitos em triplicatas com eletrodos diferentes. Na Figura 34 pode-se ver as diferenças dos perfis eletroquímicos em PCE|CuNps|sonda Hant 1, PCE|CuNps|Hant 2 e PCE|CuNps|HDV.

Figura 34 - Voltamogramas de pulso diferencial em nanopartículas de cobre em sonda Hant 1, alvo negativo (HDV) com indicador azul de metileno e alvo positivo (Hant2) com indicador azul de metileno.



FONTE: elaborada pela autora, 2022.

Figura 35 – Variação da resposta do biossensor para o controle em branco contendo a sonda Hant 1, biossensor com Alvo/Hant 2 e biossensor com HDV(negativo).



FONTE: elaborada pela autora, 2022.

A formação da plataforma PCE|CuNps|Hant 2|MB ocorreu por adsorção física

proveniente da interação eletrostática das nanopartículas de cobre carregadas positivamente com o grupo fosfato negativo presente na fita simples de DNA (ssDNA) (MOÇO, 2018; KARA *et al.*, 2002). O trabalho de Kara e colaboradores (2002), corrobora a afinidade eletrostática entre a carga catiônica do azul de metileno com a carga aniônica do grupo fosfato do DNA, atuando como indicador da sequências de ácidos nucleicos. Essa afinidade favoreceu a distinção entre a fita simples de DNA (ssDNA) e a fita dupla de DNA (dsDNA ou duplêx).

Durante a hibridização do Hantavírus ocorreu uma diminuição nos sinais voltamétricos de redução do MB. Ao comparar a fita simples de DNA com a fita dupla de DNA, tem-se que a hibridização de pares de bases de Watson-Crick resulta numa estrutura mais estável e menos flexível quando comparada a fita simples de DNA da sonda produzindo um efeito de restrição à transferência eletrônica entre a solução do par redox e o eletrodo com a fita dupla de DNA (DA SILVA; MADURRO; MADURRO, 2017).

A corrente de pico na presença do alvo não específico (HDV) evidenciou a semelhança com a resposta da sonda, não havendo especificidade e hibridização entre a sonda Hant 1 e a detecção do HDV. As correntes de pico para a detecção do alvo positivo (Hant 2) para Hantavírus e alvo não específico (HDV) apresentaram uma grande diferenciação, Figura 35, evidenciando a funcionalização efetiva do biossensor (MOÇO *et al.*, 2018).

4.6 Construção da curva analítica

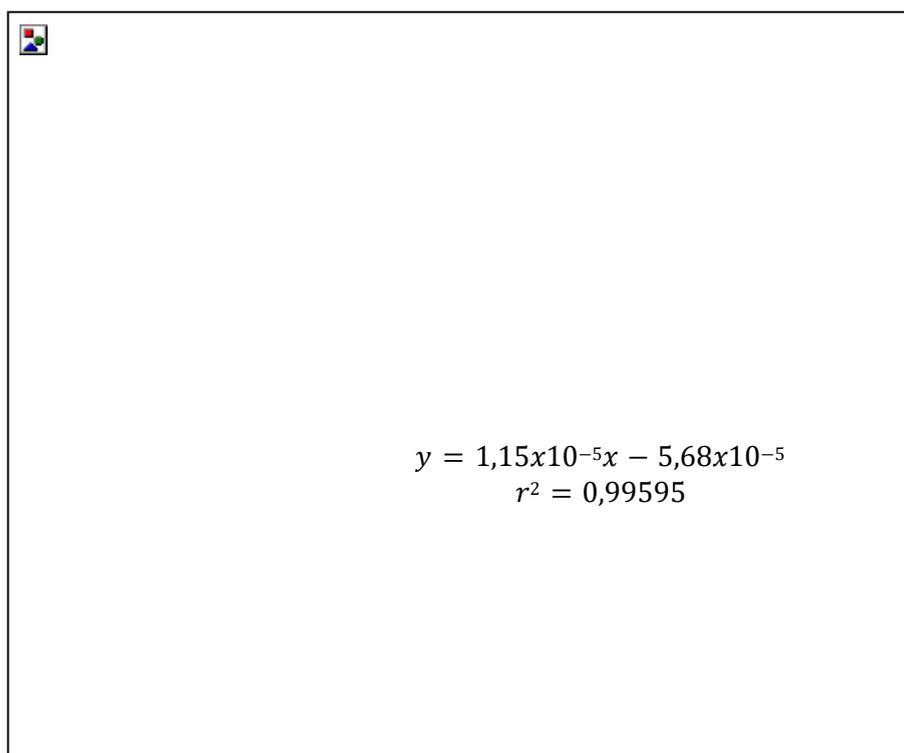
A corrente de carregamento da dupla camada foi medida com a solução de tampão fosfato na presença do azul de metileno.

A curva de calibração construída com a corrente de pico de redução da solução de azul de metileno 50 μM em função das concentrações do alvo Hant 2 de 0,03 pg/mL, 0,3 pg/mL, 3 pg/mL, 30 pg/mL e 300 pg/mL os seguintes parâmetros: $R^2 = 0,995$, limite de detecção de 4,56 pg/mL, limite de quantificação 15,22 pg/mL, sensibilidade de $1,15 \times 10^{-5}$ pg/mL⁻¹ e faixa linear de resposta de 0,03 pg/mL até 300 pg/mL (Figura 36).

