



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Métodos diagnósticos para o vírus Zika: genossensor eletroquímico baseado em nanocompósito polimérico e plataforma óptica e colorimétrica usando nanopartículas de ouro e prata

Aluno: Anna Clara Rios Moço

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

Co-Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

UBERLÂNDIA - MG

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Métodos diagnósticos para o vírus Zika: genossensor eletroquímico baseado em nanocompósito polimérico e plataforma óptica e colorimétrica com nanopartículas de ouro e prata

Aluno: Anna Clara Rios Moço

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

Co-Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

**Disertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do Título
de Mestre em Genética e
Bioquímica.**

UBERLÂNDIA – MG

2018

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

M688m Moço, Anna Clara Rios, 1989
2018 Métodos diagnósticos para o vírus Zika [recurso eletrônico] :
genossensor eletroquímico baseado em nanocompósito polimérico e
plataforma óptica e colorimétrica com nanopartículas de ouro e prata /
Anna Clara Rios Moço. - 2018.

Orientadora: Ana Graci Brito Madurro.

Coorientador: João Marcos Madurro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.809>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. 2. Zika virus. 3. Nanopartículas. 4. Diagnóstico. I.
Madurro, Ana Graci Brito, (Orient.). II. Madurro, João Marcos,
(Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Métodos diagnósticos para o vírus Zika: genossensor eletroquímico baseado em nanocompósito polimérico e plataforma óptica e colorimétrica usando nanopartículas de ouro e prata

ALUNO: Anna Clara Rios Moço

COMISSÃO EXAMINADORA

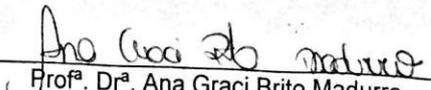
Presidente: Profª. Drª. Ana Graci Brito Madurro
(Orientador)

Examinadores: Profª. Drª. Karen Wohnrath

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

Data da Defesa: 26/07/2018

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas


Profª. Drª. Ana Graci Brito Madurro

*“Look up at the stars and not down at your feet.
Try to make sense of what you see, and wonder
about what makes the universe exist. Becurious.”*

Stephen Hawking (1942 – 2018)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família, pais e irmãos, pelo apoio por todos esses anos de estudo e, especialmente, minha mãe, por me confortar e acalantar nos momentos difíceis da minha trajetória de vida. Obrigada por ser meu suporte inexorável.

Agradeço à luz da minha vida, minha afilhada, Cecília, por ser fonte constante de muitas alegrias em minha vida. Aos meus outros sobrinhos, João Luiz, Maria Luiza e Felipe: obrigada pela existência de vocês e por despertar efusivamente em mim o sentimento mais nobre do ser humano: o amor.

Agradeço ao Bruno, companheiro de grandes momentos de felicidade e compaixão durante este período. Obrigada pela paciência e empatia.

Imenso agradecimento à minha mãe científica, Ana Graci, que me acolheu e orientou e sempre esteve à disposição no campo pessoal e profissional. A admiração é crescente pela sua nobreza de espírito, serenidade e sabedoria.

Ao professor João Marcos pelos conselhos, co-orientação, disponibilidade e paciência. Aos colegas da LAFIP-NANOTEC/BIOSENS que foram de fundamental importância no desenvolvimento deste trabalho: Pedro Henrique, Sandro Henrique, Jussara, Heliane, Lívia, José, João, Jéssica, Mônica, Rafael, Bárbara, Rafaela, Carlos e Ana Cristina. Sem dúvidas, o dia-a-dia fica mais fácil com a presença de vocês!

Obrigada à banca examinadora pela disponibilidade de participação e contribuição neste trabalho.

Agradeço aos órgãos de fomento, CAPES e FAPEMIG, por financiarem os projetos e ao Instituto Adolf Lutz pelo fornecimento das amostras para execução deste trabalho.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFM: *Atomic Force Microscopy* (Microscopia de força atômica)

AgNps: *silver nanoparticles* (nanopartículas de prata)

AuNps: *gold nanoparticles* (nanopartículas de ouro)

C: capsídeo viral

DENV: *dengue virus* (vírus da dengue)

DNA: *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

dsDNA: *double stranded deoxyribonucleic acid* (dupla fita de ácido desoxirribonucleico)

E: Envelope viral

EG/OG_r/PoliTir: Eletrodo de grafite/Óxido de grafeno reduzido/Politiramina

F: constante de Faraday

fg: fentograma

GOx: Glicose oxidase

HCV: *Hepatitis C virus*

HOMO: *Highest Occupied Molecular Orbital* (orbital molecular ocupado de mais alta energia)

I: corrente faradáica

IP: corrente de pico

IP_A: corrente de pico anódico

IP_C: corrente de pico catódico

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

JEV: *Japanese encephalitis virus* (vírus da encefalite japonesa)

LD: Limite de Detecção

LPS: Lipossacarídeos

LQ: Limite de Quantificação

Kb: *Kilobase*

kDa: *Kilodalton*

mC: milicoulomb

mg: miligrama

µg: micrograma

mL: mililitro

µL: microlitro

NCR: *Non Coding Region* (região não codificante)

ng: nanograma

nm: nanômetros

NM1: *Neisseria meningitidis*

NS: *Non structural* (não-estrutural)

OG: Óxido de Grafeno

OGr: Óxido de Grafeno reduzido

OGr/PoliTir: Óxido de grafeno reduzido/Politiramina

OMS: Organização Mundial de Saúde

ORF: *Open Region Frame* (região de leitura aberta)

PC: Polímeros Condutores

pH: Potencial Hidrogeniônico

PoC: *Point-of-Care* (ponto de cuidado)

PTFE: Politetrafluoretileno

prM: precursor de membrana

Q: quantidade de carga

RE: retículo endoplasmático

RNA: *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

RNAg: RNA genômico

rpm: rotação por minuto

RT- PCR: *reverse transcription polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa)

S: coeficiente angular

Sa: média aritmética da rugosidade

Sq/RMS: média da raiz quadrada da rugosidade

ssDNA: *single stranded Deoxyribonucleic acid*

Sz/Smáx: altura máxima da rugosidade

UV-Vis: Ultravioleta-visível

VC: voltametria cíclica

VDP: voltametria de pulso diferencial

WNV: *West Nile virus*

YFV: *Yellow fever virus*

YSI: *Yellow Spring Instruments*

ZIKV: *Zika vírus*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Vírus Zika (ZIKV)	1
1.2	Biossensores	6
1.2.1	Definição e classificação	6
1.2.2	Biossensores eletroquímicos	13
1.2.3	Polímeros condutores aplicados em biossensores	18
1.3	Nanomaterias	20
1.3.1	Óxido de grafeno reduzido (OGr)	20
1.3.2	Nanopartículas metálicas: ouro e prata	22
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos específicos	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Equipamentos e reagentes	27
3.2	Amostras biológicas	28
3.3	Genossensor eletroquímico	28
3.3.1	Preparo do eletrodo de trabalho	28
3.3.2	Pré-condicionamento dos eletrodos de grafite	30
3.3.3	Redução eletroquímica de OG sobre eletrodo de grafite	31
3.3.4	Eletropolimerização de tiramina sobre EG/OGr	32
3.3.5	Construção do bioeletrodo e detecção eletroquímica do alvo complementar	32
3.3.6	Detecção eletroquímica do RNA genômico (RNAg)	33
3.3.7	Estudo de seletividade	34
3.3.8	Curva de calibração	35
3.3.9	Estabilidade do bioeletrodo	35
3.3.10	Análises morfológicas	36
3.4	Plataformas colorimétricas e ópticas baseadas em nanopartículas metálicas de ouro e prata	36
3.4.1	Síntese de nanopartículas de ouro (AuNps)	36
3.4.2	Funcionalização das AgNps com oligonucleotídeo específico	37
3.4.3	Detecção óptica e colorimétrica do alvo complementar	38

3.4.4	Detecção óptica e colorimétrica de RNAg	39
3.4.5	Estabilidade das AuNps-ZIKV1S	40
3.4.6	Síntese de nanopartículas de prata (AgNps).....	40
3.4.7	Funcionalização das AgNps com oligonucleotídeo específico ..	41
3.4.8	Detecção óptica e colorimétrica do alvo complementar	42
3.4.9	Detecção óptica e colorimétrica de RNAg	42
3.4.10	Estabilidade das AgNps-ZIKV1S	43
3.5	Estatística e tratamento de dados	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1	Estudos eletroquímicos.....	44
4.1.1	Seleção dos eletrodos de grafite.....	44
4.1.2	Óxido de grafeno reduzido (OGr) eletroquimicamente	45
4.1.3	Eletropolimerização da tiramina.....	49
4.1.4	Bioeletrodo de EG/OGr/PoliTir	53
4.1.5	Curva de calibração.....	57
4.1.6	Estabilidade do genossensor	59
4.1.7	Análise morfológica com AFM	60
4.2	Estudos colorimétricos e ópticos.....	62
4.2.1	Síntese de AuNps	62
4.2.2	Detecção colorimétrica e óptica do RNAg do vírus Zika.....	63
4.2.3	Estabilidade das AuNps funcionalizadas com ZIK1SV	65
4.2.4	Síntese de AgNps e estudo de interação de sonda e alvo complementar	66
4.2.5	Detecção colorimétrica e óptica de RNAg ZIKV em AgNps	69
4.2.6	Estabilidade das AgNps funcionalizadas com ZIKV1S	70
5	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

RESUMO

O presente trabalho descreve o desenvolvimento de genossensor eletroquímico com eletrodos de grafite modificados com óxido de grafeno reduzido e politiramina para detecção do RNAg do vírus Zika (ZIKV) e genossensor óptico e colorimétrico baseado em nanopartículas de ouro e prata. A infecção por vírus Zika (ZIKV) tornou-se questão emergencial em termos de saúde global desde a epidemia no Brasil em 2015. Desde então o vírus tem se espalhado para outros países na América Latina e nos Estados Unidos. O controle e monitoramento da infecção por ZIKV são limitados devido a indisponibilidade de drogas, vacinas e diagnóstico rápido. Neste último fator, o teste diagnóstico mais utilizado é a técnica de transcriptase reversa (RT-PCR) que consiste em um método laborioso e pode ocasionar em resultados indeterminados. O presente estudo avaliou a resposta eletroquímica, colorimétrica e óptica de amostras de RNAg do vírus Zika de 10 pacientes infectados e que foram validadas previamente pelo método de RT-PCR tradicional. A plataforma EG/OGr/PoliTir mostrou superioridade no quesito de transferência eletrônica e aumento da área superficial quando comparada ao EG sem modificação. A sonda ZIK1V foi imobilizada na plataforma de EG/OGr/PoliTir e detectado o material genômico do vírus por monitoramento das mudanças eletroquímicas do par redox $[Fe(CN)_6]^{4-}/[Fe(CN)_6]^{3-}$ por técnica de voltametria de pulso diferencial. Os parâmetros analíticos foram analisados e o genossensor eletroquímico apresentou limite de detecção de 10 fg/mL com resposta de corrente decrescendo menos do que 20% no período avaliado de 90 dias. Na plataforma óptica e colorimétrica foi imobilizada sonda tiolada seguida de hibridização com alvo, leitura no espectrofotômetro e mudanças visuais de cor. A plataforma se mostrou sensível às variações de concentração de material genético, decrescendo cerca de 5% em 90 dias. Assim, as plataformas aqui desenvolvidas demonstram-se como soluções eficientes e de baixo custo no controle da infecção e preenche a lacuna de escassez de métodos diagnósticos para o vírus Zika.

Palavras chave: vírus Zika; genossensor eletroquímico; genossensor óptico; óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente; politiramina; nanopartículas de ouro; nanopartículas de prata

ABSTRACT

The present work describes the development of electrochemical genossensor with graphite electrodes modified with reduced graphene oxide and polythiramine to detect the gRNA of Zika virus (ZIKV) and optical and colorimetric genossensor based on gold and silver nanoparticles. Zika virus (ZIKV) infection has become an emerging global health issue since the 2015 outbreak in Brazil. Since then the virus has spread to other countries in Latin America and the in United States. The control and monitoring of ZIKV infection are limited due to the unavailability of drugs, vaccines and rapid diagnosis. The most commonly used diagnostic test is the reverse transcriptase (RT-PCR) technique, which consists of a laborious method and can lead to indeterminate results. The present study evaluated the electrochemical, colorimetric and optical response of Zika virus gRNA samples from 10 infected patients wich were previously validated by the traditional RT-PCR method. The GE/rGO /Polytir platform showed superiority in electronic transfer and increased surface area when compared to GE without modification. The ZIK1V probe was immobilized on the GE/rGO/Polytir platform and the virus genomic material was detected by monitoring the electrochemical changes of the redox pair $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ by differential pulse voltammetry. The analytical parameters were analyzed and the electrochemical genossensor showed detection limit of 10 fg/mL with current response decreasing less than 20% in the evaluated period of 90 days. In the optical and colorimetric platform the thiolated probe was immobilized followed by hybridization with target, spectrophotometer reading and visual changes of color. The platform was sensitive to variations in genetic material concentration and response decreasing less than by 5% in 90 days. Thus, the platforms developed here demonstrated efficient and cost-effective solutions in infection control and fills the gap of lack of diagnostic methods for the Zika virus.

Keywords: Zika virus; electrochemical genossensor; optical genossensor; electrochemically reduced graphene oxide; polythiramine; gold nanoparticles; silver nanoparticles

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vírus Zika (ZIKV)

O vírus Zika (ZIKV) é pertencente à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*. Esse gênero engloba mais de 50 espécies de vírus transmitidos por artrópodes e carrapatos. As características gerais da família quanto ao genoma, replicação, tradução, hospedeiros e taxonomia estão descritas na Tabela 1. Os hospedeiros primários habituais são os mamíferos e pássaros cujas manifestações da infecção variam entre febre hemorrágica assintomática grave ou fatal e doenças neurológicas. Nos humanos, em aproximadamente 80% dos casos os indivíduos infectados são assintomáticos e o restante apresenta quadro de febre, erupção cutânea, astralgia, mialgia, conjuntivite e dor de cabeça (KLASE et al., 2016). Muitos patógenos humanos estão incluídos nesse gênero, como o vírus da febre amarela (YFV), vírus da dengue (DENV), vírus da encefalite japonesa (JEV) e vírus do Nilo Ocidental (WNV) (VAINIO et al., 2018).

Tabela 1. Características da família *Flaviviridae* (VAINIO et al., 2018).

Característica	Descrição
Genoma	Aproximadamente 9.0-13kb de RNA não segmentado e positivo
Replicação	Citoplasmática, nas vesículas de membrana derivadas do retículo endoplasmático (RE); Vírions montados brotam no lúmen do RE e são secretadas pela via de transporte vesicular
Tradução	Diretamente do RNA genômico (RNAg)
Hospedeiros	Mamíferos (todos os gêneros); maioria dos membros do gênero <i>Flavivirus</i> são hospedados por artrópodes
Taxonomia	Quatro gêneros com mais de 60 espécies

Em 1947, durante uma vigilância para febre amarela (YFV) na floresta Zika, em Uganga, foi coletado soro de um macaco *rhesus* sentinela e isolado pela primeira vez o vírus Zika (cepa africana MR-766), assim chamado pelo lugar no qual foi identificado primeiramente (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Posteriormente, em 1948, o vírus foi também identificado no mosquito *Aedes africanus* na mesma floresta, sugerindo a transmissão mosquito-hospedeira. A partir das primeiras evidências do vírus, foram coletados soros de outros macacos *rhesus* na floresta Zika e foi constatado que muitos possuíam anticorpos contra o vírus, evidenciando que estes indivíduos já haviam entrado em contato com o patógeno. Além disso, anticorpos contra o vírus foram detectados em soro de humanos nas redondezas da floresta em Uganga (G. W. A. DICK, M.D., B.SC., M.R.C.P. (EDIN.), 1952) e nos anos seguintes em várias áreas da África e Ásia (POND, 1963). Em 1966, na Malásia, foi identificada uma cepa não africana do vírus, nomeada P6-740, em mosquitos *Aedes aegypti* (MARCHETTE; GARCIA; RUDNICK, 1969).

O primeiro caso documentado da manifestação clínica da infecção por vírus Zika foi em 1954, na Nigéria, sendo que até o começo dos anos 2000 poucos casos foram reportados na África e Ásia (MACNAMARA, 1954). No entanto, em 2007, houve a primeira grande epidemia nas ilhas Yap, uma parte dos estados federados da Micronésia. Os casos reportados apresentaram manifestações como febre alta, coceira, artralgia e conjuntivite (LANCIOTTI et al., 2008). Em 2013-2014 ocorreu outro surto epidêmico na Polinésia Francesa. Apesar das manifestações clínicas da infecção serem semelhantes ao surto de 2007 nas ilhas Yap, desta vez o vírus Zika foi associado a casos severos ligados com complicações neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré (OEHLER et al., 2014).

No começo de 2015, a infecção por ZIKV foi detectada em indivíduos no nordeste brasileiro e no final do mesmo ano a infecção já havia se espalhado para, pelo menos, 14 estados brasileiros (WHO, 2015). Após evidências de que a cepa do vírus circulante no Brasil pertencia à linhagem do Zika proveniente da Ásia (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015) especulou-se sobre a origem da introdução do vírus no Brasil, todas relacionadas à viagens internacionais, como: visita do Papa em julho de 2013 para Jornada Mundial da Juventude com jovens católicos da África e Ásia; a Copa Mundial em 2014 que trouxe milhares de pessoas de outros

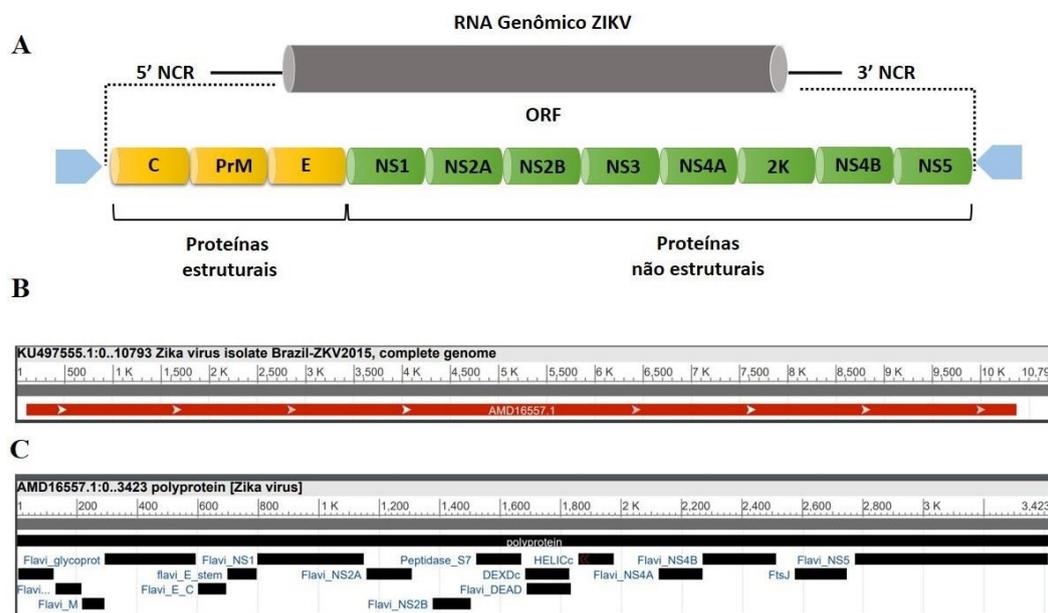
países em diferentes regiões do Brasil; o campeonato mundial de canoagem com participantes dos países do Pacífico, em 2014 (MUSSO, 2015).

A preocupação mundial reside no fato do grande aumento de casos relatados de microcefalia pré-natal após o surto pandêmico no Brasil. Calvet e colaboradores (2016) mostraram o primeiro estudo de caso com evidências científicas detalhadas sobre a ligação entre o vírus Zika e microcefalia (CALVET et al., 2016). O grupo brasileiro demonstrou tal relação analisando o líquido amniótico de mulheres grávidas infectadas por vírus Zika no qual havia presença do genoma do vírus e anticorpos IgM anti-vírus Zika. A partir desse estudo ficou constatado a possibilidade de o vírus ultrapassar a barreira placentária e, possivelmente, ocasionar dano ao tecido cerebral em desenvolvimento nos fetos. Ademais, estudos presentes na literatura confirmam que de 5 a 10% de mulheres grávidas infectadas por ZIKV confirmadas em laboratórios de Porto Rico relatadas no Registro de Gravidez Zika dos EUA resultaram em feto ou criança com defeitos congênitos associados a infecção por ZIKV (LATHROP et al., 2018).

Em 2016, a Organização Mundial de Saúde (OMS), declarou que a infecção por Zika era considerada preocupação mundial de saúde pública (WHO, 2015). Posteriormente, houve casos confirmados nos EUA e América Latina, (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2018), evidenciando a alta transmissibilidade do vírus Zika. Além disso, um estudo conduzido por Messina e colaboradores (2016), por modelamento de distribuição de espécies, mostrou um mapa de regiões aptas para a sobrevivência e disseminação do vírus em regiões tropicais e sub-tropicais, com mais de 2,17 bilhões de pessoas habitando estas áreas (MESSINA et al., 2016).

O ZIKV, estruturalmente, exibe um nucleocapsídeo icosaédrico simétrico com, aproximadamente, 50-60 nm de tamanho composto por RNA genômico com quase 11 kb. A Figura 1 mostra a representação do RNA genômico do ZIKV com as estruturas gênicas e a poliproteína. O RNA é simples fita, de polaridade positiva, flanqueado por duas regiões não codificantes (5' e 3' NCR — *Non Coding Region*) e um único quadro aberto de leitura (ORF — *Open Region Frame*) que codifica uma poliproteína com, aproximadamente, 4000 aminoácidos (5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3') (Figura 1A) (DASTI, 2016). Posteriormente, a poliproteína é clivada em 3 proteínas estruturais como

capsídeo (C), envelope (E), precursor de membrana (prM) e 7 proteínas não estruturais (NS – *Non Structural*) que são essenciais para a replicação e montagem



do vírus (FAYE et al., 2014).

Figura 1. RNA genômico do ZIKV. (A) Ilustração representativa do RNA genômico e proteínas estruturais e não estruturais. (B) Representação gráfica retirada do *GenBank* (Acesso KU497555.1) do genoma da cepa brasileira do ZIKV, mostrando a quantidade de pares de bases e tradução na poliproteína (Acesso AMD16557.1). (C) Representação gráfica retirada do *GenBank* referente à poliproteína (Acesso AMD16557.1) antes e depois do processamento.

Na Figura 1A é possível observar a quantidade de bases e regiões dos genes da cepa brasileira do ZIKV (10.793 b) (*GenBank* - Acesso KU497555.1) que codifica uma poliproteína (*GenBank* - Acesso AMD16557.1) com 3.423 aminoácidos. A poliproteína é posteriormente clivada em proteínas essenciais para a estrutura e replicação viral, como as proteínas NS, peptidases e helicases (Figura 1B). Evidências sugerem que após a infecção, seguida da picada do mosquito, a replicação viral ocorra em células dendríticas locais com posterior disseminação para os nódulos linfáticos e corrente sanguínea (CALVET et al., 2018).

Como já mencionado, o ZIKV é um vírus transmitido, principalmente, por mosquitos do gênero *Aedes* e apresenta dois ciclos de transmissão (Figura 2): ciclo selvagem, envolvendo a manutenção do ZIKV entre primatas não-humanos e

mosquitos do ambiente selvagem; e ciclo urbano que envolve a transmissão entre humanos e mosquitos urbanos.

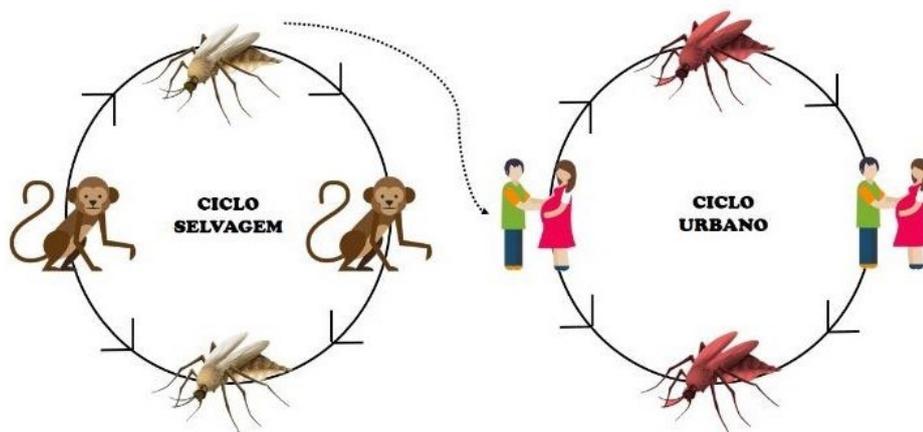


Figura 2. Ciclos de transmissão de ZIKV mediados por mosquitos *Aedes*: ciclo selvagem com manutenção do ZIKV em primatas não humanos e mosquitos do ambiente selvagem; ciclo urbano: transmissão entre humanos e mosquitos urbanos. Autoria própria.

Nessa situação, os mosquitos do ambiente selvagem podem entrar em contato com os humanos, dependendo de alguma proximidade geográfica, iniciando o ciclo urbano com vetores provenientes dos centros urbanos (WEAVER et al., 2016). Ainda, no ciclo urbano, acredita-se que a transmissão do ZIKV seja realizada, predominantemente, pelo *A. aegypti* e *A. albopictus*, sendo que o primeiro é o principal vetor encontrado nos surtos epidêmicos mundiais (EPELBOIN et al., 2017).

Outras maneiras de transmissão, que não envolvem a picada do mosquito, foram recentemente documentadas como a transfusão de sangue, transmissão pré-natal e por vias sexuais, sendo que o ZIKV é o primeiro *Flavivirus* identificado como sendo sexualmente transmissível (CALVET et al., 2018). O ZIKV já foi identificado, além do sangue de pacientes infectados, em sêmen (ATKINSON et al., 2017), urina (FONSECA et al., 2014), saliva (SABALZA et al., 2018) e leite materno (CALVET et al., 2018).

Os métodos atuais de diagnósticos para o vírus Zika são sorológicos e moleculares, tais como: ELISA, reações de cadeia da polimerase, teste de neutralização, fixação de complemento e teste de inibição de hemaglutinação (TAMBO et al., 2017). Os testes sorológicos apresentam extensa reação cruzada com anticorpos dos outros vírus da mesma família, como a dengue e febre amarela (VAINIO et al., 2018). A solução comumente empregada para a reação cruzada é usar dois ou mais testes sorológicos para a confirmação do diagnóstico do Zika (CHARREL et al., 2016). Os métodos moleculares, como RT-PCR convencional e em tempo real, são específicos porém demandam pessoal qualificado, equipamentos e reagentes caros e longo tempo de resposta (MUNOZ-JORDAN, 2017). Deste modo, é de suma importância o desenvolvimento de métodos de detecção do vírus Zika de forma rápida, confiável e, principalmente, menos onerosa, visto que as maiores epidemias do vírus Zika ocorrem em países com recursos limitados.

1.2 Biossensores

1.2.1 Definição e classificação

A IUPAC define os biossensores como dispositivos que usam reações bioquímicas específicas mediadas por enzimas, imunossistemas, tecidos, organelas ou células inteiras isoladas para detectar um analito geralmente por sinais elétricos, térmicos ou ópticos.

Segundo Karunakaran, Rajkumar, Bhargava (2015), os componentes dos biossensores são: analito, biorreceptor, transdutor, dispositivo eletrônico e instrumento de exibição dos dados (Figura 3). O analito é a substância de interesse que deseja-se detectar e o biorreceptor é a molécula que reconhece especificamente o analito. É válido salientar que neste trabalho utilizam-se dos termos sonda e alvo como análogos aos termos analito e biorreceptor, respectivamente. O processo de geração de sinal (na forma de luz, calor, pH, carga ou mudança de massa), após a interação entre analito e biorreceptor, é chamado de

biorreconhecimento. O transdutor é o elemento que converte uma forma de energia em outra, ou seja, no biossensor a característica do transdutor é transformar o evento de biorreconhecimento em um sinal mensurável. O dispositivo eletrônico é a parte do biossensor que processa o sinal do transdutor e prepara para exibição dos dados. Esse dispositivo amplifica e converte o sinal analógico para digital que, por fim, é exibido em algum sistema de interpretação no formato de números, gráficos, tabelas, imagens, entre outros (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).

