



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

**Desenvolvimento e caracterização de um novo nanocompósito baseado em
ácido de grafeno e nanopartículas de cobre aplicado em biossensor
eletroquímico na detecção do vírus Zika**

Aluna: Lida Natalia Parra Gelves

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

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

**UBERLÂNDIA - MG
2023**



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

**Desenvolvimento e caracterização de um novo nanocompósito baseado em
ácido de grafeno e nanopartículas de cobre aplicado em biossensor
eletroquímico na detecção do vírus Zika**

Aluna: Lida Natalia Parra Gelves

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Graci Brito Madurro

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

**UBERLÂNDIA - MG
2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico/PPGGB.				
Data:	Trinta de Março de dois mil e vinte e três	Hora de início:	15:50h	Hora de encerramento:	16:20h
Matrícula do Discente:	12022GBI008				
Nome do Discente:	Lida Natalia Parra Gelves				
Título do Trabalho:	Desenvolvimento e caracterização de um novo nanocompósito baseado em ácido de grafeno e nanopartículas de cobre aplicado em biossensor eletroquímico na detecção do vírus Zika.				
Área de concentração:	Bioquímica.				
Linha de pesquisa:	Nanobiotecnologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Biossensores para diagnóstico point-of-care do vírus Zika.				

Aos trinta dias do mês de março de dois mil e vinte e três, às 15:50 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma Cisco Webex, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: João Marcos Madurro (Orientador), José Luís Roperro Vega e Lizandra Ferreira de Almeida Borges. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). João Marcos Madurro apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor (a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(A) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Jose Luis Ropero-Vega, Usuário Externo**, em 31/03/2023, às 00:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Marcos Madurro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/03/2023, às 11:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lizandra Ferreira de Almeida e Borges, Usuário Externo**, em 31/03/2023, às 11:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4314667** e o código CRC **33018A36**.



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

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

G321
2023 Gelves, Lida Natalia Parra, 1997-
Desenvolvimento e caracterização de um novo nanocompósito baseado em ácido de grafeno e nanopartículas de cobre aplicado em biossensor eletroquímico na detecção do vírus Zika [recurso eletrônico] / Lida Natalia Parra Gelves. - 2023.

Orientador: João Marcos Madurro.
Coorientadora: Ana Graci Brito Madurro.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.148>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Madurro, João Marcos, 1961-, (Orient.).
II. Madurro, Ana Graci Brito, 1967-, (Coorient.). III.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



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

**Desenvolvimento e caracterização de um novo nanocompósito baseado em
ácido de grafeno e nanopartículas de cobre aplicado em biossensor
eletroquímico na detecção do vírus Zika**

ALUNA: Lida Natalia Parra Gelves

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. João Marcos Madurro (Orientador)

Examinadores:

Dr. José Luís Roperro Vega

Dra. Lizandra Ferreira de Almeida Borges

Data da Defesa: 30 /03 /2023.

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

Prof. Dr. João Marcos Madurro

Dedico este trabajo a mi madre, Ana Virginia Gelves y, mi padre,
Joaquín Ángel Parra, mi polo a tierra y quien me cuida desde el cielo
junto a Dios.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Ana Virginia Gelves e Joaquín Ángel Parra, por serem os principais promotores dos meus sonhos, por acreditar e confiar em mim, por sua constante compreensão e apoio incondicional ao longo da minha vida, pois, do contrário, nada disso teria sido possível.

Aos meus irmãos Joaquín, Fabio e Cristian, que me ouviram e apoiaram em muitas decisões da minha vida pessoal e profissional. Eles são meu grande orgulho como irmãos e meu exemplo a seguir.

A busca pelo avanço científico e tecnológico é um esforço coletivo e tenho uma grande rede de mentores, colegas e amigos que desempenharam papéis cruciais na conclusão desta pesquisa. Quero agradecer aos meus orientadores, Prof. Dr. João Marcos Madurro e Prof^a. Dra. Ana Graci Brito Madurro, pela paciente orientação e constante encorajamento. Eles me ensinaram não apenas conhecimento técnico, mas também como pensar criticamente, analiticamente e cientificamente. Olhando para trás nos meus anos como estudante de formatura, sou grata por esta maravilhosa oportunidade que me permitiu crescer no conhecimento e no caráter. As lições mais importantes que aprendi durante esse período não foram detalhes eletroquímicos ou técnicas de laboratório ou mesmo relacionadas à ciência, eram lições de resiliência, perseverança, motivação, autoconfiança, humildade e graça.

Aos meus colegas da LAFIP-NANOTEC/BIOSENS: Anna Clara, José Augusto, José Manuel, Luiz Fernando e Jéssica, pelos grandes momentos de aprendizado e apoio moral.

À Dr. José Luis Roperó e à Prof^a. Dra. Lizandra Ferreira de Almeida Borges, membros da banca, que cordialmente aceitaram meu convite.

À Universidade Federal de Uberlândia, ao Instituto de Genética e Bioquímica e ao Instituto de Química, pelo espaço físico disponibilizado e por todo apoio técnico-administrativo.

Agradeço aos órgãos de fomento, CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	viii
APRESENTAÇÃO	01
CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	04
1. Virus Zika (ZIKV)	04
1.1 ZIKA: Estrutura e genoma	07
1.2 Patogênese do ZIKV	09
1.3 Manifestações clínicas associadas à infecção pelo ZIKV	12
1.4 Mecanismos de transmissão do ZIKV	13
1.4.1 Transmissão vetorial do ZIKV	14
1.4.2 Transmissão não vetorial	15
1.4.2.1 Transmissão sexual	15
1.4.2.2 Transmissão materno fetal	15
1.4.2.3 Transmissão por fluidos corporais	16
1.5 Diagnóstico	17
2. Biossensores	18
2.1 Definição e classificação	18
2.2 Biossensores eletroquímicos	21
3. Nanomateriais para biossensores: Nanobiossensores	25
3.1 Nanocompósitos	27
3.2 Grafeno e seus derivados	27
3.2.1 Ácido de grafeno	29
3.3 Nanopartículas metálicas: Cobre	30
CAPÍTULO II - FABRICAÇÃO DE NANOCOMPÓSITO DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE E ÁCIDO DE GRAFENO PARA APLICAÇÃO EM BIOCENSORES ELETROQUÍMICOS	40
RESUMO	41

ABSTRACT

42

ABREVIATURAS

ZIKV: Zika vírus (Virus Zika)

DENV: Dengue virus (vírus da dengue)

GBS: Síndrome de Guillain-Barré

ADEM: Encefalomielite disseminada aguda

OMS: Organização Mundial de Saúde

DNA: Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

RNA: Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)

RNAg: RNA genômico

NCR: Non Coding Region (região não codificante)

NS: Non estructural (não-estrutural)

ORF: Open Region Frame (região de leitura aberta)

C: Capsídeo

prM: Proteína precursora

E: Proteína do envelope

Kb: Kilobase

kDa: Kilodalton

NPCs: Células progenitoras neurais

FDA: Food and Drug Administration

RT-LAMP: Loop de transcrição reversa

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

TMA: Amplificação mediada por transcrição

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

WE: Eletrodo de trabalho

RE: Eletrodo de referência

CE: Contraeletrodo

I: Corrente faradáica

IP: Corrente de pico

IPA: Corrente de pico anódico

IPC: Corrente de pico catódico

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

LD: Limite de Detecção

SPE: Eletrodos *screen-printed*

VC: voltametria cíclica

VDP: voltametria de pulso diferencial

nm: nanômetros

OG: Óxido de Grafeno

OGr: Óxido de Grafeno reduzido

AG: Ácido de grafeno

CuNps: Copper nanoparticles (nanopartículas de cobre)

APRESENTAÇÃO

O vírus Zika é o foco de uma pandemia contínua e emergência de saúde pública. Inicialmente limitado a casos esporádicos na África e na Ásia em 2007, no entanto, o aparecimento do vírus Zika no Brasil em 2015 anunciou uma rápida disseminação pelo continente americano, colocando-o em destaque devido às sérias complicações neurológicas relatadas.

Em 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou o ZIKV uma emergência de saúde pública internacional devido ao aumento desproporcional de casos de infecção pelo vírus Zika na América Central e do Sul, bem como as ligações entre a infecção pelo ZIKV e malformações congênitas, incluindo microcefalia e neurológicas condições como a síndrome de Guillain-Barré (GBS), uma condição neurológica mediada pelo sistema imunológico.

A OMS concluiu que a infecção pelo vírus Zika durante a gravidez pode fazer com que os bebês nasçam com microcefalia e outras malformações congênitas, conhecidas como síndrome do Zika congênita, além de estar associada a outras complicações da gravidez, como parto prematuro e aborto espontâneo.

Em 2022, a Organização Mundial da Saúde informou que foram identificados um total de 89 países e territórios com evidências documentadas de transmissão indígena do vírus Zika por mosquitos.

Existem diferentes métodos de diagnóstico laboratorial usados atualmente para a detecção do vírus Zika: análise molecular, detecção sorológica de anticorpos anti-ZIKV e isolamento viral. A primeira técnica baseia-se na detecção do material viral por meio do RNA do RT-PCR em tempo real (reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcriptase reversa). No entanto, existem limitações associadas ao seu uso, bem como elevados requisitos de equipamentos e pessoal treinado.

No método sorológico, ao detectar anticorpos anti-ZIKV, existe uma desvantagem potencial, uma vez que os anticorpos podem apresentar reação cruzada com outros flavivírus, como o vírus da dengue e o vírus Chikungunya, ambos prevalentes em regiões tropicais com maior índice de infecção.

Em relação à metodologia diagnóstica mais recente, uma cultura viral leva muito tempo para se obter um resultado verdadeiro, o que dificulta o diagnóstico nos sistemas de saúde. Portanto, considerando os problemas potenciais dos métodos discutidos, há uma necessidade urgente de novos testes diagnósticos rápidos, simples e sensíveis para o ZIKV.

Neste contexto, os desenvolvimentos atuais no domínio da nanobiotecnologia têm conduzido à criação de novas metodologias benéficas para o sistema de saúde nas áreas da vigilância da saúde e do diagnóstico médico.

Entre elas estão os biossensores, os quais são ferramentas versáteis para a detecção de biomarcadores, que têm se destacado no setor comercial e de pesquisa como uma alternativa que oferece diagnósticos avançados devido a diferentes características vantajosas que incluem alta seletividade, sensibilidade, baixo custo de produção, respostas rápidas e capacidade de detecção em tempo real sendo, portanto, uma plataforma atraente para uma variedade de aplicações em diagnóstico clínico.

Os biossensores foram desenvolvidos principalmente com foco na miniaturização por meio do uso de novos materiais. Entre os nanomateriais usados para fabricação de biossensores, os conformados à base de carbono são promissores, pois exibem propriedades eletrônicas excepcionais, dando-lhes a capacidade de obter melhores sinais de corrente em várias aplicações de detecção.

Nanocompósitos à base de grafeno ou derivados de grafeno e nanopartículas metálicas depositadas na superfície de eletrodos têm sido explorados para biossensores devido à sua excelente biocompatibilidade, alta área de superfície e conjugação seletiva de sítio com biomoléculas.

A presente pesquisa descreve o desenvolvimento e caracterização de um novo nanocompósito baseado em ácido de grafeno e nanopartículas de cobre aplicado em biossensor de DNA para a detecção do vírus Zika.

Essa dissertação foi preparada conforme as normas estabelecidas pelo Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia. A dissertação é composta pelo Capítulo I e II.

O Capítulo I traz a fundamentação teórica, apresentada por uma revisão bibliográfica que aborda os temas do vírus Zika e os nanomateriais para biossensores como plataformas de detecção de doenças.

O Capítulo II é composto por um documento de depósito de patente, o qual está na fase de revisão.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. Virus Zika (ZIKV)

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus que apresenta genoma de RNA de fita simples de polaridade positiva, capaz de replicação imediatamente após a entrada celular. O vírus Zika é pertencente à família de vírus *Flaviviridae*, membro do gênero *Flavivirus* e, filogeneticamente, está relacionado a vários outros vírus de importância clínica, incluindo o vírus do Nilo Ocidental (WNV), vírus da febre amarela (YFV) e vírus da dengue (DENV), todos os quais foram associados à transmissão por mosquitos (FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019; HOSSEIN, 2020; MARTINS; MEDRONHO; CUNHA, 2021).

Ao longo do surgimento do vírus Zika, diferentes vias de transmissão foram documentadas, principalmente associadas ao mecanismo de transmissão pela picada do mosquito do gênero *Aedes* infectado, denominado transmissão vertical. O ZIKV é transmitido por várias espécies de mosquitos, incluindo *Aedes africanus*, *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* e *Ae. Hensilli* (FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019; MARTÍN-ACEBES; SAIZ, 2019; VERMISOGLU et al., 2020).

Outras vias de transmissão incluem todo tipo de fluido, como transfusão de sangue, transmissão pré-natal, por via sexual ZIKV, causaram uma taxa mais alta de disseminação (GORSHKOV et al., 2019; RASMUSSEN; JAMIESON, 2020; GIRALDO; GONZALEZ-OROZCO; RAJSBAUM, 2023).

O vírus Zika é o foco de uma epidemia e emergência de saúde pública. O ZIKV foi identificado pela primeira vez em 1947 em Uganda, onde foi isolado de um macaco rhesus sentinela. Tempos depois, o ZIKV foi isolado de mosquitos *Aedes africanus*. Inicialmente limitado a casos humanos esporádicos na África e na Ásia entre 1964 e 2007, sem grandes consequências para a saúde.

O primeiro surto de ZIKV causador da doença foi relatado na Micronésia em 2007 e em 2013, um surto foi relatado na Polinésia Francesa, que posteriormente se espalhou para várias ilhas do Pacífico (WHO, 2022).

O aparecimento do vírus Zika no Brasil em 2015 anunciou uma rápida disseminação pelo continente americano, colocando-o em destaque devido às

sérias complicações neurológicas relatadas (KAZMI et al., 2020; EINSPIELER; MARSCHIK, 2021).

Em 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou o ZIKV uma emergência de saúde pública internacional devido ao aumento desproporcional de casos de infecção pelo vírus Zika na América Central e do Sul, bem como as ligações entre a infecção pelo ZIKV e malformações congênitas, incluindo microcefalia e, a síndrome de Guillain-Barré (GBS), uma condição neurológica mediada pelo sistema imunológico (POMAR et al., 2019; MASMEJAN et al., 2020).

A OMS concluiu que a infecção pelo vírus Zika durante a gravidez pode fazer com que os bebês nasçam com microcefalia e outras malformações congênitas, conhecidas como síndrome do Zika congênita, além de estar associada a outras complicações da gravidez, como parto prematuro e aborto espontâneo. Na atualidade, a proporção de recém-nascidos afetados de mães infectadas com o vírus Zika durante a gravidez não foi estabelecida com certeza (WHO, 2022; (EINSPIELER; MARSCHIK, 2021).

Em 2018, 86 países e territórios tinham evidências de transmissão do vírus Zika e mais de 500.000 casos suspeitos foram notificados na América Latina e no Caribe. Assim, no mesmo ano as estimativas publicadas variaram de 6% dos bebês nascidos de mulheres com e sem sintomas de possível infecção pelo vírus Zika nos Estados Unidos da América (EUA) a 42% dos bebês nascidos de mulheres com sintomas de erupção cutânea durante a gravidez no Brasil (WHO, 2022).

Um relatório atualizado sobre a epidemiologia global da transmissão do vírus Zika foi publicado pela Organização Mundial da Saúde em fevereiro de 2022. Os dados relatados pela OMS abrangem até dezembro de 2021, onde foram identificados um total de 89 países e territórios com evidências documentadas de transmissão indígena do vírus Zika por mosquitos. Dois países foram adicionados neste último relatório; a França foi adicionada após o relatório de transmissão indígena reconhecida no final de 2019, e o Quênia foi adicionado após publicações recentes documentarem fortes evidências laboratoriais de transmissão indígena anterior (WHO, 2022).

Existem três linhagens reconhecidas do vírus Zika (linhagem africana, linhagem asiática e linhagem americana), mostradas na Figura 1 e caracterizadas por mutações chave pré-epidêmicas e pós-epidêmicas, por meio de estudos de filogenia (GUTIÉRREZ-BUGALLO et al., 2019).