A partir das triplicatas realizadas em eletrodos diferentes, a linha base foi feita com a solução de tampão fosfato e a detecção com azul de metileno foi realizada na plataforma. A diferença entre a linha base e as detecções foram realizadas no *software*

Origin. Os resultados evidenciam que o azul de metileno foi imobilizado na plataforma PCE|CuNp, favorecendo as interações entre o azul de metileno com o alvo Hant 2

Figura 36 - Resposta linear e parâmetros da análise de variação da corrente de pico de redução da solução de azul de metileno 50 μM vs as concentrações do alvo Hant 2 da curva analítica.



FONTE: elaborada pela autora, 2022.

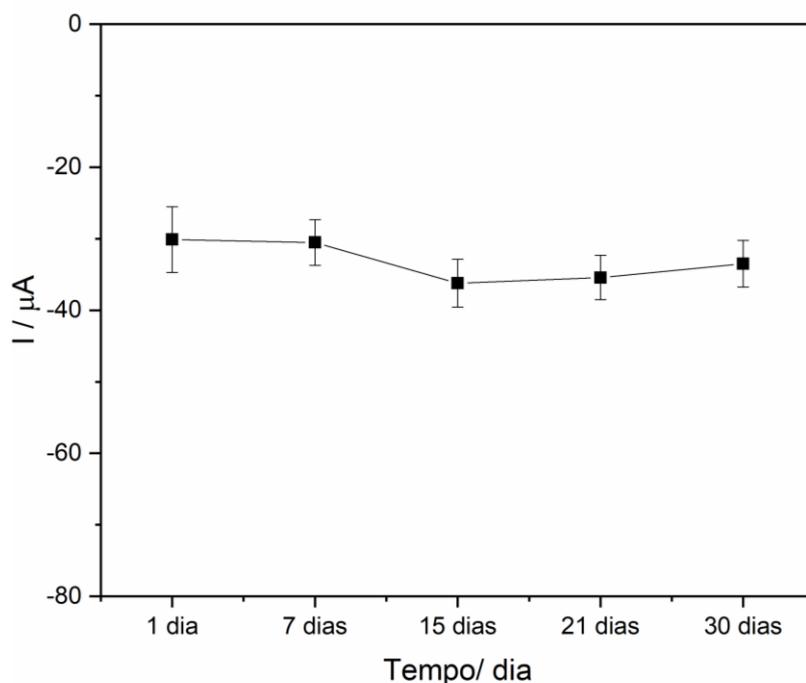
4.7 Estabilidade

O estudo do tempo de estabilidade de resposta de um biossensor é fundamental para uma avaliação da vida útil de prateleira, considerando portanto a viabilidade da comercialização do biossensor e os custos financeiros (MOÇO *et al.*, 2018). O processo de envelhecimento de um biossensor ocorre de acordo com a diminuição da sensibilidade durante um intervalo de tempo. Esse processo envolve mecanismo complexo, sendo afetado por vários parâmetros, como os reagentes, os componentes eletrônicos e as camadas da plataforma desenvolvida (PANJAN *et al.*, 2017).

Para a certificação da estabilidade realizou-se medidas eletroquímicas com os biossensores recém-preparados e após os intervalos de 7, 15, 21 e 30 dias. Observou-se que

a estabilidade dos biossensores se mantém em 100% durante 30 dias, Figura 37.

Figura 37 - Estabilidade do genossensor durante 7, 15, 21 e 30 dias.



FONTE: elaborada pela autora, 2022.

O PCE é promissor, visto que a estabilidade é melhor ou semelhante às novas plataformas para detectar materiais genéticos. As futuras aplicações comerciais de novas plataformas de biossensores apresenta a estabilidade como um parâmetro importante (ONDES *et al.*, 2021). Considerando que os materiais à base de carbono são inertes devido à natureza hidrofóbica da rede de carbono, pode-se afirmar que tanto a mudança na reatividade da tinta de carbono quanto na conformação de biomoléculas inseridas para biorreconhecimento influenciam na funcionalização dessas plataformas (MOÇO *et al.*, 2021).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento deste trabalho permitiu a construção de genossensor eletroquímico para a detecção do alvo complementar Hant 2. A plataforma desenvolvida com eletrodos à base de tinta de carbono (PCE) e posterior eletrodeposição de nanopartículas de cobre corresponde aos princípios básicos de um biossensor: especificidade, sensibilidade, valores de limites de detecção e quantificação baixos e boa estabilidade.

Dentro das caracterizações eletroquímicas, a área geométrica dos eletrodos impressos confeccionados foi comparada com a área eletroquimicamente ativa do PCE modificado com as nanopartículas de cobre, corroborando com a equação de Randles Sevcik. Como foi evidenciado neste trabalho, a resposta do PCE modificado com nanopartículas de cobre apresentou melhor performance quando comparada ao PCE sem modificações, comprovando a existência de mais sítios ativos na superfície do eletrodo com nanopartículas. Outro aspecto relevante na performance do genossensor foi a imobilização de oligonucleotídeos específicos ao Hantavírus, beneficiando o aumento da área superficial e possibilitando maiores interações com a plataforma de nanopartículas de cobre.