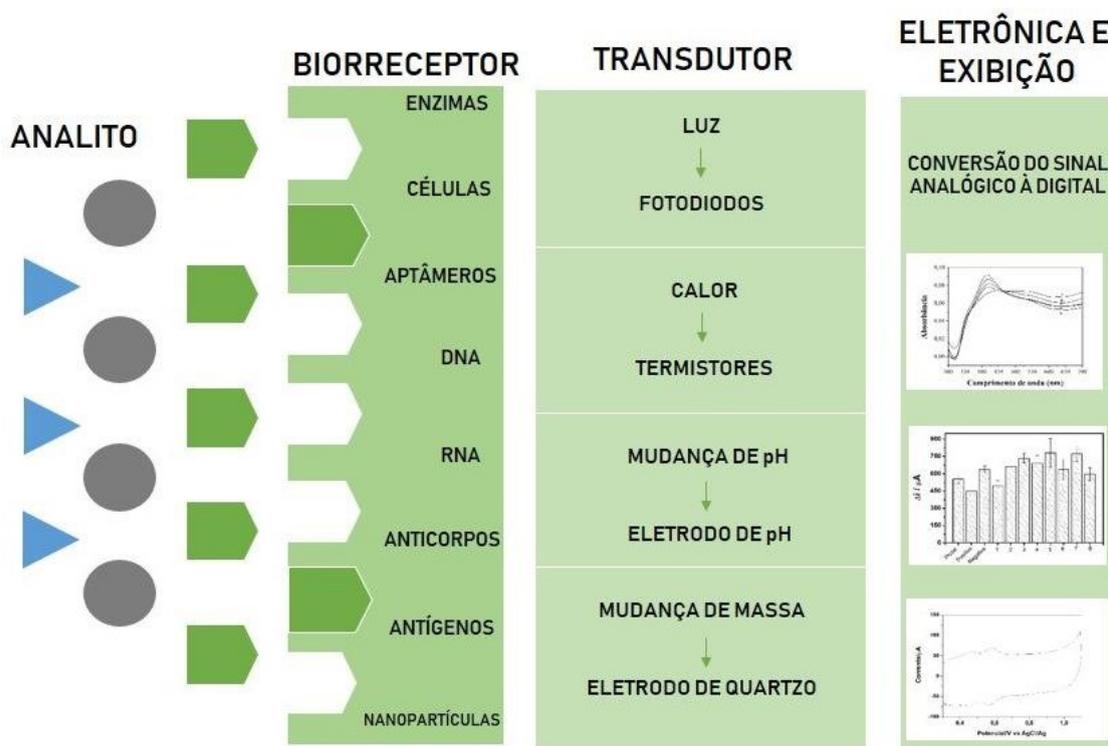


Figura 3. Configuração esquemática de um biossensor. Autoria própria.

O princípio básico de proporcionalidade entre a concentração de um analito e um sinal elétrico do biossensor remonta a 1906, quando M. Cremer, mesmo antes do conceito de pH evidenciou que a concentração de um ácido em um líquido é proporcional ao potencial elétrico localizados em lados opostos de uma membrana de vidro (KADEN, 2010). Entretanto, Leland C. Clark, Jr, em 1956, desenvolveu o primeiro biossensor para detecção de oxigênio no sangue (CLARK, 1956). Leland

C. Clark, Jr objetivava medir a redução de oxigênio com um eletrodo de platina e correlacionar com a concentração de oxigênio no sangue. As primeiras tentativas de detecção não foram satisfatórias, devido ao fato de que os componentes do sangue ficavam adsorvidos no eletrodo e, conseqüentemente, alteravam o sinal gerado. Assim, o pesquisador utilizou um polímero de celulose (invólucro de celofone), o qual tinha o papel de separar as biomoléculas e o oxigênio, de modo que apenas essas últimas moléculas poderiam atingir o eletrodo (RENNEBERG et al., 2007). Posteriormente, Leland C. Clark, Jr adicionou a enzima glicose oxigenase como parte integrante do biossensor e, em 1962, o “eletrodo Clark” enzimático foi criado (CLARK; LYONS, 1962).

Após o pioneirismo de Leland C. Clark, Jr outros tipos de biossensores enzimáticos foram desenvolvidos. Em 1969, George Guilbault publicou sobre um eletrodo para detecção potenciométrica de uréia utilizando a enzima urease imobilizada (GUILBAULT; MONTALVO, 1969). Finalmente, em 1975, o primeiro biossensor comercial foi desenvolvido pela *Yellow Spring Instruments* (YSI), baseado nos biossensores de Leland C. Clark, Jr, para detecção de glicose (RENNEBERG et al., 2007). Desde então, o estudo e desenvolvimento dos biossensores tornaram-se constantes na pesquisa científica e, atualmente, a área é multidisciplinar, envolvendo ciências básicas, fundamentos de micro/nanotecnologia e eletrônica.

O crescimento exponencial das publicações sobre biossensores pode ser visualizado na Figura 4. No período de 1995 a 2017 foram publicados cerca de 79 mil artigos com o termo “biossensor”, utilizando como base apenas o banco de dados do “*ScienceDirect*”. Os números evidenciam a importância no desenvolvimento de biossensores no cenário mundial e crescentes descobertas no meio científico.

A grande variedade nas aplicações dos biossensores convergem em uma finalidade em comum: a melhora da qualidade de vida da população. Nesse sentido, os biossensores são utilizados, dentre outros exemplos, no monitoramento ambiental (UMAR et al., 2015), defesa contra bioterrorismo (WALLER et al., 2016), segurança alimentar (MEHROTRA, 2016), detecção de doenças (OLIVEIRA et al., 2018) e descobrimento de drogas (CHEN et al., 2018).

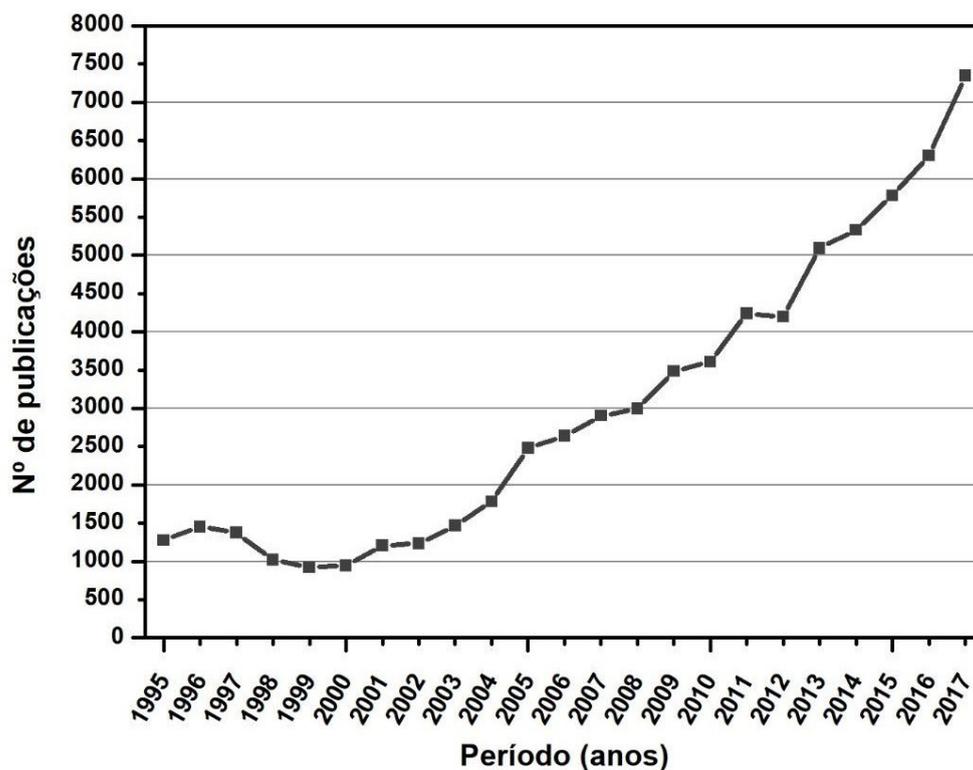


Figura 4. Número de publicações com termo “biossensor” de 1995 a 2017 no *ScienceDirect*. Autoria própria.

Segundo a IUPAC, os biossensores podem ser classificados sob o viés do elemento de biorreconhecimento, modo de transdução do sinal ou, ainda, a combinação dos dois (THÉVENOT et al., 2001). Os biossensores classificados de acordo com o modo de transdução do sinal podem ser categorizados de acordo com os mecanismos de transdução, a saber: eletroquímico, sensores térmicos, ópticos e sensores sensíveis à massa.

De todas as quatro categorias de classificação por modo de transdução de sinal, os biossensores eletroquímicos destacam-se no meio acadêmico e comercial, pois apresentam características vantajosas como, baixo custo de produção, portabilidade, alta sensibilidade e compatibilidade com as tecnologias de microfabricação (MAHATO et al., 2018). Além disso, a relativa facilidade e variedade na modificação para a melhoria da performance do biossensor tornam-se fatores proeminentes na escolha deste modo de transdução. De modo geral, o fundamento que rege essa classe de biossensores diz respeito à produção ou

consumo de íons ou elétrons decorrente das reações químicas entre a biomolécula imobilizada e o analito alvo. Essas reações afetam as propriedades elétricas mensuráveis da solução, como a corrente elétrica ou potencial (THEVENOT, 1999). Mais detalhes sobre biossensores eletroquímicos serão explorados ao longo do trabalho.

Os biossensores ópticos operam medindo o sinal em forma de luz e podem ser baseados, por exemplo, nos fenômenos da fluorescência e difração óptica (VELASCO-GARCIA, 2009). Essa classe é a segunda mais explorada depois dos biossensores eletroquímicos, trazendo características como, alta velocidade de detecção, sensibilidade e detecção de múltiplos analitos (YOO; LEE, 2016). O fenômeno de ressonância de plasmons de superfície será abordado em tópico específico.

Os biossensores piezoelétricos, ou sensitivos à massa, utilizam da propriedade de piezoelectricidade de alguns materiais que não possuem um centro de simetria, como o quartzo. O efeito piezoelétrico aparece quando é aplicada uma pressão capaz de deformar a rede cristalina de materiais dielétricos, causando uma separação dos centros de gravidade das moléculas carregadas de maneira oposta, gerando momentos dipolares em cada molécula (ALDER; MCCALLUM, 1983). O principal componente piezoelétrico utilizado nos biossensores é o cristal de quartzo. Com a aplicação de um sinal elétrico, com frequência específica, os cristais oscilam e a frequência de oscilação é dependente da frequência elétrica aplicada, assim como da massa do cristal. Deste modo, com o aumento da massa, causado pela ligação às biomoléculas, a frequência de oscilação do cristal muda e esta mudança pode ser mensurada eletricamente para determinar a massa adicional (VO-DINH; CULLUM, 2000). Os cristais piezoelétricos são utilizados como microbalanças com vantagens em relação ao seu tamanho, peso reduzido, alta sensibilidade, simplicidade de construção e operação (TOMBELLI et al., 2006).

A última classe dos biossensores baseados no modo de transdução refere-se aos transdutores termométricos ou calorimétricos. Esses biossensores são baseados na mudança de temperatura que ocorre quando o analito se liga à biomolécula imobilizada na superfície do sensor termal. Essa mudança, representada pela produção ou absorção de calor, é proporcional à entalpia molar

e ao número total de moléculas na reação. A medida da temperatura ocorre por meio de termistores e são insensíveis às propriedades ópticas e eletroquímicas da amostra (MOHANTY, 2015). Muitos biossensores calorimétricos são utilizados com propósito de análise de componentes de processos industriais como na indústria alimentícia (BHAND et al., 2010).

Sob o viés do biorreconhecimento, os biossensores são classificados em: enzimáticos, baseados em receptores proteicos, imunossensores, biossensores de DNA e biossensores celulares.

As enzimas são catalisadores biológicos que, quando imobilizadas em biossensores, possibilitam a conversão de substratos não detectáveis em produtos detectáveis. A reação enzimática permite que haja detecção de substratos, produtos, inibidores, moduladores da reação catalítica, entre outros subprodutos reacionais (MARCO; BARCELÓ, 1996). Ainda, não apenas uma classe enzimática pode ser imobilizada, mas várias classes, de modo que possibilite a detecção de outras espécies reacionais.

Os biossensores enzimáticos que quantificam a glicose no sangue representam grande parte do mercado de biossensores disponíveis e são estudados desde o desenvolvimento do biossensor pioneiro de Leland C. Clark, Jr. Esses biossensores possuem, normalmente, duas enzimas: glicose oxidase (GOx) e glicose desidrogenase. A GOx utiliza o oxigênio como aceptor de elétrons sendo que pode haver competição entre o mediador artificial e a medição de oxigênio. Deste modo, enzimas que não utilizam o oxigênio como aceptor de elétrons, como a glicose desidrogenase dependente de pirroloquinolina-quinona, têm sido usadas de modo a prevenir possíveis interferências decorrentes do oxigênio (BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2015).

Os receptores proteicos são proteínas não-catalíticas que ocorrem nas membranas celulares conectando o espaço extracelular e intracelular, funcionando como sensores químicos envolvidos em várias vias bioquímicas. São responsáveis pela comunicação célula-célula, por ligações específicas reversíveis de neurotransmissores e hormônios que coordenam a atividade celular e são alvos de ligações de muitas drogas e toxinas (PADDLE, 1996). O mecanismo de sensoriamento natural torna os receptores proteicos ótimas escolhas na aplicação em biossensores. Mayall e colaboradores (2017) desenvolveram um sistema de

detecção de bactérias Gram-negativas em microeletrodo de ouro immobilizando o receptor-4 *Toll-Like* que possui afinidade por lipossacarídeos (LPS) da membrana externa das bactérias. O grupo relata que, na identificação de todas as espécies Gram-negativas, a utilização do receptor como molécula de biorreconhecimento possibilitou a detecção de ampla gama de LPSs diferentes enquanto que, anticorpos, por exemplo, devido a especificidade com um substrato, constitui-se como obstáculo na detecção de várias bactérias diferentes (MAYALL et al., 2017).

Os imunossensores utilizam da ligação altamente específica entre antígenos e anticorpos. O anticorpo, ou imunoglobulina, é uma molécula glicoproteica complexa capaz de se ligar a antígenos (agentes biológicos como toxinas, bactérias, vírus, pólen, fungos, células teciduais ou proteínas com peso molecular maior que 1.5 kDa) formando um complexo estável (FELIX; ANGNES, 2018). Essa propriedade é crucial nos imunossensores visto que, normalmente, apenas um tipo de analito (antígeno) é de interesse na detecção e esta molécula se liga exatamente no sítio de ligação do antígeno no anticorpo com especificidade e seletividade. Além disso, com o advento da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais, ou seja, anticorpos que se ligam a apenas um epítipo (porção do antígeno que interage com o anticorpo) pode-se eliminar a chance de ocorrência de reações cruzadas com outras biomoléculas na detecção do alvo (MARCO; BARCELÓ, 1996).

Os biossensores celulares utilizam de células ou micro-organismos inteiros ou componentes celulares específicos como elementos de biorreconhecimento. Como células têm diversos componentes de membrana, o analito tende a se ligar com maior frequência ocasionando limites de detecção baixos, sendo este uma das vantagens na utilização desses biomateriais para o biorreconhecimento (MONOŠÍK; STREĎANSKÝ; ŠTURDÍK, 2012). Dentre outros exemplos, os biossensores microbianos, cada vez mais explorados, são capazes de detectar várias substâncias químicas e oferecem a facilidade de operar em condições diversas como, variedade no pH e temperatura (LEI; CHEN; MULCHANDANI, 2006). Entretanto, oferecem a desvantagem de pouca seletividade.

Os biossensores que utilizam fragmentos de DNA como biorreconhecimento são denominados genossensores ou biossensores de DNA e são bastante explorados devido ao seu baixo custo, estabilidade e rapidez na resposta

(LUCARELLI et al., 2004). A molécula de DNA possui ligações entre seus pares de bases de maneira específica, o que a torna uma biomolécula que apresenta robustez para o desenvolvimento de biossensores. Os genossensores convertem o evento de reconhecimento entre os pares de bases por ligação Watson-Crick em um sinal analítico detectável (AVRAHAM RASOOLY; HEROLD, 2008). De maneira geral, esse tipo de biossensor distingue o evento de hibridização entre a sonda imobilizada (oligonucleotídeos) e o alvo na amostra, possibilitando identificar o sinal do analito quando é formada dupla-fita de DNA (dsDNA ou duplêx), após a hibridização, ou quando há a ausência do mesmo (fitas simples de DNA — ssDNA).

1.2.2 Biossensores eletroquímicos

A eletroquímica é uma técnica de superfície que oferece várias vantagens para a detecção em biossensores. Uma das principais limitações no desenvolvimento de biossensores *point-of-care* (PoC) é a dificuldade de miniaturização de transdutores e o alto custo na produção dos mesmos. A inerente característica de PoC, de possível realização de testes laboratoriais junto ao paciente, requer que esses dispositivos sejam de fácil manuseio e interpretação. Os transdutores eletroquímicos conseguem preencher essas lacunas que separam o desenvolvimento acadêmico da produção comercial efetiva desses dispositivos. Além disso, o crescente interesse em aplicar a nanotecnologia em biossensores possibilita a diminuição dos componentes do sensor, de modo a aumentar a relação sinal-ruído de processos que ocorrem na interface dos dispositivos.

As técnicas eletroquímicas são geralmente organizadas em categorias principais de acordo com o tipo de medida da técnica. A técnica amperométrica investiga reações que geram uma corrente mensurável; a técnica potenciométrica investiga reações que geram potencial mensurável ou acúmulo de cargas; as técnicas condutimétricas exploram as alterações mensuráveis das propriedades condutivas de um meio entre os eletrodos; as técnicas impedimétricas medem a impedância (tanto resistência quanto reatância) (SKOOG et al., 2005).

Na potenciometria há a medida de potencial de uma célula eletroquímica sob condições estáticas, de modo que não há corrente significativa através das células e sua composição permanece inalterada (HARRIS, 2007). Nas medidas

potenciométricas é necessário um eletrodo de referência, um eletrodo indicador (eletrodo de trabalho) e um dispositivo de medida de potencial. O eletrodo de referência é uma meia-célula com potencial conhecido, independente da concentração do analito; o eletrodo indicador fica imerso na solução contendo o analito e desenvolve um potencial dependente da atividade do analito. A ponte salina é um outro componente importante na célula potenciométrica e previne os componentes da solução do analito de se misturarem com a solução do eletrodo de referência. Como eletrodo indicador os eletrodos baseados em potenciais de membrana, ou eletrodos íon-seletivos, são importantes ferramentas em constante desenvolvimento e as concentrações iônicas são medidas diretamente a partir desses eletrodos (SKOOG et al., 2005).

Os métodos condutimétricos monitoram mudanças na condutividade elétrica de uma solução ou meio. Nas reações eletroquímicas ocorre a produção de íons ou elétrons que, em conjunto, alteram a condutividade ou resistividade da solução, de modo que o sensor condutimétrico detecta essas variações. No entanto, as medidas de condutância possuem relativa baixa sensibilidade (MOHANTY, 2015). Na literatura há exemplos de biossensores com esse modo de detecção eletroquímica como, por exemplo, imunossensores condutimétricos que detectam *Escherichia coli* e *Salmonella spp*, patógenos de interesse à biossegurança de alimentos (MUHAMMAD-TAHIR; ALOCILJA, 2003).

Nos métodos amperométricos a corrente resultante da oxidação ou redução de espécies eletroativas é monitorada continuamente e é proporcional à concentração do analito. Quando a corrente é medida em um potencial constante a técnica referida é a amperometria. Por outro lado, se a medida da corrente é realizada com variações controladas de potencial, a técnica é denominada voltametria (GRIESHABER et al., 2008).

O transdutor amperométrico é sensível à transferência de cargas entre as interfaces de fases como, por exemplo, entre dois eletrodos separados por um analito. No sistema de células eletroquímicas, uma das reações de meia-célula é cuidadosamente controlada para o estudo das mudanças na transferência de cargas na interface da outra reação da meia-célula, chamada eletrodo de trabalho. Ao controlar um potencial fixo ou variável na célula eletroquímica ocorre a formação de excesso de potencial que será a diferença entre o potencial aplicado e o de

equilíbrio da célula. Nesse excesso de potencial, a transferência eletrônica torna-se termodinamicamente favorável e reações oxidativas ou redutivas podem ocorrer (HAMMOND et al., 2016). Esses processos são governados pela lei de Faraday, portanto denominados processos faradaicos. Processos que alteram a superfície interfacial, porém não ocasionam a transferência de cargas, são denominados processos não-faradaicos.

Para o entendimento da relação entre concentração e corrente, é importante citar as equações de Faraday que elucidam os fenômenos eletrônicos na interface do eletrodo/eletrólito. Na Equação 1 a corrente faradaica I é determinada pelo número de elétrons envolvidos na reação, sendo representada por n ; F representa contante de Faraday; A é a área do eletrodo; j é o fluxo do analito nos limites interfaciais. Esse último parâmetro descreve a taxa da reação e é calculado pela Equação 2, sendo k_0 a constante de taxa heterogênea da transferência de elétrons e descreve a cinética da transferência e c_0 que corresponde à concentração do analito na interface eletrodo/eletrólito que, por sua vez, é dependente do transporte de massa do analito para a interface (HAMMOND et al., 2016).

$$I = nFAj$$

Equação 1

$$j = k_0c_0$$

Equação 2

Desse modo, com a dependência entre a concentração do analito e a corrente, torna-se possível a correlação entre essas variáveis e, conseqüentemente, a aplicação em biossensores. Vários fatores podem afetar os mecanismos supracitados e o entendimento dos processos possibilita o manejo de estratégias com objetivo de minimizar os fatores que podem diminuir a performance do biossensor. Assim, os fatores gerais que influenciam a taxa da reação são: a concentração do analito e outras espécies na matriz e nos limites interfaciais; o transporte de massa das espécies da solução até os limites interfaciais; transferência de elétrons nos limites interfaciais; outras reações químicas que podem ocorrer dentro da amostra-matriz; outras interações com os eletrodos (adsorção, eletrodeposição); fatores externos, como temperatura e pressão. Dentro

do fator de transporte de massa, é importante salientar que o analito possui três maneiras de alcançar o eletrodo: por difusão, convecção e migração. O primeiro através de um gradiente de concentração, o segundo por movimentos na solução governados por fenômenos físicos (ebulição, agitação) e o terceiro por atração ou repulsão de uma superfície carregada (HARRIS, 2007).

A base da voltametria é a medida de corrente em uma célula eletroquímica em condições de completa polarização de concentração, cuja velocidade de oxidação e redução do analito é limitada pela velocidade de transferência de massa do analito para a superfície do eletrodo (SKOOG et al., 2005). A instrumentação para realização de técnicas voltamétricas consiste em uma célula eletroquímica com três eletrodos imersos em uma solução que contém o analito e excesso de um eletrólito não reativo (eletrólito suporte). No eletrodo de trabalho, o potencial em relação ao eletrodo de referência varia linearmente com o tempo. O eletrodo de referência tem um potencial constante durante o experimento. A corrente medida é aquela que flui entre o eletrodo de trabalho e o terceiro eletrodo, o eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo (HARRIS, 2007). As correntes geradas pelas reações redox na superfície do eletrodo de trabalho e do fluxo do contra-eletrodo são correntes faradaicas, como anteriormente exposto.

As técnicas voltamétricas são amplamente difundidas tanto para análises quantitativas como qualitativas e algumas estão listadas na Figura 5. A voltametria cíclica é bastante utilizada para o estudo qualitativo sobre processos eletroquímicos, sendo possível obter informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos. O termo cíclico se refere à varredura de potencial tanto do sentido direto quanto no sentido inverso. Ou seja, tanto para regiões mais positivas (anódicas) quanto para as mais negativas (catódicas). Na Figura 5A pode ser visualizada uma representação esquemática sobre a varredura de potencial de forma linear em relação ao tempo (E vs t) utilizando potencial em forma de triângulo. Durante a varredura do potencial, o potenciostato mede a corrente *versus* o potencial aplicado (I vs E) no eletrodo de trabalho. As espécies oxidadas geradas no sentido direto são reduzidas no sentido inverso, gerando picos separados para a reação de oxidação e de redução, respectivamente, e cada uma delas caracterizadas por um potencial e corrente de

pico. Desse modo, a varredura do potencial em ambas as direções fornece informações sobre o comportamento eletroquímico das espécies geradas no eletrodo de trabalho (KISSINGER; LAFAYETTE; HEINEMAN, 1983).

Na técnica de voltametria de pulso diferencial, pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho, como está representado na Figura 5B. A corrente é medida antes da aplicação do pulso (S1) e depois da aplicação (S2) e instrumentalmente a primeira é subtraída da segunda. A diferença das correntes é obtida *versus* o potencial aplicado e o voltamograma resultante possui picos de corrente de forma gaussiana onde a concentração do analito é diretamente proporcional à área do pico. Ao medir as duas correntes e realizar a subtração é possível corrigir a corrente capacitiva (não-faradáica) gerada. Ou seja, a corrente total de ocorrência na interface eletrodo-solução é medida minimizando a contribuição de correntes de fundo indesejáveis, proporcionando o aumento de sensibilidade da técnica e justificando a popularidade desse método na detecção em biossensores eletroquímicos (BARD; FAULKNER, 2001).

Na voltametria de onda quadrada é aplicada uma onda quadrada simétrica de amplitude ΔE_p sobreposta a um potencial crescente, na forma de escada, com amplitude ΔE_s , largura a e período τ característicos do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho (Figura 5C). Como na voltametria de pulso diferencial, a corrente é medida duas vezes, ao final do pulso direto e outro ao final do pulso reverso, onde a direção do pulso é contrária à direção da varredura. A realização da medida de corrente duas vezes tem o propósito igual ao pulso diferencial: diminuir a influência das correntes não-faradaicas. O diferencial dessa técnica consiste na velocidade de aquisição de dados, que é maior do que a técnica anteriormente citado, devido ao fato de que, com o aumento da frequência dos ciclos de onda quadrada por segundo, é possível que as velocidades de varredura de potencial sejam mais rápidas e sem perda da resolução (OSTERYOUNG; OSTERYOUNG, 1985).

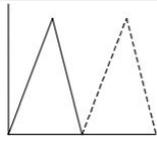
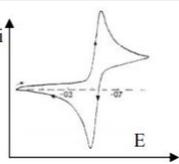
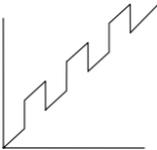
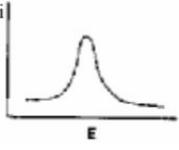
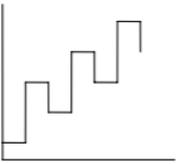
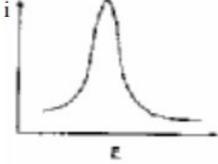
Técnica voltamétrica	Sinal de excitação (E vs t)	Corrente resultante (i vs E)
(A) Voltametria Cíclica		
(B) Pulso Diferencial		
(C) Onda Quadrada		

Figura 5. Técnicas voltamétricas utilizadas em biossensores eletroquímicos e diferenças nos sinais de excitação e corrente resultante. Autoria própria.

1.2.3 Polímeros condutores aplicados em biossensores

Os polímeros condutores (PC) são polímeros conjugados que apresentam elétrons π delocalizados ao longo da cadeia polimérica, proporcionando suas funções únicas, como: condutividade elétrica, baixa energia óptica de transição, baixo potencial de ionização e alta afinidade eletrônica. Devido aos altos valores de condutividade elétrica desses polímeros orgânicos os mesmos também são chamados de “metais sintéticos” (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002).

Os métodos englobados na polimerização aplicados na síntese de polímeros condutores são três: química, eletroquímica e fotoeletroquímica. Entretanto, em termos de aplicações biológicas, a polimerização eletroquímica possui vantagens inerentes, como: realização em condições de temperatura ambiente em eletrodos e microeletrodos; o filme polimérico resultante fica confinado ao eletrodo e ao seu formato, portanto, o desenho do eletrodo e a espessura do mesmo pode ser controlada em escalas nanométricas a micrométricas;

possibilidade de variar as propriedades dos PCs variando as condições de eletropolimerização (PENG et al., 2009).