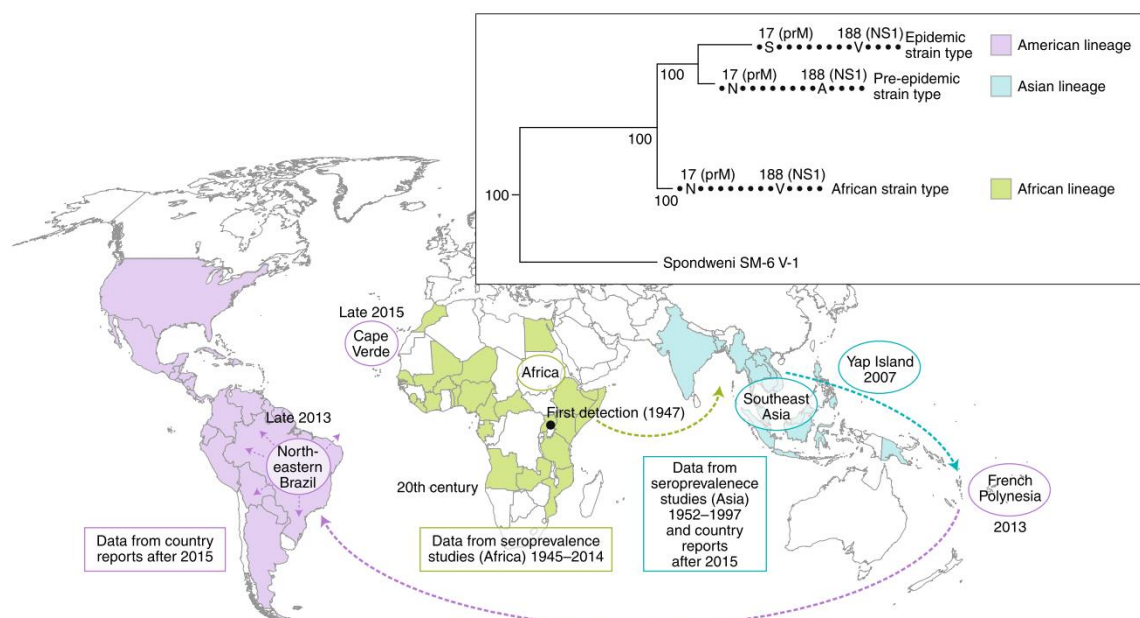


Figura 1. Linhagens reconhecidas do vírus Zika: linhagem africana, verde; linhagem asiática, azul e linhagem americana, roxa (GUTIÉRREZ-BUGALLO et al., 2019).

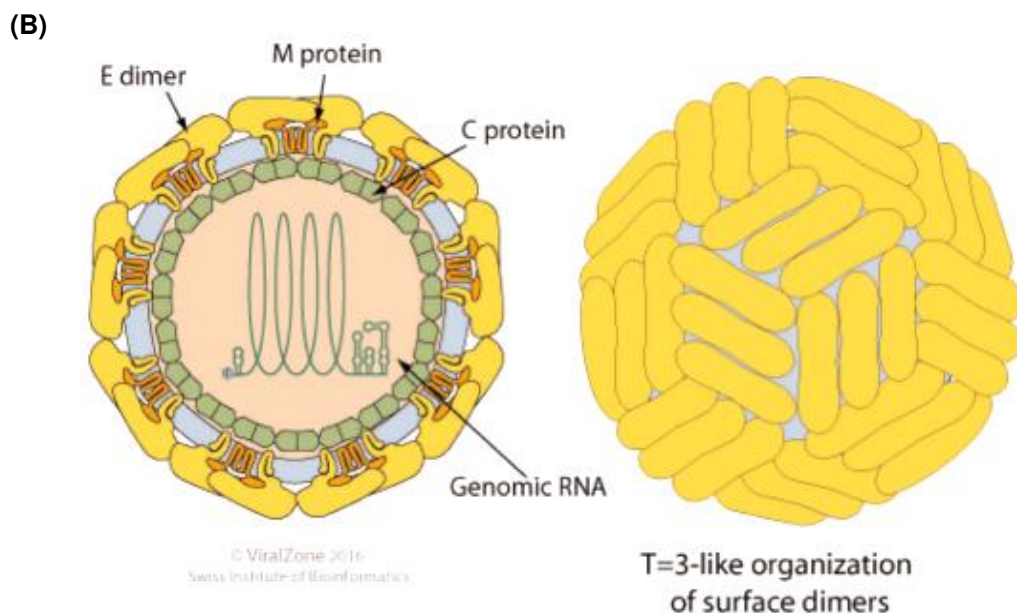
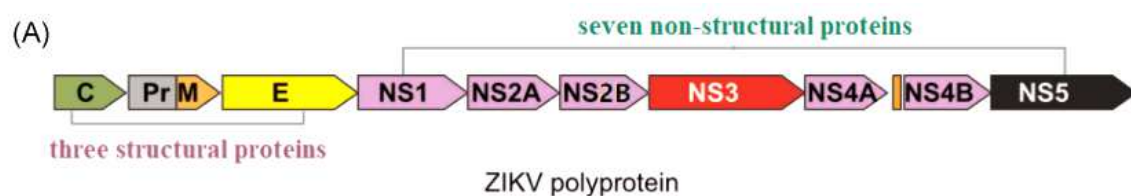
A Tabela 1 identifica os países e territórios com transmissão atual ou anterior do vírus Zika (WHO, 2022).

Tabela 1 . Países e territórios com transmissão atual ou anterior do vírus Zika (WHO, 2022).

WHO Regional Office	Country / territory	Total
AFRO	Angola; Burkina Faso; Burundi; Cabo Verde; Cameroon; Central African Republic; Côte d'Ivoire; Ethiopia; Gabon; Guinea-Bissau; Kenya; Nigeria; Senegal; Uganda	14
AMRO/PAHO	Anguilla; Antigua and Barbuda; Argentina; Aruba; Bahamas; Barbados; Belize; Bolivia (Plurinational State of); Bonaire, Sint Eustatius and Saba; Brazil; British Virgin Islands; Cayman Islands; Colombia; Costa Rica; Cuba; Curaçao; Dominica; Dominican Republic; Ecuador; El Salvador; French Guiana; Grenada; Guadeloupe; Guatemala; Guyana; Haiti; Honduras; Easter Island– Chile; Jamaica; Martinique; Mexico; Montserrat; Nicaragua; Panama; Paraguay; Peru; Puerto Rico; Saint Barthélemy; Saint Kitts and Nevis; Saint Lucia; Saint Martin; Saint Vincent and the Grenadines; Saint Maarten; Suriname; Trinidad and Tobago; Turks and Caicos; United States of America; United States Virgin Islands; Venezuela (Bolivarian Republic of)	49
SEARO	Bangladesh; India; Indonesia; Maldives; Myanmar; Thailand	6
WPRO	American Samoa; Cambodia; Cook Islands; Fiji; French Polynesia; Lao People's Democratic Republic; Marshall Islands; Malaysia; Micronesia (Federated States of); New Caledonia; Palau; Papua New Guinea; Philippines; Samoa; Singapore; Solomon Islands; Tonga; Vanuatu; Viet Nam	19
EURO	France (Var department)	1
Total		89

1.1 ZIKA: Estrutura e genoma

O comprimento do genoma do ZIKV é de 10.794 kb, codificando 3.419 aminoácidos, e compreende uma molécula de RNA de fita simples de sentido positivo que possui um único quadro de leitura aberta (ORF - *Open Region Frame*) longo flanqueado por duas regiões não codificantes (5' e 3' NCR – *Non Coding Region*) (Giraldo *et al.*, 2023). O ORF codifica para todos os componentes estruturais e não estruturais do ZIKV, incluindo uma poliproteína, que é clivada na proteína do capsídeo (C), proteína precursora (prM), proteína do envelope (E) e 7 proteínas não estruturais (NS - *Non Structural*) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 2) (ZHANG *et al.*, 2021).



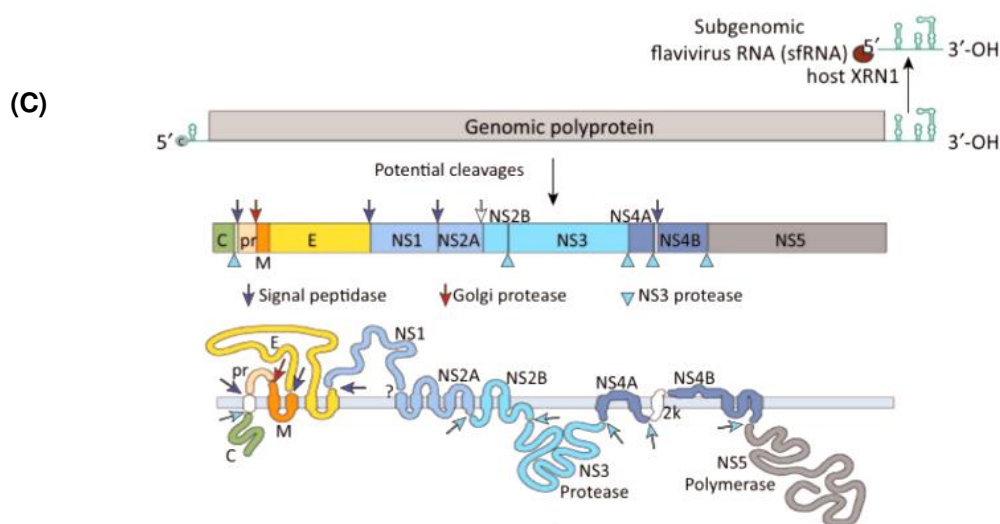


Figura 2. (A) Poliproteínas do ZIKV, incluindo três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais. (B) Vírions do ZIKV. (imagens modificadas de ViralZone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics). (C) Expressão do genoma do ZIKV (ZHANG et al., 2021).

A Figura 2A mostra as proteínas do vírion, sendo que a proteína E é a principal proteína de superfície e desempenha um papel importante em várias características do ciclo viral: fusão das membranas por meio de endocitose mediada por receptor, principalmente por meio da família de receptores de lectina do tipo C da célula hospedeira e na mediação da união (ZHANG et al., 2021)..

O prM evita a fusão prematura e a proteína C facilita o empacotamento do genoma do ZIKV nas partículas do vírus (BHARDWAJ et al., 2021; ZHANG et al., 2021).

As sete proteínas não estruturais desempenham um papel fundamental na regulação da replicação e transcrição viral juntamente com a ativação das respostas antivirais do hospedeiro (KAZMI et al., 2020; ZHANG et al., 2021).

A NS1 é uma proteína altamente imunogênica e conservada do gênero flavivírus, envolvida na replicação viral, evasão imune do hospedeiro e quebra das barreiras do tecido sanguíneo (BHARDWAJ et al., 2021).

A proteína não estrutural NS2A está envolvida na replicação do RNA viral e na evasão imune (ZHANG et al., 2019).

A proteína NS3 é uma helicase de RNA que está associada a NS2B e NS4A. Foi relatado que as proteínas NS4A e NS4B (27 kDa) bloqueiam a neurogênese e promovem a autofagia (GIRALDO; GONZALEZ-OROZCO; RAJSBAUM, 2023).

A maior proteína viral cuja porção C-terminal possui atividade de RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) é a proteína NS5, sendo uma metiltransferase que participa da síntese e modificação do RNA viral (BHARDWAJ et al., 2021; GIRALDO; GONZALEZ-OROZCO; RAJSBAUM, 2023).

A Figura 2B mostra que os vírions do ZIKV são envelopados esféricos. Eles possuem aproximadamente 50 nm de diâmetro e as proteínas prM/M e E de superfície estão dispostas em uma simetria tipo icosaédrica $T = 3$ (ZHANG et al., 2021).

1.2 Patogênese do ZIKV

A capacidade de evadir a resposta imune inata e adaptativa para infectar com eficiência diferentes células e tecidos faz parte das características relevantes que o vírus Zika possui para causar patologia. Embora estudos significativos tenham sido feitos para entender a patogênese da infecção pelo ZIKV, há poucas informações porque envolve interações complexas entre fatores virais e do hospedeiro e muito ainda precisa ser esclarecido (ZHANG et al., 2021; RAJSBAUM, 2023).

Diferentes estudos têm se baseado no entendimento dos mecanismos moleculares da interação vírus-hospedeiro, sendo estudados tanto *in vitro* quanto *in vivo*, nos quais múltiplos mecanismos de patogênese têm sido propostos que podem envolver o ZIKV, seja por amortecimento de uma resposta antiviral efetiva que leva ao aumento da replicação ou indiretamente induzindo imunopatologia devido a resposta imune desregulada (RASMUSSEN; JAMIESON, 2020; JAYACHANDRAN; CHANDA; BALAMURALI, 2021).

Com base na transmissão vetorial, a infecção pelo ZIKV começa com uma picada de mosquito de uma pessoa infectada pelo ZIKV. A replicação viral ocorre nas células epiteliais do intestino médio do mosquito e continua até as glândulas salivares. Após um período de incubação de 10 dias, o mosquito pode transmitir o vírus através da saliva infectada (JAYACHANDRAN; CHANDA; BALAMURALI, 2021).

Quando o mosquito infectado pelo ZIKV transmite o vírus aos humanos por meio de uma picada, o ZIKV infecta e se replica nas células dendríticas,

espalhando-se pelo sangue para outras partes do corpo humano (MWALIKO et al., 2021; GIRALDO; GONZALEZ-OROZCO; RAJSBAUM, 2023).

O vírus Zika primeiro se liga a receptores celulares que são específicos para diferentes flavivírus. Nesse sentido, alguns receptores foram propostos em estudos de cultura de células, incluindo membros do receptor ZIKV: DC-SIGN (molécula de adesão intracelular específica de células dendríticas) e proteínas receptoras de fosfatidilserina: TYRO 3, AXL, TIM e TAM. A proteína AXL é provavelmente uma das mais estudadas em células e *in vitro* e tem sido proposta como uma forte candidata a receptor para ZIKV, uma vez que parece desempenhar um papel importante na patogênese viral (VUE & TANG, 2021; RAJSBAUM, 2023).

Esses receptores facilitam a entrada e a infecção do ZIKV em macrófagos, monócitos, células progenitoras neurais (NPCs) e células fetais, desempenhando funções importantes como adesão, migração, replicação e evasão do sistema imunológico, liberação de citocinas e vias de sinalização de antígenos (KAZMI et al., 2020).

Estudos determinaram que a inativação dos receptores não resulta em proteção total contra a infecção viral porque flavivírus diferentes usam receptores diferentes para entrar (GIRALDO; GONZALEZ-OROZCO; RAJSBAUM, 2023).

Um dos aspectos mais intrigantes da patogênese do ZIKV é sua característica única de causar defeitos embrionários (efeitos teratogênicos) após a infecção do vírus em mulheres grávidas, e, também, sua associação com microcefalia (Mulkey *et al.*, 2020). Uma possível explicação é a capacidade do ZIKV de infectar células progenitoras neurais e causar apoptose celular. Foi relatado que, em mulheres grávidas, a infecção viral se estende por um período mais longo à medida que as células da placenta e as células dos tecidos reprodutivos são infectadas e se espalha no embrião, resultando na replicação do vírus no cérebro fetal por meses com efeitos crescentes durante os primeiros meses de gravidez (BHARDWAJ et al., 2021).

Esses estudos deixam clara a preferência do ZIKV em infectar células neurais no embrião em desenvolvimento, porém, ainda não está tão claro quais são os mecanismos moleculares que conferem ao ZIKV a preferência única por esses tecidos. A expressão específica de tecidos de receptores celulares

necessários para a internalização do ZIKV foi proposta como uma possível explicação para esse evento, mas até o momento não foi claramente demonstrado que um único receptor principal ou específico seja necessário para a entrada do ZIKV, ao menos em condições fisiológicas. Da mesma forma, deve-se levar em consideração a possibilidade de que diferentes fatores do hospedeiro desempenhem um papel essencial na determinação do tropismo do ZIKV e até contribuam para a persistência do ZIKV no organismo (GIRALDO; GONZALEZ-OROZCO; RAJSBAUM, 2023).

Outro aspecto interessante do ZIKV é que pode ser transmitido por contato sexual, e o RNA do ZIKV pode ser encontrado no sêmen de homens por vários meses após o início da infecção, indicando persistência no sistema reprodutor masculino e possível disseminação do vírus por via sexual (ABUSHOUK; NEGIDA; AHMED, 2016; RASMUSSEN; JAMIESON, 2020).

Essas características foram evidenciadas em diferentes estudos experimentais nos quais camundongos imunodeficientes mostraram que o ZIKV tem a capacidade de infectar uma ampla variedade de células pertencentes ao tecido reprodutor masculino, entre as quais estão as células epiteliais luminais, as células de Sertoli, as células de Leydig, espermatogônias, espermátocitos primários e células mióides peritubulares das espermatogônias (ZHANG et al., 2021).

Em humanos, vários estudos para entender a causa da transmissão para a mãe e o subsequente efeito teratogênico mostraram que o ZIKV também pode infectar células somáticas e germinativas. Alguns modelos animais foram capazes de fornecer evidências adicionais de que o ZIKV, no trato reprodutivo feminino, pode infectar o colo do útero e o tecido vaginal e, assim, infectar o embrião durante a gravidez (MULKEY et al., 2020; RASMUSSEN; JAMIESON, 2020).

É importante ressaltar que estudos em modelos de camundongos forneceram informações sobre infecção subcutânea ou intravaginal com ZIKV, revelando que a infecção por ZIKV pode proteger contra o desafio intravaginal secundário devido à presença de altos níveis de anticorpos neutralizantes e células T específicas do ZIKV. A transferência passiva de anticorpos específicos ou células T também reduziu a infecção intravaginal, sugerindo que uma resposta

imune adaptativa pode proteger contra infecções vaginais sexualmente transmissíveis (GIRALDO; GONZALEZ-OROZCO; RAJSBAUM, 2023).