A sonda específica ao Hantavírus (Hant 1) foi imobilizada na plataforma com o indicador de hibridização azul de metileno com grande especificidade ao Hant 2. As intercalações do azul de metileno no interior da sonda estão relacionadas com as interações eletrostáticas. A detecção do alvo positivo e negativo apresenta uma grande diferenciação em relação aos valores de resistência a transferência de carga.

Observou-se que a sensibilidade do genossensor se manteve presente às variações de concentração do material genético do vírus com um limite de detecção de 4,56 pg/mL e o limite de quantificação 15,22 pg/mL. A estabilidade foi analisada durante intervalos de tempo de 1, 7, 15, 21 e 30 dias, considerando o desvio padrão, a estabilidade se manteve em 100% durante 30 dias.

Os atuais métodos de detecção envolvendo os ácidos nucleicos virais e as proteínas virais demandam equipamentos de alto custo e equipe especializada em laboratórios de referência. O presente trabalho possibilita uma grande contribuição de metodologias alternativas baseadas na detecção em biossensores, visto que se destaca pelo baixo custo, boa reprodutibilidade com soluções simples e acessíveis para futuras comercializações. Portanto, um diagnóstico rápido e acessível para a detecção do

Hantavírus é importante para a identificação e a busca do tratamento desta zoonose que apresenta taxas significativas de morbidade e mortalidade em vários países do globo.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, André S. *et al.*, Electrochemical detection of Salmonella using gold nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 40, n. 1, p. 121-126, 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.06.054>.
- ALLAHNOURI, Farzad *et al.*, Screen-printed carbon electrode modified with a copper@ porous silicon nanocomposite for voltammetric sensing of clonazepam. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 10, p. 1-9, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3784-z>.
- ALTINTAS, Zeynep (Ed.). **Biosensors and nanotechnology: applications in health care diagnostics**. John Wiley & Sons, 2017. ISBN: 9781119065036 versão *online*.
DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119065036>.
- ALVES, Livia Maria *et al.*, Biossensores para detecção de Toxoplasma gondii. 2018. **Tese de doutorado. Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia**
DOI: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1202>. Disponível em:
<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/24253>. Acesso em 10 jan. 2022.
- AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana; SAKSIDA, Ana; KORVA, Miša. Hantavirus infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, p. e6-e16, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12291>.
- BARD, Allen J.; FAULKNER, Larry R. Métodos Eletroquímicos: Fundamentos e Aplicações. **Tecnologia de Superfície**, v. 20, n. 1, pág. 91-92, 1983. ISBN 0-471-04372-9.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Doenças Tropicais Negligenciadas; **Secretaria de Vigilância em Saúde**, 1969. ISSN 9352-7864
Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/3/boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf. Acesso em: 14 jan. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância, prevenção e controle das hantavíroses** Brasília: Ministério da Saúde, 2013. ISBN 978-85-334-2093-9
Disponível em:
https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_prevencao_controle_hantavirose.pdf. Acesso em: 14 jan. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis – DEIDT. **Doenças tropicais negligenciadas**, 2021. ISSN 9352-7864. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2021/boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf. Acesso em: 14 jan. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Hantavirose**. 2020 Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hantavirose-1>.

BRETT, Ana Maria Oliveira; BRETT, Christopher Michael Ashton. **Electroquímica –Princípios, Métodos e Aplicações**. Coimbra: Livraria Almedina, 1996. 471 p. ISBN 9789724009728.

BRUMMER-KORVENKONTIO, Markus *et al.*, Epidemiology of Sindbis virus infections in Finland 1981–96: possible factors explaining a peculiar disease pattern. **Epidemiology & Infection**, v. 129, n. 2, p. 335-345, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268802007409>.

BI, Zhenqiang; FORMENTY, Pierre BH; ROTH, Cathy E. Hantavirus infection: a review and global update. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 01, p. 003-023, 2008. DOI: <https://doi.org/10.3855/jidc.317>.

BOLFE, V. J. *et al.*, Electrical impedance behavior of biological tissues during transcutaneous electrical stimulation. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 11, p. 153-159, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-35552007000200011>.

BURYA, Scott J. Ferrocyanide: An Inappropriate Reagent for ds-DNA Binding Mode Determination. 2009. **Tese de Doutorado. The Ohio State University**. Disponível em: http://rave.ohiolink.edu/etdc/view?acc_num=osu1248721621. Acesso em: 14 jan. 2022.

CESEWSKI, Ellen; JOHNSON, Blake N. Electrochemical biosensors for pathogen detection. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 159, p. 1-29, 2020. ISSN 0956-5663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112214>.

CHAPMAN, Louisa E. *et al.*, Intravenous ribavirin for hantavirus pulmonary syndrome: safety and tolerance during 1 year of open-label experience. **Antiviral therapy**, v. 4, n. 4, p. 211-219, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1177/135965359900400404>.

CHATTERJEE, K.; WAN, Y.; "RNA". Enciclopédia Britânica , 13 de julho de 2018, Disponível em: <https://www.britannica.com/science/RNA>. Acesso em: 17 jan. 2022.

CHO, Hae-Wol; HOWARD, Colin R. Antibody responses in humans to an inactivated hantavirus vaccine (Hantavax®). **Vaccine**, v. 17, n. 20-21, p. 2569-2575, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00057-2](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00057-2).