A eletropolimerização de polímeros condutores é geralmente realizada por técnicas de corrente constante ou galvanostática; potencial constante ou potenciostático; ciclos/varredura de potencial. Os melhores filmes eletrodepositados são aqueles que empregam técnicas eletroquímicas em células divididas com eletrodo de trabalho, contra-eletrodo ou auxiliar e eletrodo de referência (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002). De modo geral, durante a polimerização eletroquímica, no primeiro passo, o monômero neutro é oxidado em determinado potencial até formação de cátions radicais. O potencial de oxidação determinado ocasiona a acessibilidade do mesmo via solução eletrolítica seguida por reações de acoplamento até formação de oligômeros que serão depositados na superfície do eletrodo (HEINZE, 1991).

Monômeros que contém grupos aromáticos diretamente ligados ao oxigênio são mais fáceis de polimerizar, apresentando alta reprodutibilidade e resistência mecânica, o que fornece estabilidade aos eletrodos modificados (DE CASTRO et al., 2008). A tiramina (4-hidróxi-fenetilamina) (Figura 6) é um monômero que possui grupo –OH que aumenta sua solubilidade em componentes polares. A utilização em meio ácido para produção de poli-[4-(2-aminoetil)fenol], politiramina (Figura 6), possibilita a formação de filmes finos com propriedades condutivas melhoradas (ABRAHÃO et al., 2013).

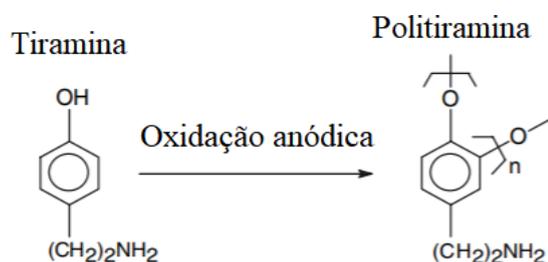


Figura 6. Representação esquemática da eletropolimerização da tiramina. Modificado de DE CASTRO *et al.*, 2008.

Abrahão e colaboradores (2013) propuseram o mecanismo de eletropolimerização da tiramina em meio ácido, detalhado na Figura 7. O grupo

inferiu que os mecanismos do processo envolvem: remoção eletrônica do orbital molecular mais alto (em inglês, HOMO) da tiramina protonada formando um radical cátion protonado; o radical cátion protonado formado, estabilizado por ressonância, perde um próton para formar o radical protonado reativo; o radical protonado acopla ao carbono orto do cátion radical protonado para formação de um dímero; por fim, os dímeros oxidados ou oligômeros acoplam a outros monômeros via cátion radical nas posições *orto*, o que ocasiona a propagação da reação em cadeia da eletropolimerização.

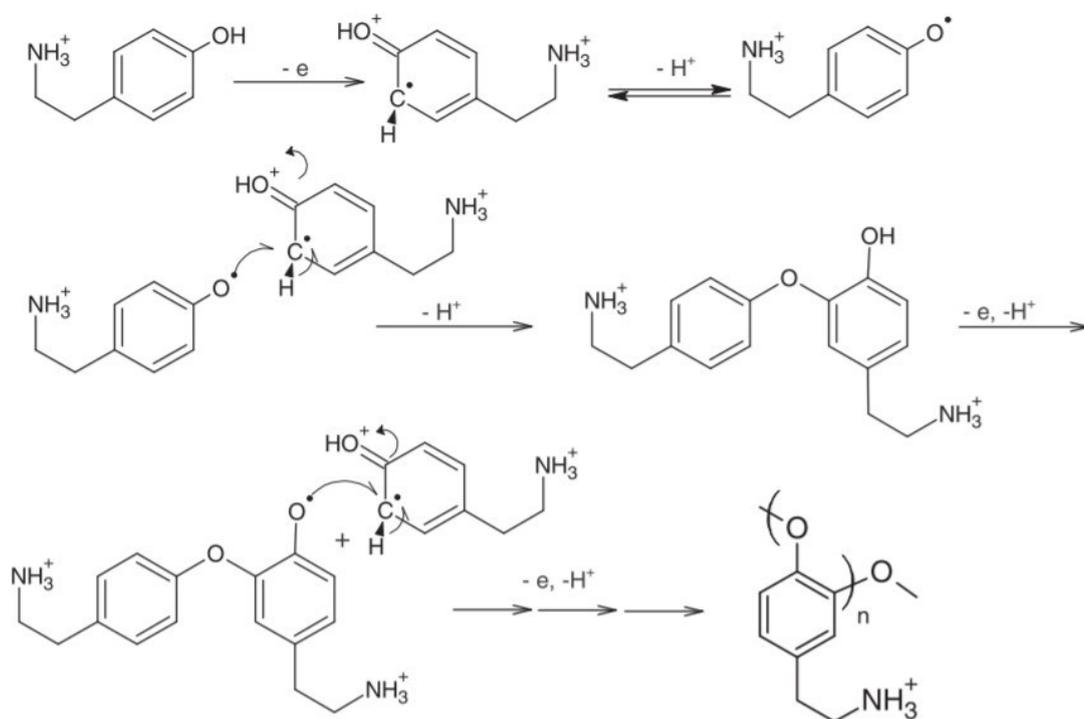


Figura 7. Mecanismo proposto por Abraão e colaboradores (2013) da eletropolimerização da tiramina em meio ácido.

1.3 Nanomaterias

1.3.1 Óxido de grafeno reduzido (OGr)

Os materiais carbonáceos são bastante utilizados na eletroquímica em modificações de eletrodos e são explorados no sentido de melhorar a performance

eletroquímica nesses eletrodos. Os nanomateriais gráfiticos, principalmente grafeno, são alvos de estudos em pesquisas inovadoras devido ao fato de possuir extraordinárias propriedades físicas, químicas e elétricas (BROWNSON; SMITH; BANKS, 2017).

O óxido de grafeno (OG) é o grafeno quimicamente modificado que é preparado por oxidação e esfoliação acompanhado com modificações do plano basal. O OG consiste em uma monocamada com alto conteúdo de oxigênio tipicamente com o raio C/O menor do que 3:1 e próximo a 2:1. A monocamada, em aspecto de folha, possui grupos carbonila, hidroxila, epóxidos em ambos os lados. É um material hidrofílico e seus grupos oxidados quebram a rede de condutividade dos elétrons π (GAO, 2015).

O OGr é o OG reduzido por métodos que objetivam a redução do conteúdo de oxigênio, como representado na Figura 8. Esse nanomaterial possui sítios eletroativos remanescentes e estrutura similar ao do grafeno. Fornece, como outras vantagens, preparação fácil e barata, bons rendimentos reacionais, grande área superficial, possibilidade de funcionalização e boa biocompatibilidade (GAO, 2015).



Figura 8. Ilustração esquemática de possíveis formas de preparação do grafeno e OGr. Modificado de FILIP; TKAC, 2014.

A redução do GO pode ser realizada quimicamente, termicamente ou eletroquimicamente (ROWLEY-NEALE et al., 2018). O objetivo final de todos os métodos é reestruturar a rede sp^2 gráfitica, porém cada método resulta em OGr

diferentes que podem influenciar a resposta eletroquímica de eletrodos modificados com os mesmos (PEI; CHENG, 2012). Os métodos químicos geralmente deixam impurezas dos agentes redutores e a redução não é completa (PARK; RUOFF, 2009). Já os métodos térmicos tem melhores resultados no sentido de remover a maioria das funcionalidades de oxigênio, mas, com a utilização de altas temperaturas, deixam defeitos, como carbonos sp³ (MCALLISTER et al., 2007). Os métodos de redução eletroquímicos são considerados “métodos verdes” pelo uso de condições amenas de temperatura e pressão em soluções aquosas e não utilização de agentes redutores (SHAO et al., 2010).

Na redução eletroquímica de OG emprega-se, normalmente, tampão fosfato como suporte ou tampão eletrólito (GAO et al., 2012). As soluções eletrolíticas são muito importantes por serem responsáveis pela condutividade do meio, parâmetro crucial para formação de filmes de alta qualidade na superfície do eletrodo (HILDER et al., 2011). Além disso, o controle de pH do meio influencia na deposição sobre o eletrodo, sendo que valores de pH maiores que 10 do meio produzem filmes instáveis devido à maior solubilidade em meio básico (LIU et al., 2011).

1.3.2 Nanopartículas metálicas: ouro e prata

A nanotecnologia compreende partículas na escala entre 1 a 100 nm (Figura 9) bem como sua produção, desenho, caracterização e aplicação destas estruturas, de modo que, controlando a manipulação do tamanho e forma, a nível nanométrico, obtém-se estruturas e sistemas com características ou propriedades superiores (BAWA, 2007). Em paralelo a essa definição, a aplicação de nanoestruturas na medicina é chamado de nanomedicina e abrange a utilização das mesmas para fins terapêuticos, na bioengenharia e diagnóstico (LANGER; WEISSLEDER, 2015).

As nanopartículas possuem propriedades diferentes ao seu material de origem, ou *bulk* (Figura 9), como, por exemplo, efeitos de superfície e confinamento quântico (RODUNER, 2006) o que lhes conferem as excelentes características exploradas nas aplicações nos setores de diagnóstico (TONG et al., 2014). Essas propriedades diferenciais entre as nanopartículas e os substratos de origem refletem nas abordagens gerais de produção das mesmas: as técnicas *top down* e

bottom up. No primeiro caso, um substrato macroscópico inicial é gradualmente processado até a formação de partículas nanométricas e, no segundo caso, o fenômeno é invertido: utilização de partículas nanométricas automontadas com a finalidade de formação do substrato macroscópico inicial (DARAIO; JIN, 2012).

Na área de diagnósticos a funcionalidade final requerida pelos nanomateriais converge na melhora da especificidade e sensibilidade de determinada detecção de reconhecimento biológico (OLIVEIRA et al., 2014). Essas funções são conseguidas pelas inúmeras vantagens inerentes aos nanomateriais, como aumento da área superficial para ligação com biomoléculas.

O tamanho, formato e constante dielétricas das nanopartículas metálicas e semicondutoras determinam o comportamento óptico, eletrônico e magnético das mesmas (EUSTIS; EL-SAYED, 2006). A solução final de prata coloidal possui coloração amarela que é resultado da absorção da radiação eletromagnética em ressonância com os plasmons de superfície. Com o aumento do tamanho das nanopartículas de prata, a cor amarela característica da solução padrão se extingue e passa a possuir a coloração característica da prata em escala macroscópica. Do mesmo modo, a solução coloidal de ouro possui coloração vermelha e seu correspondente *bulk* possui uma cor amarelo brilhante.

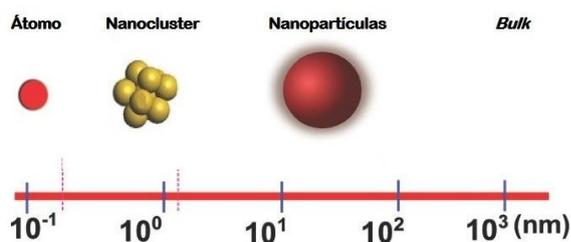


Figura 9. Hierarquia dos materiais do átomo ao bulk (substrato macroscópico). Modificado de YU et al., 2015.

A mudança de coloração das nanopartículas metálicas é explicada interação com a luz em escala nanométrica (Figura 10). Quando o comprimento da luz é muito maior do que o tamanho da nanopartícula, a luz entra em ressonância com os plásmons de superfície. O plasmon é a oscilação coletiva de cargas em

determinado meio ocasionando a separação dipolar de cargas nas nanopartículas. As cargas e lados opostos, acoplados com uma força restauradora, contribuem para o surgimento do fenômeno de plasmons. Quando a frequência da oscilação dos elétrons entra em ressonância com a frequência da radiação eletromagnética da luz incidente, ocorre a ressonância de plasmons de superfície. Esse fenômeno está intrinsicamente ligado à intensidade da força restauradora que, por sua vez, está ligada a distância entre o dipolo formado e, como consequência, observa-se a mudança de coloração quando altera-se o tamanho das partículas (JAIN et al., 2007).

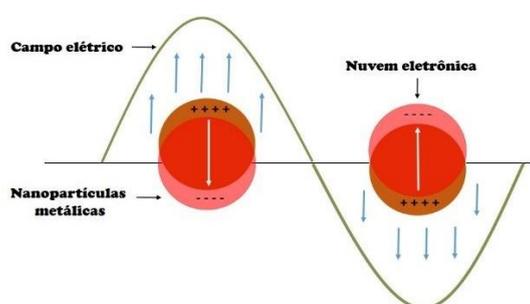


Figura 10. Ilustração esquemática do fenômeno de ressonância plasmônica em nanopartículas metálicas. Autoria própria.

Em ouro (Au), prata (Ag) e cobre (Cu) a condição de ressonância é completa em espectros de luz visível, tornando eses metais “plasmônicos” grandes atrativos para aplicações ópticas (KREIBIG; VOLLMER, 1995). Neste trabalho, as nanopartículas de ouro e prata serão referidas como AuNps e AgNps, respectivamente.

O fenômeno de ressonância ocorre na superfície das nanopartículas, portanto processos que alteram a superfície podem causar mudanças na constante dielétrica e no fenômeno de ressonância. Processos que ocorrem superficialmente, como interação ou ligação com moléculas e biomoléculas, podem ser identificados observando a mudança que eles induzem na densidade eletrônica da superfície que resulta na mudança absorção plasmônica de superfície máxima. Essa sensibilidade às mudanças superficiais é a base para a utilização de nanopartículas metálicas como sensores sensitivos (EUSTIS; EL-SAYED, 2006).

Os nanomateriais plasmônicos são utilizados, entre outros propósitos, no desenvolvimento de sistemas de biosensoriamente sensíveis e seletivos para atender às demandas na saúde pública, como a detecção de vírus influenza (AHMED et al., 2017) e tuberculose (KIM et al., 2016). Além disso, são empregados em plataformas diagnósticas PoC para o aumento da especificidade desses métodos (LEE et al., 2017). Na detecção de RNA do ZIKV, Adegoke e colaboradores (2017) mostraram que os sinais de ressonância plasmônica de superfície de nanopartículas plasmônicas podem ser utilizados para mediar o sinal de fluorescência de nanocristais de *quantum dots* semicondutores. Neste estudo, o aumento da fluorescência, baseada na detecção de RNA de ZIKV, foi proporcional ao sinal de fluorescência mediados por ressonância plasmônica de superfície localizada (ADEGOKE et al., 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolvimento de genossensor eletroquímico, baseado em eletrodos de grafite modificados com óxido de grafeno reduzido e politiramina, e óptico, utilizando nanopartículas de ouro e prata, para detecção do RNA genômico do vírus Zika extraído de pacientes infectados.

2.2 Objetivos específicos

- Redução eletroquímica e caracterização do óxido de grafeno;
- Eletropolimerização de monômeros de tiramina sobre eletrodos de grafite modificados ou não com OGr;
- Caracterização eletroquímica de eletrodos de grafite modificados com politiramina (EG/PoliTir) e óxido de grafeno reduzido (EG/OGr/PoliTir);
- Imobilização de sonda específica ao vírus Zika na plataforma EG/OGr/PoliTir;
- Detecção de RNAg de vírus Zika de soro de pacientes infectados;

- Estudo de seletividade e especificidade da plataforma EG/OGr/PoliTir com sonda imobilizada utilizando controle negativo de RNAg de vírus da Hepatite C;
- Determinação dos parâmetros analíticos do genossensor;
- Determinação da estabilidade do bioeletrodo EG/OGr/PoliTir-ZIK1V;
- Caracterização por microscopia de força atômica de EG/OGr/PoliTir-ZIK1V, EG/OGr/PoliTir-ZIK1V-RNAg ZIKV e EG/OGr/PoliTir-ZIK1V-RNAg HCV;
- Síntese de nanopartículas de ouro pelo método de Turkevich modificado;
- Caracterização das AuNps por espectrofotometria de UV-Vis;
- Funcionalização de sonda específica ao vírus Zika nas AuNps;
- Detecção colorimétrica e óptica em AuNps de RNAg de vírus Zika de sorode pacientes infectados;
- Estudo de seletividade e especificidade das AuNps funcionalizadas com sonda específica utilizando controle negativo;
- Determinação da estabilidade das AuNps funcionalizadas com sonda específica;
- Síntese de nanopartículas de prata por redução de borohidreto de sódio e estabilização por citrato de sódio;
- Caracterização das AgNps por espectrofotometria de UV-Vis;
- Funcionalização de sonda específica ao vírus Zika nas AgNps;
- Detecção colorimétrica e óptica em AgNps de RNAg de vírus Zika de sorode pacientes infectados;
- Estudo de seletividade e especificidade das AgNps funcionalizadas com sonda específica utilizando controle negativo.
- Determinação da estabilidade das AgNps funcionalizadas com sonda específica;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equipamentos e reagentes

As soluções do presente trabalho foram preparadas com água deionizada e ultra pura (resistividade de 18,2 MΩ cm, Gehaka). Previamente aos testes eletroquímicos, as mesmas foram desoxigenadas com gás nitrogênio ultrapuro por tempo proporcional ao volume (1 min/ mL⁻¹). Os testes eletroquímicos foram executados em um potenciostato (CHI Instruments) e os espectros de absorvância analisados em espectrofotômetro UV-Vis SHIMADZU. A temperatura e concentração das soluções estão indicadas após sua citação durante o texto. Os reagentes utilizados foram de padrão analítico e estão listados na Tabela 2:

Tabela 2. Reagentes utilizados.

Reagentes	Fórmula química	Fonte	Pureza %
Ácido perclórico	HClO ₄	Merck	37%
Ácido tetracloroáurico (III) tri-hidratado	HAuCl ₄ · 3H ₂ O	Sigma	49%
Citrato de sódio	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	Synth	99%
Cloreto de potássio	KCl	Neon	99%
Cloreto de sódio	NaCl	Synth	99%
Ferricianeto de potássio	K ₃ [Fe(CN) ₆]	Vetec	99%
Ferrocianeto de potássio	K ₄ [Fe(CN) ₆] · 3H ₂ O	Reagen	99%
Fosfato de sódio dibásico	Na ₂ HPO ₄	Synth	99%
Fosfato de sódio monobásico	NaH ₂ PO ₄	Synth	99%
Cloridrato de tiramina	C ₈ H ₁₂ ClNO	Acros Organics	98%
Nitrato de prata	AgNO ₃	Acros Organics	98%

3.2 Amostras biológicas

O oligonucleotídeo ZIKV2 é o alvo complementar de ZIK1V e ZIKV1S (adição de enxofre na porção 5') e as sequências são específicas ao vírus Zika (*GenBank*: KU497555.1). Tais sequências foram escolhidas com base na análise da sequência do genôma do vírus com, aproximadamente, 11 kb (Figura 1) e são regiões conservadas, em relação às outras cepas do vírus (cruzamento com banco de dados no *GenBank*) e repetitivas.

Os oligonucleotídeos liofilizados foram preparados em solução tampão citrato de sódio salino (citrato de sódio 0,03 mol L⁻¹, NaCl 0,3 mol L⁻¹, ajustado com ácido cítrico, pH 7,0) obtendo a concentração de 1 mmol L⁻¹. Como controle negativo, foram utilizadas soluções de oligonucleotídeos específicos à *Neisseria meningitidis* (NM1) e RNA genômico de vírus da Hepatite C (9,6 kb), o qual foi purificado utilizando-se o extrator ABBOTT m2000sp.

Tabela 3. Sequências de oligonucleotídeos utilizados no trabalho.

Nome	Sequência	Fonte
ZIKV1S	5- [S]CCGCTGCCCAACACACAAG-3	Invitrogen
ZIK1V	5- CCGCTGCCCAACACACAAG -3	Invitrogen
ZIKV2	5- CTTGTGTTGGGCAGCGG -3	Invitrogen
NM1	5- TGTTGGGCAACCTGATTG -3	Invitrogen

3.3 Genossensor eletroquímico

3.3.1 Preparo do eletrodo de trabalho

Os eletrodos de trabalho de grafite foram confeccionados a partir do corte de barras de grafite de 6 mm com pureza de 99,9995% adquiridas da Alfa Aesar. Os discos resultantes, de 3 a 4 mm, foram colados na superfície de um cilindro metálico envolto de material polimérico politetrafluoretileno (PTFE) da Teflon® por meio de cola condutora constituída de 70% de floco de prata e 30% de cola epóxi (Araldite®) (Figura 11A). O tempo para completa secagem (24 h) foi aguardado e,

posteriormente, as lacunas entre o grafite e o teflon foram preenchidos com cola epóxi (Araldite®) e levados à 90°C para remoção de possíveis bolhas de ar. Novamente foram aguardados 24 h para completa secagem em temperatura ambiente.

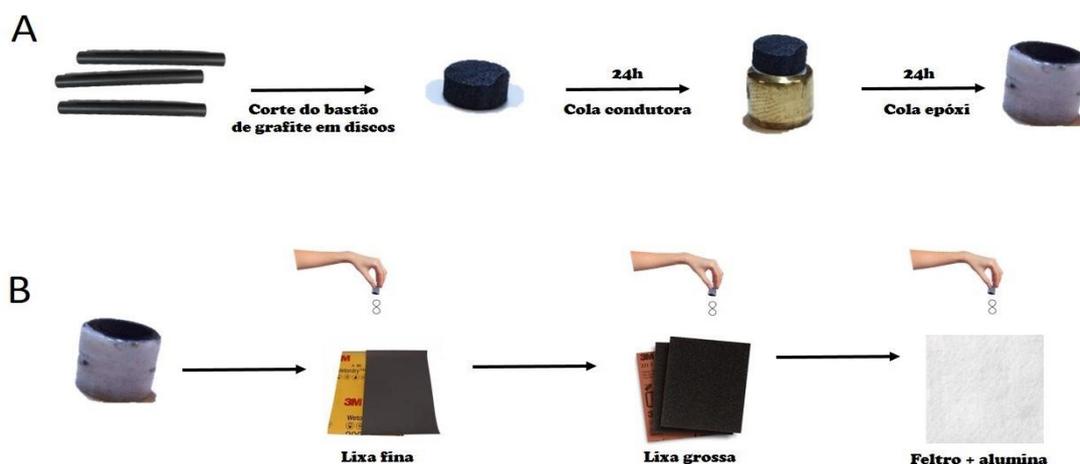


Figura 11. Preparo dos eletrodos de grafite e polimento. (A) Processo de corte dos bastões de grafite e colagem dos discos. (B) Método de polimento manual em lixa fina, grossa e em feltro com pasta de alumina. Autoria própria.

O polimento de grafite foi realizado por meio de duas lixas d'água, 400 e 1200 (3M®) e feltro embebido de suspensão de alumina 0,3 μm (Micropolish A, Buehler) (Figura 11B). Posteriormente, os eletrodos foram submersos em água deionizada e sonicados por 10 minutos, com o objetivo de remoção da alumina aderida à superfície do grafite. A secagem dos eletrodos foi realizada com nitrogênio ultra-puro e, para as análises eletroquímicas, os mesmos foram conectados à uma base metálica revestida com teflon para contato elétrico. A Figura 12 ilustra imagens dos elementos do eletrodo de grafite artesanal confeccionado.



Figura 12 . Preparo dos eletrodos de grafite. Fotografia da vista lateral (A) e superior (B) dos elementos do eletrodo. Da esquerda para direita: base de Teflon®, cilindro metálico, disco de grafite e eletrodo após colagem e polimento. Autoria própria.

3.3.2 Pré-condicionamento dos eletrodos de grafite

Para garantir a reprodutibilidade e padronização da área superficial dos eletrodos para procedimentos posteriores, os mesmos foram caracterizados eletroquimicamente por voltametria cíclica em solução de ácido perclórico (HClO_4) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte, na velocidade de 50 mV.s^{-1} , na janela de potencial entre $0,00 \text{ V}$ a $+ 1,20 \text{ V}$ com 4 ciclos de varredura.

Todas as medidas eletroquímicas deste trabalho foram realizadas em célula de 3 compartimentos (Figura 13), com capacidade para 25 mL de solução, acopladas a um potenciostato (CH Instruments). Os eletrodos utilizados foram: eletrodo auxiliar de platina (área geométrica de 2 cm^2) (Figura 13A), eletrodo de trabalho de grafite (Figura 13B) e eletrodo de referência de Ag/AgCl e KCl (3 mol L^{-1}) (Figura 13C).

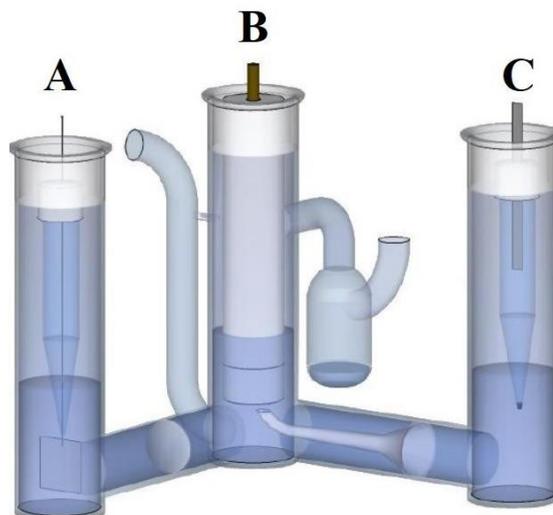


Figura 13. Ilustração esquemática da célula de três compartimentos com (A) eletrodo auxiliar de platina, (B) eletrodo de trabalho de grafite e (C) eletrodo de referência de Ag/AgCl (RODOVALHO, 2014).

3.3.3 Redução eletroquímica de OG sobre eletrodo de grafite

A dispersão do óxido de grafeno (OG) foi preparada com 1,0 mL de água deionizada e 1,0 mg de OG. A mesma foi deixada em banho ultrassônico por 20 min e vortexados por 1 min. Em seguida, a dispersão foi submetida a centrifugação a 3500 rpm por 5 minutos. Nos eletrodos de grafite selecionados pela etapa anterior, foram gotejados 15 μL do sobrenadante na superfície e mantidos a 55°C por 20 minutos para completa secagem do material.

A redução eletroquímica do OG (Figura 14) foi executada por voltametria cíclica em tampão fosfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) como eletrólito suporte, na faixa de 0,00 V a - 1,50 V, com velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} , sob 10 ciclos de varredura, onde ocorre a estabilização da corrente.

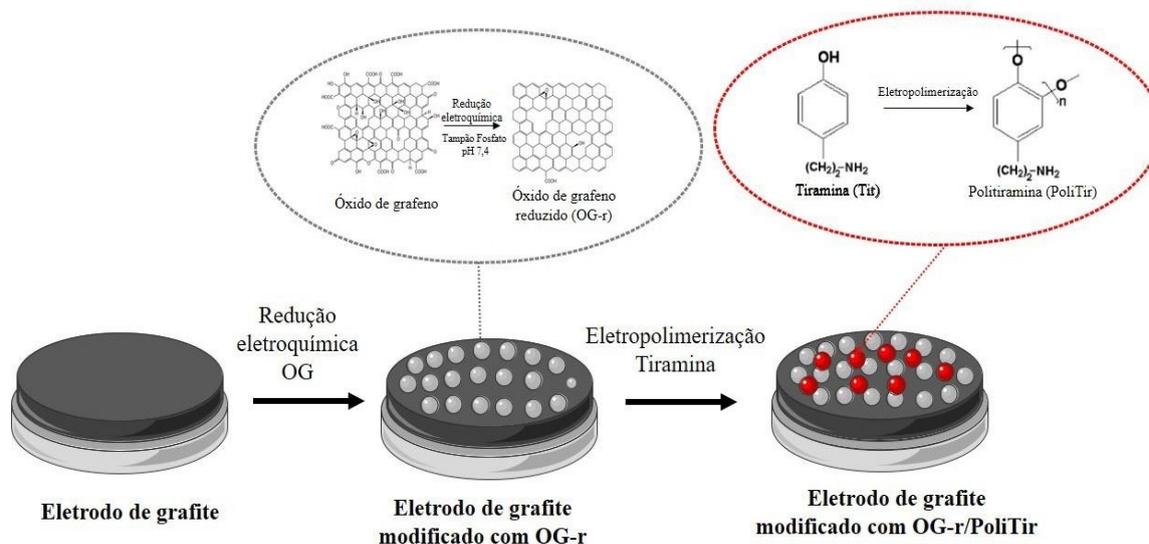


Figura 14. Ilustração esquemática da redução eletroquímica de OG e eletropolimerização de tiramina sobre eletrodo de grafite. Autoria própria.