1.3 Manifestações clínicas associadas à infecção pelo ZIKV

Desde que a primeira infecção humana pelo ZIKV foi relatada em 1952, os sintomas da infecção foram assintomáticos ou levemente sintomáticos, com dor de cabeça, febre baixa, dores musculares/articulares e conjuntivite mais comumente presentes (BHARDWAJ et al., 2021).

Os sintomas da infecção por ZIKV se desenvolvem em 3 a 5 dias com o aumento da temperatura do paciente infectado e, subsequentemente, desenvolvem uma erupção cutânea maculopapular (ALAM et al., 2021a).

Devido à rápida disseminação do ZIKV pelo mundo, os sintomas tornaram-se diversos e, na epidemia em países como a Polinésia e o Brasil, foram relatadas diferentes manifestações neurológicas associadas ao ZIKV, incluindo síndrome de Guillain Barré (GBS), mielite transversa, meningoencefalite, encefalomielite disseminada aguda (ADEM) (TAVAKOLI et al., 2017), levantando grandes preocupações sobre a patogenicidade do ZIKV.

GBS é uma doença autoimune que afeta o sistema nervoso periférico e causa fraqueza muscular e paralisia. Uma possível explicação apresentada é que os anticorpos neutralizantes produzidos contra o ZIKV têm como alvo os glicolipídios presentes nos nervos periféricos, induzindo lesões da mielina ou das membranas axonais levando à polineuropatia desmielinizante inflamatória (PATTNAIK; SAHOO; PATTNAIK, 2020; ALAM et al., 2021a; MARTINS; MEDRONHO; CUNHA, 2021).

Conforme relatado por Keshavarz *et al.*, 2016, a ressonância magnética mostrou danos aos nervos cranianos, cone medular, raízes nervosas da cauda equina e gânglios espinhais lombares. Mais pesquisas são necessárias para melhor caracterizar o mecanismo de resposta imune envolvido no desenvolvimento de GBS associado à infecção por ZIKV.

A encefalomielite disseminada aguda é uma doença inflamatória que afeta o sistema nervoso central, alterando principalmente a substância branca do cérebro e da medula espinhal. Perda de visão, fraqueza, dormência e perda de

equilíbrio foram relatados em pacientes com ADEM induzida por ZIKV (BASILE; KOK; DWYER, 2017; NOORBAKHS et al., 2019).

Estudos imunohistoquímicos de pacientes infectados suportam a presença de antígenos virais na região cerebelar (BARROS et al., 2019). Foi relatado que o ZIKV tem como alvo preferencial o centro de memória do cérebro, inibindo a potencialização de longo prazo do hipocampo (BHARDWAJ et al., 2021).

Outros sintomas relatados entre pacientes infectados pelo ZIKV incluem polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda e neuropatia axonal motora aguda (PATTNAIK; SAHOO; PATTNAIK, 2020).

1.4 Mecanismos de transmissão do ZIKV

O ZIKV é um vírus transmitido principalmente pelo modo de transmissão vetorial, através da injeção de saliva infectante por meio da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti*. O ZIKV também pode ser transmitido por outras espécies do mesmo gênero, como *Aedes hensilli*, *Aedes polynesiensis* e *Aedes albopictus* (MCKENZIE; WILSON; ZOHDY, 2019; CHOUIN-CARNEIRO et al., 2020).

A transmissão não vetorial da infecção pelo ZIKV pode ocorrer com a transmissão de mãe para filho, por via sexual (tanto de indivíduos sintomáticos quanto assintomáticos), por transfusão, por meio de medula óssea ou transplante de órgãos (Figura 3) (MARTINS; MEDRONHO; CUNHA, 2021).

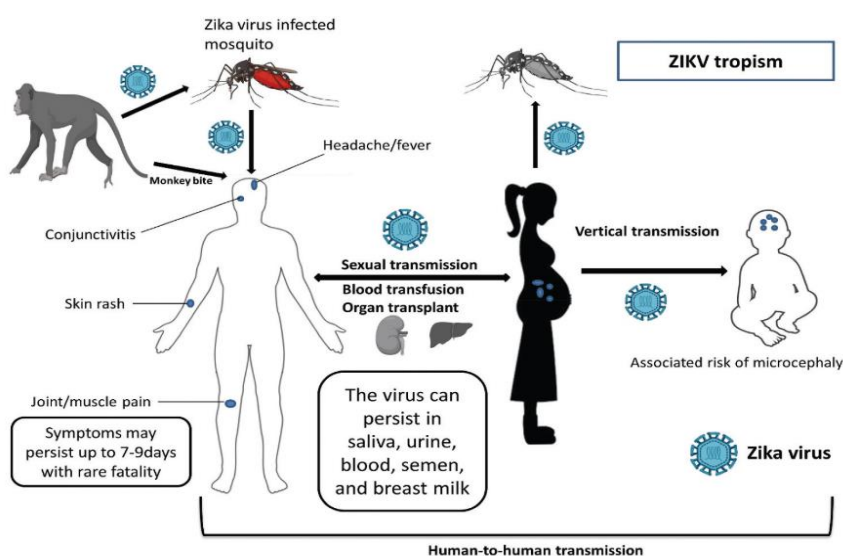


Figura 3. Biologia do vírus ZIKA, mostrando os modos de transmissão, tropismo e sintomas da doença associados ao ZIKV (MWALIKO et al., 2021).

Embora partículas infecciosas do ZIKV tenham sido detectadas em amostras de leite materno, a amamentação não foi confirmada como um modo de transmissão (MARBÁN-CASTRO et al., 2021).

1.4.1 Transmissão vetorial do ZIKV

Arbovírus é um termo geral usado para caracterizar centenas de vírus de RNA que dependem de artrópodes (mosquitos ou carrapatos) para começar a transmitir infecções aos humanos por meio da picada de artrópodes (insetos) infectados (HERRADA et al., 2018).

Assim como outros vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*, uma das formas de transmissão do ZIKV ao homem é pela picada de um mosquito infectado, predominantemente por *A. aegypti* e *A. albopictus*, sendo o primeiro o principal vetor encontrado em surtos epidêmicos globais (POMAR et al., 2019; GIRALDO; GONZALEZ-OROZCO; RAJSBAUM, 2023).

Com base em investigações adicionais da transmissão do ZIKV por meio de mosquitos infectados, o ZIKV foi isolado de dois países na África e na Ásia com linhagens conhecidas de ZIKV de várias espécies diferentes de mosquitos *Aedes*, incluindo: *A. aegypti*, *A. africanus*, *A. albopictus*, *A. apicoargenteus*, *A. furcifer*, *A. luteocephalus*, *A. opok* e *A. vittatus*) que podem potencialmente atuar como vetores de transmissão viral nessas áreas endêmicas (FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019; MASMEJAN et al., 2020).

Outros vírus que tiveram grande impacto na saúde humana e são transmitidos pelo *Aedes aegypti* são os quatro seguintes: vírus da febre amarela (YFV), dengue (DENV), chikungunya e ZIKV. O período de desenvolvimento dos mosquitos dura entre 5 a 8 dias desde a fase de ovo até as larvas e pupas, e mais 3 dias para se tornarem adultos (GUTIÉRREZ-BUGALLO et al., 2019).

Se o mosquito adulto morder um primata portador do ZIKV, é provável que a transmissão do vírus comece pelo sangue do animal e o mosquito continue a propagação do vírus causando surtos ou epidemias (YADAV; MOHITE, 2020).

1.4.2 Transmissão não vetorial

1.4.2.1 Transmissão sexual

A transmissão sexual do ZIKV tem sido relatada desde 2008 no Colorado, EUA, e esforços significativos têm sido feitos para explorar esse modo de transmissão. Desde este primeiro relatório, houve muito mais casos de ZIKV adquirido sexualmente em regiões não endêmicas (MASMEJAN et al., 2020).

O fator relevante desse tipo de transmissão do vírus é que, como o indivíduo infectado vem de áreas endêmicas e mantém relações sexuais com o parceiro, isso resulta no aumento dos casos de ZIKV.

Portanto, a saúde pública indica que a transmissão sexual pode surgir devido à rápida disseminação do ZIKV, que se espalhará para várias regiões geográficas do mundo, não excluindo como o efeito afetará a fertilidade e a segurança do banco de espermatozoides e óvulos (YADAV; MOHITE, 2020).

Por isso, em 2017 a Organização Mundial da Saúde (OMS) apresentou um plano para entender mais sobre a transmissão sexual do ZIKV e como combater a epidemia de ZIKV. Em particular, descobriu-se que o ZIKV infecta os testículos, detectando vestígios de RNA do ZIKV no fluido seminal (JAYACHANDRAN; CHANDA; BALAMURALI, 2021).

Curiosamente, o ZIKV é o primeiro arbovírus detectado no sêmen humano e pode ser transmitido sexualmente. Alguns relatos indicam que o RNA do ZIKV e a carga viral infecciosa podem ser detectados na urina e na saliva de pacientes infectados, portanto, devido às propriedades relacionadas ao comportamento relacionado à atividade sexual, era bastante difícil distinguir entre transmissão sexual e transmissão urinária/salivar (PATTNAIK; SAHOO; PATTNAIK, 2020).

1.4.2.2 Transmissão materno fetal

Existem amplas evidências que confirmam que mães infectadas pelo ZIKV podem transmitir o vírus para seus fetos durante a gravidez. Vários estudos demonstraram a capacidade do ZIKV de atravessar a placenta e infectar tecidos neurais de fetos, dada a detecção de RNA e antígenos do ZIKV na placenta, líquido amniótico e tecidos cerebrais de bebês (RASMUSSEN; JAMIESON, 2020).

Além disso, o ZIKV pode danificar a placenta humana e apresentar neurotropismo fetal significativo. De acordo com relatórios científicos usando

modelos de camundongos, foi relatado que a infecção pelo ZIKV poderia causar dano placentário e morte fetal durante a gravidez, o que corrobora as hipóteses sobre a transmissão transplacentária; confirmando a associação da infecção pelo ZIKV com distúrbios teratogênicos congênitos quando as mães foram infectadas pelo ZIKV durante a gravidez (GORSHKOV et al., 2019; RASMUSSEN; JAMIESON, 2020).

Casos mundialmente conhecidos e que suscitaram preocupação com a patogenicidade do vírus ocorreram no Brasil, onde gestantes infectadas relataram que seus bebês nascem com distúrbios teratogênicos congênitos, como a microcefalia. Da mesma forma, na Espanha, o ZIKV foi detectado no líquido amniótico de mulheres grávidas durante a 17ª semana de gravidez. A ultrassonografia revelou malformações fetais, como artrogripose e microcalcificações cerebrais (GIRALDO; GONZALEZ-OROZCO; RAJSBAUM, 2023).

Um resultado intrigante sobre o ZIKV foi a detecção de altas cargas de RNA e partículas virais no leite materno de mães infectadas. Com base nisso, o resultado indicou que a transmissão do ZIKV pode ocorrer da mãe para o bebê (MARBÁN-CASTRO et al., 2021).

No entanto, em estudos recentes foram avaliados dois casos de transmissão vertical do ZIKV, resultando na presença de RNA do ZIKV no leite materno e no soro das duas amostras. Por outro lado, quando o leite materno foi inoculado com células Vero, a replicação do ZIKV não pôde ser detectada, tornando a transmissão pelo leite materno incerta, mas plausível. Portanto, mais evidências são necessárias para apoiar a transmissão do ZIKV através do leite materno (MULKEY et al., 2020).

1.4.2.3 Transmissão por fluidos corporais

Testes de diagnóstico por RT-PCR revelaram a presença de RNA do ZIKV na urina, sangue, saliva e outros fluidos corporais, indicando possível transmissão por fluidos corporais (YADAV; MOHITE, 2020; BOERAS et al., 2022)

Na Polinésia Francesa, cerca de 3% dos doadores de sangue assintomáticos com RNA do ZIKV foram detectados durante um surto de ZIKV, levantando a possibilidade do risco potencial de transmissão do ZIKV por meio de

transfusões de sangue recebidas de pacientes infectados. Para resolver esse problema, a OMS emitiu diretrizes rígidas para doação/transusão de sangue em regiões onde o ZIKV era endêmico em fevereiro de 2016 (OMS, 2022). Da mesma forma, a Associação Americana de Bancos de Sangue tomou medidas preventivas para controlar a transmissão do vírus por meio de transusão de sangue, incluindo a inativação de patógenos e o teste de ácido nucleico (NAT) de hemoderivados (HOSSEIN, 2020).

Outros métodos para prevenir a transmissão do ZIKV através de transfusões de sangue foram aplicados. Um dos métodos foi a detecção do ZIKV no sangue doado por um teste simples, mas preciso, e outro foi evitar doações de sangue de pessoas infectadas em regiões endêmicas do ZIKV ou que viajaram para essas regiões (MCKENZIE; WILSON; ZOHDY, 2019).

No entanto, as estratégias de detecção e transmissão do ZIKV a partir do sangue doado requerem uma investigação mais aprofundada (BHARDWAJ et al., 2021).

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo ZIKV é desafiador, pois os sintomas se assemelham aos de outras infecções por flavivírus. A Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos aprovou até o momento 5 testes sorológicos e 14 testes moleculares para os quais amostras de saliva, urina e soro são coletadas de pacientes (NOORBAKHSH et al., 2019; BHARDWAJ et al., 2021).

A detecção do ZIKV pode ser realizada pela detecção dos componentes virais do ZIKV (proteínas virais, RNA ou isolado do vírus) ou pela medição da concentração de anticorpos contra as proteínas virais do ZIKV (resposta imune do hospedeiro) por meio de ensaios sorológicos (ALZATE et al., 2020; ZHANG et al., 2021).

Muitas estratégias foram desenvolvidas para a detecção do ZIKV, incluindo isolamento viral, ensaios sorológicos, ensaios moleculares e métodos de detecção (ALAM et al., 2021).

Além dessas metodologias para detectar o ZIKV, métodos mais avançados e complexos também foram desenvolvidos, como a amplificação isotérmica

mediada por *loop* de transcrição reversa (RT-LAMP), a tecnologia de amplificação mediada por transcrição (TMA), na invasão de filamentos de transcrição reversa (RT-SIBA), dispositivo bioplasmonico baseado em papel, amplificação isotérmica da polimerase recombinase de transcrição reversa, espectroscopia de infravermelho próximo, ensaio de detecção elétrica de lisado viral aprimorado por nanopartículas e imunoensaio de fluxo lateral fluorescente baseado em smartphone (PETERS; STEVENSON, 2019; ALAM et al., 2021a).

Dos testes aprovados pelo FDA, podemos citar: O teste de ácido nucléico (NAT), que é baseado em RT-PCR que utiliza sangue total ou soro para o diagnóstico de ZIKV. Isso é feito para pacientes com início dos sintomas ≤ 7 dias (AZAR; WEAVER, 2019; BHARDWAJ et al., 2021).

Para sintomas ≥ 7 dias, imunoensaios enzimáticos (EIAs), ensaios de imunofluorescência (IFAs) e ensaios de neutralização, como testes de neutralização por redução de placas (PRNTs), entre outros, são importantes ferramentas de diagnóstico sorológico (POMAR et al., 2019).

Em diagnóstico *in vitro*, a ferramenta de diagnóstico molecular padrão-ouro para ZIKV é PCR quantitativo de transcrição reversa (qRT-PCR), mas problemas de alto custo e portabilidade dificultam seu uso como ponto de atendimento (POC) durante programas de vigilância (MOÇO et al., 2019).

Alternativamente, amplificação mediada por loop de transcrição reversa (RT-LAMP) e cassete microfluídico são mais amplamente utilizados devido ao seu baixo custo e fácil manuseio logístico, no entanto, permanecem metodologias complexas e pessoal qualificado para realizar seu uso (SINGH et al., 2018).

Portanto, estratégias novas, rápidas, precisas e sensíveis para a detecção de ZIKV são urgentemente necessárias para prevenir e controlar efetivamente os surtos de ZIKV.

2 Biossensores

2.1 Definição e classificação

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), um biossensor é um dispositivo que converte um biorreconhecimento (ligação por afinidade, como entre um anticorpo e um antígeno) ou biocatalítico (uma reação

enzimática etc.) em uma análise sinal proporcional à concentração do alvo (IMRAN; AHMADI; KERMAN, 2021).

Os sensores são dispositivos usados para detectar a presença de uma substância específica de interesse ou para medir uma propriedade física, como temperatura, massa ou características elétricas ou ópticas, e produzir um sinal para registro ou processamento subsequente (NARESH; LEE, 2021).

Entre os principais componentes de um biossensor, pode ser encontrado: um analito, um biorreceptor, um transdutor, um processador de sinal e uma tela (HUANG; ZHU; KIANFAR, 2021)(Figura 4).