CHO, Hae-Wol; HOWARD, Colin R.; LEE, Ho-Wang. Review of an inactivated vaccine against hantaviruses. **Intervirology**, v. 45, n. 4-6, p. 328-333, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1159/000067925>.

CHOI, Y. *et al.*, Inactivated Hantaan virus vaccine derived from suspension culture of Vero cells. **Vaccine**, v. 21, n. 17-18, p. 1867-1873, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00005-7).

CLARK JR, Leland C.; LYONS, Champ. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of sciences**, v. 102, n. 1, p. 29-45, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>.

DA SILVA, Jussara Vieira; MADURRO, Ana Graci Brito; MADURRO, João Marcos. Modified electrode with reduced graphene oxide/poly (3-hydroxyphenylacetic acid): a new platform for oligonucleotide hybridization. **Journal of Solid-State Electrochemistry**, v. 21, n. 7, p. 2129-2139, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10008-017-3601-8>.

DEARING, M. Denise; DIZNEY, Laurie. Ecology of hantavirus in a changing world. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1195, n. 1, p. 99-112, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05452.x>.

DE CASTRO, Ana Cristina Honorato *et al.*, A new genosensor for meningococcal meningitis diagnosis using biological samples. **Journal of Solid-State Electrochemistry**, v. 22, n. 8, p. 2339-2346, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10008-018-3940-0>.

DE OLIVEIRA, Danielle A. *et al.*, Serological electro-detection of rheumatoid arthritis using mimetic peptide. **Protein and Peptide Letters**, v. 25, n. 9, p. 878-883, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2174/0929866525666180917161931>.

DE OLIVEIRA, Renata Carvalho *et al.*, Hantavirus reservoirs: current status with an emphasis on data from Brazil. **Viruses**, v. 6, n. 5, p. 1929-1973, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/v6051929>.

DONG, Xue *et al.*, Genotype of isolated strain of hantavirus in Liaoning area. **Zhonghua shi yan he lin Chuang Bing du xue za zhi= Zhonghua Shiyan he Linchuang Bingduxue Zazhi= Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology**, v. 19, n. 1, p. 39-42, 2005. PMID: 16201470. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/16201470>. Acesso em: 12 jan. 2022.

EBNESAJJAD, Sina; EBNESAJJAD, Cyrus. **Surface treatment of materials for adhesive bonding**. William Andrew, 2013. ISBN: 978-0-323-26435-8. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=USgeAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=EBNESAJJAD,+Sina%3B+EBNESAJJAD,+Cyrus.+Surface+treatment+of+materials+for+adhesive+bonding.+William+Andrew,+2013.&ots=4OLtUmr6Y&sig=YxBkwoY4Qi1VerYmU-UvsU1xJPY#v=onepage&q=EBNESAJJAD%2C%20Sina%3B%20EBNESAJJAD%2C%20Cyrus.%20Surface%20treatment%20of%20materials%20for%20adhesive%20bonding.%20William%20Andrew%2C%202013.&f=false>. Acesso em: 12 jan. 2022.

FERREIRA, Marcelo S. *et al.*, Hantavirus pulmonary syndrome in Brazil: clinical aspects of three new cases. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, p. 41-46, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652000000100007>.

FERREIRA, Marcelo Simão. Hantavírus. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 36, n. 1, p. 81-96, 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/Sc7BFD5RdCxYQnWkY67WkwM/?format=pdf&lan>

g=pt. Acesso em: 12 jan. 2022.

FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes *et al.*, Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on Araraquara virus recombinant nucleocapsid protein. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 81, n. 2, p. 273-276, 2009. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.81.273>.

FIGUEIREDO, Luiz Tadeu M.; CAMPOS, Gelse Mazzoni; RODRIGUES, Fernando Bellissimo. Síndrome pulmonar e cardiovascular por Hantavirus: aspectos epidemiológicos, clínicos, do diagnóstico laboratorial e do tratamento. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 1, p. 13-23, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822001000100003>.

FONSECA, Lidsy Ximenes; OLIVEIRA, Stefan Vilges de; DUARTE, Elisabeth Carmen. Magnitude e distribuição dos óbitos por hantavirose no Brasil, 2007-2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, p. e2017221, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5123/S1679-49742018000200011>.

FLAUZINO, José MR *et al.*, Label-free and reagentless electrochemical genosensor based on graphene acid for meat adulteration detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 195, p. 113628, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113628>.

FREEMAN, Willard M.; WALKER, Stephen J.; VRANA, Kent E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **Biotechniques**, v. 26, n. 1, p. 112-125, 1999. DOI: <https://doi.org/10.2144/99261rv01>.

GOGOLA, Jeferson L. *et al.*, Label-free electrochemical immunosensor for quick detection of anti-hantavirus antibody. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 842, p. 140-145, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.04.066>.

GROEN, Jan *et al.*, Identification of Hantavirus serotypes by testing of post-infection sera in immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays. **Journal of medical virology**, v. 33, n. 1, p. 26-32, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.1890330106>.

HARDESTAM, Jonas *et al.*, Puumala hantavirus excretion kinetics in bank voles (*Myodes glareolus*). **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 8, p. 1209, 2008. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1408.080221>.

HUGGINS, John W. *et al.*, Prospective, double-blind, concurrent, placebo-controlled clinical trial of intravenous ribavirin therapy of hemorrhagic fever with renal syndrome. **Journal of Infectious Diseases**, v. 164, n. 6, p. 1119-1127, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/164.6.1119>.