3.3.4 Eletropolimerização de tiramina sobre EG/OGr

Após redução eletroquímica de OG sob eletrodo de grafite (EG/OGr), os eletrodos foram submetidos a voltametria cíclica para eletropolimerização de tiramina, a fim de formar a plataforma EG/OGr/PoliTir. A solução monomérica de tiramina a $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ foi deaerada por 50 minutos (1 min/1 ml) e submetida a voltametria cíclica na janela de potencial de 0,00 V a + 1,10 V, na velocidade de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ com 20 ciclos de varredura.

Ao fim da eletropolimerização, os eletrodos de EG/OGr/PoliTir foram submetidos a voltametria cíclica à fim de remoção do monômero residual em solução de ácido perclórico (HClO_4) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte, na velocidade de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, janela de potencial entre 0,00 V a + 1,20 V com 4 ciclos de varredura.

3.3.5 Construção do bioeletrodo e detecção eletroquímica do alvo complementar

Na construção do bioeletrodo foi utilizada sonda específica de oligonucleotídeos para o vírus Zika (ZIK1V) na concentração de 1 µg/mL em tampão citrato de sódio (0,03 mol L⁻¹, NaCl 0,3 mol L⁻¹). Foram gotejados 15 µL dessa solução nos eletrodos e mantidos hermeticamente fechados em temperatura ambiente por 30 minutos, tempo esse para que ocorra adsorção física da sonda à plataforma de EG/OGr/PoliTir. Seguidamente, os eletrodos EG/OGr/PoliTir/ZIK1V foram lavados por 6 segundos emergidos em tampão fosfato de sódio (0,1 mol L⁻¹, pH 7,4), de modo que haja remoção de sondas que não se adsorveram na plataforma.

A sequência de oligonucleotídeo complementar (ZIKV2) foi utilizada para avaliação da especificidade da sonda imobilizada. Assim, após a lavagem, os eletrodos foram secados com N₂ ultra-puro e foram gotejados 15 µL de ZIKV2 na concentração de 1 µg/mL. Os eletrodos EG/OGr/PoliTir/ZIK1V:ZIKV2 foram submetidos a 55°C por 20 minutos, permitindo que o sistema esteja em temperatura ótima de anelamento entre sonda e alvo. Após esse período, os eletrodos foram lavados por 6 segundos emergidos em tampão fosfato de sódio (0,1 mol L⁻¹, pH 7,4), para remoção de biomoléculas que não se anelaram à sonda. Para detecção eletroquímica de alvo complementar foi monitorado o pico de corrente da sonda aniônica de ferro/ferricianeto de potássio (K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆].3H₂O, 5 mmol L⁻¹, contendo 0,1 mol L⁻¹ de KCl) por voltametria de pulso diferencial (VDP) antes e após hibridização com modulação de amplitude de 25 mV, intervalo de pulso 0,2 s e velocidade de 30 mV.s⁻¹.

3.3.6 Detecção eletroquímica do RNA genômico (RNAg)

As amostras de RNAg extraídos de soro de pacientes infectados por vírus Zika foram obtidas pelo Instituto Adolfo Lutz (SP), laboratório de análises, credenciado como Laboratório Nacional em Saúde Pública e Laboratório de Referência Macroregional pelo Ministério da Saúde Brasileiro (<http://www.ial.sp.gov.br/>).

Nos eletrodos EG/OGr/PoliTir/ZIK1V sensibilizados com sonda, conforme item anterior, foram gotejados 15 µL de RNAg em tampão fosfato (1 µg/mL) previamente quantificados em espectrofotômetro (BioDrop®). Os eletrodos

EG/OGr/PoliTir/ZIK1V:RNAg foram submetidos a 55°C por 20 minutos (Figura 15). Após esse período, os eletrodos foram lavados por 6 segundos emergidos em tampão fosfato de sódio (0,1 mol L⁻¹, pH 7,4), para remoção de biomoléculas que não se anelaram à sonda. Para detecção eletroquímica de alvo complementar foi monitorado o pico de corrente da sonda aniônica (K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆].3H₂O, 5 mmol L⁻¹, contendo 0,1 mol L⁻¹ de KCl) por VDP antes e após hibridização com modulação de amplitude de 25 mV, intervalo de pulso 0,2 s e velocidade de 30 mV.s⁻¹.

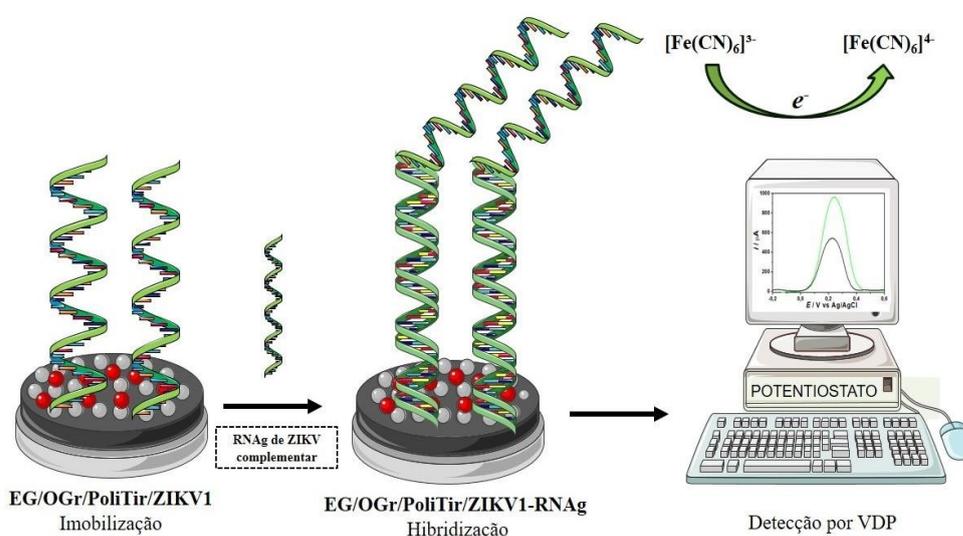


Figura 15. Ilustração esquemática da imobilização e detecção de RNAg em eletrodo EG/OGr/PoliTir/ZIK1V. Autoria própria.

3.3.7 Estudo de seletividade

Na avaliação sobre a seletividade do sistema foi utilizado material de RNAg viral de Hepatite C como controle negativo. Nos eletrodos EG/OGr/PoliTir/ZIK1V sensibilizados com sonda, conforme item 3.3.6, foram gotejados 15 µL de RNAg em tampão fosfato (1 µg/mL) previamente quantificados em espectrofotômetro (BioDrop®). Os eletrodos EG/OGr/PoliTir/ZIK1V:RNAg foram submetidos a 55°C por 20 minutos. Após esse período, os eletrodos foram lavados por 6 segundos emergidos em tampão fosfato de sódio (0,1 mol L⁻¹, pH 7,4), para remoção de

biomoléculas que não se anelaram à sonda. Para detecção eletroquímica de alvo complementar foi monitorado o pico de corrente da sonda aniônica de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6].3H_2O$, 5 mmol L⁻¹, contendo 0,1 mol L⁻¹ de KCl por VDP antes e após a hibridização com modulação de amplitude de 25 mV, intervalo de pulso 0,2 s e velocidade de 30 mV.s⁻¹.

3.3.8 Curva de calibração

Na construção da curva de calibração do biossensor, o RNAg de pacientes infectados com ZIKV foram utilizados nas concentrações de 10⁻⁶ g/mL, 10⁻⁸ g/mL, 10⁻⁹ g/mL, 10⁻¹² g/mL e 10⁻¹⁴ g/mL. A construção do bioeletrodo e detecção eletroquímica das diferentes concentrações foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 3.3.5 e 3.3.6, respectivamente. O software Origin® 7 foi utilizado para construção da curva de calibração relacionando a corrente de pico com o logaritmo negativo da concentração do RNAg do ZIKV.

No cálculo da sensibilidade considerou-se o coeficiente angular da reta (S). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados segundo as equações 3 e 4:

$$LD = \frac{3\delta}{S} \quad (3)$$

$$LQ = \frac{10\delta}{S} \quad (4)$$

onde δ é o desvio padrão do branco e S o coeficiente angular da reta da curva de calibração (SHRIVASTAVA; GUPTA, 2011).

3.3.9 Estabilidade do bioeletrodo

As análises da estabilidade do bioeletrodo frente ao tempo foram conduzidas por 60 dias. Os eletrodos modificados com a sonda (EG/OGr/PoliTir/ZIK1V), conforme item 3.3.6, foram estocados em câmaras úmidas hermeticamente fechadas e protegidas da luz a 8°C. Em intervalos de 10 dias os eletrodos foram avaliados conforme item 3.3.6 da metodologia de detecção eletroquímica de RNAg.

3.3.10 Análises morfológicas

As análises morfológicas do genossensor foram realizadas por Microscopia de Força Atômica (AFM) das etapas de imobilização e detecção com RNAg de vírus Zika e alvo não complementar de RNAg do vírus da Hepatite C. A análises topográficas foram realizadas no AFM da marca Hitachi modelo AFM5100N no modo de microscopia de força dinâmica com cantiléver de silício de constante molar 1.0 N/m com frequência de 0,38 Hz.

3.4 Plataformas colorimétricas e ópticas baseadas em nanopartículas metálicas de ouro e prata

3.4.1 Síntese de nanopartículas de ouro (AuNps)

O método de síntese de AuNps foi baseado na metodologia de Turkevich-Frens (TURKEVICH, 1995) (FRENS, 1973) com modificações. Antes de realizar o experimento foi necessário siliconizar todas as vidrarias e barra magnética utilizada com silicone da marca SigmaCote® e, após 24 horas, as mesmas foram lavadas várias vezes com água deionizada.

As soluções utilizadas de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) 1% (p/v), agente precursor, e citrato tri-sódio 1% (p/v), agente redutor, foram preparadas em água deionizada (Figura 16 A). Todas as soluções foram filtradas por membranas de acetato de celulose (Coring®) Acoplados à uma seringa de porosidade de 0,20 μm .

A sequência da metodologia de síntese de AuNps está ilustrada na Figura 16 B. Primeiramente, em um erlenmeyer de 500 mL, foram adicionados 200 mL de água deionizada sob agitação magnética e aquecimento até a fervura. A água foi mantida nessas condições por 5 minutos. Em seguida, 232,5 mL de água deionizada e filtrada foi adicionada e, novamente, aquecendo até o ponto de fervura. Foram adicionado 15 mL de citrato de sódio 1% (p/v) sob agitação por 5 minutos.

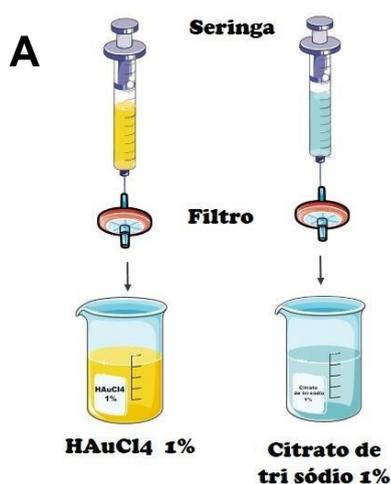
Após a adição do agente redutor e passados 5 minutos, a agitação foi aumentada e a temperatura mantida em, aproximadamente, 150°C. Rapidamente

foram adicionados 2,5 mL de ácido tetracloroáurico 1% (p/v) e mantidos nessas condições por 25 min ou quando a coloração da solução tornar-se avermelhada. As soluções coloidais de AuNps foram armazenadas à temperatura de 8°C.

3.4.2 Funcionalização das AuNps com oligonucleotídeo específico

De modo a facilitar a interação entre as nanopartículas metálicas de ouro e prata e o oligonucleotídeo específico, as mesmas foram sintetizadas com enxofre na terminação 5' (ZIKV1S). Em microtubos foram adicionados 200 µL de AuNps e 2 µL de ZIKV1S (0,1 mg/µL) e deixados em temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, foram adicionados 10 µL de solução de NaCl saturada aos microtubos para observação da ocorrência ou não ocorrência de agregação das AuNps.

O espectro de absorção foi analisado em espectrofotômetro UV-VIS (SHIMADZU®) em cubetas de quartzo (caminho óptico de 1 cm). Foi realizada diluição 1:1 das AuNps com água deionizada e executada a varredura de 300 a 700 nm. Os resultados observados foram comparados com solução de AuNPs conjugada com ZIKV1S antes e após adição de NaCl.



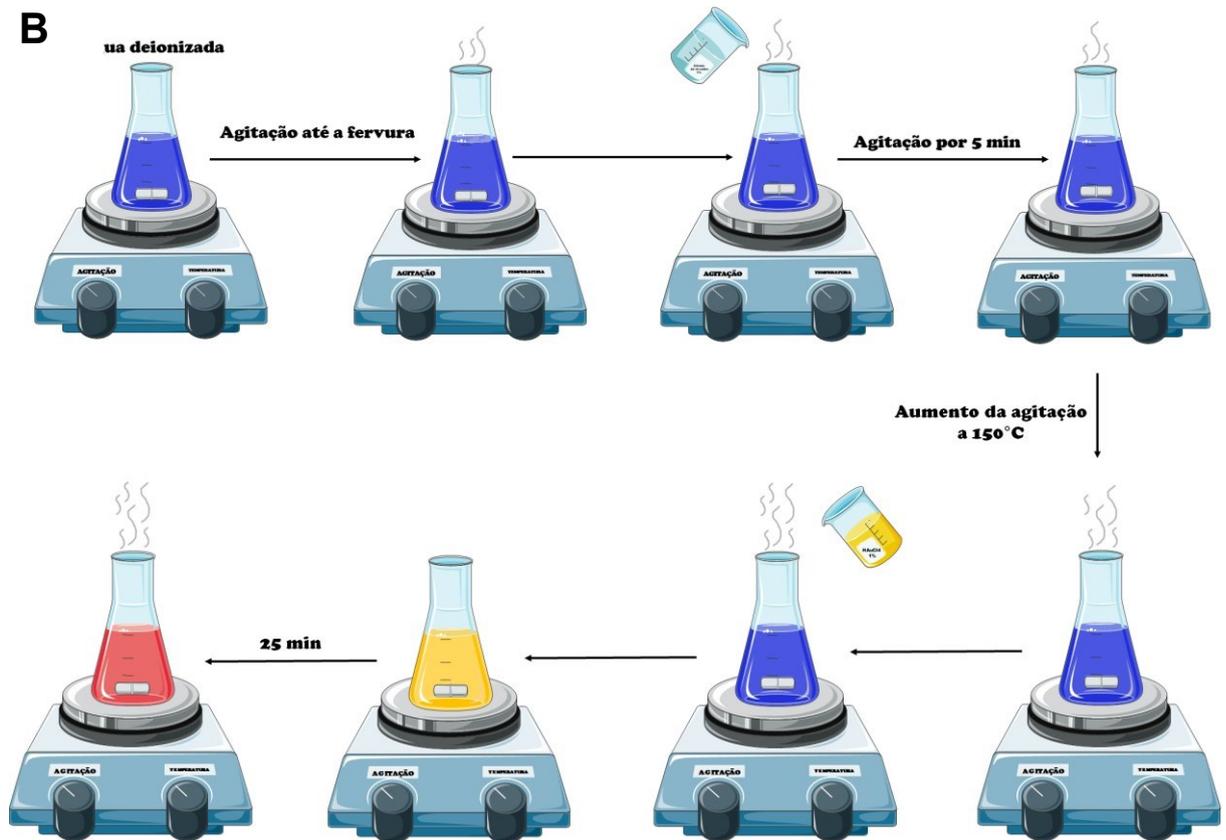


Figura 16. Ilustração esquemática da metodologia de síntese de AuNps. (A) Soluções utilizadas e sistema de filtração: H₂AuCl 1%; citrato de tri-sódio 1%; filtro de membrana 0,22 µm. (B) Sequência da síntese de AuNps. Autoria própria.

3.4.3 Detecção óptica e colorimétrica do alvo complementar

Com o objetivo de avaliar a especificidade da sonda, oligonucleotídeos não complementares de *Neisseria meningitidis* (NM1) foram mantidos nas mesmas condições do alvo complementar (ZIKV2) e os espectros analisados após adição de sal saturado.

Primeiramente, as AuNps foram funcionalizadas com ZIKV1S (Figura 17), conforme descrito no item 3.4.2 e, posteriormente, foram adicionados 2 µL de alvo complementar ao Zika (ZIKV2) (0,1 mg/µL) e alvo não complementar de *N. meningitidis* (NM1) (0,1 mg/µL) e mantidos a 55°C por 20 minutos.

Após o período de interação entre AuNps conjugado com ZIKV1S (AuNps-ZIKV1S) e alvo complementar e não complementar, 10 µL de solução saturada de

NaCl foram adicionados e o monitoramento da cor e espectro de absorção foi realizado em espectrofotômetro UV-VIS, como descrito no item 3.4.2.

3.4.4 Detecção óptica e colorimétrica de RNAg

A detecção óptica e colorimétrica foi realizada com RNAg extraído do soro de 10 pacientes infectados pelo vírus Zika. Na solução de AuNps funcionalizadas com ZIKV1S, conforme item 3.4.2, foram adicionados 2 μ L da amostra-alvo de RNAg e incubados a 55°C por 20 minutos. Nessas condições o RNAg hibridiza com o oligonucleotídeo específico do ZIKV1S formando o complexo AuNps-ZIKV1S-RNAg. A adição de grupamento tiol à extremidade 5' caracteriza-se como passo crucial para a orientação da ligação dos oligonucleotídeos às AuNps, devido ao fato de o enxofre possuir forte interação com ouro.

Posterior à etapa de hibridização, 10 μ L de solução de NaCl saturada foram adicionados aos microtubos para observação da formação de agregação e decorrente mudança de coloração. Os espectros foram monitorados por espectrofotômetro UV-VIS, conforme descrito no item 3.4.2.

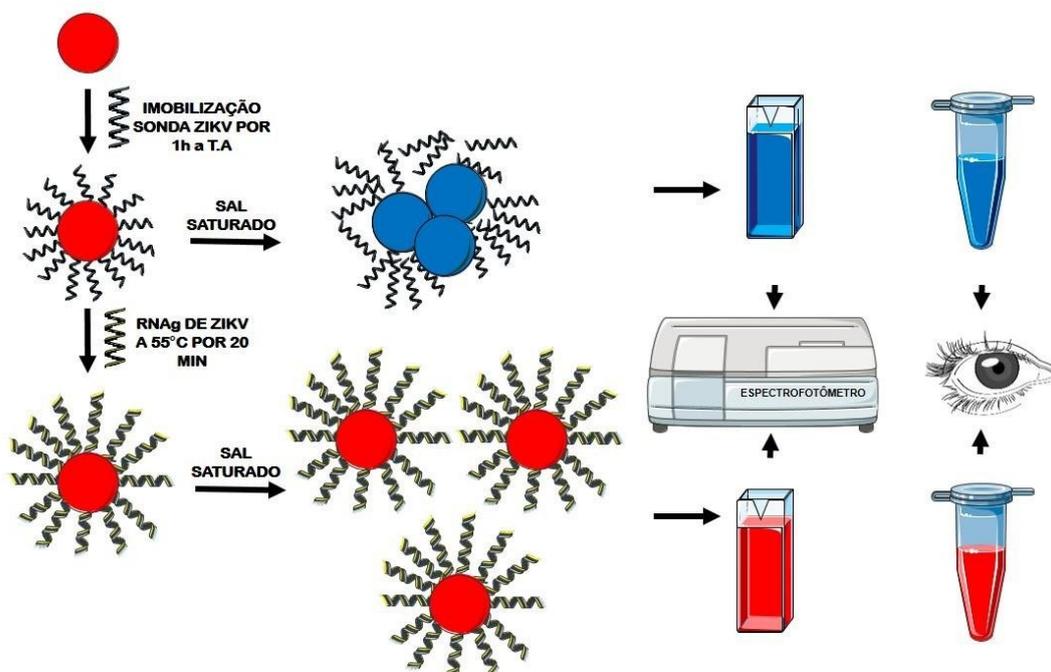


Figura 17. Representação ilustrativa da funcionalização de AuNps com oligonucleotídeo específico ZIKV1S e detecção colorimétrica e óptica de RNAg do vírus. Autoria própria.

3.4.5 Estabilidade das AuNps-ZIKV1S

O sistema AuNps-ZIKV1S foi analisado quanto à estabilidade frente ao tempo por 90 dias. Após etapa de funcionalização das AuNps com o ZIKV1S (item 3.4.2), os microtubos foram estocados na temperatura de 8°C por 90 dias. Em intervalos de 10 dias as nanopartículas foram submetidas à metodologia de acordo com o item 3.4.3 e analisados em espectrofotômetro, conforme item 3.4.2.

3.4.6 Síntese de nanopartículas de prata (AgNps)

Antes do processo de síntese das AgNps todas as vidrarias foram mantidas por 24 h em ácido nítrico concentrado, objetivando a limpeza das mesmas e impedindo formações de impurezas e de sítos de nucleação ao decorrer da síntese. Após 24 h, o ácido nítrico foi descartado e as vidrarias lavadas com água deionizada.

Na síntese das AgNps (Figura 18) todas as condições reacionais devem ser criteriosamente controladas, como temperatura e concentração de reagentes. É importante destacar que o boroidreto de sódio é um agente redutor forte na presença de íons prata e, dessa maneira, é necessária a realização da síntese em banho de gelo de modo que se elimine a energia de ativação, pela diminuição da temperatura do sistema, permitindo o controle cinético do tamanho das nanopartículas (BANNE et al., 2017).

A metodologia descrita foi baseada e modificada de Doty e colaboradores (2005). Todo o procedimento de síntese das AgNps (Figura 18) foi conduzido em banho gelado no agitador magnético. Para tal fim, utilizou-se cubos de gelo em recipiente com água deionizada onde é colocado o erlenmeyer com a solução de AgNO_3 . Para o preparo dessa solução, em um erlenmeyer com 25 mL de água deionizada, adicionou-se 258 μL de solução de AgNO_3 0,01 mol.L⁻¹ com auxílio de pipeta automática. A barra de agitação apropriada foi colocada no erlenmeyer e o conjunto levado ao agitador magnético em banho de gelo. A solução foi agitada vigorosamente e com auxílio da pipeta *pasteur* gotejou-se 258 μL de NaBH_4 0,005 mol.L⁻¹ e 1000 μL citrato de sódio a 0,03 mol.L⁻¹ até solução tornar-se amarelo brilhante em, aproximadamente, 15 minutos.

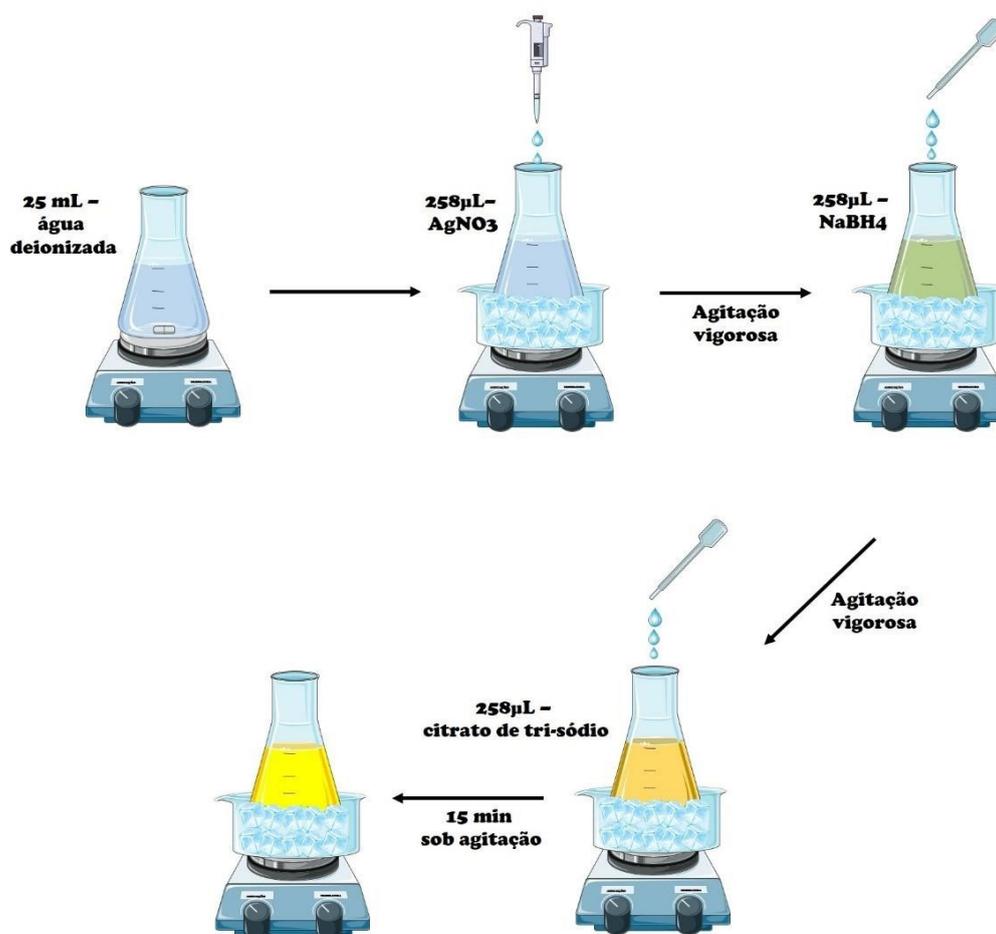


Figura 18. Ilustração esquemática sequencial da metodologia de síntese de AgNps. Autoria própria.

3.4.7 Funcionalização das AgNps com oligonucleotídeo específico

Em microtubos foram adicionados 50 µL de AgNps e 2 µL de ZIKV1S (0,1 mg/µL) e deixados em temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, foram adicionados 10 µL de solução de NaCl saturada aos microtubos para observação da ocorrência ou não ocorrência de agregação das AgNps.

O espectro de absorção foi analisado em espectrofotômetro UV-VIS (SHIMADZU®) em cubetas de quartzo (caminho óptico de 1 cm). Foi realizada diluição da solução em 1:1 das AgNps com água deionizada e executada a varredura de 300 a 700 nm. Os resultados observados foram comparados com solução de AgNps conjugada com ZIKV1S antes e após adição de NaCl.

3.4.8 Detecção óptica e colorimétrica do alvo complementar

A avaliação da especificidade do dispositivo colorimétrico e óptico foi conduzido com alvo não complementar de oligonucleotídeos proveniente de outro micro-organismo: *N. meningitidis*.

As AgNps são funcionalizadas com ZIKV1S (Figura 19), conforme descrito no item 3.4.7 e, posteriormente, são adicionados 2 µL de alvo complementar ao Zika (ZIKV2) (0,1 mg/µL) e alvo não complementar de *N. meningitidis* (NM1) (0,1 mg/µL) e mantidos a 55°C por 20 minutos.

Após o período de interação entre AgNps conjugado com ZIKV1S (AgNps-ZIKV1S) e alvo complementar e não complementar, 10 µL de solução saturada de NaCl foram adicionados e o monitoramento da cor e espectro de absorção foi realizado em espectrofotômetro UV-VIS, como descrito no item 3.4.7. Os resultados observados foram comparados com solução de AgNps conjugadas com ZIKV1S e após adição de NaCl.

3.4.9 Detecção óptica e colorimétrica de RNAg

Com o objetivo de promover a acessibilidade do RNA genômico (RNAg) ao ZIKV1S funcionalizado nas AgNps, a amostra-alvo de RNAg foi submetida ao tratamento térmico em 98°C durante 5 minutos, removendo assim as estruturas secundárias e terciárias do RNAg. Na solução de AgNps funcionalizadas com ZIKV1S, conforme item 3.4.7, são adicionados 2 µL da amostra-alvo de RNAg (4 pacientes infectados) e incubados a 55°C por 20 minutos. Nessas condições o RNAg hibridiza com o oligonucleotídeo específico do ZIKV1S formando o complexo AgNps-ZIKV1S-RNAg.

Posterior à etapa de hibridização, 10 µL de solução de NaCl saturada são adicionados aos microtubos para observação da formação de agregação e decorrente mudança de coloração. Os espectros foram monitorados por espectrofotômetro UV-VIS, conforme descrito no item 3.4.7.