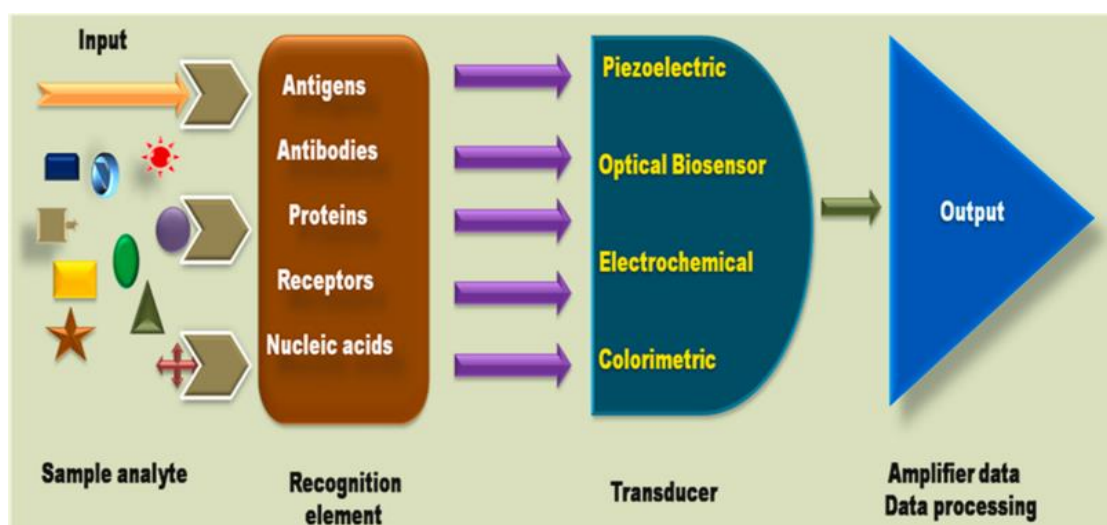


Figura 4. Princípio operacional de um biossensor e os componentes principais (I) analito da amostra (II) Elemento de reconhecimento (III) Transdutor (IV) Processamento de dados do amplificador (ALAM et al., 2021b).

O analito refere-se à molécula alvo que está sendo detectada, enquanto o receptor biológico é uma biomolécula (material genético) que se liga ao analito. O biorreceptor é geralmente imobilizado no transdutor que converte a energia do evento de biorreconhecimento em um sinal quantificável (LINO et al., 2022).

O processador de sinal condiciona o sinal, subtraindo o ruído e amplificando o sinal que pode ser exibido através de uma interface do usuário (DEMEKE TEKLEMARIAM et al., 2020).

A qualidade na operação dos biossensores é validada e refletida dependendo de seis propriedades: seletividade, faixa linear de resposta, sensibilidade, limite de detecção, reprodutibilidade e estabilidade (MAHBUB; HOQUE, 2020).

A seletividade, que se refere à capacidade do biorreceptor de distinguir o analito contra outros componentes da matriz. As concentrações analíticas que produzem uma mudança linear na resposta do sinal são definidas coletivamente como a faixa linear de resposta (RABBANI; HOQUE; BIN, 2020).

Outra característica importante é a sensibilidade do biossensor que se refere à inclinação dessa faixa linear ou à menor alteração na concentração do analito que estimula uma mudança de sinal. Relacionado à sensibilidade está o limite de detecção (LOD) ou a menor concentração de analito que pode ser detectada (RABBANI; HOQUE; BIN, 2020).

A reprodutibilidade é uma das características relevantes em um biossensor, referindo -se à capacidade de um biossensor de gerar a mesma resposta de sinal para a mesma concentração de analito em diferentes condições (KIM et al., 2022).

Finalmente, a estabilidade, que é interpretada como a consistência de um sinal em resposta a influências ambientais ou cinéticas, como a temperatura ou dissociação do analito unido (MAHBUB; HOQUE, 2020).

Os biossensores podem ser considerados como uma ferramenta de diagnóstico avançada que oferece diferentes características vantajosas para o monitoramento, como alta sensibilidade, especificidade, requerendo menos volume e menos experiência do operador (RABBANI; HOQUE; BIN, 2020).

Os biossensores são baseados em vários elementos de reconhecimento, como DNA, oligonucleotídeos, aptâmeros, antígenos, anticorpos, enzimas, células e tecidos. De acordo com estes, os biossensores são classificados como genossensores (DNA e oligonucleotídeos), aptassensores (aptâmeros) imunossensores (anticorpos e antígenos) e sensores enzimáticos (enzimas, células e tecidos) (SAYLAN et al., 2019; HUANG; ZHU; KIANFAR, 2021).

Os biossensores são muito diversos e podem ser classificados de acordo com o método de transdução. A maioria dos biossensores usa técnicas de transdução eletroquímica ou óptica, embora os biossensores acústicos também tenham sido relatados (KIM et al., 2022).

Entre os vários tipos de biossensores, os biossensores eletroquímicos são operados há vários anos em vários campos. Alguns já foram comercializados,

pois são relativamente fáceis de funcionalizar e relativamente baratos (LINO et al., 2022).

2.2 Biossensores eletroquímicos

A eletroquímica é o estudo do fluxo e transferência de elétrons entre espécies químicas e os fatores que afetam esse processo. Essa transferência de elétrons ocorre tipicamente como resultado de mudanças químicas envolvendo oxidação ou redução de espécies (DE EGUILAZ; CUMBA; FORSTER, 2020).

Essas reações são chamadas de reações redox, e cada metade da reação (oxidação ou redução) é chamada de "meia célula". O movimento e fluxo desses elétrons e cargas é chamado de corrente (MENON et al., 2020).

A reação química ocorrida consome íons ou elétrons, o que altera as propriedades elétricas (corrente ou tensão) da solução, e a mudança nas propriedades elétricas pode ser detectada como um sinal eletroquímico (CORDEIRO et al., 2021).

Esses sinais eletroquímicos podem ser quantitativamente relacionados à quantidade de analito. O sinal eletroquímico produzido devido a mudanças nas propriedades elétricas é a propriedade de transdução dos biossensores eletroquímicos (KHAN et al., 2020).

Os biossensores eletroquímicos geralmente usam a configuração de uma célula eletroquímica composta por três eletrodos; consistindo em um eletrodo de trabalho (WE), auxiliar (CE) e referência (RE) (GOUD et al., 2021), como está representado na Figura 5, com um modelo de eletrodos *screen-printed* (SPE).

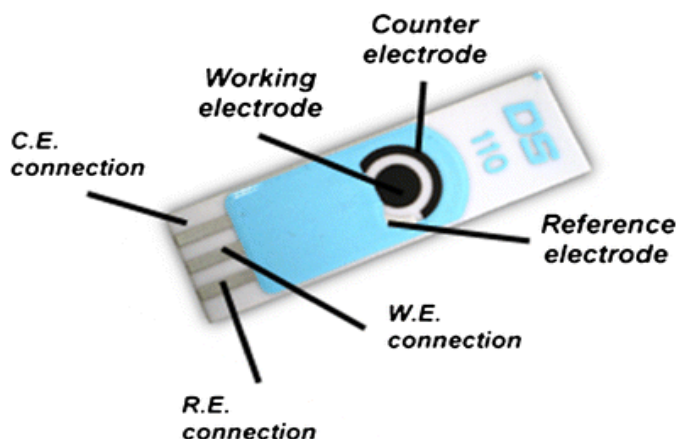


Figura 5. Modelo de eletrodo *Screen-printed* (SPE). Eletrodo de trabalho (WE), eletrodo de referência (RE), contraeletrodo (CE) (BARTON et al., 2016).

O eletrodo de trabalho é o eletrodo que aciona a reação eletroquímica de interesse aplicando um potencial relativo ao eletrodo de referência. O potencial refere-se à energia disponível do elétron que pode conduzir reações e a quantidade de trabalho necessária para mover uma carga de teste de um eletrodo para o outro (BARTON et al., 2016).

Fisicamente, a magnitude do potencial resulta da carga presente em excesso da quantidade de carga inata do material condutor. Isso é alimentado por uma fonte de energia externa que direciona os elétrons para dentro ou para fora de um eletrodo (ABDUL GHANI et al., 2022).

O eletrodo de trabalho geralmente é modificado com a biomolécula de interesse, que é específica do agente biológico para permitir a detecção das reações químicas produzidas (DE EGUILAZ; CUMBA; FORSTER, 2020).

Existem muitas técnicas diferentes que analisam tais processos e características eletroquímicas, mas a maioria dessas técnicas emprega equipamentos e princípios comuns (Figura 6).

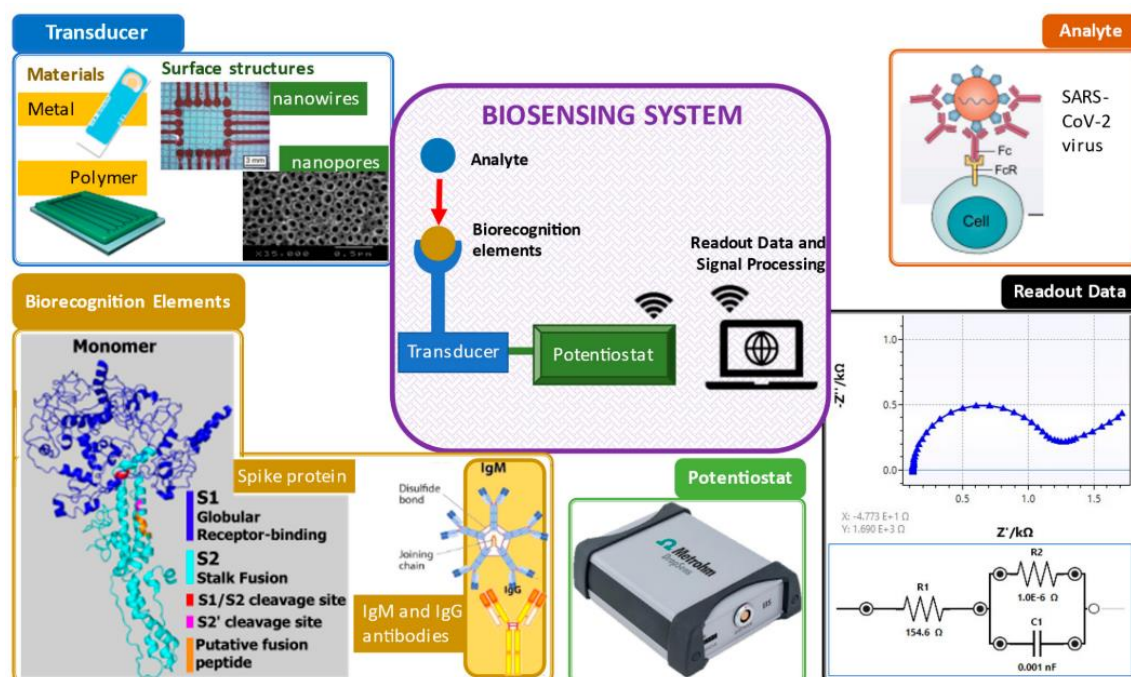


Figura 6. Elementos importantes em um sistema de biossensores eletroquímicos. No sentido horário do canto superior direito: analito, dados de leitura de espectroscopia de impedância eletroquímica, potenciostato, elementos de biorreconhecimento e suas estruturas de superfície (ABDUL GHANI et al., 2022).

Assim, a leitura eletroquímica é fornecida por meio de técnicas de voltametria, como amperometria, voltametria cíclica (CV), voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrada (SWV), usando dispositivos potenciométricos, bem como impedimétricos, usando espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) (PACHECO et al., 2013; ZHU et al., 2022).

Nos métodos interfaciais dinâmicos, o potencial eletroquímico da célula é controlado enquanto são realizadas medições de outras variáveis, entre as quais está a voltametria, na qual a corrente é medida em função do potencial elétrico.

Da mesma forma, é possível variar o sinal de excitação de potencial aplicado a um eletrodo de trabalho, variando também a resposta de corrente produzida. Técnicas como voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial estão relacionadas a uma forma de onda característica dependendo do sinal de excitação (ABDUL GHANI et al., 2022).

A técnica de voltametria cíclica é a técnica mais amplamente utilizada para adquirir informações qualitativas sobre processos eletroquímicos. A característica de fornecer rapidamente informações sobre a termodinâmica de processos redox, sobre a cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos de adsorção determinam a eficiência e relevância da técnica (AKIN et al., 2022).

O potencial de varredura da voltametria cíclica é configurado para ler o sinal no sentido direto ou reverso, ou seja, para regiões mais positivas (anódicas) e mais negativas (catódicas). A Figura 7 mostra uma representação esquemática da varredura de potencial de forma linear e escala, em relação ao tempo (E vs t) usando o potencial em forma de triângulo (PACHECO et al., 2013)..

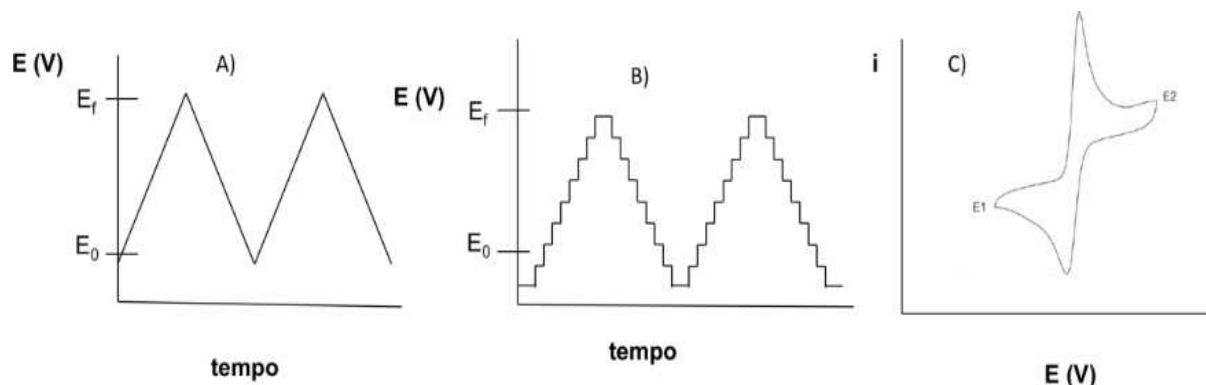


Figura 7. Aplicação do potencial para a voltametria cíclica: A) potencial com

varredura linear e B) potencial do tipo escada C) voltamograma obtido para um sistema reversível (PACHECO et al., 2013).

Durante a varredura de potencial, o potenciostato mede a corrente versus o potencial aplicado (I versus E) no eletrodo de trabalho. As reações de oxidação geradas na direção direta são reduzidas na direção reversa, gerando picos separados para a reação de oxidação e redução, respectivamente, cada uma caracterizada por um pico de potencial e corrente (HUANG; ZHU; KIANFAR, 2021). Portanto, a varredura de potencial em ambas as direções fornece informações sobre o comportamento eletroquímico das espécies geradas no eletrodo de trabalho.

Na técnica da voltametria de pulso diferencial, pulsos de potencial são aplicados na forma de pulsos de amplitude constante sobre um potencial de varredura crescente (RUIYI et al., 2022), conforme mostrado na Figura 8.

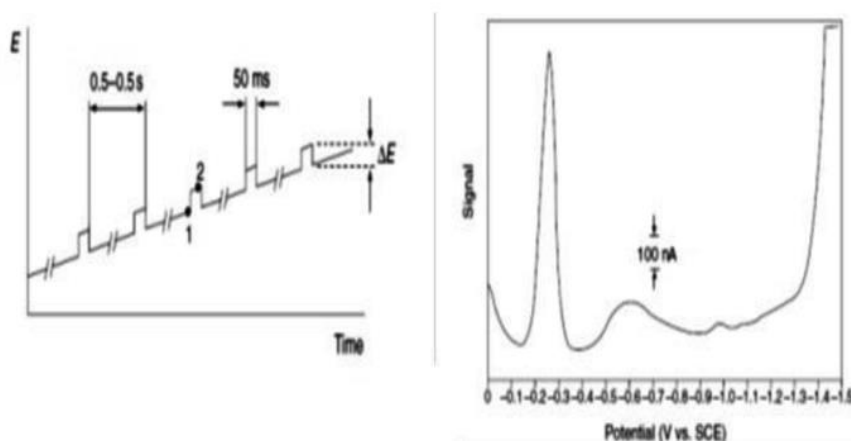


Figura 8. Gráfico de potencial-tempo (esquerda) e corrente-potencial (direita) em voltametria de pulso diferencial (HUANG; ZHU; KIANFAR, 2021).

A corrente para cada pulso é aplicada em dois estágios, antes e depois da aplicação do pulso e o diagrama de diferença dessas duas correntes é representado em termos de potencial. O gráfico resultante tem a forma de um pico. Medindo as duas correntes e subtraindo, é possível corrigir a corrente capacitiva (não faradaica) gerada (PACHECO et al., 2013).

Este método tem alta sensibilidade devido à remoção da corrente de fundo durante a operação de diferença e a forma de pico do padrão.

3 Nanomateriais para biossensores: Nanobiossensores

Do final dos anos 1990 ao início dos anos 2000, o uso da nanotecnologia para pesquisa de dispositivos de monitoramento biológico experimentou um crescimento explosivo (OLIVEIRA et al., 2018).

Os nanomateriais possuem várias características, como grande proporção de área de superfície por volume, bem como efeitos de tamanho quântico que dominam em nanoescala (WU et al., 2020).