HJELLE, Brian *et al.*, Rapid and specific detection of Sin Nombre virus antibodies in patients with hantavirus pulmonary syndrome by a strip immunoblot assay suitable for field diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 600-608, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.35.3.600-608.1997>.

INSTRUMENTS, Gamry. **Basics of electrochemical impedance spectroscopy**.

Disponível em: <https://www.gamry.com/application-notes/EIS/basics-of-electrochemical-impedance-spectroscopy/>. Acesso em: 24 jan. 2022.

ISSA, R.; HAMDAN, N. A.; NOH, M. F. M. Differential pulse voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue on screen printed carbon electrode for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. **Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 304-311, 2010.

DOI: <https://doi.org/10.3923/biotech.2010.304.311>.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2 ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-), created by S. J. Chalk.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1351/goldbook.B00663>.

JOSÉ DE BRITO SILVA, Jorge. Desenvolvimento de biossensores eletroquímico e piezelétrico de DNA para diagnósticos clínicos. 2004. **Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife**. Disponível em:

<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/1928>. Acesso em: 11 jan. 2022.

JIANG, Hong *et al.*, Hantavirus infection: a global zoonotic challenge. **Virologica Sinica**, v. 32, n. 1, p. 32-43, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3899-x>.

JONSSON, Colleen B.; FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes; VAPALAHTI, Olli. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 2, p. 412-441, 2010.

DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.00062-09>.

KARA, Pinar *et al.*, Genossensor eletroquímico para detecção de interação entre azul de metileno e DNA. **Comunicações Eletroquímicas**, v. 4, n. 9, pág. 705-709, 2002.

DOI: [https://doi.org/10.1016/S1388-2481\(02\)00428-9](https://doi.org/10.1016/S1388-2481(02)00428-9).

KHAN, Ibrahim; SAEED, Khalid; KHAN, Idrees. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian journal of chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908-931, 2019.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>.

KILLARD, Anthony J. Disposable sensors. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 3, n. 1, p. 57-62, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.06.013>.

KORAKA, Penelope *et al.*, Evaluation of two commercially available immunoassays for the detection of hantavirus antibodies in serum samples. **Journal of clinical virology**, v. 17, n. 3, p. 189-196, 2000.

DOI: [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(00\)00096-2](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(00)00096-2).

KURIEN, Biji T.; SCOFIELD, R. Hal. Free radical mediated peroxidative damage in systemic lupus erythematosus. **Life sciences**, v. 73, n. 13, p. 1655-1666, 2003.

DOI: [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00475-2](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00475-2).

KURIEN, Biji T.; SCOFIELD, R. Hal. Western blotting. **Methods**, v. 38, n. 4, p. 283-293, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.007>.

KUMAR, Archana Kaliyaraj Selva *et al.*, A mini-review: How reliable is the drop casting technique? **Electrochemistry Communications**, v. 121, p. 106867, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2020.106867>.

KRAMSKI, Marit *et al.*, Detection and typing of human pathogenic hantaviruses by real-time reverse transcription-PCR and pyrosequencing. **Clinical chemistry**, v. 53, n. 11, p. 1899-1905, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.093245>.

KRAUTKRÄMER, Ellen; ZEIER, Martin; PLYUSNIN, Alexander. Hantavirus infection: an emerging infectious disease causing acute renal failure. **Kidney international**, v. 83, n. 1, p. 23-27, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/ki.2012.360>.

LAENEN, Lies *et al.*, Hantaviridae: current classification and future perspectives. **Viruses**, v. 11, n. 9, p. 788, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11090788>.

LEDERER, Sabine *et al.* Correction: Indirect Immunofluorescence Assay for the Simultaneous Detection of Antibodies against Clinically Important Old and New World Hantaviruses. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 11, p. e0008864, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008864>.

LÉGER, Jean-Michel; HAHN, Françoise. Contribution of in-situ infrared reflectance spectroscopy in the study of nanostructured fuel cell electrodes. **In: In-situ Spectroscopic Studies of Adsorption at the Electrode and Electrocatalysis**. Elsevier Science BV, 2007. p. 63-98. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-044451870-5/50004-X>.

LEITE FILHO, Valfrido Furtado; MANHABOSCO, Taíse Matte; MACHADO, Giovanna; Eletropolimerização e caracterização de polianilina com incorporação de nanopartículas de TiO₂ a diferentes pHs. 2015. 94 f. **Dissertação (Mestrado em Ciência com ênfase em Física dos Materiais) – Escola de Minas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto**, Ouro Preto, 2015. Disponível em: <http://www.repositorio.ufop.br/jspui/handle/123456789/6399>.

LIU, Mengqin; LUO, Chunhua; PENG, Hui. Electrochemical DNA sensor based on methylene blue functionalized polythiophene as a hybridization indicator. **Talanta**, v. 88, p. 216-221, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.10.035>.

LIN, Xin-Hua *et al.*, Electrochemical DNA biosensor for the detection of short DNA species of chronic myelogenous leukemia by using methylene blue. **Talanta**, v. 72, n. 2, p. 468-471, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.11.015>.

LIMONGI, Jean Ezequiel *et al.*, Hantavirus cardiopulmonary syndrome in the Triangulo Mineiro and Alto Paranaíba regions, State of Minas Gerais, 1998-2005: clinical-epidemiological aspects of 23 cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 295-299, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000300009>.