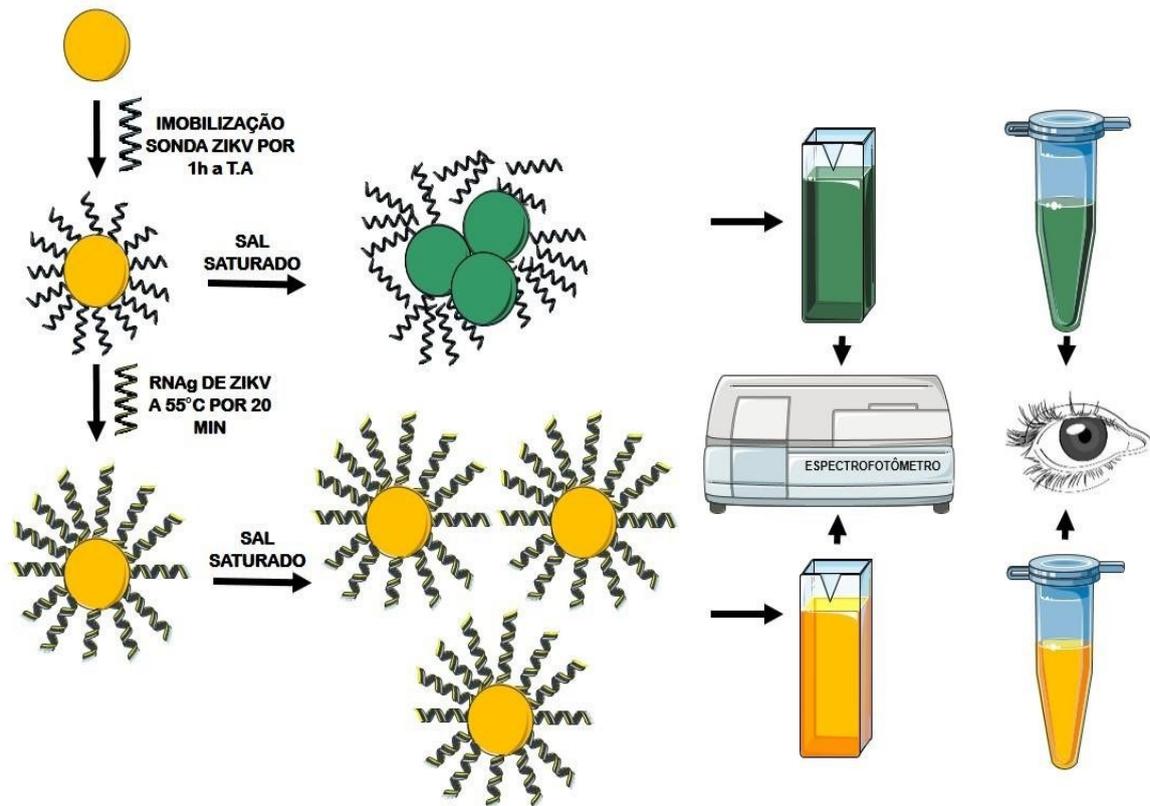


Figura 19. Representação ilustrativa da funcionalização de AgNps com oligonucleotídeo específico ZIKV1S e detecção colorimétrica e óptica de RNAg do vírus. Autoria própria.

3.4.10 Estabilidade das AgNps-ZIKV1S

A fim de monitorar a estabilidade do dispositivo colorimétrico e óptico para diagnóstico de vírus Zika, as AgNPs modificadas com ZIKV1S foram mantidas a 8°C durante 90 dias. Testes foram executados a cada mês por quatro meses, mais especificamente nos dias: 0, 30, 60 e 90. Após cada teste foram realizadas leituras no espectrofotômetro UV-VIS com o objetivo de monitorar alterações no espectro de absorção frente ao tempo.

3.5 Estatística e tratamento de dados

Os voltamogramas, histogramas e espectros de absorção apresentados neste trabalho foram elaborados no *software* Origin® 7. Os experimentos eletroquímicos foram condizidos em triplicata em sua totalidade e, quando não

mencionados no texto, a média aritmética e desvio padrão estarão apresentados em histogramas. Os resultados que apresentaram desvios-padrão inferiores a 10% da média foram estabelecidos como aceitáveis. Os voltamogramas apresentados foram subtraídos de suas respectivas linhas de base, alinhados verticalmente e a área e altura dos mesmos foram obtidos pela ferramenta de integração do *software* Origin® 7. Além disso, os valores de correntes de pico I_P e cálculo de carga (Q) foram calculadas integrando toda a área dos voltamogramas de corrente por tempo. Os espectros de absorbância foram subtraídos de suas respectivas linhas de base e os picos de absorção calculados também pela ferramenta de integração do *software* Origin® 7.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos eletroquímicos

4.1.1 Seleção dos eletrodos de grafite

Após o polimento dos eletrodos de grafite os mesmos foram submetidos à medidas de voltametria cíclica realizadas no eletrólito suporte HClO_4 $0,5 \text{ mol/L}^{-1}$, de modo que os eletrodos escolhidos para os subseqüentes experimentos possuem o perfil eletroquímico como na Figura 20, com corrente máxima entre 35 a 40 μA . Além de padronizar os perfis eletroquímicos dos eletrodos de grafite, a voltametria cíclica em eletrólito suporte tem a finalidade de remoção de possíveis interferentes contaminantes adsorvidos na superfície que sejam eletroativos. Portanto, os EG que não exibiram comportamento semelhante à Figura 20 foram descartados.

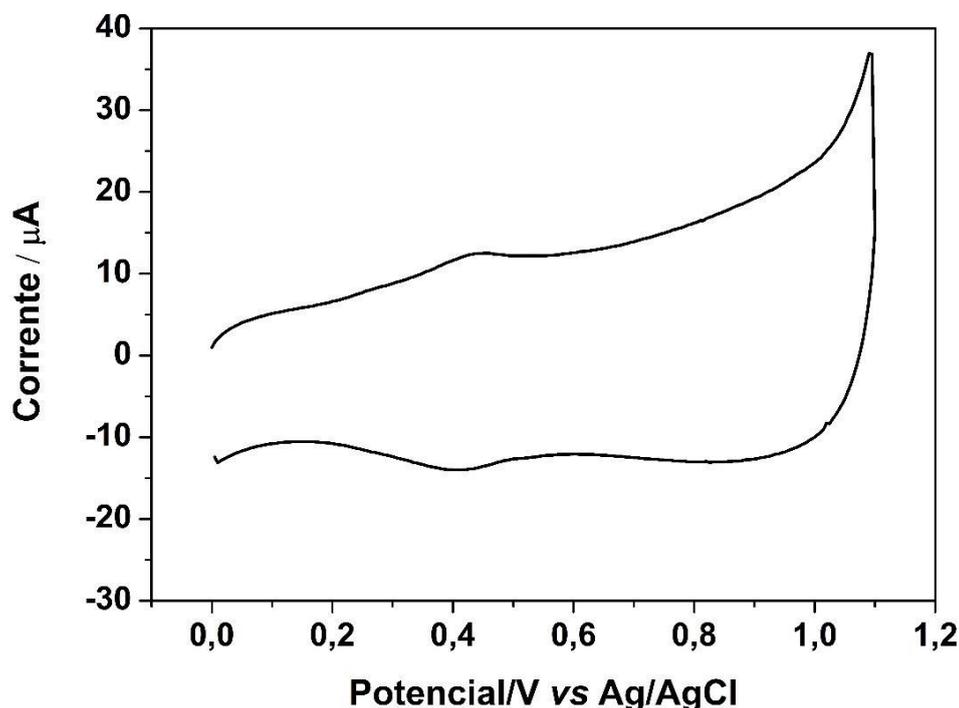


Figura 20. Voltamograma cíclico do EG em eletrólito suporte HClO_4 $0,5 \text{ mol/L}^{-1}$ com velocidade de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

4.1.2 Óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente

A aplicação de OG é extensamente explorada em várias áreas como eletroanálise e eletrocatalise. A limitação da utilização desse material reside no fato de ser isolante, o que restringe as aplicações em eletroquímica. A remoção ou redução de grupos específicos oxigenados da estrutura de OG permite o ajuste da fração sp^2 , transformando a forma isolante em semicondutora. Além disso, via redução química, a estrutura adquire a qualidade semelhante à semi-metal, ou do inglês *graphene like-semi metal* (LOH et al., 2010).

A voltametria cíclica permite a visualização dos picos de redução de OG e reversibilidade do processo, variando o potencial ciclicamente em faixa determinada. O presente estudo utiliza a faixa de potencial entre 0 e - 1,5 V à fim de remoção/diminuição dos grupos oxigenados. A análise de Gao e colaboradores (2016), sobre o comportamento eletroquímico da redução de OG, mostrou que a desordem do OGr diminui e a condutividade aumenta significativamente no primeiro

ciclo de redução. Além disso, os grupamentos O=C-OH foram completamente reduzidos em C=O em potenciais entre - 1,0 V e - 1,4 V. Ainda, o grupo discute que os grupamentos O=C-OH são estáveis durante os potenciais iniciais e a quantidade de C=O resultante é completamente reduzido em potenciais mais negativos (maiores que -1,4V) (GAO et al., 2016).

A Figura 21 apresenta o voltamograma cíclico de redução de OG 1 mg/mL em água deionizada após secagem sobre o eletrodo de grafite. O eletrólito suporte empregado foi tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4, realizado com 10 ciclos de varredura de potencial na velocidade de 50 mV.s⁻¹. Anterior ao experimento as soluções foram desoxigenadas por 25 minutos em N₂ para impedir possíveis reações de competição entre a redução dos grupos funcionais oxigenados do OG e do O₂ solubilizados no eletrólito suporte. À medida que o OG é consumido, a corrente diminui até a aproximação de zero, quando ocorre a conversão parcial em OGr no eletrodo de trabalho.

Como ilustrado na Figura 21, no primeiro ciclo da redução podem ser observados três picos em - 0,47 V, - 1,05 V e - 1,3 V que desaparecem no segundo ciclo. Estes resultados estão de acordo com a literatura, como, por exemplo, Dogan e colaboradores (2013), utilizando como eletrodo de referência o Ag/AgCl KCl 3 mol L⁻¹, observaram picos catódicos entre - 0,4 V e - 0,6 V na redução de OG que foram atribuídos à redução de grupos oxigenados do OG (DOĞAN; EKINCI; DEMIR, 2013). Além disso, picos entre - 0,6 V e - 1,0 V são atribuídos aos processos eletroquímicos irreversíveis do OG. Em potenciais mais negativos, como demonstrado por Gao e colaboradores (2009), os grupamentos O=C-OH são completamente reduzidos. Os diferentes tipos de grupos funcionais oxigenados na superfície do OG leva à diversidade da reatividade eletroquímica e ocasiona a grande faixa de potenciais de redução (GUO et al., 2009).

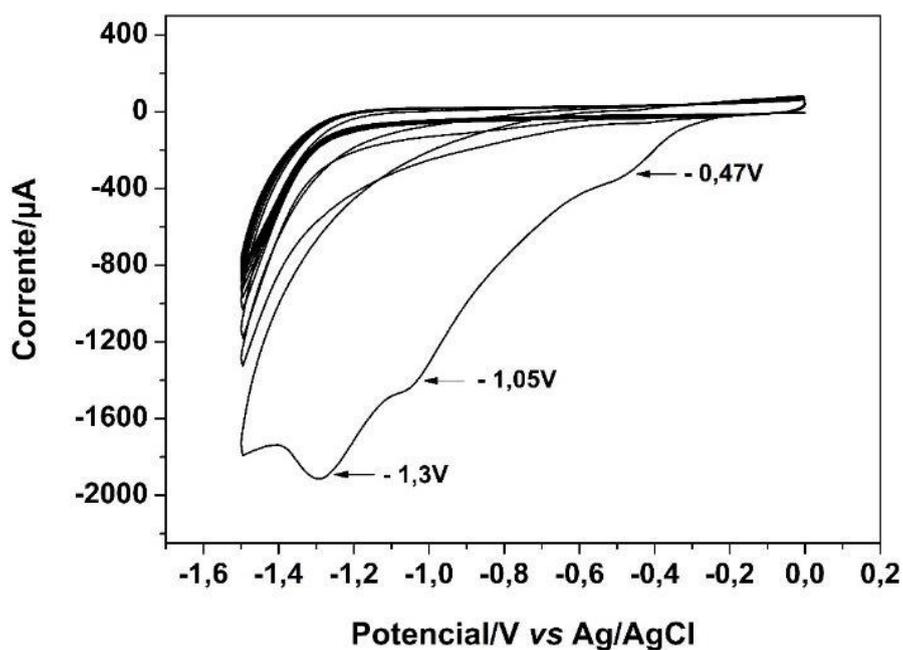


Figura 21. Redução eletroquímica por voltametria cíclica do OG na superfície do eletrodo de grafite em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4, entre 0,0 a -1,5 V, 10 ciclos e velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} .

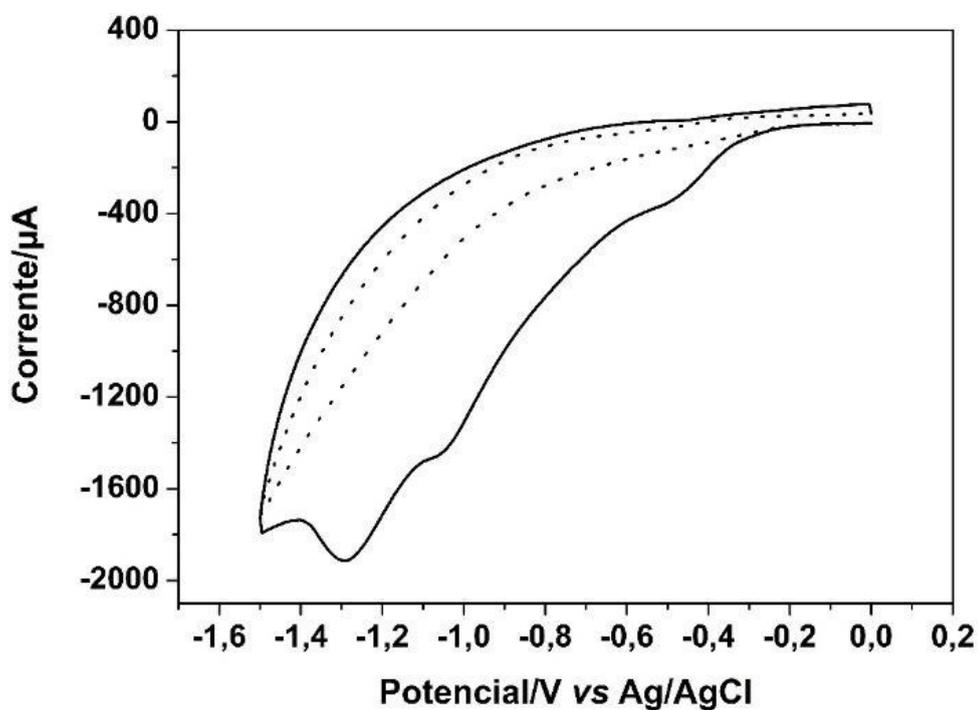


Figura 22. Voltamogramas cíclicos da primeira volta de redução do EG (linha pontilhada) e OG (linha contínua) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4, 50 mV.s^{-1} , entre 0,0 a -1,5 V.

Na Figura 22 é possível visualizar o primeiro ciclo de redução em EG e em EG/OG em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4, $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, entre $0,0 \text{ V}$ a $-1,5 \text{ V}$. Como esperado, o grafite não possui nenhum pico de redução, corroborando os dados experimentais sobre a redução dos grupos oxigenados de OG. Desse modo, a redução eletroquímica de OG foi obtida com sucesso de modo rápido e ecologicamente favorável, ou seja, sem a utilização de solventes tóxicos e contaminantes, como a hidrazina (GURUNATHAN et al., 2013). Os altos potenciais negativos foram capazes de superar as barreiras energéticas para a redução das funções oxigenadas no plano basal e nas extremidades, levando a redução eficiente do OG e aumento da condutividade.

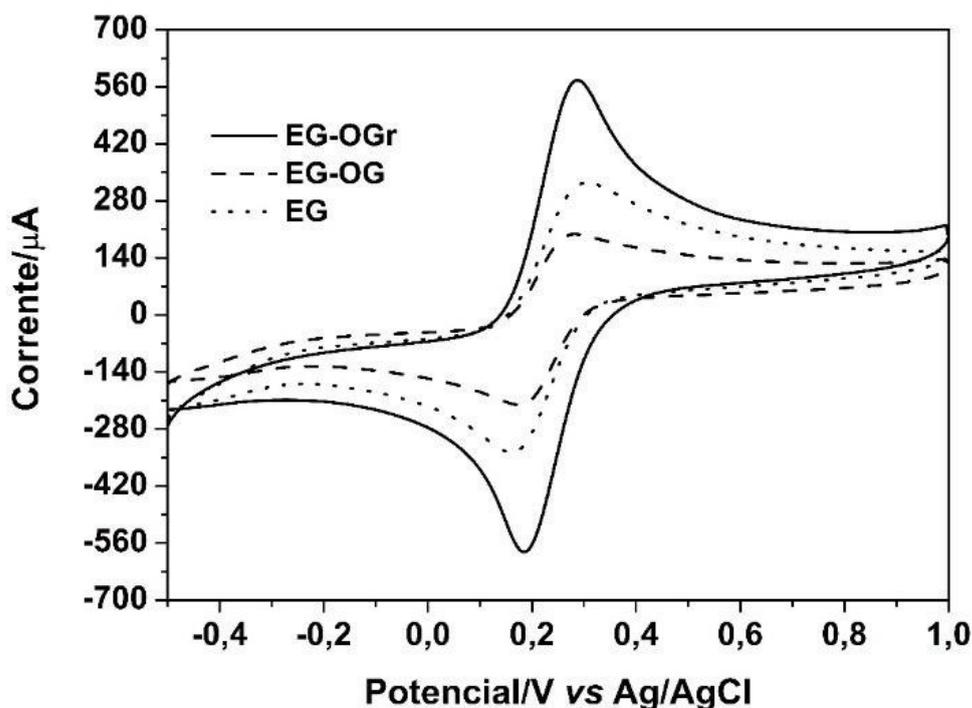


Figura 23. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução aquosa de sonda aniônica ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) 5 mmol L^{-1} e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl com 50 mV s^{-1} , entre $-0,4 \text{ V}$ e $1,0 \text{ V}$. Em (—) EG/OGGr, (-----) EG/OG e () EG/OGGr.

A Figura 23 mostra um ciclo da voltametria cíclica na presença da sonda aniônica ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) 5 mmol L^{-1} e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl com $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, entre $-0,4 \text{ V}$ e $1,0 \text{ V}$. A análise permite o conhecimento das propriedades de transferência eletrônica na interface eletrodo-solução comparando o EG, EG/OG e EG/OGGr. O voltamograma de EG/OGGr, na presença do par redox, evidencia um aumento das

correntes de pico anódico e catódico (I_{Pa} e I_{Pc} , respectivamente) de EG/OGr quando comparado à EG e EG/OG, significando que a transferência eletrônica do par redox ocorre mais facilmente.

Os perfis de EG e EG/OG apresentam alargamento nos picos de oxidação/redução e diminuição das I_P , sendo que quando o EG é modificado com OG o voltamograma exibe o maior distanciamento dos potenciais de pico ocasionados pelo aumento de resistência à transferência eletrônica. O OG em solução aquosa apresenta carga negativa devido aos grupos carboxilícos ionizados, possibilitando a repulsão eletrostática entre a sonda aniônica $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (DA SILVA; MADURRO; MADURRO, 2017). Além disso, a baixa condutividade de OG é explicada devido à quebra de aromaticidade com a inserção de grupos funcionais oxigenados (DU et al., 2012). O aumento da corrente e a melhor definição do pico do par redox no eletrodo modificado com OGr demonstra que a redução eletroquímica de OG foi eficiente e resultou no almejado aumento de condutividade da plataforma baseada em eletrodos de grafite.

4.1.3 Eletropolimerização da tiramina

Na Figura 24 é exibido o voltamograma cíclico da eletropolimerização da tiramina em eletrodos selecionados modificados com OGr. A eletropolimerização foi realizada em meio ácido à fim de garantir a eletroatividade do filme. De Castro e colaboradores (2008) mostraram que a eletropolimerização em meios alcalinos favorece a formação de camada passivante de PoliTir que, conseqüentemente, diminui a eletroatividade na matriz polimérica.

A eletropolimerização foi realizada ciclicamente entre 0 e +1,1 V e três picos podem ser identificados devido à oxidação e polimerização da tiramina através da posição *orto* do grupamento fenólico (Figura 7). A oxidação da tiramina foi observada em, aproximadamente, +0,91 V (Figura 24-3) e os outros dois picos, em correntes menores, foram observados em +0,56 V (Figura 24-1) e +0,44 V (Figura 24-3). Os dois picos observados podem ser atribuídos à oxidação da tiramina e das espécies fenólicas. Tal fenômeno é observado em outros compostos fenólicos e a oxidação dos fenóis é localizado em + 0,43 V (KURAMITZ et al., 2001).

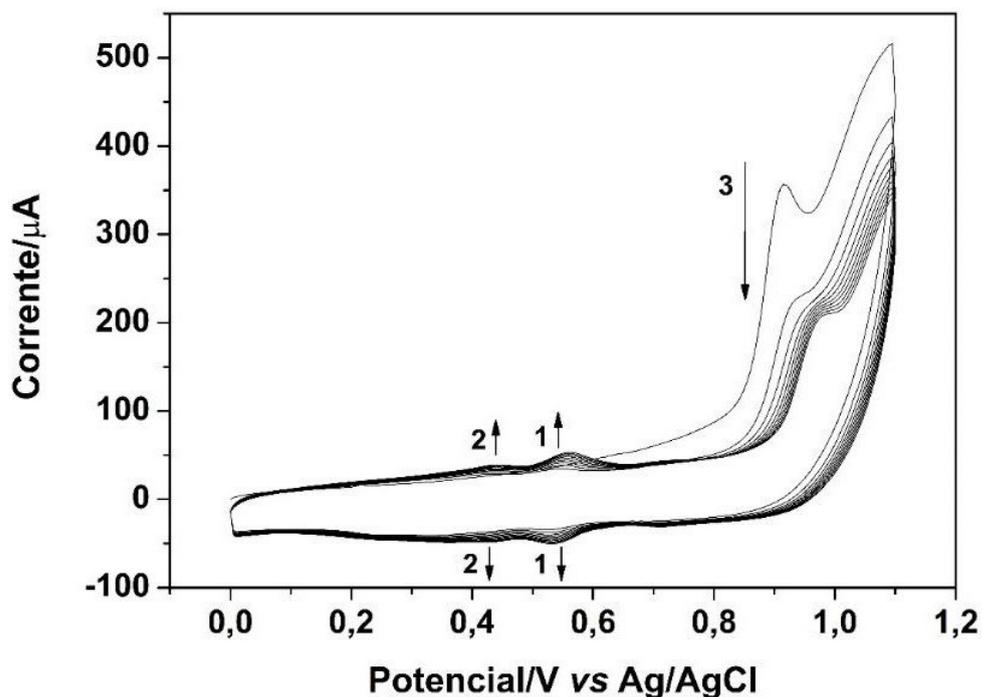


Figura 24. Polimerização eletroquímica da tiramina ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$) em HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ com varredura de 20 ciclos a $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ entre $0,0\text{V}$ a $+1,1\text{V}$.

O comportamento da corrente é notório no decorrer da eletropolimerização, havendo aumento inicial, no primeiro ciclo, diminuição e, por fim, estabilização da mesma. Pelo primeiro ciclo é possível observar que a oxidação da tiramina é irreversível e, durante os ciclos restantes, a corrente de pico diminui. Por outro lado, a corrente aumenta entre $+0,4 \text{ V}$ e $+0,6 \text{ V}$ indicando que o filme de polímero eletroativo está sendo formado e cobrindo a superfície do EG/OGr (DE CASTRO et al., 2008).

Para observar a diferença da corrente e área superficial entre EG, EG/OGr/ PoliTir e EG/PoliTir foram realizadas medidas de voltametria cíclica em eletrólito suporte HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ entre $0,0 \text{ V}$ a $+1,1 \text{ V}$ (Figura 25). Ocorre pequeno aumento de corrente quando o eletrodo de grafite é modificado apenas com o polímero de tiramina. O aumento mais significativo é conseguido quando o EG é modificado com OGr e politiramina, evidenciando o papel importante do OGr no aumento da condutividade da plataforma e aumento da área superficial do

eletrodo, possivelmente por permitir que uma maior quantidade de espécies chegue na interface eletrodo-solução.

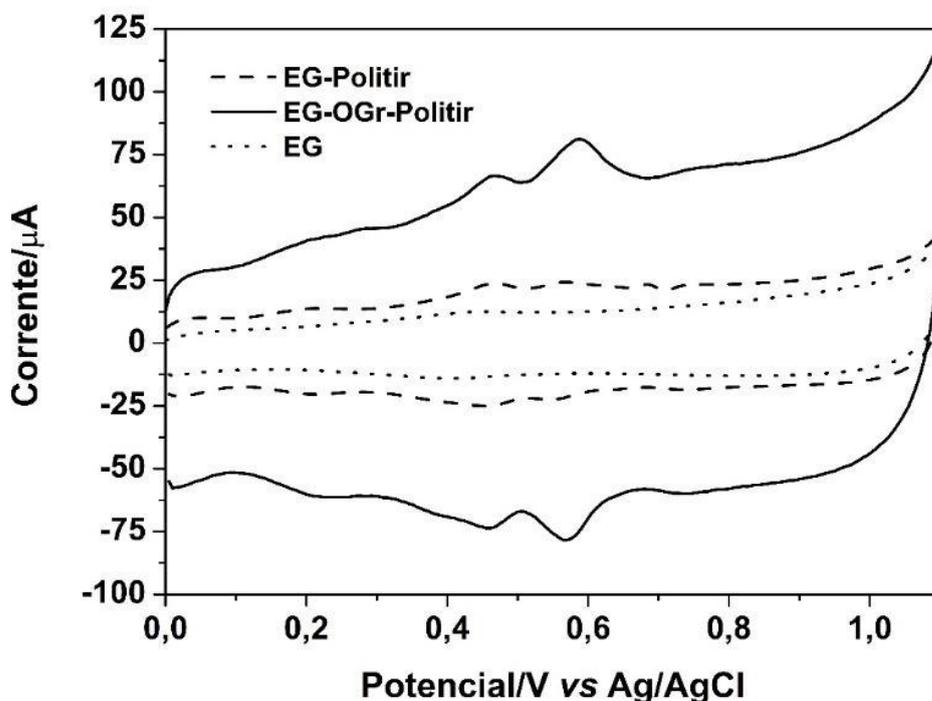


Figura 25. Voltametria cíclica em eletrólito suporte HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ 50 mV.s^{-1} entre $0,0\text{V}$ a $+1,1\text{V}$. Em (—) EG/OGGr/PoliTir, (-----) EG/PoliTir e (·····) EG.

A análise da quantidade de carga foi realizada, como mostrado na Figura 26, por meio da integração de toda a área dos voltamogramas da corrente em função do tempo, obtendo a carga total do processo de oxi-redução, com auxílio do *software Origin®* (Figura 25). Os valores de quantidade carga foram $5,46 \text{ mC}$, $8,55 \text{ mC}$ e $26,08 \text{ mC}$ para o EG, EG/PoliTir e EG/OGGr/PoliTir, respectivamente. Em relação ao eletrodo de grafite, quando o mesmo é modificado com politiramina e OGr/PoliTir, a quantidade de carga aumenta $1,6\text{x}$ e 5x , respectivamente. Já quando comparado EG/PoliTir e EG/OGGr/PoliTir ocorre um aumento de carga em 3x . O aumento gradativo de corrente de EG a OG/OGGr/PoliTir novamente confirma o papel importante do OGr na transferência eletrônica e consequente aumento de condutividade de toda a plataforma.