Os efeitos de superfície, incluindo o aumento da tensão e elasticidade da superfície, ocorrem porque os átomos na superfície de um material têm menos parceiros de ligação do que suas contrapartes internas (MAHBUB; HOQUE, 2020).

Por esses motivos, os avanços da nanotecnologia nos últimos anos deram origem a novas técnicas e dispositivos de biossensoriamento. Assim, vários nanodispositivos têm gradualmente dado lugar à monitorização de diferentes elementos de interesse em várias áreas, incluindo biomedicina e biotecnologia, detecção de materiais tóxicos, purificação de água, indústria alimentar, eletrônica e optoeletrônica, medicina forense, entre outras (UKHUREBOR et al., 2022).

O termo "nanobiossensor" pode ser visto como resultado dos avanços da nanotecnologia utilizada para fins de biossensoriamento, levando à aplicação da detecção de sinais bioquímicos e biofísicos devido a uma doença específica em nível molecular ou celular (NARESH; LEE, 2021).

Em geral, os nanobiossensores são biossensores compostos por materiais que possuem suas dimensões em nanoescala. Os materiais em nanoescala apresentam propriedades únicas e inovadoras em comparação com seus equivalentes em maior escala (RABBANI; HOQUE; BIN, 2020).

Entre as características únicas dos nanomateriais podem ser encontradas: condutividade elétrica, características magnéticas, fotoemissão, calor, propriedades luminescentes e atividade catalítica (SHER et al., 2021).

O diagnóstico clínico, separação de amostras, amplificação de sinal e detecção de elementos de reconhecimento biológico são algumas das áreas nas quais as qualidades aprimoradas oferecidas pelos nanomateriais são aplicadas com sucesso (WU et al., 2020).

Além disso, os nanomateriais têm contribuído para aumentar a sensibilidade de diversos dispositivos de monitoramento para detectar atividades biológicas (KIM et al., 2022).

Os biossensores foram desenvolvidos principalmente com foco na miniaturização por meio do uso de novos materiais para fabricar sensores. Mais e mais pesquisas estão sendo feitas para melhorar os métodos atuais de nanofabricação, criar nanomateriais e desenvolver novos sensores usando as propriedades dos nanomateriais (EHTESABI, 2020).

As características dos vários biossensores/nanobiossensores baseiam-se principalmente na natureza dos nanomateriais utilizados nos mecanismos de detecção. As principais vantagens dos nanossensores incluem: velocidade de resposta, baixa quantidade de amostra necessária, robustez, capacidade de utilização em pontos de atendimento (portabilidade) e custo/benefício atrativo (EHTESABI, 2020; MAHBUB; HOQUE, 2020).

Diferentes dispositivos biossensores foram desenvolvidos utilizando nanoestruturas que alcançaram a industrialização comercial em todo o mundo. Da mesma forma, vários estudos propuseram dispositivos com grande potencial de aplicação, por exemplo, dispositivos amperométricos usados para a detecção enzimática de glicose (RABBANI; HOQUE; BIN, 2020; KAYA et al., 2021; SHER et al., 2021; AKIN et al., 2022).

Além disso, pontos quânticos e nanomateriais bioconjugados são usados como agentes de fluorescência para detectar a ligação de biomoléculas específicas e, além disso, para melhorar a detecção usando microscópios eletrônicos (NARESH; LEE, 2021; ZHU et al., 2022).

As nanopartículas de base metálica são materiais de destaque em aplicações eletrônicas e ópticas, usadas de forma eficiente para detectar sequências de ácidos nucleicos. As nanopartículas auxiliam na imobilização, permitem um melhor carregamento do analito e possuem boas propriedades catalíticas, além de apresentar biocompatibilidade com agentes biológicos (RABBANI; HOQUE; BIN, 2020).

A proposta de combinar as áreas da biologia com a eletrônica para tornar o sistema mais acessível, digital e projetar um sistema multiplexado em pequena escala é muito benéfica para o sistema de monitoramento biológico. Além disso,

os desenvolvimentos atuais no campo da nanotecnologia e suas aplicações na área biomédica levaram à expansão de novas técnicas nas áreas de diagnóstico médico, monitoramento de saúde, segurança alimentar, etc (NARESH; LEE, 2021).

A modificação posterior usando nanoestruturas de carbono e/ou metal aumenta a sensibilidade, melhorando a imobilização de elementos de reconhecimento ou a ligação de moléculas alvo devido ao aumento da área de superfície (UKHUREBOR et al., 2022).

Entre os nanomateriais usados para fabricar nanossensores, os nanomateriais à base de carbono são promissores, pois exibem propriedades eletrônicas excepcionais, dando-lhes a capacidade de obter melhores sinais em várias aplicações de detecção. Além de sua alta área superficial, os nanomateriais à base de carbono são materiais biocompatíveis e são vantajosos em termos de simplicidade, velocidade e sensibilidade (FAHMY et al., 2022).

3.1 Nanocompósitos

O termo "nanocompósito" foi definido como materiais heterogêneos (multifásicos), combinados uns com os outros em dimensões de nanoescala para obter as vantagens das propriedades individuais de seus constituintes e alcançar uma funcionalidade mais eficiente (OMANOVIĆ-MIKLIČANIN et al., 2020).

Nanocompósitos são materiais que podem exibir propriedades individuais, dependendo dos componentes, como propriedades mecânicas, químicas, elétricas, ópticas e catalíticas. As membranas de nanocompósitos fornecem tais condições para a penetração do componente desejado enquanto atuam como uma cortina preventiva contra outros componentes desfavoráveis (BUEHLER; MISRA, 2019).

Nanocompósitos à base de grafeno e nanopartículas metálicas depositadas na superfície de eletrodos têm sido explorados para biossensores devido à sua excelente biocompatibilidade, alta área de superfície e conjugação seletiva de sítio com biomoléculas (BUEHLER; MISRA, 2019; LEE et al., 2020).

3.2 Grafeno e seus derivados

O grafeno é um material formado por uma camada de átomos de carbono, frequentemente conhecido por sua estrutura de favo de mel 2D de camada única,

na qual ambas as superfícies estão disponíveis para adsorção de moléculas (VERMISOGLLOU et al., 2020).

O grafeno apresenta propriedades interessantes, pois é um material com alta resistência mecânica, condução eletrônica e térmica, além de ser quimicamente estável, forte e flexível (LEE et al., 2020).

Sua superfície é extraordinariamente grande ($2630 \text{ m}^2/\text{g}$), mesmo assim é um material leve (AKIN et al., 2022).

Estas propriedades mencionadas tornam este material adequado para muitas aplicações, desde a parte mecânica até a sua aplicação como material de biodeteção.

O uso do grafeno em várias aplicações de detecção com base em uma leitura eletroquímica foi demonstrado em muitos sensores práticos que funcionam como sensores químicos, sensores de gás e biossensores. (LI et al., 2017; LEE et al., 2020; ALHAZMI et al., 2021; AKIN et al., 2022).

O grafeno e seus derivados, como óxido de grafeno (GO), óxido de grafeno reduzido (GOr) e ácido de grafeno (AG), que contêm vários grupos funcionais de oxigênio (hidroxila, carboxila e grupos funcionais epóxi) (Figura 9) , surgiram para uso potencial em biossensores (MATHEW et al., 2020).

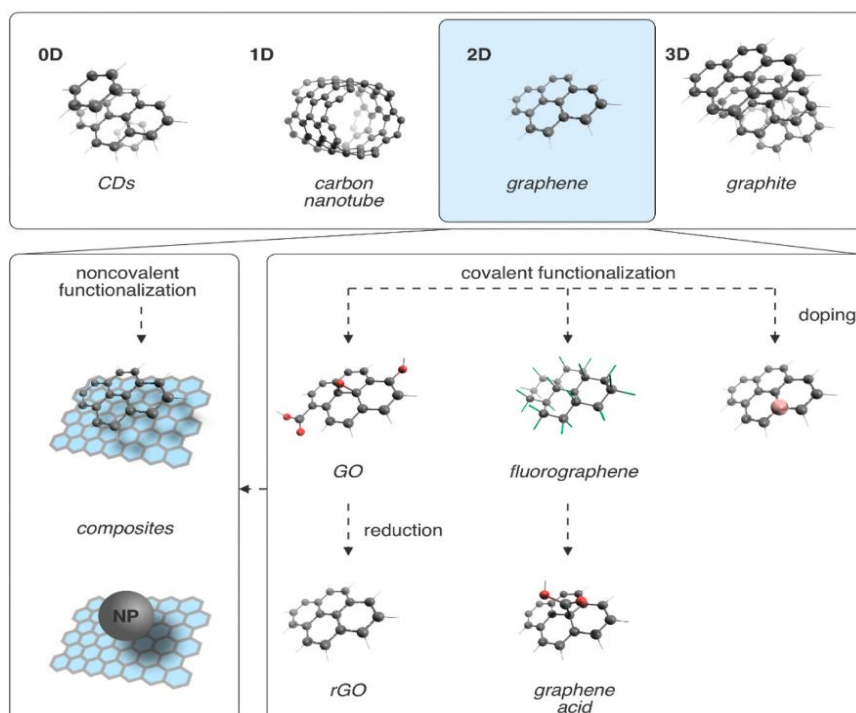


Figura 9. O painel superior mostra estruturas selecionadas de nanomateriais à base de carbono com suas dimensões formais e os painéis inferiores fornecem

uma visão geral da funcionalização do grafeno não covalente e covalente. CD (carbon dots), óxido de grafeno GO, GO reduzido rGO e nanopartícula NP. Os átomos de carbono são mostrados como bolas pretas e oxigênio como bolas vermelhas, átomos de hidrogênio e flúor como barras brancas e verdes, respectivamente (VERMISOGLOU et al., 2020).

A presença de grupos funcionais como hidroxila e carboxila na rede do grafeno tornam as folhas desses materiais de carbono fortemente hidrofílicas e permitem a integração com vários tipos de nanopartículas inorgânicas, incluindo metais nobres, óxidos metálicos, nanopartículas semicondutoras, quantum dots (QD) e nanoclusters (NC) para melhorar o desempenho de sensores baseados neles, o que é particularmente útil para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos (PUMERA; SOFER, 2017; LEE et al., 2020).

3.2.1 Ácido de grafeno (AG)

O ácido de grafeno é considerado um novo membro da família dos derivados do grafeno, apresentando composição próxima a $C_1(COOH)_1$, sendo o produto da oxidação dos grupos -OH do óxido de grafeno a grupos -COOH (REUILLARD et al., 2020) (Figura 10).

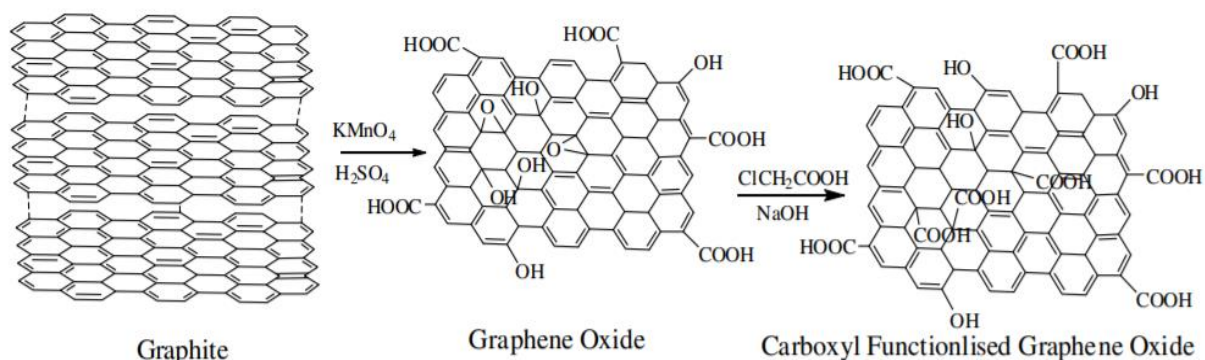


Figura 10. Funcionalização do óxido de grafeno (OG) com -COOH (PATEL et al., 2020).

O ácido de grafeno é um material com química bem definida, uma vez que ambos os lados do grafeno são densamente carregados por grupos carboxila (com um grau de funcionalização de ~15%) de forma homogênea ao longo da rede de carbono (BAKANDRITSOS et al., 2017; PUMERA; SOFER, 2017).

Devido ao fato de a superfície do ácido de grafeno ser rica em grupos funcionais de oxigênio (ácido carboxílico, carbonila, epóxido e hidroxila) e o aumento de grupos carboxila permitir a imobilização eficiente de qualquer tipo de biomoléculas, o que o expõe como um material atraente para aplicação em detecção eletroquímica (ALHAZMI et al., 2021).

Da mesma forma, o ácido de grafeno pode encontrar inúmeras aplicações nas áreas de bioquímica e biomedicina. Estudos mostraram que a composição e/ou grau de redução do grafeno/óxido de grafeno reduzido impacta muito o comportamento das biomoléculas ligadas a ele ou o caráter da própria ligação (EHTESEBI, 2020; ALHAZMI et al., 2021; FAHMY et al., 2022).

3.3 Nanopartículas metálicas: cobre

A nanotecnologia refere-se à pesquisa e desenvolvimento de tecnologia nas escalas atômica, molecular e macromolecular, levando à manipulação controlada e ao estudo de estruturas e dispositivos com escalas de comprimento na faixa de 1 a 100 nanômetros em uma dimensão (filmes finos), em duas dimensões (nanotubos, nanofios) ou em três dimensões (nanopartículas, pontos quânticos)(DIN; REHAN, 2017).

As propriedades dos nanomateriais oferecem a capacidade de interagir com funções biológicas complexas de novas maneiras, operando na própria escala das biomoléculas (FAHMY et al., 2022).

Muitos campos, como ciência biomédica, ciência da energia, óptica e magnetismo estão progredindo devido à aplicação de inovações nanotecnológicas. Na atualidade, vários nanomateriais estão sendo usados em sistemas de administração de medicamentos (antimicrobianos), biomarcação e sensores (UKHUREBOR et al., 2022).

As nanopartículas (NPs) são um material que apresenta todas as três dimensões na faixa da nanoescala, sendo de grande interesse para pesquisa, pois formam a ligação entre materiais *bulk* e estruturas moleculares ou atômicas. A relação área de superfície para volume é bastante grande em nanopartículas, dando-lhes uma grande força motriz para difusão em temperaturas mais altas, além de fascinante sensibilidade ultravioleta-visível, elétrica, catalítica, térmica e propriedades antibacterianas (MALEKZAD et al., 2017).

O pequeno tamanho de partícula, permite a presença de muitos átomos na superfície das nanopartículas. Dependendo da forma e tamanho das nanopartículas, variam fatores como área e volume e, portanto, sensibilidade e condutividade ultravioleta-visível (HASSANPOUR et al., 2018).

Outros fatores relevantes que podem variar devido à mudança na área de superfície da nanopartícula incluem níveis de energia eletrônica, afinidade eletrônica, transições eletrônicas, propriedades magnéticas, temperatura de transição de fase, ponto de fusão e afinidade com polímeros, biomoléculas e moléculas orgânicas (LUO et al., 2006; MALEKZAD et al., 2017).

Os efeitos quânticos são devidos à combinação de tamanho quântico e efeitos de carga Coulombica que conferem carga às nanopartículas (VEIGAS et al., 2012).

Devido a esses efeitos e sua natureza dependente do tamanho, as nanopartículas são usadas em catálise, detecção e geração de imagens. As nanopartículas metálicas têm desempenhado um papel importante no desenvolvimento de novos biossensores e/ou no aprimoramento de técnicas de monitoramento biológico existentes para atender a demanda por diagnósticos biomoleculares mais específicos e altamente sensíveis (MALEKZAD et al., 2017).

Graças às propriedades físico-químicas únicas de tais materiais metálicos em nanoescala, foi alcançado o desenvolvimento de uma ampla variedade de biossensores, tais como: nanobiossensores para diagnóstico de doenças no local de atendimento, nanossondas para detecção/imagem *in vivo*, monitoramento celular e monitoramento de doenças patogêneses e outros procedimentos que beneficiam a pesquisa científica (OLIVEIRA et al., 2018; DUARTE et al., 2021).

As nanopartículas representam uma das abordagens baseadas em nanotecnologia mais comuns para o desenvolvimento de biossensores, devido à sua simplicidade, maleabilidade físico-química e altas áreas de superfície (DUARTE et al., 2021).

Existem inúmeras técnicas para sintetizar NPs de metais nobres, incluindo métodos químicos como redução química, redução fotoquímica, coprecipitação, decomposição térmica, hidrólise, entre outros, e métodos físicos (deposição de vapor, ablação a laser, trituração etc.), a fim de obter nanopartículas homogêneas, permitir o controle sobre o tamanho, forma e propriedades da

superfície, a fim de aproveitar melhor suas propriedades físico-químicas únicas para biodetecção (VEIGAS et al., 2012; UKHUREBOR et al., 2022).

As nanopartículas à base de cobre vêm ganhando importância devido às suas aplicações em catálise, eletrônica impressa, sensores, entre outros. A síntese de nanopartículas de cobre com base em métodos químicos utiliza agentes redutores agressivos e solventes orgânicos (AMEH; SAYES, 2019).