MAES, Piet *et al.*, Hantaviruses: immunology, treatment, and prevention. **Viral immunology**, v. 17, n. 4, p. 481-497, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1089/vim.2004.17.481>

MAES, Piet; CLEMENT, Jan; VAN RANST, Marc. Recent approaches in hantavirus vaccine development. **Expert review of vaccines**, v. 8, n. 1, p. 67-76, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1586/14760584.8.1.67>.

MACDONALD, Digby D. Chronopotentiometry. In: **Transient Techniques in Electrochemistry**. Springer, Boston, MA, 1977. p. 119-184. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4613-4145-1_5.

MALHOTRA, Bansi Dhar.; PANDEY, Chandra Mouli. **Biosensors: fundamentals and applications**. Smithers rapra, 2017. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=LQBNDwAAQBAJ&lpq=PR3&ots=K3PJiltbM_&dq=%20MALHOTRA%2C%20Bansi%20Dhar.%3B%20PANDEY%2C%20Chandra%20Mouli.%20Biosensors%3A%20fundamentals%20and%20applications.%20Smithers%20rapra%2C%202017.&lr&hl=pt-BR&pg=PP1#v=onepage&q=MALHOTRA,%20Bansi%20Dhar.:%20PANDEY,%20Chandra%20Mouli.%20Biosensors:%20fundamentals%20and%20applications.%20Smithers%20rapra,%202017.&f=false. Acesso em: 21 jan. 2022.

MANZANARES-PALENZUELA, C. Lorena *et al.*, Electrochemical genosensors as innovative tools for detection of genetically modified organisms. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 66, p. 19-31, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.10.006>.

MARTINS, Gustavo *et al.*, Quick electrochemical immunoassay for hantavirus detection based on biochar platform. **Talanta**, v. 204, p. 163-171, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.101>.

MATTAR, Salim; GUZMAN, Camilo; FIGUEIREDO, Luis Tadeu. Diagnosis of hantavirus infection in humans. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 13, n. 8, p. 939-946, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1047825>.

MEISEL, Helga *et al.*, Development of novel immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM enzyme immunoassays based on recombinant Puumala and Dobrava hantavirus nucleocapsid proteins. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 12, p. 1349-1357, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1128/CVI.00208-06>.

MERTZ, Gregory J. *et al.*, Placebo-controlled, double-blind trial of intravenous ribavirin for the treatment of hantavirus cardiopulmonary syndrome in North America. **Clinical infectious diseases**, v. 39, n. 9, p. 1307-1313, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1086/425007>.

MILLAN, Kelly M.; MIKKELSEN, Susan R. Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 17, p. 2317-2323, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac00065a025>.

MIR, Mohammed A. Hantaviruses. **Clinics in laboratory medicine**, v. 30, n. 1, p. 67-91, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.01.004>.

MIR, S.; Hantavirus Induced Kidney Disease **Frontiers in Medicine**, v.8, p. 1-16, 2022.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.795340>.

MOÇO, Anna CR *et al.*, Carbon ink-based electrodes modified with nanocomposite as a platform for electrochemical detection of HIV RNA. **Microchemical Journal**, v. 170, p. 106739, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106739>.

MOÇO, Anna CR *et al.*, Métodos diagnósticos para o vírus Zika: genossensor eletroquímico baseado em nanocompósito polimérico e plataforma óptica e colorimétrica com nanopartículas de ouro e prata. 2018. **Dissertação de mestrado. Programa de pós graduação em Genética e Bioquímica. Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia**. DOI: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.809>.

MOHAMED, Elwy A. Green synthesis of copper & copper oxide nanoparticles using the extract of seedless dates. **Heliyon**, v. 6, n. 1, p. e03123, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03123>.

MOHANTY, U. S. Electrodeposition: a versatile and inexpensive tool for the synthesis of nanoparticles, nanorods, nanowires, and nanoclusters of metals. **Journal of applied electrochemistry**, v. 41, n. 3, p. 257-270, 2011.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s10800-010-0234-3>.

MOURA, Pamella Ferreira *et al.*, A relação da incidência da Hantavirose com o índice de desmatamento nas regiões sul e sudeste do Brasil no período de 2008 a 2017. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 11, p. e9103-e9103, 2021.
DOI: <https://doi.org/10.25248/reas.e9103.2021>.

MORELI, Marcos Lázaro; SOUSA, Ricardo Luiz Moro de; FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes. Detection of Brazilian hantavirus by reverse transcription polymerase chain reaction amplification of N gene in patients with hantavirus cardiopulmonary syndrome. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 633-638, 2004.
DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000600018>.

MULLIS, Kary *et al.*, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986. p. 263-273.
DOI: <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>.

MURÁNYI, Walter *et al.*, Hantavirus infection. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 12, p. 3669-3679, 2005.
DOI: <https://doi.org/10.1681/ASN.2005050561>.

NAWAZ, Mian Hasnain *et al.*, Development of a portable and disposable NS1 based electrochemical immunosensor for early diagnosis of dengue virus. **Analytica chimica acta**, v. 1026, p. 1-7, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.032>.