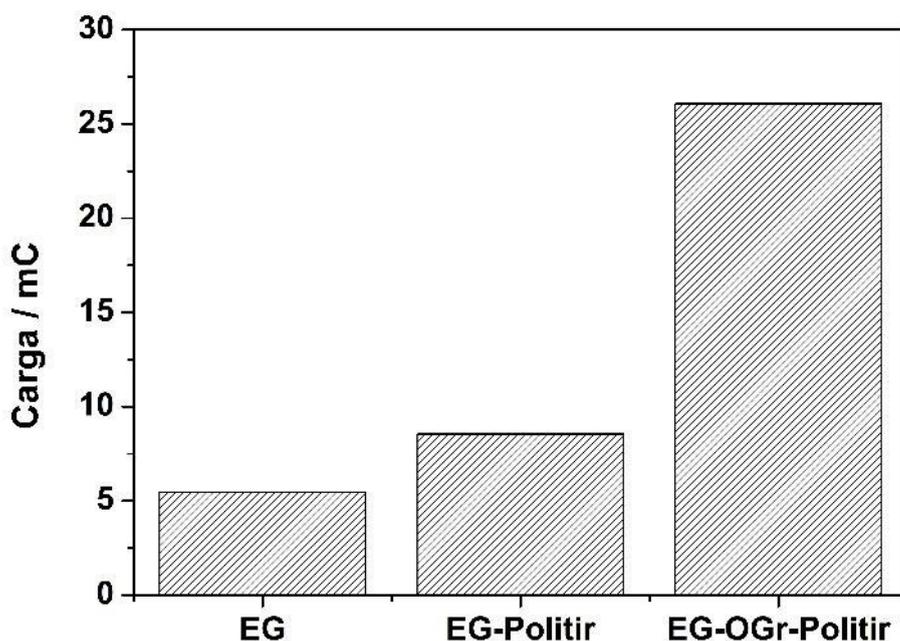


Figura 26. Histogramas referentes à quantidade de cargas envolvidas nos processos oxidativos e redutivos da plataforma EG/OGr/PoliTir em eletrólito suporte.

A investigação das propriedades eletrônicas da plataforma foi conduzida em sonda aniônica $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5 mmol L^{-1} e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl com 50 mV.s^{-1} , entre $-0,4 \text{ V}$ e $1,0 \text{ V}$, como apresentado na Figura 27. As correntes de pico anódica foram $325,2 \text{ } \mu\text{A}$, $624 \text{ } \mu\text{A}$, $801,9 \text{ } \mu\text{A}$ para EG, EG/PoliTir e EG/OGr/PoliTir, respectivamente. Portanto, entre o EG e EG-Politir houve um aumento de $1,92\text{x}$ e entre EG/PoliTir e EG/OGr/PoliTir de $1,28\text{x}$. O alargamento de I_P de EG quando comparado às outras curvas demonstra que o nanocompósito favorece a transferência eletrônica em solução.

A molécula de tiramina é caracterizada pela presença de um grupo fenólico ativo, com $pK_a = 10,52$ e um grupo para(2-etilamino) inativo, portanto a polimerização eletroquímica tende a se desenvolver pela porção fenólica (DAI et al., 2003). Assim, a oxidação da tiramina em meio ácido resulta na formação de politiramina com grupos amino expostos (KHUDAISH et al., 2014). Dessa maneira, os grupos amino do polímero de tiramina, em meio neutro da sonda aniônica, fornecem cargas positivas ao filme formado e, portanto, permite a atração

eletrostática com os íons do par redox em solução, favorecendo o maior aumento de I_p dentre as três curvas. Além disso, a presença de OGr pode aumentar a área eletroativa do eletrodo, resultando em um incremento na resposta de corrente.

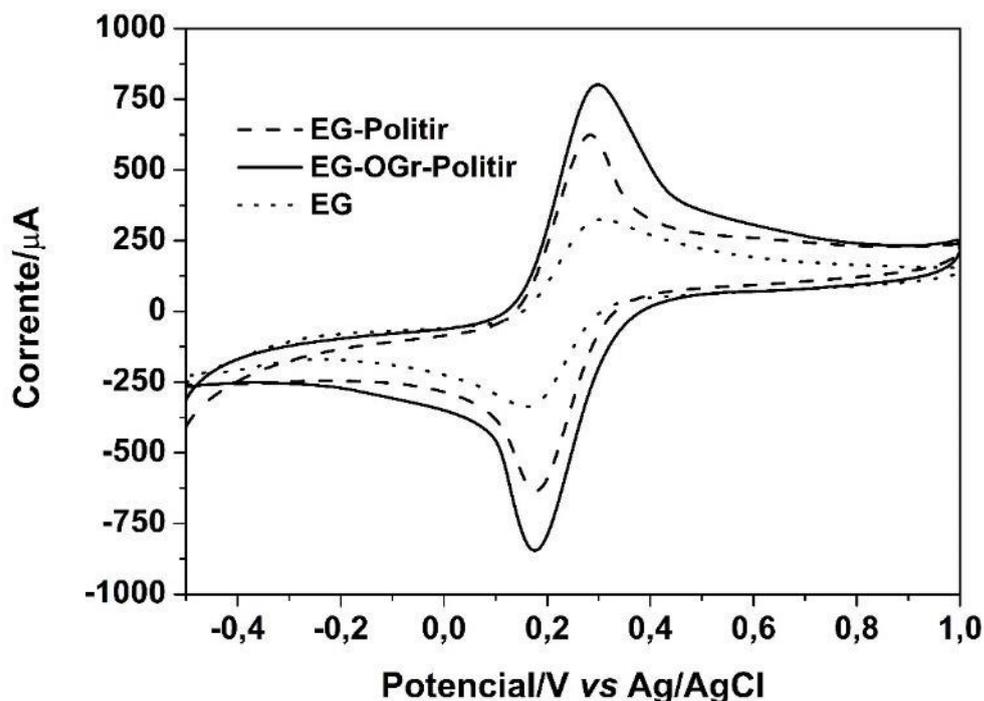


Figura 27. Voltamogramas cíclicos conduzidos em solução aquosa de sonda aniônica ($K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5 mmol L⁻¹ e 0,1 mol L⁻¹ de KCl com 50mV.s⁻¹, entre -0,4V e 1,0V. Em (—) EG/OGr/PoliTir, (-----) EG/PoliTir e () EG.

4.1.4 Bioeletrodo de EG/OGr/PoliTir

A voltametria de pulso diferencial foi utilizada como técnica de eletrodeteção do alvo RNAg do vírus Zika. A Figura 28 mostra as diferenças nos perfis eletroquímicos em $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5 mmol L⁻¹ e 0,1 mol L⁻¹ de KCl dos eletrodos EG/OGr/PoliTir, EG/OGr/PoliTir/ZIK1V, EG/OGr/PoliTir/ZIK1V-RNAg ZIKV e EG/OGr/PoliTir/ZIK1V-RNAg HCV e as diferenças nos picos de corrente (Figura 29) em 1332,22 µA, 1108,33 µA, 633,5 µA e 1009 µA, respectivamente. As diferenças das respostas de corrente mostram a diminuição do pico em 1,2 vezes entre EG/OGr/PoliTir e EG/OGr/PoliTir/ZIK1V e 1,7 entre EG/OGr/PoliTir/ZIK1V e EG/OGr/PoliTir/ZIK1V-RNAg ZIKV.

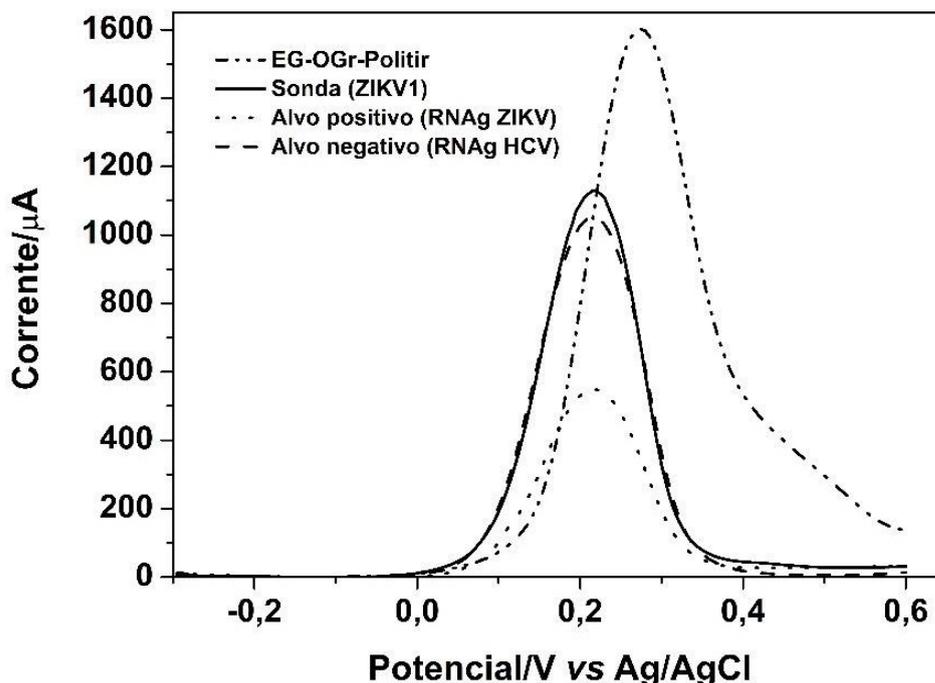


Figura 28. Voltamogramas de pulso diferencial em solução aquosa de sonda aniônica ($K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5 mmol L^{-1} e $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de KCl com $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, entre $-0,4\text{V}$ e $1,0\text{V}$. Em (—) EG/OGr/PoliTir (-----), Sonda (ZIKV1) (—), Alvo negativo (RNAg HCV), (-----) Alvo positivo (RNAg ZIKV) (·····).

A funcionalização da plataforma EG/OGr/PoliTir com sonda de oligonucleotídeo específica ao vírus Zika (ZIKV1) ocorre por adsorção física oriunda da interação eletrostática entre os grupamentos amino da politiramina e o esqueleto fosfato negativo em solução neutra com pH próximo a 7 da simples-fita de oligonucleotídeos. Desse modo, é possível inferir que quando a sonda é adsorvida no nanocompósito o pico de corrente de oxidação do par redox diminui devido ao efeito de bloqueio da sonda, causando restrição à transferência de massa das espécies redox em solução.

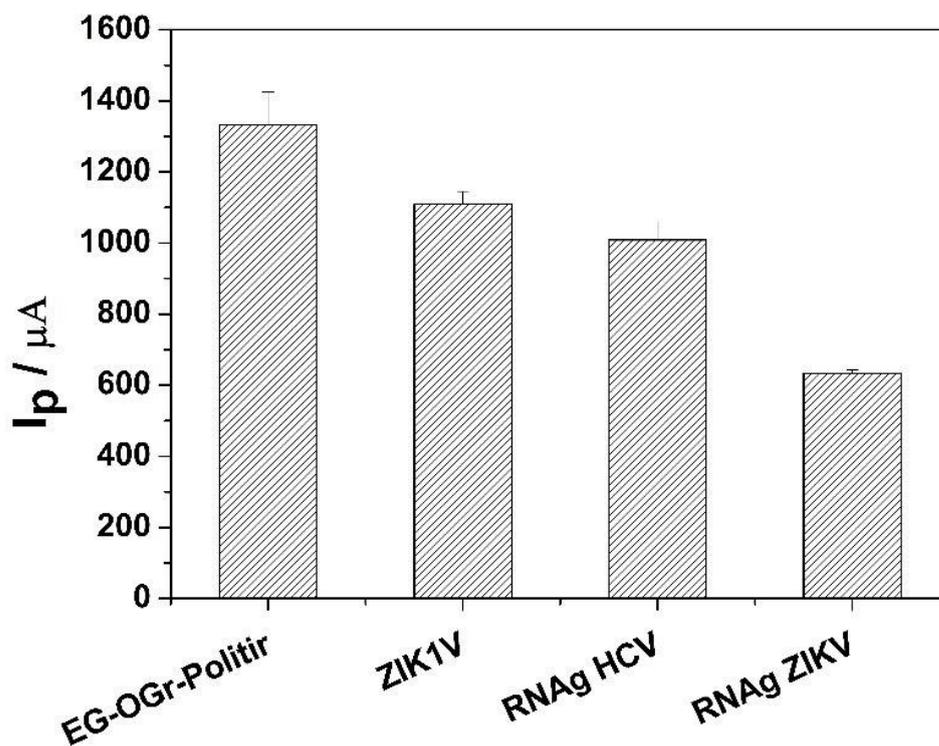


Figura 29. Histogramas da resposta do pico da corrente de EG/OGGr/PoliTir, EG/OGGr/PoliTir/ZIK1V, EG/OGGr/PoliTir/ZIK1V-RNAg ZIKV e EG/OGGr/PoliTir/ZIK1V-RNAg HCV.

As espécies redox em solução também apresentaram diferença após hibridização com RNA específico do vírus Zika, cujo decréscimo em relação a sonda foi de 1,7 vezes. No fenômeno de hibridização de pares de bases de Watson-Crick ocorre ligações de hidrogênio entre as mesmas e ocorrência do *duplex* de DNA. Essa estrutura é mais estável e menos flexível, quando comparada a simples fita de DNA da sonda, de modo que o efeito de restrição à transferência eletrônica entre a solução do par redox e o eletrodo é maior (DA SILVA; MADURRO; MADURRO, 2017).

Como controle negativo foi utilizado RNAg de vírus da hepatite C com 9,6 kb (CHOI; KIM; OH, 2003). A resposta de corrente na presença do controle negativo demonstrou semelhança com a resposta da sonda, devido ao fato de que, como não há especificidade entre a sonda e o RNA de HCV, este não hibridiza e tende a ser removido no processo de lavagem. A diferenciação entre alvo positivo e negativo entre RNAs com tamanho semelhante demonstra a grande especificidade e seletividade da sonda e cumpre requisito importante no desenvolvimento de

biossensores: a diferenciação da biomolécula específica dentre outras semelhantes.

As amostras de RNAg de 10 pacientes infectados por vírus Zika, previamente validados por RT-PCR, foram quantificados em espectrofotômetro UV-Vis (Tabela 4). Todas as amostras foram testadas no bioeletrodo e diluídas previamente na proporção de 1:10 em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4). Os resultados das respostas de corrente do pico de oxidação por técnica de voltametria de pulso diferencial em solução de sonda aniônica ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol L^{-1} e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl) podem ser visualizados na Figura 30.

Tabela 4. Quantificação das amostras de RNAg de ZIKV em espectrofotômetro UV-Vis.

Amostras	Quantificação $\mu\text{g/mL}$
A1	54,74
A2	88,70
A3	88,65
A4	112,70
A5	31,93
A6	46,67
A7	116,53
A8	63,12
A9	117,80
A10	59,92

As amostras diferenciaram-se da sonda mostrando a resposta dos picos de corrente de oxidação do ferrocianeto diminuída pelo mecanismo supracitado sobre comportamento dos íons ferrocianetos na hibridização. A variação da resposta de corrente de pico de acordo com a variação na concentração do RNAg também foi verificada, sendo que as amostras mais concentradas, A4, A7 e A9 apresentaram menor resposta de corrente em relação as menos concentradas. Os dados sugerem que há correlação entre corrente e concentração sendo que, com o

aumento da concentração de RNAg, há maior possibilidade de ocorrência de hibridização e, como consequência, maior dificuldade na transferência eletrônica e menor a corrente de pico de oxidação das espécies redox.

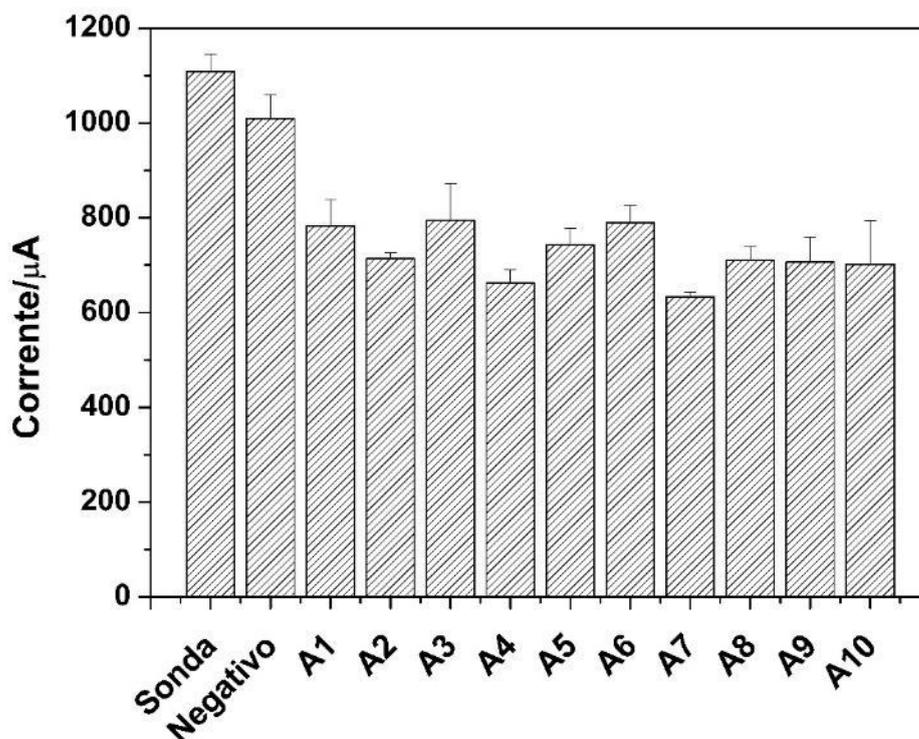


Figura 30. Histogramas da corrente de pico da sonda (ZIK1V), alvo negativo (RNAg HCV) e 10 amostras positivas para o ZIKV (RNAg ZIKV).

4.1.5 Curva de calibração

A Figura 31 mostra o registro dos sinais de resposta analíticos obtidos pela corrente de pico anódica por voltametria de pulso diferencial em solução aniônica ($K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 5 mmol L⁻¹ e 0,1 mol L⁻¹ de KCl) *versus* a variação da concentração de RNAg. A curva de calibração foi contruída variando a concentração do RNAg em 10⁻⁶ µg/mL, 10⁻⁸ µg/mL, 10⁻⁹ µg/mL, 10⁻¹² µg/mL e 10⁻¹⁴ µg/mL com valores de 779,37 µA, 819,03 µA, 843,09 µA, 871 µA e 924,86 µA, respectivamente.

Com a variação da resposta de corrente com a concentração, foi realizada análise de regressão linear no *software Origin* obtendo um perfil de linearidade de

$R^2 = 0,98044$ e um limite de detecção de 10 fg/mL. Os métodos atualmente empregados na detecção de RNAg do vírus Zika são baseados em métodos quantitativos e qualitativos da reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction – RT-PCR*) (LANDRY; ST. GEORGE, 2017). O método comumente empregado de RT-PCR qualitativa possui limite de detecção de 250 cópias/mL sendo, aproximadamente, 15 fg/mol (CDC, 2016). Já o método quantitativo triplex de RT-PCR para detecção de vírus da dengue, Zika e chikugunya mundialmente empregado possui limite de detecção entre 5000 a 1000 cópias/ML ou, aproximadamente, 0,3 pg/mL e 58 fg/mL, respectivamente (SANTIAGO et al., 2018).

Aliado ao fato do genossensor desenvolvido apresentar boa sensibilidade quando comparado aos métodos “padrão ouro” de detecção de RNAg, outras vantagens são apresentadas em relação aos mesmos: não haver necessidade de mão de obra especializada; tempo de resposta do genossensor de, aproximadamente, 20 minutos; facilmente miniaturizável com possíveis aplicações em campo; potencial para produção em massa; custo menor quando comparado aos equipamentos e reagentes utilizados na RT-PCR.

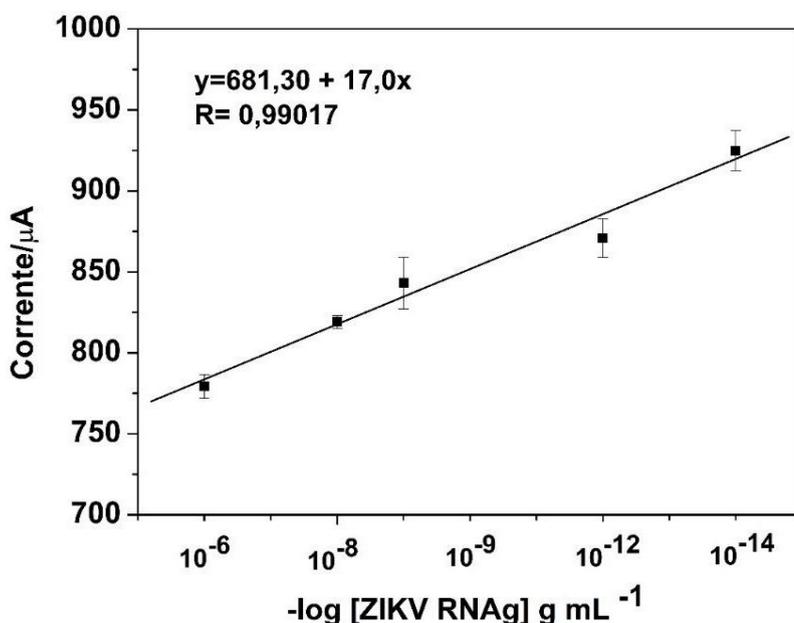


Figura 31. Resposta linear e parâmetros da análise de regressão da curva analítica.

4.1.6 Estabilidade do genossensor

A estabilidade frente ao tempo do biossensor é muito importante em termos de vida útil de prateleira e, portanto, tópico essencial no quesito financeiro e viabilidade da comercialização do mesmo. A diminuição da sensibilidade durante o tempo é referida como envelhecimento do biossensor e o mecanismo é complexo, afetando vários parâmetros, como as camadas poliméricas e reagentes (PANJAN; VIRTANEN; SESAY, 2017). Deste modo, o eletrodo modificado com nanocompósito funcionalizado com sonda específica foi armazenado a 8°C e a resposta foi avaliada nos intervalos de 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias. Na Figura 32 é possível observar que a resposta diminuiu em 20% no dia 10 e permaneceu constante e dentro do desvio padrão até o dia 60.

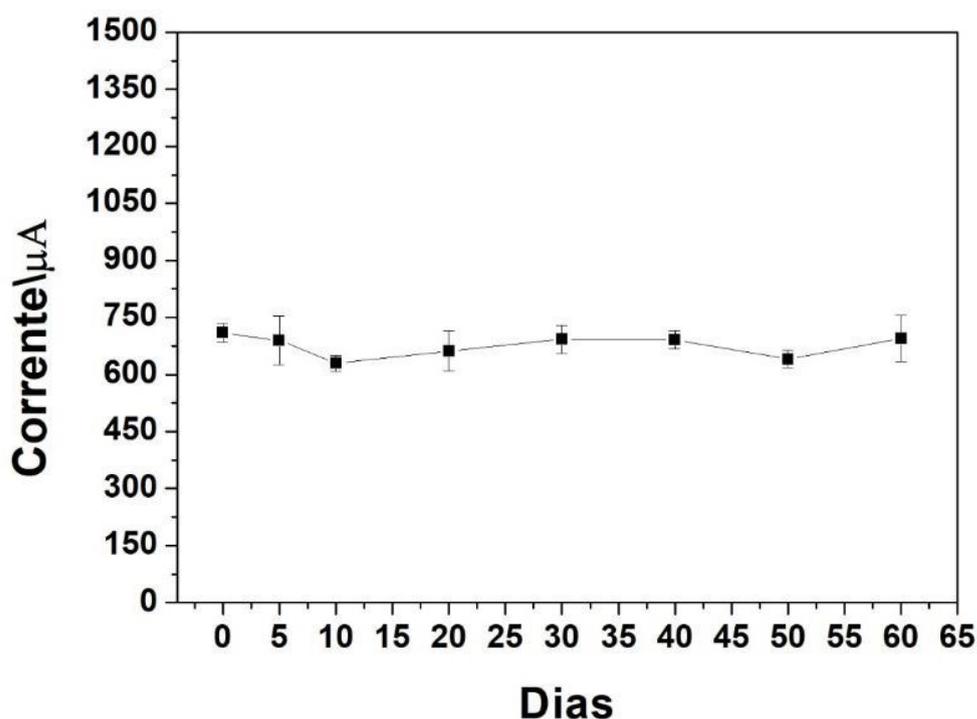


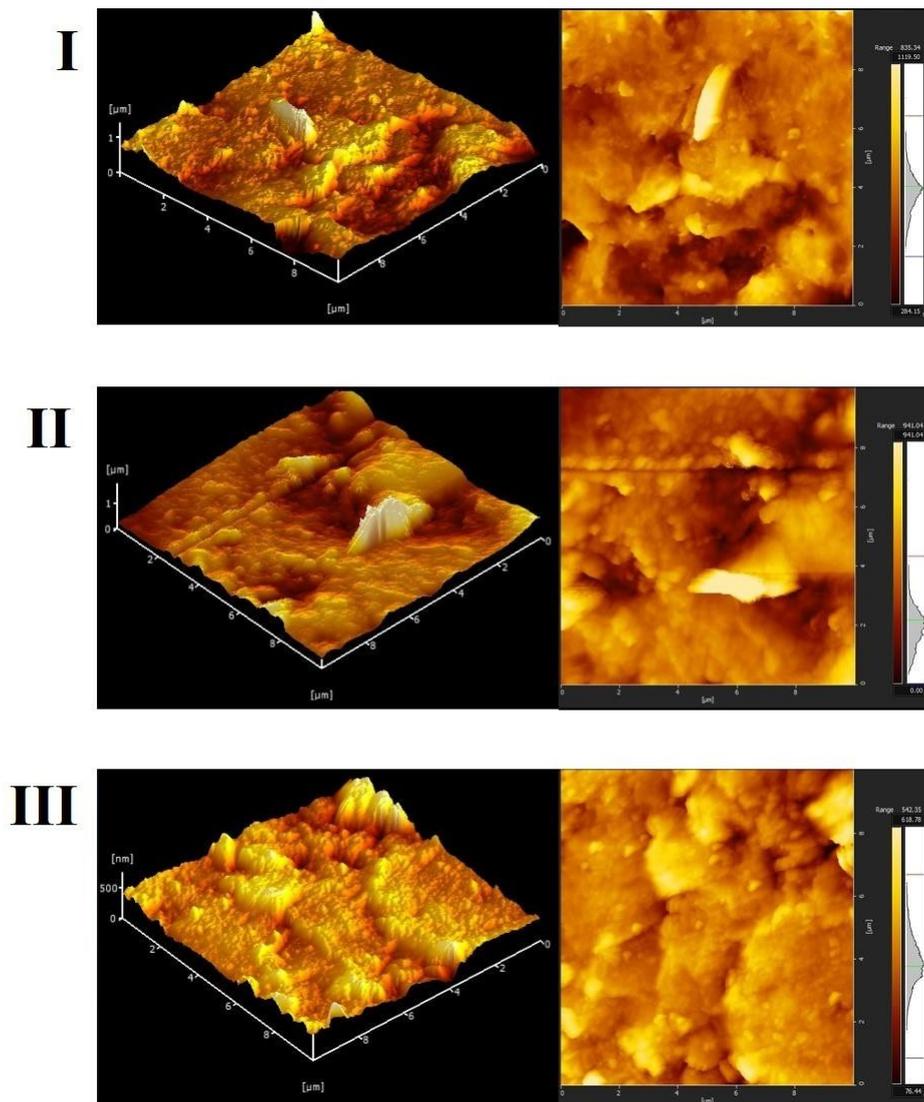
Figura 32. Estabilidade do genossensor durante 60 dias.

4.1.7 Análise morfológica com AFM

As análises morfológicas foram realizadas por meio de medidas de AFM nos eletrodos de EG/OGr/PoliTir/ZIK1V, EG/OGr/PoliTir/ZIK1V-RNAg ZIK1V e EG/OGr/PoliTir/ZIK1V-RNAg HCV e podem ser visualizadas na Figura 32. A análise da rugosidade dos eletrodos mostrou diferenças ao longo da modificação com sonda e alvo. O eletrodo modificado com o nanocompósito e a sonda apresenta rugosidade (S_q) de 132,20 nm (Figura 33) com picos mais angulares quando comparados com alvo positivo. Por sua vez, a rugosidade do nanocompósito, após hibridização entre sonda e alvo, aumentou em 48,30 nm e adquiriu aspectos globulares nos picos. Os picos do controle negativo tornaram-se menos volumosos e mais angulares em relação ao controle positivo, bem como a diminuição de sua rugosidade ($S_q = 78,38$ nm).

As diferenças morfológicas na superfície do eletrodo modificado refletem as interações entre sonda e alvo empregadas neste trabalho. A sonda constituída de nucleotídeos e comprimento de cerca de 20 bases recobre a superfície do eletrodo interagindo com o nanocompósito (Figura 33-I) formando picos mais alargados e menores. Quando o alvo de RNAg é adicionado, o mesmo hibridiza com a sonda em região complementar e, deste modo, formam-se complexos sonda-alvo caracterizados como regiões globulares (Figura 33-II). Ao comparar a altura máxima da rugosidade ($S_z/máx$) é possível observar um aumento da sonda-alvo em relação à plataforma funcionalizada apenas com sonda, sendo este aumento de 1,25 vezes. Na Figura 33-III é observado picos mais angulares e menores que na Figura 33-II, o que, provavelmente, ocorreu devido ao fato de que o RNAg de HCV não interage especificamente com a sonda e, portanto, é removido com eficiência após a lavagem, fato este que não ocorre quando o alvo específico é adicionado devido às ligações de hidrogênio estáveis formadas após formação da dupla-fita DNA-RNA.