A presença desses produtos químicos perigosos na superfície das nanopartículas aumenta o problema de toxicidade, enquanto o uso e descarte de solventes tóxicos desencadeia problemas ambientais. Para superar esses problemas, a síntese verde de nanopartículas tornou-se popular nos últimos anos. Muitas metodologias de síntese verde para nanopartículas de prata e ouro foram relatadas. No entanto, existem apenas alguns relatos disponíveis para a síntese verde de nanopartículas de cobre em que o ácido ascórbico, gomas vegetais, extratos vegetais e microrganismos foram usados como agentes redutores (DIN; REHAN, 2017; AMEH; SAYES, 2019; CHAKRABORTY et al., 2022).

REFERÊNCIAS

ABDUL GHANI, M. A. et al. Portable Electrochemical Biosensors Based on Microcontrollers for Detection of Viruses: A Review. *Biosensors*, v. 12, n. 8, 2022.

ABUSHOUK, A. I.; NEGIDA, A.; AHMED, H. An updated review of Zika virus. *Journal of Clinical Virology*, v. 84, p. 53–58, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2016.09.012>>.

AKIN, M. et al. Mobile device integrated graphene oxide quantum dots based electrochemical biosensor design for detection of miR-141 as a pancreatic cancer biomarker. *Electrochimica Acta*, v. 435, n. June, p. 141390, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2022.141390>>.

ALAM, M. A. et al. Diagnostic approaches for the rapid detection of Zika virus—A review. *Process Biochemistry*, v. 101, n. June 2020, p. 156–168, 2021b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.11.009>>.

ALHAZMI, H. A. et al. Graphene-based biosensors for disease theranostics: Development, applications, and recent advancements. *Nanotechnology Reviews*, v. 11, n. 1, p. 96–116, 2021.

ALZATE, D. et al. Genosensors for differential detection of Zika virus. *Talanta*, v. 210, p. 120648, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120648>>.

AMEH, T.; SAYES, C. M. The potential exposure and hazards of copper nanoparticles : A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 71, n. June, p. 103220, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103220>>.

AZAR, S. R.; WEAVER, S. C. Vector competence: What has Zika virus taught us? *Viruses*, v. 11, n. 9, p. 1–24, 2019.

BAKANDRITSOS, A. et al. Cyanographene and Graphene Acid: Emerging Derivatives Enabling High-Yield and Selective Functionalization of Graphene. *ACS Nano*, v. 11, n. 3, p. 2982–2991, 2017.

BARTON, J. et al. Screen-printed electrodes for environmental monitoring of heavy metal ions : a review. p. 503–517, 2016.

BASILE, K.; KOK, J.; DWYER, D. E. Zika virus: what, where from and where to? *Pathology*, v. 49, n. 7, p. 698–706, 2017.

BHARDWAJ, U. et al. Gist of Zika Virus pathogenesis. *Virology*, v. 560, n.

May, p. 86–95, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.04.008>>.

BOERAS, D. et al. Evaluation of Zika rapid tests as aids for clinical diagnosis and epidemic preparedness. *eClinicalMedicine*, v. 49, p. 101478, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101478>>.

BUEHLER, M. J.; MISRA, A. Mechanical behavior of nanocomposites. *MRS Bulletin*, v. 44, n. 1, p. 19–24, 2019.

CHAKRABORTY, N. et al. Green synthesis of copper/copper oxide nanoparticles and their applications: a review. *Green Chemistry Letters and Reviews*, v. 15, n. 1, p. 185–213, 2022.

CHOUIN-CARNEIRO, T. et al. Zika virus transmission by brazilian aedes aegypti and aedes albopictus is virus dose and temperature-dependent. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 9, p. 1–14, 2020.

CORDEIRO, T. A. R. et al. Electrochemical biosensors for neglected tropical diseases: A review. *Talanta*, v. 234, n. March, 2021.

DE EGUILAZ, M. R.; CUMBA, L. R.; FORSTER, R. J. Electrochemical detection of viruses and antibodies: A mini review. *Electrochemistry Communications*, v. 116, n. May, p. 106762, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.elecom.2020.106762>>.

DEMEKE TEKLEMARIAM, A. et al. Biosensor and molecular-based methods for the detection of human coronaviruses: A review. *Molecular and Cellular Probes*, v. 54, n. August, p. 101662, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101662>>.

DIN, M. I.; REHAN, R. Synthesis , Characterization , and Applications of Copper Nanoparticles. *Analytical Letters*, v. 50, n. 1, p. 50–62, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/00032719.2016.1172081>>.

DUARTE, J. L. et al. Nanotechnology as a tool for detection and treatment of arbovirus infections. *Acta Tropica*, v. 216, n. October 2020, 2021.

EHTESABI, H. Application of carbon nanomaterials in human virus detection. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, v. 5, n. 4, p. 436–450, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2020.09.005>>.

EINSPIELER, C.; MARSCHIK, P. B. Desideratum: a developmentalist view of Zika virus infection. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 21, n. 4, p. 444–445, 2021. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30454-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30454-0)>.

FAHMY, H. M. et al. Recent Progress in Graphene- and Related Carbon-Nanomaterial-based Electrochemical Biosensors for Early Disease Detection. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, v. 8, n. 3, p. 964–1000, 2022.

FERRARIS, P.; YSSEL, H.; MISSÉ, D. Zika virus infection: an update. *Microbes and Infection*, v. 21, n. 8–9, p. 353–360, 2019.

GIRALDO, M. I.; GONZALEZ-OROZCO, M.; RAJSBAUM, R. Pathogenesis of Zika Virus Infection. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 18, n. 1, 2023.

GORSHKOV, K. et al. Zika virus: Origins, pathological action, and treatment strategies. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. JAN, 2019.

GOUD, K. Y. et al. Electrochemical diagnostics of infectious viral diseases: Trends and challenges. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 180, n. February, p. 113112, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113112>>.

GUTIÉRREZ-BUGALLO, G. et al. Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. *Nature Ecology and Evolution*, v. 3, n. 4, p. 561–569, 2019.

HASSANPOUR, S. et al. Diagnosis of hepatitis via nanomaterial-based electrochemical , optical or piezoelectrical biosensors : a review on recent advancements. 2018.

HERRADA, C. A. et al. Advances in Diagnostic Methods for Zika Virus Infection. *Journal of Medical Devices, Transactions of the ASME*, v. 12, n. 4, 2018.

HOSSEIN, F. An overview of the current medical literature on Zika virus. *Biophysical Reviews*, v. 12, n. 5, p. 1133–1138, 2020.

HUANG, X.; ZHU, Y.; KIANFAR, E. Nano Biosensors : Properties , applications and electrochemical techniques. *Journal of Materials Research and Technology*, v. 12, p. 1649–1672, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.03.048>>.

IMRAN, S.; AHMADI, S.; KERMAN, K. Electrochemical biosensors for the detection of sars-cov-2 and other viruses. *Micromachines*, v. 12, n. 2, p. 1–23, 2021.

JAYACHANDRAN, B.; CHANDA, K.; BALAMURALI, M. M. Overview of Pathogenesis, Diagnostics, and Therapeutics of Infectious Diseases: Dengue and Zika. *ACS Omega*, v. 6, n. 35, p. 22487–22496, 2021.

KAYA, H. O. et al. Pathogen detection with electrochemical biosensors:

Advantages, challenges and future perspectives. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 882, 2021.

KAZMI, S. S. et al. A review on Zika virus outbreak, epidemiology, transmission and infection dynamics. *Journal of Biological Research (Greece)*, v. 27, n. 1, p. 1–11, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40709-020-00115-4>>.

KHAN, M. Z. H. et al. Ultrasensitive detection of pathogenic viruses with electrochemical biosensor: State of the art. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 166, n. April, p. 112431, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112431>>.

KIM, E. R. et al. Trends in Biotechnology Biosensors for healthcare : current and future perspectives. *Trends in Biotechnology*, p. 1–22, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.12.005>>.

LEE, J. S. et al. Graphene oxide-based molecular diagnostic biosensor for simultaneous detection of Zika and dengue viruses. *2D Materials*, v. 7, n. 4, 2020.

LI, Y. et al. A microbial electrode based on the co-electrodeposition of carboxyl graphene and Au nanoparticles for BOD rapid detection. *Biochemical Engineering Journal*, v. 123, p. 86–94, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2017.03.015>>.

LINO, C. et al. Biosensors as diagnostic tools in clinical applications. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, v. 1877, n. 3, p. 188726, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188726>>.

LUO, X. et al. Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors. p. 319–326, 2006.

MAHBUB, T.; HOQUE, E. *Introduction to nanomaterials and nanomanufacturing for nanosensors*. [s.l.] Elsevier Inc., 2020.

MALEKZAD, H. et al. Noble metal nanoparticles in biosensors : recent studies and applications. v. 6, n. 3, p. 301–329, 2017.

MARBÁN-CASTRO, E. et al. Zika virus infection in pregnant women and their children: A review. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, v. 265, p. 162–168, 2021.

MARTÍN-ACEBES, M. A.; SAIZ, J.-C. The Scientific Response to Zika Virus. *Journal of Clinical Medicine*, v. 8, n. 3, p. 369, 2019.

MARTINS, M. M.; MEDRONHO, R. D. A.; CUNHA, A. J. L. A. Da. Zika virus in Brazil and worldwide: a narrative review. *Paediatrics and International Child Health*, v. 41, n. 1, p. 28–35, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/20469047.2020.1776044>>.

MASMEJAN, S. et al. Zika Virus. p. 1–14, 2020.

MATHEW, T. et al. Graphene-based functional nanomaterials for biomedical and bioanalysis applications. *FlatChem*, v. 23, n. August, p. 100184, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.flatc.2020.100184>>.

MCKENZIE, B. A.; WILSON, A. E.; ZOHDY, S. Aedes albopictus is a competent vector of Zika virus: A meta-analysis. *PLoS ONE*, v. 14, n. 5, p. 1–16, 2019.

MENON, S. et al. Recent advances and challenges in electrochemical biosensors for emerging and re-emerging infectious diseases. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 878, p. 114596, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114596>>.

MOÇO, A. C. R. et al. Electrochemical Detection of Zika Virus in Biological Samples: A Step for Diagnosis Point-of-care. *Electroanalysis*, v. 31, n. 8, p. 1597–1604, 2019.

MULKEY, S. B. et al. Neurodevelopmental Abnormalities in Children with in Utero Zika Virus Exposure Without Congenital Zika Syndrome. *JAMA Pediatrics*, v. 174, n. 3, p. 269–276, 2020.

MWALIKO, C. et al. Zika virus pathogenesis and current therapeutic advances. *Pathogens and Global Health*, v. 115, n. 1, p. 21–39, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/20477724.2020.1845005>>.

NARESH, V.; LEE, N. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. *Sensors (Switzerland)*, v. 21, n. 4, p. 1–35, 2021.

NOORBAKHSH, F. et al. Zika virus infection, basic and clinical aspects: A review article. *Iranian Journal of Public Health*, v. 48, n. 1, p. 20–31, 2019.

OLIVEIRA, D. A. et al. Application of nanomaterials for the electrical and optical detection of the hepatitis B virus. *Analytical Biochemistry*, v. 549, p. 157–163, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.03.023>>.

OMANOVIĆ-MIKLIČANIN, E. et al. Nanocomposites: a brief review. *Health*

and Technology, v. 10, n. 1, p. 51–59, 2020.

PACHECO, W. F. et al. Voltammetry : A Brief Review About Concepts. v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PATEL, K. et al. A Novel Method for the Removal of Uranium by Using Carboxyl Functionalized Graphene Oxide. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, v. 798, n. 1, 2020.

PATTNAIK, A.; SAHOO, B. R.; PATTNAIK, A. K. Current status of zika virus vaccines: Successes and challenges. *Vaccines*, v. 8, n. 2, p. 1–19, 2020.

PETERS, R.; STEVENSON, M. Zika virus diagnosis: challenges and solutions. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 25, n. 2, p. 142–146, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.12.002>>.

POMAR, L. et al. Zika virus during pregnancy: From maternal exposure to congenital Zika virus syndrome. *Prenatal Diagnosis*, v. 39, n. 6, p. 420–430, 2019.

PUMERA, M.; SOFER, Z. Towards stoichiometric analogues of graphene: Graphane, fluorographene, graphol, graphene acid and others. *Chemical Society Reviews*, v. 46, n. 15, p. 4450–4463, 2017.

RABBANI, M.; HOQUE, E.; BIN, Z. *Nanosensors in biomedical and environmental applications : Perspectives and prospects*. [s.l.] Elsevier Inc., 2020.

RASMUSSEN, S. A.; JAMIESON, D. J. Teratogen update: Zika virus and pregnancy. *Birth Defects Research*, v. 112, n. 15, p. 1139–1149, 2020.

REUILLARD, B. et al. Noncovalent Integration of a Bioinspired Ni Catalyst to Graphene Acid for Reversible Electrocatalytic Hydrogen Oxidation. 2020.

RUIYI, L. et al. Electrochemical detection of chlorpyrifos in fruits with gold-histidine functionalized graphene quantum dot-graphene hybrid and target-induced DNA cycle amplification. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 355, n. October 2021, p. 131314, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131314>>.

SAYLAN, Y. et al. An alternative medical diagnosis method: Biosensors for virus detection. *Biosensors*, v. 9, n. 2, 2019.

SHER, M. et al. Nano-engineered screen-printed electrodes: A dynamic tool for detection of viruses. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 143, p. 116374, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116374>>.

SINGH, R. K. et al. Advances in diagnosis, surveillance, and monitoring of

zika virus: An update. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. JAN, p. 1–17, 2018.

TAVAKOLI, A. et al. Current diagnostic methods for HIV. *Future Virology*, v. 12, n. 3, p. 141–155, 2017.

UKHUREBOR, K. E. et al. A Methodical Review on the Applications and Potentialities of Using Nanobiosensors for Disease Diagnosis. *BioMed Research International*, v. 2022, 2022.

VEIGAS, B. et al. Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications. p. 1657–1687, 2012.

VERMISOGLU, E. et al. Human virus detection with graphene-based materials. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 166, n. June, 2020.

VUE, D.; TANG, Q. Zika Virus Overview: Transmission, Origin, Pathogenesis, Animal Model and Diagnosis. *Zoonoses*, v. 1, n. 1, p. 1–29, 2021.

WHO. Countries and territories with current or previous Zika virus transmission. Updated February 2022. Accessible at: Countries and territories with current or previous Zika virus transmission, February 2022

WU, Q. et al. Mechanical properties of nanomaterials: A review. *Nanotechnology Reviews*, v. 9, n. 1, p. 259–273, 2020.

YADAV, A. R.; MOHITE, S. K. A review on zika virus infection. *Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology*, v. 12, n. 4, p. 295–297, 2020.

ZHANG, X. et al. Recent progresses and remaining challenges for the detection of Zika virus. *Medicinal Research Reviews*, v. 41, n. 4, p. 2039–2108, 2021.

ZHU, Q. et al. Highly sensitive and selective electrochemical aptasensor with gold-aspartic acid, glycine acid-functionalized and boron-doped graphene quantum dot nanohybrid for detection of α -amanitin in blood. *Analytica Chimica Acta*, v. 1219, n. May, p. 340033, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340033>>.

CAPÍTULO II

FABRICAÇÃO DE NANOCOMPÓSITO DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE E ÁCIDO DE GRAFENO PARA APLICAÇÃO EM BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Este capítulo compreende um documento de depósito de patente, o qual está na fase de revisão para posteriormente ser submetido no INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

RESUMO

A nanotecnologia é um dos campos em expansão desta era, na qual alcançou o status de um dos esforços de pesquisa críticos do início do século XXI. As propriedades únicas dos conjuntos atômicos e moleculares construídos em escala nanométrica, abrem a possibilidade de manipular as propriedades físicas, químicas e biológicas dessas partículas, permitindo o desenho e uso racional de nanomateriais para diferentes finalidades. Os avanços da nanotecnologia nos últimos anos deram origem a novas técnicas e dispositivos de biossensoriamento. Assim, vários nanodispositivos têm gradualmente dado lugar à monitorização de diferentes elementos de interesse em diferentes áreas, incluindo a biomedicina no diagnóstico de doenças, controlo de poluentes, detecção de patógenos, monitorização de processos de fabrico e sistemas de transporte. Por esse motivo, o objetivo do presente estudo foi a fabricação e aplicação de um nanocompósito baseado em nanopartículas de cobre (CuNPs) e ácido de grafeno (AG) para biossensores eletroquímicos. Nanopartículas de cobre foram obtidas por síntese verde utilizando-se extrato de gengibre como agente redutor e estabilizador, produzindo-se NPs com tamanho médio de 8,0 nm e, o ácido de grafeno, sintetizado por uma metodologia simples, levando ao aumento de grupos de ácidos carboxílicos na rede de carbono. Esse método melhora as propriedades eletrônicas de plataformas eletroquímicas e contribui com o aumento da sensibilidade, seletividade e estabilidade de biossensores. A detecção indireta de biomoléculas simples como sequências de DNA PoliGA–PoliCT e específicas como um fragmento de RNAg específico (ZIKV) para a detecção de vírus Zika indicou diferenciação de sonda e alvo pelo aumento da resposta de corrente eletroquímica após hibridização do alvo específico. Portanto, o produto do presente estudo é de grande interesse para o setor industrial e de pesquisa como um nanocompósito para biossensores obtido por síntese verde, sendo atrativo para diversas aplicações devido à possibilidade de usar uma grande variedade de elementos específicos de reconhecimento biológico, como sondas de DNA/RNA, anticorpos, enzimas, proteínas.