NÉMETH, Viktória *et al.* Detection of Dobrava-Belgrade hantavirus using recombinant-nucleocapsid-based enzyme-linked immunosorbent assay and SYBR Green-based real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Archives of virology**, v. 156, n. 9, p. 1655-1660, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1013-0>.

NIH, **National Human Genome Research Institute**. Disponível em: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Deoxyribonucleic-Acid>. Acesso em: 10 fev. 2022.

OZSOZ, Mehmet Sengun (Ed.). **Electrochemical DNA biosensors**. CRC Press, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1201/b11988>.

ÖNDEŞ, Baha *et al.*, High stability potentiometric urea biosensor based on enzyme attached nanoparticles. **Microchemical Journal**, v. 160, p. 105667, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105667>.

PACHECO, Wagner Felipe *et al.*, Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20130040>. Disponível em: <https://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/380>. Acesso em: 10 fev. 2022.

PADULA, Paula Julieta *et al.*, Genetic diversity, distribution, and serological features of hantavirus infection in five countries in South America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 3029-3035, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.38.8.3029-3035.2000>.

PÁDUA, Michelly de *et al.*, Development of a novel plaque reduction neutralisation test for hantavirus infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 624-628, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-02760150102>.

PASA, André Avelino; MUNFORD, Maximiliano Luis. **Encyclopedia of Chemical Processing**. 2006. DOI: <http://doi.org/10.1081/E-ECHP-120037171>.

PAULA, Lucas Ferreira de *et al.*, Desenvolvimento de tintas condutivas e sua aplicação em eletrodos impressos. 2013. **Tese de doutorado - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia**. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/17517>. Acesso em: 15 fev. 2022.

PANJAN, Peter; VIRTANEN, Vesa; SESAY, Adama Marie. Determination of stability characteristics for electrochemical biosensors via thermally accelerated ageing. **Talanta**, v. 170, p. 331-336, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.011>.

PEREIRA, Soraya dos Santos. Seleção e caracterização de Nanocorpos de Camelídeos contra o antígeno recombinante do segmento-S de Hantavírus, cepa Araucária. 2013. **Tese de Doutorado. Universidade Federal de Rondônia – UNIR.**

Disponível em: <http://www.ri.unir.br/jspui/handle/123456789/1822>. Acesso em: 15 fev. 2022.

PÉREZ-FERNÁNDEZ, Beatriz; MARTÍN-YERGA, Daniel; COSTA-GARCÍA, Agustín. Galvanostatic electrodeposition of copper nanoparticles on screen-printed carbon electrodes and their application for reducing sugars determination. **Talanta**, v. 175, p. 108-113, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.026>.

POLAT, Ceylan *et al.*, A novel genetic lineage of Tula orthohantavirus in Altai voles (*Microtus obscurus*) from Turkey. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 67, p. 150-158, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.015>.

RABONI, Sonia M. *et al.*, Clinical survey of hantavirus in southern Brazil and the development of specific molecular diagnosis tools. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 72, n. 6, p. 800-804, 2005.

DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.72.800>.

RABONI, Sonia Mara *et al.*, Hantavirus infection in Brazil: development and evaluation of an enzyme immunoassay and immunoblotting based on N recombinant protein. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 58, n. 1, p. 89-97, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.11.012>.

RABTI, Amal; BEN AOUN, Sami; RAOUAFI, Noureddine. A sensitive nitrite sensor using an electrode consisting of reduced graphene oxide functionalized with ferrocene. **Microchimica Acta**, v. 183, n. 12, p. 3111-3117, 2016.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1959-4>.

PERUMAL, Veeradasan; HASHIM, Uda. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **Journal of applied biomedicine**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jab.2013.02.001>.

REGIART, Matías *et al.*, Copper nanoparticles applied to the preconcentration and electrochemical determination of β -adrenergic agonist: An efficient tool for the control of meat production. **Talanta**, v. 135, p. 138-144, 2015.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.12.026>.

RIBEIRO, Guilherme A.; KNOP, Lauren N.; RASTGAAR, Mo. Multi-directional ankle impedance during standing postures. **IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering**, v. 28, n. 10, p. 2224-2235, 2020.

DOI: <https://doi.org/10.1109/TNSRE.2020.3018650>.

RONAGHI, Mostafa; UHLÉN, Mathias; NYRÉN, Pål. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. **Science**, v. 281, n. 5375, p. 363-365, 1998.

DOI: <https://doi.org/10.1126/science.281.5375.363>.

SCHMALJOHN, Connie; HJELLE, Brian. Hantaviruses: a global disease problem.

Emerging infectious diseases, v. 3, n. 2, p. 95, 1997.

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid0302.970202>. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9204290/>. Acesso em: 17 fev. 2022.

SCHMALJOHN, C. S.; HOOPER, J. W. Bunyaviridae: the viruses and their replication. **Fields of Virology**, p.1581-1633, 2001.

Disponível em: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573668924685386880>. Acesso em: 17 fev. 2022.

SCHMALJOHN, C. S. *et al.*, Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. **Science**, v. 227, n. 4690, p. 1041-1044, 1985.

DOI: <https://doi.org/10.1126/science.2858126>.

SHRIVASTAVA, Alankar *et al.*, Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. **Chronicles of young scientists**, v. 2, n. 1, p. 21-25, 2011. DOI: <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>.