Desse modo, foi possível evidenciar, morfológicamente, que o biomaterial interage com o nanocompósito sem sofrer grandes lixiviações nos processos sequenciais de imobilização e detecção e que, por sua vez, dependem da interação específica do alvo com a sonda de RNAg do vírus Zika.



	Sa (nm)	Sz/Smáx (nm)	Sq/RMS (nm)
(I) EG/OGr/PoliTir/ZIK1V	96,37	1424,00	132,20
(II) EG/OGr/PoliTir/ZIK1V-RNAg ZIKV	123,60	1779,00	180,50
(III) EG/OGr/PoliTir/ZIK1V RNAg HCV	56,19	757,10	73,38

Figura 33. Imagens e tabela contendo parâmetros de rugosidades obtidos na microscopia de força atômica de (I) EG/OGr/PoliTir/ZIK1V, (II) EG/OGr/PoliTir/ZIK1V-RNAg ZIKV e (III) EG/OGr/PoliTir/ZIK1V RNAg HCV. Em Sa: média aritmética da rugosidade; Sz/Smáx: altura máxima da rugosidade.

4.2 Estudos colorimétricos e ópticos

4.2.1 Síntese de AuNps

A síntese de nanopartículas para posterior aplicação em plataformas biossensoras colorimétricas e ópticas é crucial para o desempenho do sensoriamento. A estabilidade ou agregação das AuNps é dependente do balanço entre forças repulsivas e atrativas entre as partículas em solução. O método realizado no presente trabalho de redução por citrato permite a estabilização em meio aquoso por íons citrato na superfície das nanopartículas. Essa estabilidade pode ser aumentada ou diminuída dependendo dos agentes estabilizadores, como pequenas moléculas carregadas, polímeros e polieletrólitos, objetivando o aumento da estabilidade por interação eletrostática e/ou impedimento estérico (DE VASCONCELOS; PEREIRA; FONSECA, 2005).

Em nanopartículas menores que 20 nm de diâmetro, a luz verde é absorvida correspondendo à uma banda de absorção (banda plasmônica de superfície) em, aproximadamente 520 nm (Figura 34A) no espectro de luz visível. Consequentemente, a solução aparece na cor avermelhada (Figura 34A). Por outro lado, quando há adição de solução de sal saturado (NaCl), há ocorrência de mudança de coloração do vermelho ao azul (623 nm) (Figura 34B). Desse modo, com adição de solução de NaCl, ocorreu um deslocamento batocrômico de 103 nm e efeito hipocrômico de 0,29 a 0,09. Na agregação das AuNps, induzida por solução de NaCl, os plásmons de superfície inter-partículas se combinam comportando-se como uma única partícula grande. O excesso de íons proveniente do NaCl saturado rompe a estabilidade eletrostática promovida pelos íons citrato, diminuindo a distância inter-partículas e favorecendo a combinação de plásmons das mesmas.

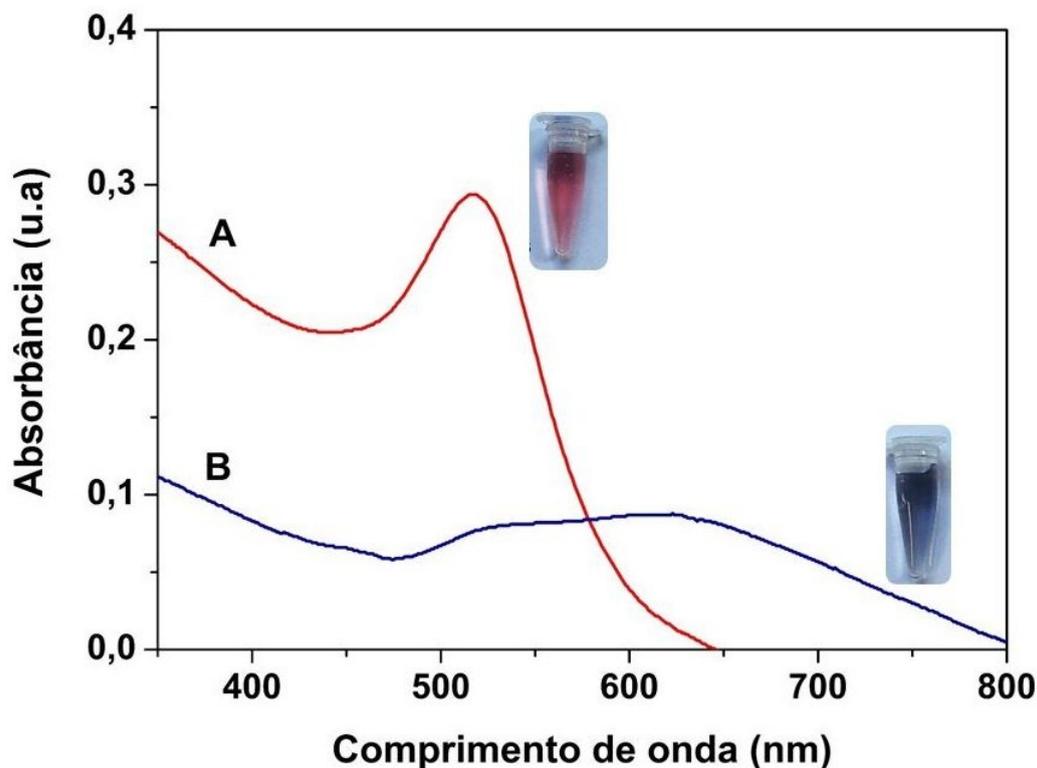


Figura 34. Espectros de absorvância obtidos antes (A) e após (B) adição de NaCl saturado. As fotografias mostram a mudança de coloração de vermelho ao azul.

4.2.2 Detecção colorimétrica e óptica do RNAg do vírus Zika

A Figura 35 mostra os espectros de absorção do ensaio biológico de detecção do RNAg do ZIKV. Os valores de comprimento de onda das AuNps (Figura 35A), AuNps-ZIKV1S-RNAg ZIKV (Figura 35B), AuNps-ZIKV1S (Figura 35C) e AuNps-ZIKV1S-RNAg HCV (Figura 35D) são, respectivamente, 520 nm, 559 nm, 617 nm e 638 nm. É observada a diminuição progressiva da absorvância em comparação às AuNps sem funcionalização da superfície e a maior estabilidade em solução das AuNps modificadas com a sonda após hibridização com RNAg do vírus Zika.

Como observado pelos espectros, quanto maior o comprimento de onda, maior o tamanho da nanopartícula ou, como citado anteriormente, maior a taxa de agregação das nanopartículas. Ou seja, quando uma solução de NaCl saturado é adicionada, o mesmo induz a agregação das AuNps apenas modificadas com a

sonda ou quando é adicionado alvo negativo de RNAg de Hepatite C. Diante desses resultados, é possível supor que o RNAg do vírus Zika oferece maior estabilidade às AuNps após ocorrência da hibridização com a sonda na superfície das AuNps. Shawkly e colaboradores (2017) observaram este fenômeno utilizando AuNps para detecção de RNA de Hepatite C e constataram que a conformação do RNA influencia na estabilidade das AuNps em solução. Assim, quando ocorre hibridização com a sonda específica o RNA pode acarretar a formação de várias camadas de cadeia de nucleotídeos ao redor das nanopartículas e, por fim, fornecendo maior estabilidade e prevenção da aproximação das nanopartículas vizinhas e sua agregação (SHAWKY et al., 2017).

A observação de que não ocorre estabilização das AuNps quando adicionado RNAg de Hepatite C demonstra a especificidade e seletividade do ensaio de modo que, mesmo em solução, o RNAg do vírus HCV, com mais de 9 kb, não hibridiza com a sonda e não fornece proteção eletrostática contra a agregação. Assim, a especificidade, hibridização e conformação do RNA em solução demonstram ser parâmetros cruciais para o evento de não agregação. Além disso, a possibilidade de visualização do resultado por mudanças na coloração, sendo o resultado positivo a mudança para vermelho ou lilás e negativo para o azul, mostra que o método é simples e possibilita a futura utilização comercial.

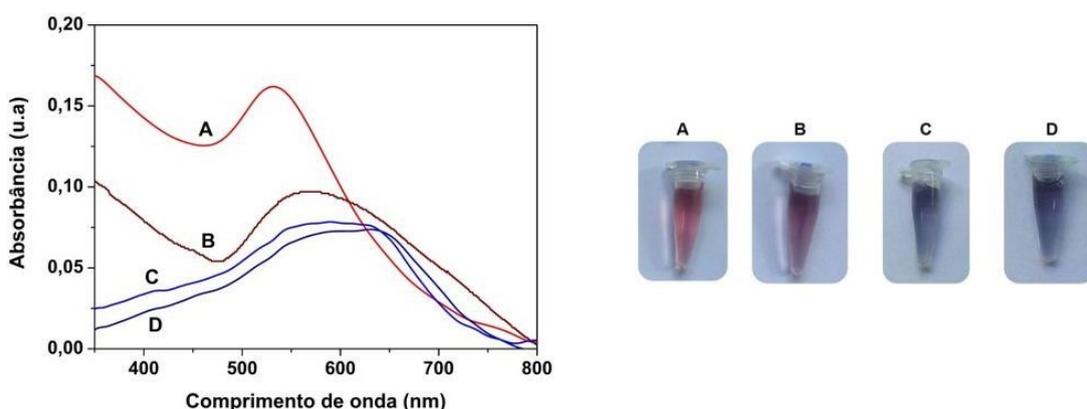


Figura 35. Espectros de absorção e fotografias referentes à detecção do RNAg do vírus Zika com AuNps. (A) AuNps, (B) AuNps-ZIKV1S-RNAg ZIKV, (C) AuNps-ZIKV1S, (D) AuNps-ZIKV1S-RNAg HCV.

As diferenças nos comprimentos de onda das amostras de RNAg de 10 pacientes infectados por vírus Zika estão exibidos na Figura 36A. Todas as amostras mostraram-se positivas e com comprimentos de onda abaixo de 580 nm, enquanto a sonda e controle negativo maiores que 620 nm. A mudança de coloração das mesmas podem ser visualizadas na Figura 36B. Apesar da coloração possuir ligeiras mudanças, os espectros corroboram os dados de que a hibridização do RNAg do vírus Zika fornece maior estabilidade às AuNps sensibilizadas com sonda específica.

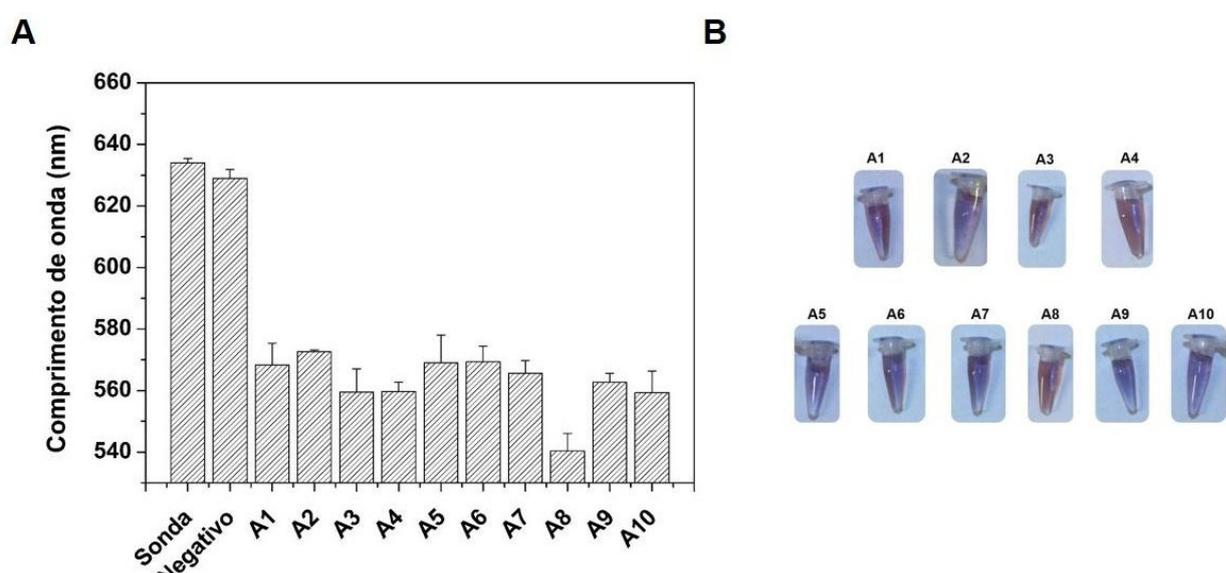


Figura 36. Histograma referente às mudanças nos comprimentos de onda de 10 amostras de RNAg de pacientes infectados por vírus Zika em (A) e em (B) as fotografias dos respectivos ensaios.

4.2.3 Estabilidade das AuNps funcionalizadas com ZIK1SV

A estabilidade das AuNps funcionalizadas com ZIK1SV foi avaliada por 60 dias e a resposta com RNAg foi testada nos dias 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 (Figura 37). Durante esse período, as AuNps-ZIK1SV foram armazenadas em 8°C protegidas da luz. A resposta manteve-se estável durante todo o período avaliado, excetuando apenas o dia 50 onde a mesma caiu apenas 4%. Desse modo, a detecção colorimétrica e óptica de RNAg do vírus Zika com AuNps mostra-se bastante estável frente ao tempo, característica que permite aplicações comerciais futuras.

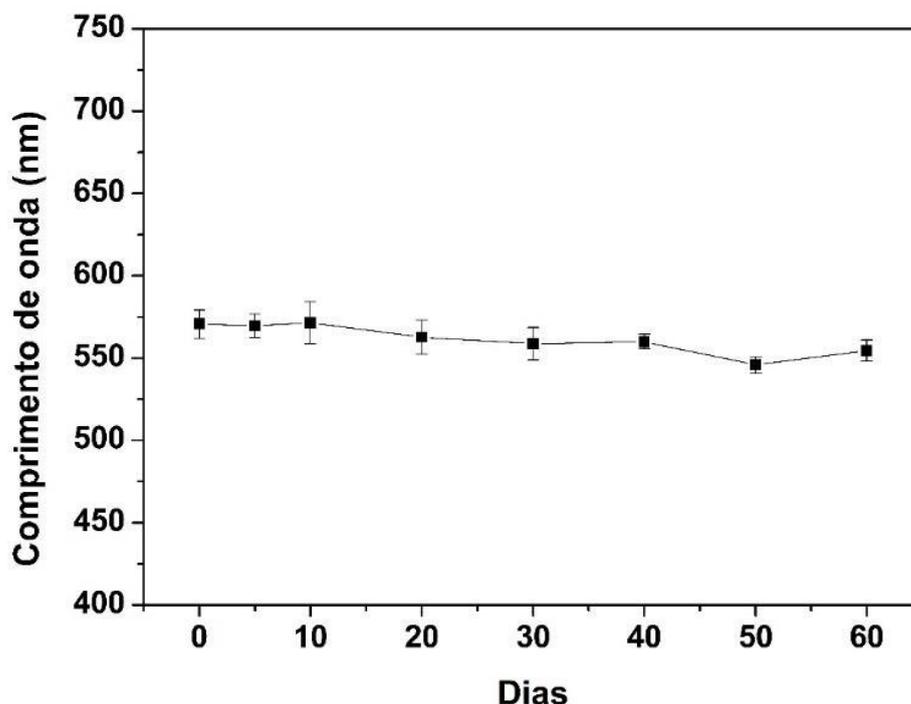


Figura 37. Estabilidade das AuNps funcionalizados com ZIK1SV por 60 dias.

4.2.4 Síntese de AgNps e estudo de interação de sonda e alvo complementar

Na Figura 38 são apresentados os espectros obtidos com espectrofotômetro UV-Vis da solução coloidal das AgNps. Na Figura 38A é observada as nanopartículas sem adição de NaCl saturado, apresentando comprimento de onda em aproximadamente 395 nm; na Figura 38B observam-se as AgNps funcionalizadas com sonda ZIKV1S após adição de solução de NaCl saturado, com comprimento de onda em 413 nm; na Figura 38C é visualizado as AgNps na presença de NaCl saturado e exibe comprimento de onda em 482 nm.

O espectro em A mostra a banda de absorção característica das AgNps de tamanho entre 11 e 14 nm e coloração amarelo brilhante. Quando o NaCl saturado é adicionado, ocorre uma desestabilização das cargas e ocorrência de agregação, com a extinção da banda característica (C) tornando-se esverdeada. No entanto, percebe-se que as AgNps funcionalizadas com sonda ZIKV1S agregam menos com

NaCl saturada, apresentando pico de absorção em 413 nm. A modificação com enxofre na extremidade 5' favorece a interação com as nanopartículas de prata.

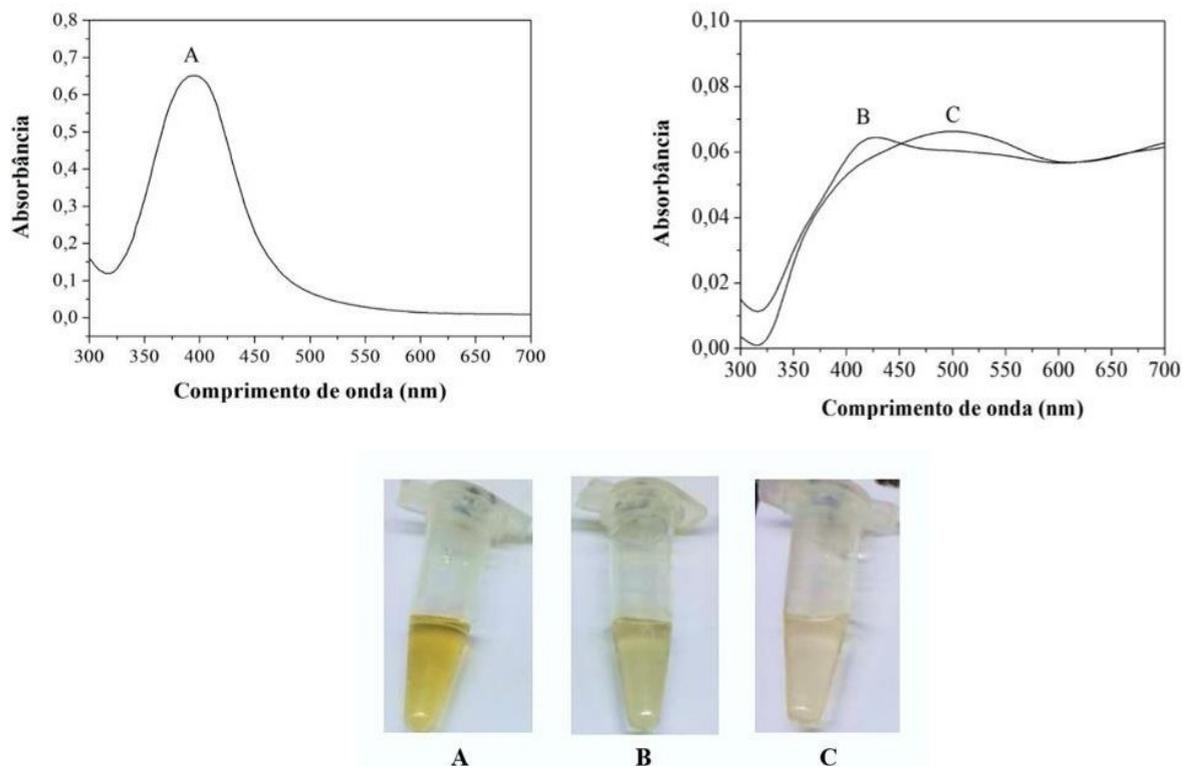


Figura 38. Espectros de absorção UV-Vis e imagens das AgNps sem adição de NaCl saturada (A), AgNps funcionalizadas com ZIKV1S e saturadas com NaCl (B) e AgNps com adição de NaCl saturada (C).

A agregação mediante solução de NaCl saturada é caracterizada pela interferência dos campos evanescentes entre as nanopartículas em solução. O campo evanescente é o campo elétrico oscilante gerado com a formação dos plasmons (DITLBACHER et al., 2000). Com a aproximação das nanopartículas adjacentes, a distância entre as mesmas cairá e o campo evanescente decairá. Em consequência disso, as nanopartículas ficam em ressonância em energias menores. O sal saturado, rico em íons, perturba a camada de passivação dificultando a agregação por repulsão coulombiana (VILELA; GONZÁLEZ; ESCARPA, 2012).

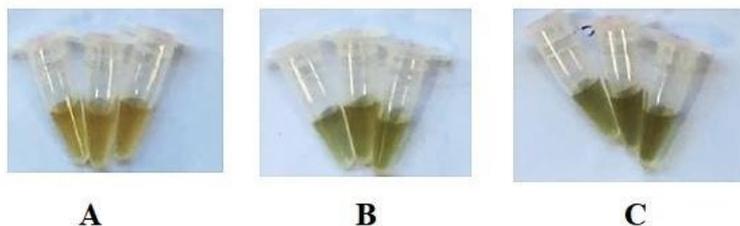
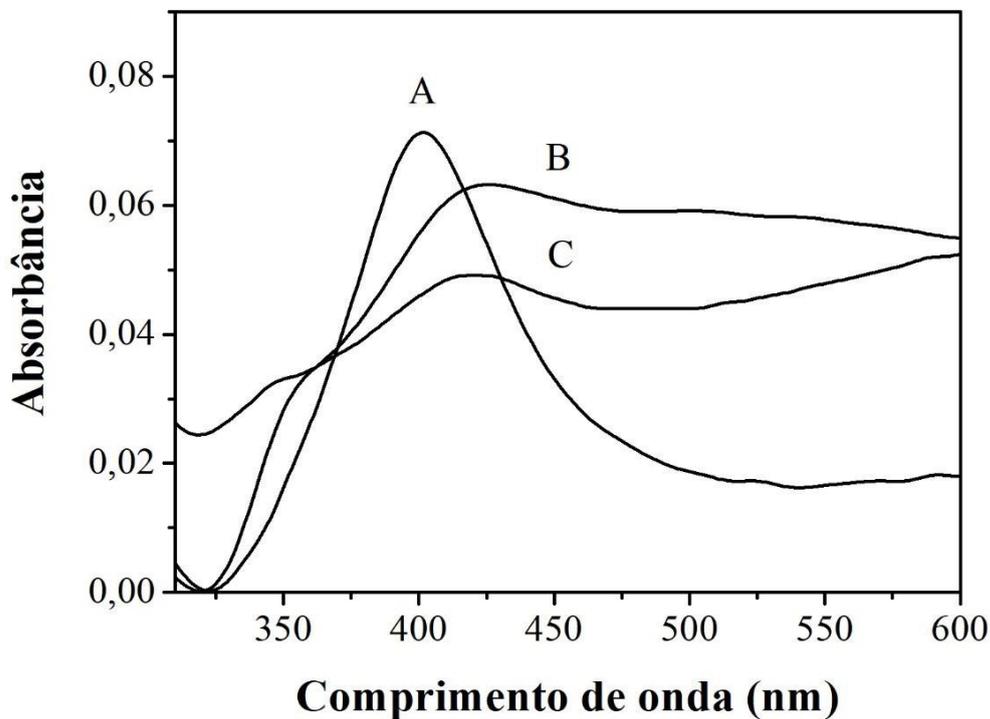


Figura 39. Espectros de absorção UV-Vis e imagens das AgNps com sonda e alvo complementar (ZIKV1S:ZIKV2) (A), AgNps funcionalizadas com sonda ZIKV1S e (B) e AgNps com sonda e alvo não complementar (ZIKV1S:NM1) (C).

A Figura 39 refere-se ao estudo da especificidade da sonda ZIKV1S selecionada. Para tal fim, é utilizada uma sequência de oligonucleotídeos não complementares (NM1). Na Figura 39A tem-se o espectro da sonda com seu alvo complementar (ZIKV1S sonda-ZIKV2 alvo), com comprimento de onda em 400 nm; na Figura 39B apenas espectro das AgNps funcionalizadas com sonda ZIKV1S, com comprimento de onda em 426 nm; a Figura 39C mostra o espectro obtido com a adição do alvo não complementar NM1, com comprimento de onda em 420 nm.

Toda modificação nas nanopartículas metálicas pode alterar o comportamento dos plasmons ocasionando a mudança de coloração das mesmas,

possibilitando a detecção óptica. Assim, quando as AgNps funcionalizadas com ZIKV1S se agregam, em consequência da adição de sal saturado, ocorre o acoplamento de plasmons e as AgNps mudam a coloração de amarelo para verde e um deslocamento batocrômico de 26 nm. Em contrapartida, quando ZIKV1S se anela ao ZIKV2, a dupla fita (ZIKV1S: ZIKV2) estabiliza a solução coloidal, de coloração amarela no comprimento de onda de 400 nm, ou seja, a mudança da coloração decorrente de formação da dupla fita de DNA configura-se como meio de detecção de material genético do vírus Zika.

De modo a corroborar com os estudos de especificidade da sonda ao alvo complementar, a Figura 39C mostra o comportamento das AgNps com um alvo não complementar de *Neisseria meningitidis*. Como o material genético desse organismo é diferente do vírus Zika, este não forma o *duplex* de DNA e ocorre deslocamento batocrômico de 19 nm, semelhante à sonda. Ou seja, a sonda ZIKV1S é específica ao vírus e é capaz de diferenciar-se com outros materiais genéticos não específicos. Essa característica é de extrema importância em análises clínicas visto que um mesmo paciente pode estar portando diferentes micro-organismos patogênicos e resultados falso positivos não são desejados.

4.2.5 Detecção colorimétrica e óptica de RNAg ZIKV em AgNps

A detecção colorimétrica é garantida em amostras de RNAg do vírus Zika conforme ilustra a Figura 40, que mostra o espectro de absorção das AgNps de 4 pacientes infectados. Na Figura 40A é ilustrado o espectro das AgNps funcionalizadas com sonda ZIKV1S com 450 nm de comprimento de onda e absorvância em 0,074. Os espectros da Figura 40B — E são referentes aos 4 pacientes infectados e possuem comprimento de onda de 421 nm, 422 nm, 419 nm e 417nm, respectivamente.

A região do RNAg do vírus Zika se anela a sequência específica funcionalizada nas AgNps e promove a maior estabilidade nas AgNps, permanecendo na coloração amarela. O restante da sequência do RNAg que não se anelou à sonda ZIKV1S de 17 bases fornece proteção contra a agregação por formação do *duplex* e *heteroduplex* entre as nanopartículas vizinhas. Deste modo,

é possível visualizar a agregação das AgNps funcionalizadas com a sonda e a não agregação daquelas que formaram o *duplex* com o RNAg alvo.