Palavras-chave: Nanopartículas de cobre, síntese verde, ácido de grafeno, nanocompósito, biossensor.

ABSTRACT

Nanotechnology is one of the booming fields of this era, in which it has achieved the status as one of the critical research endeavors of the early 21st century. The unique properties of atomic and molecular sets built on a nanometric scale, open the possibility of manipulating the physical, chemical, and biological properties of these particles, allowing the design and rational use of nanomaterials for different purposes. Advances in nanotechnology in recent years have given rise to new techniques and devices for biosensing. Thus, various nanodevices have gradually given way to the monitoring of different elements of interest in different areas, including biomedicine in disease diagnosis, pollutant control, pathogen detection, monitoring of manufacturing processes and transport systems. The aim of the present study was the manufacture and application of a nanocomposite based on copper nanoparticles (CuNP's) and graphene acid (GA) for electrochemical biosensors. Copper nanoparticles were obtained by green synthesis using ginger extract as a reducing and stabilizing agent, producing NPs with an average size of 8.0 nm and graphene acid, synthesized by a simple methodology, leading to an increase in groups of carboxylic acids in the carbon network. This method improves the electronic properties of electrochemical platforms and contributes to increasing the sensitivity, selectivity, and stability of biosensors. Indirect detection of simple biomolecules such as Poly GA - Poly CT DNA sequences and specific as a gRNA fragment (ZIKV) for Zika virus detection indicated probe and target differentiation by increased electrochemical current response after specific target hybridization. Therefore, the product of the present study is of great interest to the industrial and research sector as a nanocomposite for biosensors obtained by green synthesis, being attractive for several applications due to the possibility of using a wide variety of specific elements of biological recognition, such as probes of DNA/RNA, antibodies, enzymes, proteins.

Keywords: Copper nanoparticles, green synthesis, graphene acid, nanocomposite, biosensor.

FABRICAÇÃO DE NANOCOMPÓSITO DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE/ÁCIDO DE GRAFENO PARA APLICAÇÃO EM BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Campo de invenção

Este pedido de patente de invenção compreende a fabricação e aplicação de um nanocompósito baseado em nanopartículas de cobre (CuNPs) e ácido de grafeno (AG) para biossensores eletroquímicos. Nanopartículas de cobre foram obtidas por síntese verde utilizando-se extrato de gengibre como agente redutor e estabilizador, produzindo-se NPs com tamanho médio de 8,0 nm e o ácido de grafeno, sintetizado por uma metodologia simples, levando ao aumento de grupos de ácidos carboxílicos na rede de carbono. Esse método melhora as propriedades eletrônicas de plataformas eletroquímicas e contribui com o aumento da sensibilidade, seletividade e resposta rápida de biossensores. O nanocompósito proposto como plataforma de detecção é imobilização com biomoléculas simples como sequências de DNA Poli GA – Poli CT e mais específicas, como um oligonucleotídeo para o vírus Zika. A análise dos resultados pode ser realizada pela diferenciação de sonda e alvo com o aumento da resposta de corrente eletroquímica após hibridização do alvo específico. A presente invenção possibilita a detecção de uma grande variedade de elementos específicos de reconhecimento biológico, como sondas de DNA/RNA, anticorpos, enzimas ou proteínas de forma sensível, específica e rápida.

Estado da técnica

A nanotecnologia é um dos campos em expansão desta era, na qual alcançou o status de um dos esforços de pesquisa críticos do início do século XXI, porque, graças às propriedades únicas dos conjuntos atômicos e moleculares construídos em escala nanométrica, abre-se a possibilidade de manipular as propriedades físicas, químicas e biológicas dessas partículas, permitindo o desenho e uso racional de nanomateriais para diferentes finalidades, como liberação de drogas, agentes de contraste de imagem e fins de diagnóstico para uma ampla gama de amostras biológicas (Rabbani, M., *et al.*, *Nanofabrication for Smart Nanosensor Applications*. Elsevier Inc., 2020).

A nanotecnologia refere-se à pesquisa e desenvolvimento de tecnologia nas escalas atômica, molecular e macromolecular, levando à manipulação controlada e ao estudo de estruturas e dispositivos com escalas de comprimento na faixa de 1 a 100 nanômetros em uma dimensão (filmes finos), em duas dimensões (nanotubos, nanofios) ou em três dimensões (nanopartículas, pontos quânticos).

As propriedades dos nanomateriais oferecem a capacidade de interagir com funções biológicas complexas de novas maneiras, operando na própria escala das biomoléculas (Fahmy, H. M. *et al.*, *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 8(3), 964–1000, 2022).

Muitos campos, como ciência biomédica, ciência da energia, óptica e magnetismo estão progredindo devido à aplicação de inovações nanotecnológicas. Na atualidade, vários nanomateriais estão sendo usados em sistemas de administração de medicamentos (antimicrobianos), biomarcação e sensores (Ukhurebor, K. E., *et al.*, *BioMed Research International*, 2022).

Os materiais em nanoescala apresentam propriedades únicas e inovadoras em comparação com seus equivalentes em granel. Entre as características únicas dos nanomateriais podem ser encontradas: condutividade elétrica, características magnéticas, fotoemissão, calor, propriedades luminescentes e atividade catalítica (Sher, M., *et al.*, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 143, 116374, 2021).

O diagnóstico clínico, separação de amostras, amplificação de sinal e detecção de elementos de reconhecimento biológico são algumas das áreas nas quais as qualidades aprimoradas oferecidas pelos nanomateriais são aplicadas com sucesso. Além disso, os nanomateriais têm contribuído para aumentar a sensibilidade de diversos dispositivos de monitoramento para detectar atividades biológicas (Kim, E. R., *et al.*, *Trends in Biotechnology*, 1–22, 2022).

Do final dos anos 1990 ao início dos anos 2000, o uso da nanotecnologia para pesquisa de dispositivos de monitoramento biológico experimentou um crescimento explosivo. Os nanomateriais possuem várias características, como grande proporção de área de superfície por volume, bem como efeitos de tamanho quântico que dominam em nanoescala.

Os efeitos de superfície, incluindo o aumento da tensão e elasticidade da superfície, ocorrem porque os átomos na superfície de um material têm menos parceiros de ligação do que suas contrapartes em massa (Mahbub, T., *et al.*, *Nanofabrication for Smart Nanosensor Applications*. Elsevier Inc., 2020).

Por esses motivos, os avanços da nanotecnologia nos últimos anos deram origem a novas técnicas e dispositivos de biossensoriamento. Assim, vários nanodispositivos têm gradualmente dado lugar à monitorização de diferentes elementos de interesse em várias áreas, incluindo biomedicina e biotecnologia, detecção de materiais tóxicos, purificação de água, indústria alimentar, eletrônica e optoeletrônica, medicina forense, entre outras (Ukhurebor, K. E., *et al.*, *BioMed Research International*, 2022).

Os dispositivos de detecção são amplamente utilizados no campo das ciências biológicas e aplicações biomédicas. Alguns dos critérios básicos para um sensor aplicado à área clínica são que ele deve ser minimamente invasivo, causar dano fisiológico mínimo ou interrupção do tecido de interesse e ser extremamente sensível (Menon, S., *et al.*, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 878, 114596, 2020).

Os biossensores são dispositivos que aproveitam a alta sensibilidade das reações biológicas para detectar analitos. Em geral, os biossensores são compostos de duas partes: uma sonda específica, conhecida como elemento de reconhecimento biológico, e um mecanismo de transdução que converte a reação entre o elemento de reconhecimento e analito alvo em uma resposta identificável e mensurável, como uma emissão óptica, sinal elétrico ou movimento mecânico (Lino, C., *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1877(3), 2022).

Os biossensores foram desenvolvidos principalmente com foco na miniaturização por meio do uso de novos materiais para fabricar sensores. Mais e mais pesquisas estão sendo feitas para melhorar os métodos atuais de nanofabricação, criar novos nanomateriais e desenvolver novos sensores usando as propriedades dos nanomateriais (Ehtesabi, H. *Advanced Materials and Devices*, 5(4), 436–450, 2020).

As características dos vários biossensores/nanobiossensores baseiam-se principalmente na natureza dos nanomateriais utilizados nos mecanismos de detecção. As principais vantagens dos nanossensores incluem: velocidade, baixa quantidade de amostra necessária, robustez, capacidade de ponto de atendimento e custo-benefício.

Entre os nanomateriais usados para fabricar nanossensores, os nanomateriais à base de carbono são promissores, pois exibem propriedades eletrônicas excepcionais, dando-lhes a capacidade de obter melhores sinais em várias aplicações de detecção. Além de sua alta área superficial, os nanomateriais à base de carbono são materiais biocompatíveis e são vantajosos em termos de simplicidade, velocidade e sensibilidade (Fahmy, H. M., *et al.*, *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 8(3), 964–1000, 2022).

O grafeno é frequentemente conhecido por sua estrutura de favo de mel 2D de camada única, na qual ambas as superfícies estão disponíveis para adsorção de moléculas. O grafeno e seus derivados, como óxido de grafeno (GO), óxido de grafeno reduzido (GOr) e ácido de grafeno (AG), que contêm vários grupos funcionais de oxigênio (hidroxila, carboxila e grupos funcionais epóxi), surgiram para uso potencial em biossensores (Mathew, T., *et al.*, *FlatChem*, 100184, 2020).

Na literatura, há vários trabalhos sobre a fabricação de biossensores onde o grafeno e/ou derivados são usados como nanomaterial condutivo. Em KR101440542B1, é exposto um método para formar um padrão condutivo de grafeno laminando o grafeno sobre um substrato com um grupo tiol, que seletivamente liga-se a uma biomolécula alvo. Da mesma forma, na invenção JP5462219B2, é descrito um sensor que utiliza um filme de grafeno que contém vários pedaços de cristal de grafeno em paralelo para crescer seletivamente com a superfície do filme de óxido de alumínio padronizado, como um local de detecção seletiva para um tipo determinado de substância de uma solução de amostra.

Outro trabalho com a mesma proposta foi encontrado, como o CN102520038B, refere-se a um método de preparação de um biossensor composto por um

eletrodo de ouro processado em uma solução de óxido de grafeno e sulfato de sódio, por meio de fixação por eletrodeposição.

A presença de grupos funcionais como hidroxila e carboxila na rede do grafeno tornam as folhas desses materiais de carbono fortemente hidrofílicas e permitem a integração com vários tipos de nanopartículas inorgânicas, incluindo metais nobres, óxidos metálicos, nanopartículas semicondutoras, quantum dots (QD) e nanoclusters (NC) para melhorar o desempenho de sensores baseados neles, o que é particularmente útil para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos (Sher, M., *et al.*, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 143, 116374, 2021).

A literatura apresenta métodos de preparação de nanopartículas inorgânicas formadas por técnicas de química verde sintética, na qual US20100200501A1, consiste em nanopartículas metálicas formadas com soluções de extratos vegetais e o uso dessas nanopartículas metálicas para remover contaminantes de solos, águas subterrâneas e outros locais contaminados.

O método utiliza uma solução de íon metálico, um extrato vegetal, compreendendo um agente redutor, um polifenol e cafeína e/ou um solvente natural ou surfactante; combina-se a primeira solução de íon metálico e o extrato da planta para produzir nanopartículas metálicas. Em US20080138643A1, um método é encontrado para produção de uma mistura com um ou mais sais de cobre, selecionados de um grupo que consiste em CuCl_2 , $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, CuSO_4 , $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}$ e $\text{Cu}(\text{acac})_2$ (acetilacetato de cobre) com ácido graxo que reagem por aquecimento. As nanopartículas de cobre são pelo menos parcialmente fundidas e têm menos de cerca de 20 nm de tamanho.

O termo "nanocompósito" foi definido como materiais heterogêneos (multifásicos), combinados uns com os outros em dimensões de nanoescala para obter as vantagens das propriedades individuais de seus constituintes e alcançar uma funcionalidade mais eficiente.

Nanocompósitos à base de grafeno e nanopartículas metálicas depositadas na superfície de eletrodos têm sido explorados para biossensores devido à sua excelente biocompatibilidade, alta área de superfície e conjugação seletiva de sítio

com biomoléculas (Safdari, M., *et al.*, *Carbon-Based Polymer Nanocomposites for Environmental and Energy Applications*, Elsevier, p. 113-146, 2018).

Metodologias para a preparação de compostos à base de materiais metálicos e derivados de grafeno foram relatadas na US20130224452A1, com base em um substrato de grafeno esfoliado com hidrogênio funcionalizado (f-HEG) e nanopartículas metálicas dispersas em uma primeira superfície principal do substrato f-HEG. Da mesma forma, CN105908007B apresenta um tipo de método de preparação de material, sintetizado por prensagem à quente, composto de grafeno carbono/carbono-cobre, onde são utilizados pó de grafeno, pó de cerâmica MAX phase e pó de cobre.

Além disso, foi proposta a aplicação de compostos formados por esses materiais em dispositivos de detecção de materiais biológicos, assim como CN105866205B descreve um tipo de biossensor eletroquímico de DNA baseado em eletrodo modificado com grafeno sulfidrilado e eletrodeposição de nanopartículas de ouro para detecção do microrganismo *Staphylococcus aureus*.

Outros nanomateriais foram encontrados aplicados em plataformas de detecção de biossensores, como CN101846648A (biossensor modificado por pontos quânticos de grafeno), CN106596678A (pontos quânticos de grafeno carregados com nanomicroesferas de polidopamina dopada com prata), CN110632142B (baseado em ouro paládio-grafeno e pontos quânticos), CN106546720B (material de nanoflor de prata/grafeno 3D), US8901620B2 (camada de óxido de grafeno reduzido e uma camada de nanopartículas de metal).

A presente invenção compreende a fabricação de um nanocompósito à base de nanopartículas de cobre (CuNPs) e ácido grafeno (AG) e sua aplicação em eletrodos *screen-printed* de carbono para desenvolvimento de biossensores eletroquímicos.

O biossensor apresenta diversas características vantajosas que incluem a alta seletividade, sensibilidade, baixo custo de produção, respostas rápidas e em tempo real; sendo, portanto, uma plataforma de detecção atraente para diversas aplicações na área da biomedicina no diagnóstico de doenças, nas indústrias de alimentos e, ambientais, devido à possibilidade de usar uma grande variedade de

elementos específicos de reconhecimento biológico, como sondas de DNA/RNA, anticorpos, enzimas e proteínas.

Descrição e detalhamento dos componentes da invenção

O nanocompósito desenvolvido baseia-se em nanopartículas de cobre (CuNPs) e ácido de grafeno (AG) para a aplicação em plataformas de biossensores eletroquímicos na identificação de biomoléculas simples, como sequências de DNA Poli GA – Poli CT, e específicas, como um fragmento de DNA específico (ZIKV) para a detecção de vírus Zika, por meio da hibridização entre os pares de base da sonda com o complementar específico no RNA do vírus. O detalhamento da invenção encontra-se descrito a seguir:

Para a síntese das CuNPs, é utilizado uma metodologia verde usando extrato de gengibre com modificações. Existem diferentes componentes ativos presentes no gengibre, como curcumina, 6-gingerol, 6-shogaol e 6-paradol que podem estar participando na redução de íons metálicos. O sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) participa como agente precursor e os processos de redução e estabilização das CuNps são realizados pela ação dos biocompostos ativos presentes no gengibre (reduzindo os íons de cobre Cu^{2+} em sua forma metálica Cu^0).

Na síntese de nanopartículas de cobre, todas as condições reacionais são criteriosamente controladas, como temperatura, tempo e concentração dos reagentes, desde a extração dos biocompostos do gengibre até o processo de síntese verde.

É importante ressaltar que os compostos presentes no gengibre são compostos fenólicos e terpenos e, assim, o gengibre pode ser substituído por cravo, folhas de eucalipto, entre outros. Na extração dos biocompostos presentes no gengibre, foi usado o terc-butanol, com a finalidade de obter uma homogeneização dos compostos na solução, podendo ser substituído por acetonitrila, acetona, metanol, etanol, propanol, álcool isopropílico (2-propanol), 1-butanol, 2-butanol ou misturas entre eles.

As nanopartículas metálicas exibem a absorção de ondas eletromagnéticas visíveis pela oscilação coletiva de elétrons de condução na superfície, o que é conhecido como o efeito de ressonância de plasmons superficiais.

O interesse deste efeito é a possibilidade de utilizá-lo como revelador da presença de nanopartículas metálicas com um espectrômetro UV-visível simples. A formação das nanopartículas de cobre resulta em uma coloração verde; a mudança de coloração das CuNPs é explicada pela ocorrência da formação de plasmons de superfície como consequência da interação com a luz.