SEGATTO, Mônica Silva *et al.*, Desenvolvimento da plataforma de grafite funcionalizada com poli (ácido-4hidroxifenilacético) sobre óxido de grafeno reduzido: nanopartículas de ouro, para detecção do hormônio triiodotironina. 2017. **Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia.**

DOI: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2017.446>. Disponível em:

<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/21370>. Acesso em: 18 fev. 2022.

SEGATTO, Mônica Silva *et al.*, Eletrossíntese orgânica e caracterização do copolímero poli (anilina-co-4-aminofenol) para aplicação em imunossensor de biomarcador de distúrbios da tireoide. 2021. **Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia.**

DOI: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.432>. Disponível em:

<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/32680>. Acesso em: 18 fev. 2022.

SERGEEV, Nikolay V.; HEROLD, Keith E.; RASOOLY, Avraham. Regulatory and validation issues for biosensors and related bioanalytical technologies. **Handbook of Biosensors and Biochips**, 2008. DOI:

<https://doi.org/10.1002/9780470061565.hbb132>.

SIDWELL, Robert W.; ROBINS, Roland K.; HILLYARD, Ira W. Ribavirin: an antiviral agent. **Pharmacology & therapeutics**, v. 6, n. 1, p. 123-146, 1979.

DOI: [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(79\)90058-5](https://doi.org/10.1016/0163-7258(79)90058-5).

SILVA NETO, João Afonso da *et al.*, Desenvolvimento de eletrodo impresso utilizando condutiva e deposição por sputtering tinta. 2019. **Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia.**

DOI: <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.3007>. Disponível em:

<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/28595>. Acesso em: 20 fev. 2022.

STRAMBEANU, Nicolae *et al.*, Nanoparticles: Definition, classification and general physical properties. In: **Nanoparticles' promises and risks**. Springer, Cham, 2015. p. 3-8. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-11728-7_1.

SZABO, R. Antiviral therapy and prevention against hantavirus infections. **Acta virologica**, v. 61, n. 1, p. 3-12, 2017. DOI: https://doi.org/10.4149/av_2017_01_3.

SUNDARESAN, Periyasamy *et al.*, Facile synthesis of chitosan-carbon nanofiber composite supported copper nanoparticles for electrochemical sensing of carbendazim. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 625, p. 126934, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.126934>.

TAKAHASHI, YOSHIYUKI *et al.*, Comparison of immunofluorescence and hemagglutination inhibition tests and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody in rats infected with hemorrhagic fever with renal syndrome virus. **Journal of clinical microbiology**, v. 24, n. 5, p. 712-715, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.24.5.712-715.1986>.

THÉVENOT, Daniel R. *et al.*, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors and bioelectronics**, v. 16, n. 1-2, p. 121-131, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4).

VAHERI, Antti *et al.*, Uncovering the mysteries of hantavirus infections. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, n. 8, p. 539-550, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3066>.

VAPALAHTI, Olli *et al.*, Hantavirus infections in Europe. **The Lancet infectious diseases**, v. 3, n. 10, p. 653-661, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00774-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00774-6).

VETCHA, S.; WILKINS, E.; YATES, T. Detection of hantavirus infection in hemolyzed mouse blood using alkaline phosphatase conjugate. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 10, p. 901-909, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(02\)00113-6](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(02)00113-6).

VIAL, Cecilia *et al.*, Comparison of VSV Pseudovirus and Focus Reduction Neutralization Assays for Measurement of Anti-Andes orthohantavirus Neutralizing Antibodies in Patient Samples. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, p. 444, 2020 DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00444>.

WANG, Xiaofang; LIM, Hyun Jeong; SON, Ahjeong. Characterization of denaturation and renaturation of DNA for DNA hybridization. **Environmental health and toxicology**, v. 29, 2014 DOI: <https://doi.org/10.5620/eht.2014.29.e2014007>.

WELLS, Rachel M. *et al.*, An unusual hantavirus outbreak in southern Argentina: person-to-person transmission? Hantavirus Pulmonary Syndrome Study Group for Patagonia. **Emerging infectious diseases**, v. 3, n. 2, p. 171, 1997. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid0302.970210>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2627608/>. Acesso em: 21 fev. 2022.

WU, Liheng; XI, Zheng; SUN, Shouheng. Well-defined metal nanoparticles for electrocatalysis. In: **Studies in Surface Science and Catalysis**. Elsevier, 2017. p. 123-148. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805090-3.00004-8>

YANG, Wenrong *et al.*, Evidence for the direct interaction between methylene blue and guanine bases using DNA-modified carbon paste electrodes. **Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis**, v. 14, n. 18, p. 1299-1302, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200210\)14:18%3C1299::AID-ELAN1299%3E3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200210)14:18%3C1299::AID-ELAN1299%3E3.0.CO;2-Y).

YIWEL, Xu *et al.*, Electrochemical determination of hantavirus using gold nanoparticle-modified graphene as an electrode material and Cu-based metal-organic framework assisted signal generation. **Microchimica Acta**, v. 188, n. 4, p. 1-10, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04769-2>

ZHANG, Lisha *et al.*, Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. **Clinical pharmacology & therapeutics**, v. 83, n. 5, p. 761-769, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100400>

ZÖLLER, L. G. *et al.*, A novel mu-capture enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant proteins for sensitive and specific diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome. **Journal of clinical microbiology**, v. 31, n. 5, p. 1194-1199, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.31.5.1194-1199.1993>