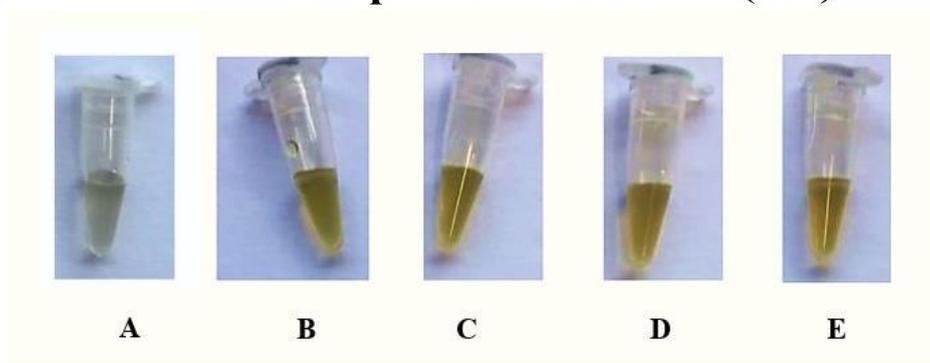
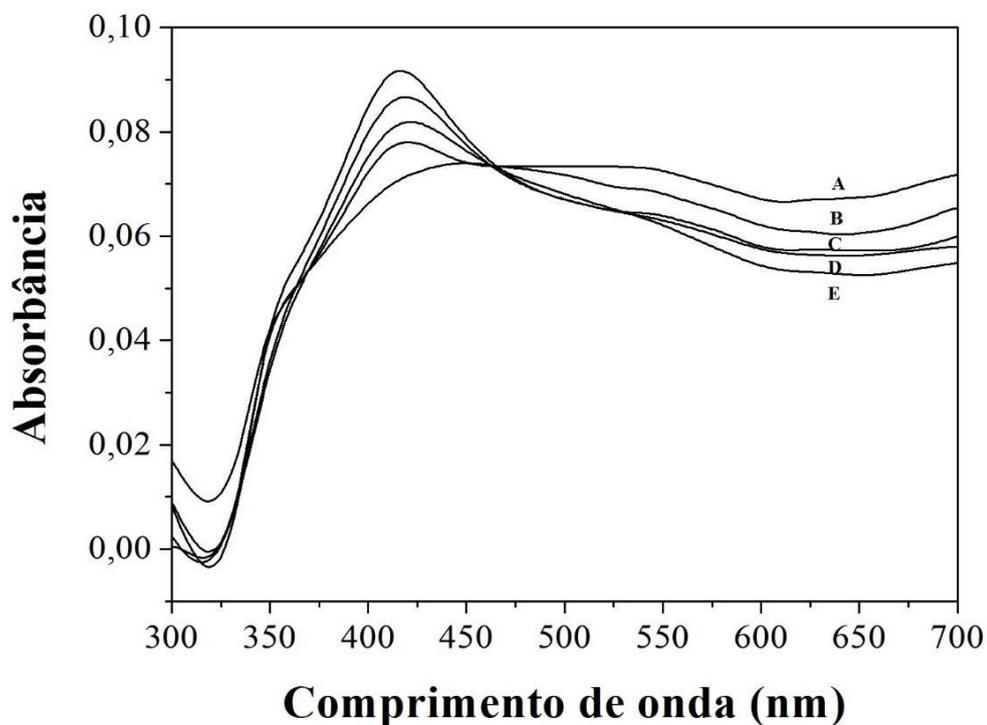


Figura 40. Espectros de absorção UV-Vis e imagens das AgNps funcionalizadas com sonda ZIKV1S (A) e AgNps com sonda e alvo RNAg ZIKV (ZIKV1S:RNAg ZIKV) de 4 amostras de RNAg extraído de pacientes infectados (B-E).

4.2.6 Estabilidade das AgNps funcionalizadas com ZIKV1S

A fim de monitorar a estabilidade dispositivo colorimétrico e óptico para diagnóstico de vírus Zika, as AgNPs modificadas com ZIKV1S são mantidas a 8°C durante 90 dias. Testes são executados a cada mês por quatro meses, mais especificamente nos dias: 0, 30, 60, e 90. Após cada teste são realizadas leituras

no espectrofotômetro UV-VIS com o objetivo de monitorar no espectro de absorção com o tempo.

A estabilidade frente ao tempo das AgNps, ou seja, a não agregação ao decorrer do tempo está representada na Figura 41. Mantiveram-se fortemente estáveis por 2 meses e, no terceiro mês, a estabilidade é de 98% no que se refere ao comprimento de onda das AgNps. Assim, a modificação da síntese de AgNps com excesso de citrato de sódio demonstra ser um passo crucial na estabilização ótima da solução coloidal contra a agregação em função do tempo.

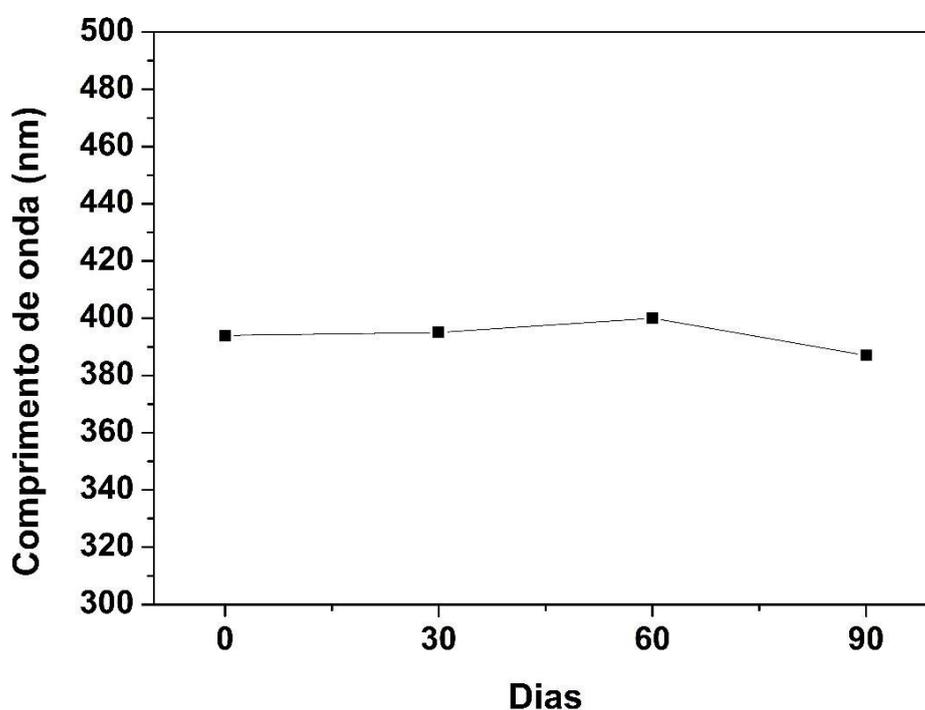


Figura 41. Estabilidade das AgNps funcionalizadas com ZIK1SV por 90 dias.

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho objetivou o desenvolvimento de genossensor eletroquímico e óptico para detecção do vírus Zika. Ambas plataformas aqui desenvolvidas preencheram os requisitos primordiais de um biossensor, a saber: especificidade, seletividade, sensibilidade, faixa linear de resposta e estabilidade frente ao tempo.

Os estudos eletroquímicos mostraram a eficiência na remoção parcial dos grupos funcionais do OG por meio da redução eletroquímica, ocasionando a formação de OGr, um material com características condutoras que foi capaz de melhorar a resposta de corrente e aumento da área superficial do eletrodo de grafite. Além disso, como evidenciado neste trabalho, a resposta de corrente do filme polimérico de tiramina apresentou melhor performance quando eletropolimerizado ao eletrodo de EG/OGr ao invés de apenas EG. Como consequência da melhora da performance do genossensor, em termos de corrente e área superficial, a imobilização de oligonucleotídeos específicos ao vírus Zika foi beneficiada com o aumento da área superficial, possibilitando que um maior número de biomoléculas interajam com a plataforma de politiramina.

A sonda específica ao vírus Zika (ZIK1V) foi imobilizada na plataforma com êxito e apresenta grande especificidade à região complementar no RNA genômico de 11kb do vírus Zika. Foi possível também observar que o genossensor eletroquímico foi sensível às variações de concentração do material genético do vírus o que possibilitou a determinação dos parâmetros analíticos, sendo que o limite de detecção foi 10 fg/mL. Esse baixo limite de detecção foi igual ou superior às metodologias comumente utilizadas para diagnóstico do vírus Zika e, além disso, o presente genossensor eletroquímico tem vantagens sobre os métodos usais, os quais: baixo custo de produção, com materiais baratos e acessíveis; possibilidade de miniaturização e utilização em campo por pessoas leigas; rapidez na resposta após interação sonda-alvo.

Os estudos ópticos e colorimétricos com AuNps e AgNps demonstram a especificidade da sonda tiolada (ZIKV1S) e sua funcionalização nas mesmas. Com a utilização das duas nanopartículas foi possível desenvolver um genossensor óptico e colorimétrico que possibilita resultados rápidos em tempo real e à “olho

nu”, por meio da mudança de coloração das nanopartículas em solução. Além disso, apresentou boa estabilidade frente ao tempo, característica de suma importância para comercialização.

Ademais, diante da escassez de biossensores para detecção do vírus Zika e dos atuais surtos mundiais, o presente trabalho constitui-se em desenvolvimento importante na área biotecnológica e, pela primeira vez, um genossensor eletroquímico baseado em eletrodos de grafite modificado com nanocompósitos e filmes poliméricos foi desenvolvido e validado. Os achados desse estudo permitiram, além da contribuição acadêmica científica, a possibilidade real de soluções simples e acessíveis para futura comercialização dos mesmos, atendendo as demandas mundiais de saúde pública urgentes nos surtos epidêmicos do vírus Zika.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, O. et al. Tyramine electropolymerization revisited by DFT and experimental study. **Journal of Molecular Structure**, v. 1037, p. 200–208, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2012.12.056>

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

AHMED, S. R. et al. In situ self-assembly of gold nanoparticles on hydrophilic and hydrophobic substrates for influenza virus-sensing platform. **Nature Publishing Group**, mar, p. 1–11, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep44495>

ALDER, J. F.; MCCALLUM, J. J. Piezoelectric crystals for mass and chemical measurements. A review. **Analyst**, v. 108, n. 1291, p. 1169–1189, 1983. <https://doi.org/10.1039/an9830801169>

ATKINSON B. et al. Presence and Persistence of Zika Virus RNA in Semen. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 4, p. 611-615, 2017. <https://doi.org/10.3201/eid2304.161692>

AVRAHAM, R.; HEROLD, K. E. **Biosensors and Biodetection Methods and Protocols Volume 2: Electrochemical and Mechanical. Methods in Molecular Biology**: Human Press, v. 2, 2008.

BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses. **Analytical Biochemistry**, v. 478, p. 107–120, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.03.011>

BANNE, S.V. et al. Synthesis and Characterization of Silver Nano Particles for EDM Applications. **Materials Today: Proceedings**, v. 4, n. 11, p. 12054–12060, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.09.130>

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: fundamentals and applications**, New York: John Wiley and Sons, Inc., v.2, 2001.

BAWA, R. Patents and nanomedicine. **Nanomedicine**, v. 2, n. 3, p. 351–374, 2007.

<https://doi.org/10.2217/17435889.2.3.351>

BHAND, S. G. et al. Fructose-selective calorimetric biosensor in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, n. 1, p. 13–18, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.01.020>

BROWNSON, D. A. C.; SMITH, G. C.; BANKS, C. E. Graphene oxide electrochemistry: the electrochemistry of graphene oxide modified electrodes reveals coverage dependent beneficial electrocatalysis. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 11, p. 1-15, 2017. <https://doi.org/10.1098/rsos.171128>

CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 653–660, 2016. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00095-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5)

CALVET, G. A. et al. Study on the persistence of Zika virus (ZIKV) in body fluids of patients with ZIKV infection in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 49, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-2965-4>

CAMPOS, G.; BANDEIRA, A.; SARDI, S. Zika Virus Outbreak, Bahia Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1881, 2015. <https://doi.org/10.3201/eid2110.150847>

CDC. Zika Virus RNA Qualitative Real-Time RT-PCR Focus Diagnostics, Inc. For use under an Emergency Use Authorization only Instructions For Use. p. 1–23, 2016.

CHARREL, R. N. et al. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 8, p. 574–584, 2016. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.171207>

CHEN, L. et al. Biosensor-based Active Ingredients Recognition System for Screening STAT3 Ligands from Medical Herbs Biosensor-based Active Ingredients Recognition System for Screening STAT3 Ligands from Medical Herbs. **Analytical Chemistry**, p. 1-11, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01103>

CHOI, H. B.; KIM, Y. G.; OH, J. W. Biochemical properties of full-length hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in insect cells. **Exp Mol Med**, v. 35, n. 6, p. 475–485, 2003. <https://doi.org/10.1038/emm.2003.62>

CLARK, L. C. J. Monitor and Control of Blood and Tissue Oxygen Tensions. **American Society for Artificial Internal Organs**, v. 2, n. 1, p. 41-48, 1956.

CLARK, L. C. J.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, v. 102, n. 1, p. 29–45, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>

DA SILVA, J. V.; MADURRO, A. G. B.; MADURRO, J. M. 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. <https://doi.org/10.1007/s10008-017-3601-8>

DAI, L. et al. A polytyramine film for covalent immobilization of oligonucleotides and hybridization. **Synthetic Metals**, v. 139, p. 251–262, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0379-6779\(03\)00131-0](https://doi.org/10.1016/S0379-6779(03)00131-0)

DARAIO, C.; JIN, S. Synthesis and Patterning Methods for Nanostructures Useful for Biological Applications. Em: **Nanotechnology for biology and medicine**, p. 27–44, 2012. https://doi.org/10.1007/978-0-387-31296-5_2

DASTI, J. I. Zika virus infections: An overview of current scenario. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 7, p. 621–625, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.05.010>

DE CASTRO, C. M. et al. Electrochemical and morphologic studies of nickel incorporation on graphite electrodes modified with polytyramine. **Journal of Materials Science**, v. 43, n. 2, p. 475–482, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10853-007-1880-7>

DE VASCONCELOS, C. L.; PEREIRA, M. R.; FONSECA, J. L. C. Polyelectrolytes in solution and the stabilization of colloids. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 1, p. 59–70, 2005. <https://doi.org/10.1081/DIS-200040170>

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4)

DITLBACHER, H. et al. Spectrally coded optical data storage by metal nanoparticles. **Optics Letters**, v. 25, n. 8, p. 563–565, 2000.

<https://doi.org/10.1364/OL.25.000563>

DOĞAN, H. Ö. EKINCI, D.; DEMIR, Ü.. Atomic scale imaging and spectroscopic characterization of electrochemically reduced graphene oxide. **Surface Science**, v. 611, p. 54–59, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.susc.2013.01.014>

DOTY, R. C. et al. Extremely Stable Water-Soluble Ag Nanoparticles. **Chem. Mater**, v. 17, n. 18, p. 4630–4635, 2005. <https://doi.org/10.1021/cm0508017>

DU, M. et al. Fabrication of DNA/graphene/polyaniline nanocomplex for label-free voltammetric detection of DNA hybridization. **Talanta**, v. 88, p. 439–444, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.10.054>

EPELBOIN, Y. et al. Zika virus: An updated review of competent or naturally infected mosquitoes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1–22, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005933>

EUSTIS, S.; EL-SAYED, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. **Chem. Soc. Rev**, v. 35, n. 3, p. 209–217, 2006. <https://doi.org/10.1039/B514191E>

FAYE, O. et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002636>

FELIX, F. S.; ANGNES, L.. Electrochemical immunosensors – A powerful tool for analytical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, p. 470–478, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.029>

FILIP, J.; TKAC, J. Is graphene worth using in biofuel cells? **Electrochimica Acta**, v. 136, p. 340–354, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.05.119>

FONSECA, K. et al. Case report: First case of Zika virus infection in a returning Canadian traveler. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 5, p. 1035–1038, 2014. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0151>

FRENS, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. **Nature Physical Science**, v. 241, n. 105, p. 20– 22, 1973. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>

DICK, G. W. A. et al. Epidemiological Notes on Some Viruses Isolated in Uganda. **Public Health**, v. 41, n. 1, p. 119, 1952.

GAO, F. et al. Electrochemically reduced graphene modified carbon ionic liquid electrode for the sensitive sensing of rutin. **Thin Solid Films**, v. 520, n. 15, p. 5064– 5069, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2012.03.002>

GAO, M. et al. Analysis of Electrochemical Reduction Process of Graphene Oxide and its Electrochemical Behavior. **Electroanalysis**, v. 28, n. 6, p. 1377–1382, 2016. <https://doi.org/10.1002/elan.201501063>

GAO, W. The chemistry of graphene oxide. **Graphene Oxide: Reduction Recipes, Spectroscopy, and Applications**, p. 61–95, 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-319-15500-5_3

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 5, p. 345–359, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00312-8](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00312-8)

GRIESHABER, D. et al. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, v. 8, n. 12, p. 1400–1458, 2008. <https://doi.org/10.3390/s80314000>

GUILBAULT, G. G.; MONTALVO, J. G. A Urea-Specific Enzyme Electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, n. 8, p. 2164–2165, 1969. <https://doi.org/10.1021/ja01036a083>

GUO, H. et al. A Green Approach to the Synthesis of Graphene Nanosheets. **ACS Nano**, v. 3, n. 9, p. 2653–2659, 2009. <https://doi.org/10.1021/nn900227d>

GURUNATHAN, S. et al. Microbial reduction of graphene oxide by Escherichia coli : A green chemistry approach. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 772–777, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.09.011>

HAMMOND, J. L. et al. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. **Essays In Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 69–80, 2016. <https://doi.org/10.1042/EBC20150008>

HARRIS, D. Quantitative Chemical Analysis: W. H. Freeman and Company, v. 42, 2007.

HEINZE, J. Electrochemistry of conducting polymers. **Synthetic Metals**, v. 43, n. 1–2, p. 2805–2823, 1991. [https://doi.org/10.1016/0379-6779\(91\)91183-B](https://doi.org/10.1016/0379-6779(91)91183-B)

HILDER, M. et al. Direct electro-deposition of graphene from aqueous suspensions w. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 13, p. 9187–9193, 2011. <https://doi.org/10.1039/c1cp20173e>

JAIN, P. K. et al. Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. **Plasmonics**, v. 2, n. 3, p. 107–118, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11468-007-9031-1>

KADEN, H. Geschichte der pH-Glaselektrode und der pH-Messtechnik History of the pH glass electrode and the electrometric pH measurement. **tm - Technisches Messen**, v. 77, n. 3, p. 129–139, 2010. <https://doi.org/10.1524/teme.2010.0048>

KARUNAKARAN, C.; RAJKUMAR, R.; BHARGAVA, K. Introduction to Biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, p. 1–68, 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00001-3>

KHUDAISH, E. A. et al. Electrochemical oxidation of chlorpheniramine at polytyramine film doped with ruthenium (II) complex: Measurement, kinetic and thermodynamic studies. **Electrochimica Acta**, v. 135, p. 319–326, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.05.029>

KIM, J. et al. Plastic chip based magnetophoretic immunoassay for point-of-care diagnosis of tuberculosis Plastic chip based magnetophoretic immunoassay for point-of-care diagnosis of tuberculosis. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, p. 23489–23497, 2016. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b06924>

KISSINGER, P. T.; LAFAYETTE, W.; HEINEMAN, W. R. Cyclic voltammetry. **J. Chem. Educ.**, v. 60, n. 9, p. 702–706, 1983. <https://doi.org/10.1021/ed060p702>

KLASE, Z. A. et al. Zika Fetal Neuropathogenesis: Etiology of a Viral Syndrome. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1–32, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004877>

KREIBIG, U.; VOLLMER, M. Optical Properties of Metal Clusters. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 25, p. 6098–6098, 1995.

<https://doi.org/10.1007/978-3-662-09109-8>

KURAMITZ, H. et al. Electrochemical oxidation of bisphenol A. Application to the removal of bisphenol A using a carbon fiber electrode. **Chemosphere**, v. 45, n. 1, p. 37–43, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00032-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00032-7)

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287>

LANDRY, M. L.; ST. GEORGE, K. Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection.

Archives of Pathology & Laboratory Medicine, v. 141, n. 1, p. 60–67, 2017.

<https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0406-SA>

LANGER, R.; WEISSLEDER, R. Nanotechnology. **JAMA**, v. 313, n. 2, p. 135–136, 2015.

<https://doi.org/10.1001/jama.2014.16315>

LATHROP, E. et al. The Zika Contraception Access Network: A feasibility programme to increase access to contraception in Puerto Rico during the 2016-17 Zika virus outbreak.

The Lancet Public Health, v. 3, n. 2, p. 91–99, 2018. [https://doi.org/10.1016/S2468-](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(18)30001-X)

[2667\(18\)30001-X](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(18)30001-X)

LEE, J. et al. Binary Nanoparticle-graphene Hybrid Structure-based Highly Sensitive Biosensing Platform for Norovirus-like Particle Detection Binary Nanoparticle- graphene Hybrid Structure-based Highly Sensitive Biosensing Platform for Norovirus-like Particle Detection. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, p. 27298–27304, 2017.

<https://doi.org/10.1021/acsami.7b07012>

LEI, Y.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Microbial biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 568, n. 1–2, p. 200–210, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.065>

LIU, C. et al. Direct Electrodeposition of Graphene Enabling the One- Step Synthesis of Graphene – Metal Nanocomposite Films. **Small**, n. 9, p. 1203–1206, 2011.

<https://doi.org/10.1002/smll.201002340>

LOH, K. P. et al. Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications.

Nature Chemistry, v. 2, n. 12, p. 1015–1024, 2010. <https://doi.org/10.1038/nchem.907>

LUCARELLI, F. et al. Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 6, p. 515– 530, 2004.

[https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00256-2](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00256-2)

MACNAMARA, F. N. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(54\)90006-1](https://doi.org/10.1016/0035-9203(54)90006-1)

MAHATO, K. et al. Shifting paradigm of cancer diagnoses in clinically relevant samples based on miniaturized electrochemical nanobiosensors and microfluidic devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 100, p. 411–428, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.09.003>

MARCHETTE, N. J.; GARCIA, R.; RUDNICK, A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, n. 3, p. 411–415, 1969. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1969.18.411>

MARCO, M. P.; BARCELÓ, D. Environmental applications of analytical biosensors. **Measurement Science and Technology**, v. 7, n. 11, p. 1547–1562, 1996. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/7/11/002>

MAYALL, R. M. et al. An electrochemical lipopolysaccharide sensor based on an immobilized Toll-Like Receptor-4. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 794–801, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.009>

MCALLISTER, M. J. et al. Expansion of Graphite. **Society**, v. 19, n. 4, p. 4396–4404, 2007. <https://doi.org/10.1021/cm0630800>

MEHROTRA, P. Biosensors and their applications - A review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, n. 2, p. 153–159, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>

MESSINA, J. P. et al. Mapping global environmental suitability for Zika virus. **eLife**, v. 5, p. 1–19, 2016. <http://doi.org/10.7554/eLife.15272>

MOHANTY, S. P. Biosensors : A Tutorial Review Biosensors : A Tutorial Review. **IEEE Potentials**, v. 25, p. 35–40, 2015. <https://doi.org/10.1109/MP.2006.1649009>

MONOŠÍK, R. STREĎANSKÝ, M.; ŠTURDÍK, E. Biosensors - classification, characterization and new trends. **Acta Chimica Slovaca**, v. 5, n. 1, p. 109–120, 2012. <https://doi.org/10.2478/v10188-012-0017-z>

MUHAMMAD-TAHIR, Z.; ALOCILJA, E. C. A conductometric biosensor for biosecurity. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, n. 5–6, p. 813–819, 2003.

[https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00020-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00020-4)

MUNOZ-JORDAN, J. L. Diagnosis of Zika Virus Infections: Challenges and Opportunities. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, p. 951–956, 2017.

<https://doi.org/10.1093/infdis/jix502>

MUSSO, D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1887–1889, 2015.

<https://doi.org/10.3201/eid2110.151125>

OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome-- case report, French Polynesia, December 2013. **Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 19, n. 9, p. 7–9, 2014. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720>

OLIVEIRA, D. A. et al. Application of nanomaterials for the electrical and optical detection of the hepatitis B virus. **Analytical Biochemistry**, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.03.023>

OLIVEIRA, O. N. et al. Nanomaterials for Diagnosis: Challenges and Applications in Smart Devices Based on Molecular Recognition. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 6, n. 17, p. 14745–14766, 2014. <https://doi.org/10.1021/am5015056>

OSTERYOUNG, J. A.; OSTERYOUNG, R. A. Square wave voltammetry. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 101–110, 1985. <https://doi.org/10.1021/ac00279a004>

PADDLE, B. M. Biosensors for chemical and biological agents of defence interest. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 11, n. 11, p. 1079–1113, 1996.

[https://doi.org/10.1016/0956-5663\(96\)82333-5](https://doi.org/10.1016/0956-5663(96)82333-5)

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Zika cases and congenital syndrome associated with Zika virus reported by countries and territories in the Americas, 2015-2018. Cumulated cases. Data as of 04 January 2018. **Pan American Health Organization**, p. 2016, 2018.

PANJAN, P.; VIRTANEN, V.; SESAY, A. M. Determination of stability characteristics for electrochemical biosensors via thermally accelerated ageing. **Talanta**, v. 170, p. 331–336, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.011>

PARK, S.; RUOFF, R. S. Chemical methods for the production of graphenes.

Nature Nanotechnology, v. 4, n. 4, p. 217–224, 2009.

<https://doi.org/10.1038/nnano.2009.58>

PEI, S.; CHENG, H. M. The reduction of graphene oxide. **Carbon**, v. 50, n. 9, p. 3210–3228, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.11.010>

PENG, H. et al. Conducting polymers for electrochemical DNA sensing. **Biomaterials**, v. 30, n. 11, p. 2132–2148, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.065>

POND, W. L. Arthropod-borne virus antibodies in sera from residents of South-East Asia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 5, p. 364–371, 1963. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(63\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(63)90100-7)

RENNEBERG, R. et al. Frieder scheller and the short history of biosensors. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 109, p. 1–18, 2007. https://doi.org/10.1007/10_2007_086

RODOVALHO, V. R. **Desenvolvimento de bioeletrodos para detecção da Proteína C Reativa e do gene MYCN**, Universidade Federal de Uberlândia - Monografia defendida no curso de Bacharelado em Biotecnologia, Cidade: Uberlândia, 64 fls, 2014.

RODUNER, E. Size matters: why nanomaterials are different. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 7, p. 583, 2006. <https://doi.org/10.1039/b502142c>

ROWLEY-NEALE, S. J. et al. An overview of recent applications of reduced graphene oxide as a basis of electroanalytical sensing platforms. **Applied Materials Today**, v. 10, p. 218–226, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2017.11.010>

SABALZA, M. et al. Detection of Zika virus using reverse-transcription LAMP coupled with reverse dot blot analysis in saliva. **Plos One**, v. 13, n. 2, p. 192398, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192398>

SANTIAGO, G. A. et al. Performance of the Triplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03772-1>

SHAO, Y. et al. Facile and controllable electrochemical reduction of graphene oxide and its applications. **J. Mater. Chem.**, v. 20, n. 4, p. 743–748, 2010. <https://doi.org/10.1039/B917975E>

SHAWKY, S. M. et al. Gold aggregating gold: A novel nanoparticle biosensor approach

for the direct quantification of hepatitis C virus RNA in clinical samples. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 92, p. 349–356, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.001>

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. B. 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. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. Fundamentos de Química Analítica, v. 58, p. 374, 2005.

TAMBO, E. et al. Addressing knowledge gaps in molecular, sero-surveillance and monitoring approaches on Zika epidemics and other arbovirus co-infections: A structured review. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 2, n. 2, p. 50–60, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2017.01.001>

THEVENOT, D. R. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification (Technical Report). **Pure Applied Chemistry**, v. 71, n. 12, p. 2333– 2348, 1999. <https://doi.org/10.1351/pac199971122333>

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

TOMBELLI, S. et al. A DNA-based piezoelectric biosensor: Strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices. **Talanta**, v. 68, n. 3, p. 806–812, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.06.007>

TONG, S. et al. Nanomedicine: Tiny particles and machines give huge gains. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 42, n. 2, p. 243-259, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10439-013-0952-x>

TURKEVICH, J. Colloidal gold. Part II. **Gold Bulletin**, v. 18, n. 4, p. 125–131, 1995. <https://doi.org/10.1007/BF03214694>

UMAR, L. et al. Application of Algae-Biosensor for Environmental Monitoring. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc**, p. 7099–7102, 2015. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2015.7320028>

VAINIO, E. J. et al. ICTV virus taxonomy profile: Partitiviridae. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 1, p. 17–18, 2018. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000985>

- VELASCO-GARCIA, M. N. Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 20, n. 1, p. 27–33, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.01.013>
- VILELA, D.; GONZÁLEZ, M. C.; ESCARPA, A. Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation : Chemical creativity behind the assay . A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 751, p. 24–43, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.08.043>
- VO-DINH, T.; CULLUM, B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 366, n. 6–7, p. 540–551, 2000. <https://doi.org/10.1007/s002160051549>
- WALLER, D. F. et al. Rapid Detection of Bacillus anthracis Spores Using Immunomagnetic Separation and Amperometry. **Biosensors**, v. 6, n. 61, p. 2–9, 2016. <https://doi.org/10.3390/bios6040061>
- WEAVER, S. C. et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control: **Elsevier Ltd**, v. 130, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.03.010>
- WHO. Zika virus outbreaks in the Americas. Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations, v. 90, n. 45, p. 609–610, 2015.
- YOO, S. M.; LEE, S. Y. Optical Biosensors for the Detection of Pathogenic Microorganisms. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 7–25, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.09.012>
- YU, P. et al. Fluorescent metallic nanoclusters: Electron dynamics, structure, and applications. **Particle and Particle Systems Characterization**, v. 32, n. 2, p.142–153, 2015. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201400040>