A solução de nanopartículas resultante foi caracterizada por espectrofotometria UV-Vis, microscopia de transmissão eletrônica e microscopia de força atômica.

Para o ensaio no espectrofotômetro UV-vis, monitora-se os picos de absorção de luz na região de 330 e 430 nm, uma vez que, em nanopartículas menores que 8 nm de diâmetro, a luz verde é absorvida, correspondendo à uma banda de absorção (banda plasmônica de superfície) em, aproximadamente, 330 nm no espectro de luz visível.

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão consiste em um feixe de elétrons, o qual atravessa uma amostra, sendo que os feixes resultantes da interação com a amostra, será combinada por lentes de objetiva, resultando em uma imagem, em que é possível observar a morfologia e estruturas das nanopartículas. A mudança de cor para o verde, reflete o aumento do tamanho das nanopartículas e, conseqüentemente, maiores comprimentos de onda.

Na síntese do ácido de grafeno, as condições como o pH, temperatura, o tempo e a concentração de reagentes são controlados criteriosamente. A obtenção do material final parte do óxido de grafite. Para isso, é utilizado o método de Hummers modificado.

A funcionalização de grupos carboxílicos no óxido de grafeno é feita pela ação dos seguintes reagentes: hidróxido de sódio (NaOH) e ácido cloroacético. O ácido monocloraacético converte os grupos hidroxila de GO em carboxila através da conjugação de porções de ácido acético presentes no ácido cloroacético. O COOH-GO foi sintetizado pela redução de grupos -OH de GO para grupo -COOH.

Para a aplicação do nanomaterial desenvolvido em biossensores eletroquímicos, foi proposto um desenho de eletrodos *screen-printed* de carbono, composto por uma camada de tinta de prata, descrito na patente BR 10 2013 001459 1 A2 (design das trilhas e do eletrodo de referência). Para o desenho relacionado aos

eletrodos de trabalho e auxiliares, foi utilizada tinta de carbono (Electrodag 423SS, Acheson Colloids Company).

As CuNps e ácido de grafeno foram utilizados na modificação de eletrodos e caracterizam-se como nanocompósitos. A modificação de eletrodos é uma estratégia utilizada para melhorar as características do biossensor como a sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Assim, os detalhes sobre a seleção dos eletrodos, construção e caracterização eletrônica da plataforma e detecção eletroquímica serão abordados a seguir.

A seleção dos eletrodos é baseada no perfil do voltamograma obtido por voltametria cíclica em ácido sulfúrico (H_2SO_4) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) como eletrólitos suporte. Os eletrodos selecionados para as etapas posteriores possuem o mesmo perfil, garantindo, assim, a reprodutibilidade dos resultados. Além disso, essa etapa é essencial na limpeza eletroquímica ou eletropolimento do eletrodo, garantindo a inexistência de espécies eletroativas na região de potencial que se pretende trabalhar.

A construção da plataforma foi previamente otimizada e consiste na deposição por drop casting de três camadas de CuNps e uma camada de ácido de grafeno. Esse processo é realizado com o gotejamento das soluções e posterior secagem na superfície do eletrodo. A caracterização das propriedades eletrônicas dessa plataforma foi realizada por voltametria cíclica monitorando o comportamento da sonda catiônica de cloreto de hexaaminorutênio II $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ contendo cloreto de potássio (KCl) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ entre $-0,5$ a $+0,1 \text{ V}$ a $0,1 \text{ V/s}$.

As respostas de corrente de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}) aumentam progressivamente com adição de CuNPs, ácido de grafeno e CuNPs com ácido de grafeno, respectivamente.

Desse modo, a modificação do eletrodo facilitou a transferência eletrônica da sonda catiônica na interface eletrodo-solução, aumentando a área eletroativa e indicando que o nanocompósito da presente invenção forma uma rede eletricamente positiva, atraindo os íons positivos $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{+2}$.

Após a modificação dos eletrodos, segue-se ao passo de imobilização dos oligonucleotídeos, que também são referidos como sonda. Nesse passo, a sonda

é gotejada no eletrodo modificado por 30 minutos. Após esse período, o eletrodo é lavado em tampão fosfato.

A imobilização entre a sonda e a plataforma ocorre via adsorção e o processo de lavagem é importante para remover as biomoléculas que não se ligaram na plataforma.

Antes da detecção da molécula alvo, é realizado o bloqueio da superfície com glicina para que as regiões dos eletrodos onde não houve imobilização sejam impossibilitadas de interagir com o alvo, garantindo a especificidade da sonda. A glicina pode ser substituída por qualquer composto eletroquimicamente inerte na faixa de potencial utilizada, como cisteína.

Depois do bloqueio, o alvo complementar de oligonucleotídeos é gotejado e deixado em temperatura específica para que ocorra a hibridização entre a sonda e alvo por meio dos pareamentos das bases nitrogenadas de Watson e Crick. Posteriormente, o eletrodo é lavado com tampão fosfato e é adicionado o brometo de etídeo, um intercalante eletroativo de DNA, que pode ser substituído por azul de metileno, rodamina, Hoechst 33258, aminoantipirina, brometo de propídio e hexaminorutênio.

A detecção eletroquímica é realizada por voltametria de pulso diferencial (VPD) entre 0,00 e +1,2 V em tampão fosfato como eletrólito e monitora o pico de oxidação do brometo de etídeo. Esse intercalante se comporta de maneira distinta com o DNA simples-fita (sonda) e DNA dupla-fita (sonda-alvo), uma vez que ele interage mais com bases pareadas do que não-pareadas.

Assim, quando há a presença do alvo, a resposta de corrente é maior do que quando está apenas com a sonda. A presente invenção apresenta a detecção de oligonucleotídeo específico para o vírus Zika, mas pode ser substituído por quaisquer sequências de oligonucleotídeos, além de abranger também a detecção de proteínas, enzimas, anticorpos e RNA.

Descrição das figuras

A FIGURA 1 corresponde ao espectro de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) referente ao ácido de grafeno, obtido

pela síntese modificada de Hummer, em sequência com a funcionalização de grupos carboxílicos. Analisando-se o espectro, atribui-se ao pico largo (indicado pela letra A) uma banda de deformação axial livre de O-H, na frequência de 3000 a 3500 cm^{-1} , visto que, utiliza-se o reagente NaOH (hidróxido de sódio) para alcalinizar o meio reacional. Atribui-se ao pico indicado pela letra B, na faixa de 1580 e 1720 cm^{-1} a deformação axial C=O, sendo tal estrutura oriunda da reação dos reagentes usados para a funcionalização de grupos carbóxilo no óxido de e infere-se que o pico indicado pela letra C nas regiões de 1034, 1235 e 1362 cm^{-1} representa a deformação angular C-O, estrutura também encontrada na molécula do óxido de grafeno (ácido carboxílico, carbonila, epóxido e hidroxila).

A FIGURA 2 A, mostra os espectros referentes à espectroscopia de UV-Visível.

As nanopartículas de cobre na faixa nanométrica exibem um fenômeno óptico chamado ressonância plasmônica de superfície localizada (SPRL), devido à oscilação coletiva dos elétrons da superfície metálica.

Esta propriedade é amplamente governada e depende do tipo de partícula, tamanho, forma e ambiente químico local. É característica das CuNPs sintetizadas pela rota verde apresentar pico predominantemente na faixa de 250–570 nm. Os espectros de absorção das amostras sintetizadas usando o gengibre são mostrados na FIGURA 2 A.

O espectro mostra que a SPR para as nanopartículas foi em 330 nm. Estes estudos resultaram em valores de banda plasmônica próxima a faixa descrita na literatura. Na FIGURA 2 B e 2 C, pode-se observar a síntese das CuNPs desde as 0 horas, sendo uma solução de cor azul claro, até a mudança de cor para verde claro, ao acontecer a formação das CuNPs após 4 horas.

A FIGURA 3 mostra a imagem de microscopia de força atômica das nanopartículas de cobre (CuNP) feitas pela síntese verde e seu perfil topográfico. Podemos observar as nanopartículas de cobre isoladas na superfície da mica. O tamanho média das CuNPs mostrou-se ser entre 3,7 até 8,0 nm.

A FIGURA 4 é possível observar uma micrografia das CuNPs oriunda das análises de microscopia eletrônica de transmissão. Pode ser observada a característica polimórfica das nanopartículas, de modo que são encontradas formas hexagonais

e esféricas. Como se observa na FIGURA 4, as CuNPs não apresentam sinais de agregação, de maneira que é possível visualizar cada nanopartícula separadamente. Isto reforça que as CuNPs foram estabilizadas pelos biocompostos presentes no gengibre, tais como os curcumina, 6-gingerol, 6-shogaol e 6-paradol. Em vista disso, os compostos orgânicos derivados do processamento das plantas, como o extrato de gengibre, podem atuar tanto como agentes redutores quanto estabilizantes na síntese de CuNPs.

A FIGURA 5 se refere às medidas do design do eletrodo *screen-printed* desenvolvido para a construção do bioeletrodo eletroquímico proposto, sendo composto com três eletrodos: referência (prata), trabalho e auxiliar (carbono).

Na FIGURA 6 encontra-se uma sequência metodológica ilustra da impressão e pré-condicionamento de eletrodos *screen-printed* descritos neste trabalho para aplicação como bioeletrodo eletroquímico.

A FIGURA 7 demonstra os procedimentos necessários para a construção do bioeletrodo após a impressão e pré-condicionamento dos eletrodos, utilizando: nanopartículas de cobre e óxido de grafeno para modificação de superfície; uma sonda de oligonucleotídeo para reconhecimento de uma sequência complementar; glicina para o bloqueio de possíveis sítios ativos não específicos e brometo de etídio para a detecção eletroquímica do alvo.

A FIGURA 8 se refere ao perfil do voltamograma obtido por voltametria cíclica após o pré-condicionamento dos eletrodos de carbono. Essa é a forma de selecionar os eletrodos que são utilizados nos passos posteriores e, assim, todos possuem o mesmo perfil, garantindo a reprodutibilidade do processo. A voltametria cíclica é realizada em ácido sulfúrico (H_2SO_4) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) como eletrólitos suporte. A faixa de potencial trabalhada é de 0,00 a +1,00 V em três velocidades: 0,5 (20 ciclos), 0,1 (10 ciclos) e 0,05 (5 ciclos) V/s.

A FIGURA 9 mostra os resultados da voltametria cíclica em hexaaminorutênio II $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_2$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ contendo cloreto de potássio (KCl) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ entre -0,5 a +0,1 V a 0,1 V/s nas diferentes etapas da construção da plataforma com nanocompósito. Esses ensaios são realizados com propósito de investigar as propriedades eletrônicas dos compostos utilizados nessa invenção. Os

voltamogramas I, II, III e IV representam, respectivamente: eletrodo de carbono sem modificação (SPCE), eletrodo modificado com CuNps 5mM em três camadas (SPCE+CuNPs), eletrodo modificado com ácido de grafeno (SPCE+AG) e eletrodo modificado com CuNps e ácido de grafeno (SPCE+CuNPs+AG). O aumento progressivo da corrente de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}) é observado e o nanocompósito exibe a maior área eletroativa. O $[Ru(NH_3)_6]Cl_2$ é uma sonda redox catiônica e, desse modo, os íons positivos $[Ru(NH_3)_6]^{+2}$ interagem com a plataforma, facilitando a transferência eletrônica na interface eletrodo-solução; assim, a plataforma com nanocompósito da presente invenção se caracteriza por ser eletronicamente negativa, uma vez que exerce efeito de atração eletrostática com os íons positivos do $[Ru(NH_3)_6]Cl_2$.

Na FIGURA 10, pode-se observar as microscopias eletrônicas de varredura do bioeletrodo preparado neste trabalho, a deposição de cada um dos materiais sintetizados (ácido de grafeno e nanopartículas de cobre) e, por último, o nanocompósito na superfície de trabalho do eletrodo na ampliação de 10.000X.

A FIGURA 10A mostra a superfície do eletrodo sem a presença do nanomaterial sintetizado, podendo-se observar uma uniformidade da superfície, sendo que o material deste eletrodo é tinta de carbono comercial.

A FIGURA 10B refere-se à superfície com a deposição de ácido de grafeno, no qual é possível observar uma superfície homogênea com detalhes porosos, mas sem nenhum aglomerado ou protuberância muito aparente.

A FIGURA 10C representa a superfície do eletrodo com as nanopartículas de cobre, apresentando pequenos grânulos distribuídos pela superfície formada por aglomerados, as pequenas partículas espalhadas pelos retículos apresentam tamanho de aproximadamente 8 nm. A imagem de MEV representada pela FIGURA 10 D retrata a presença de sulcos e aglomerados para o eletrodo com a deposição do nanocompósito fabricado, bem como a presença de placas recobertas por material de maior granulação, tendo maior rugosidade em relação as imagens descritas anteriormente.

Na FIGURA 11A observa-se o voltamograma obtido por voltametria de pulso diferencial, monitorando o pico de oxidação do intercalante de DNA brometo de

etídeo em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4), entre +0,30 a +0,90V, 0,05 V/s e amplitude de pulso 0,025V. Esse composto se liga melhor ao sulcos de DNA dupla-fita, ou seja, quando ocorre hibridização entre oligonucleotídeos da sonda (SPCE+CuNPs+AG+Poli(GA)) e alvo (SPCE+CuNPs+AG+Poli(GA)+Poli(CT)). Em I tem-se o resultado do pico de oxidação do brometo de etídeo em +0,553V para a sonda Poli(GA) e em II em +0,605V para o alvo Poli(CT). Ocorre um aumento na resposta de corrente em comparação com a sonda, indicando que o brometo de etídeo se liga melhor na dupla-fita de DNA formada entre Poli(GA) e Poli(CT).

A FIGURA 11B traz os valores da resposta de corrente do pico de oxidação do brometo de etídeo para Poli(GA) e Poli(CT) em forma de gráfico de barras. A resposta de corrente no alvo aumenta em 1,55x em relação à sonda, indicando uma maior presença de brometo de etídeo quando ocorre hibridização entre sonda e alvo.

A FIGURA 12A apresenta o voltamograma obtido por voltametria de pulso diferencial, monitorando o pico de oxidação do intercalante de DNA brometo de etídeo em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4), entre +0,30 a +0,90V, 0,05 V/s e amplitude de pulso 0,025V. Em I e II, respectivamente, podem ser observados os perfis voltamétricos da plataforma com uma sonda específica do vírus Zika (SPCE+CuNPs+AG+ZIKV1) e seu alvo complementar (SPCE+CuNPs+AG+ZIKV1+ZIKV2). O brometo de etídeo interage mais com a dupla-fita formada, ocasionando uma maior resposta da corrente pelos mecanismos supracitados.

Na FIGURA 12B é possível observar os valores da resposta de corrente do pico de oxidação do brometo de etídeo para sonda específica do vírus Zika (SPCE+CuNPs+AG+ZIKV1) e seu alvo complementar (SPCE+CuNPs+AG+ZIKV1+ZIKV2) em forma de gráfico de barras. A resposta de corrente no alvo aumenta em 1,8x em relação à sonda, indicando uma maior presença de brometo de etídeo quando ocorre hibridização entre sonda e alvo.

A FIGURA 13 A mostra os voltamogramas obtidos por voltametria de pulso diferencial, monitorando o pico de oxidação do brometo de etídeo, com as seguintes concentrações de alvo complementar: 5×10^{-5} , 3×10^{-5} , 2×10^{-5} , 1×10^{-5} e

$5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Os dados mostram que o bioeletrodo da presente invenção é sensível às variações de concentração do analito alvo.

A resposta de corrente do pico de oxidação do brometo de etídio em diferentes concentrações mostra uma relação logarítmica com essas concentrações. Assim, na FIGURA 13 B foi possível construir uma curva de calibração que pode ser representada pela fórmula:

$$I_p (\mu A) = -0,3086 (\mu A / \text{mol L}^{-1}) \cdot \log [\text{ZIKV gRNA}] (\text{mol L}^{-1}) + 2,85979 (\mu A)$$

$$r^2 = 0,99454$$

$$n = 3.$$

Exemplos de preparo

Exemplo 1: Síntese verde de nanopartículas de cobre (CuNPs) com extrato de gengibre

O procedimento de síntese das CuNPs começa com a extração dos biocompostos do gengibre. Para tal fim, utiliza-se 5 g rizoma de gengibre (*Zingiber officinale*) lavado e descascado e posteriormente pulverizado em almofariz com adição lenta de 20 mL de água deionizada. O extrato resultante foi separado usando um filtro para remover as fibras do gengibre. Seguidamente, foi tomada uma alíquota de 10 mL do extrato e adicionado em uma solução 3:7, o terc-butanol e água deionizada, respectivamente. Para o preparo dessa solução, em um erlenmeyer com 14 mL de água deionizada, foram adicionados 6 mL de terc-butanol e, finalmente, o extrato obtido do processo anterior. A solução foi fervida por 2 min em agitação constante.

Para a síntese das CuNPs, foi preparada uma solução de sulfato de cobre 5mM em 95 mL de água deionizada e 10 mL do extrato de gengibre obtido. A solução preparada foi colocada em agitação constante com agitador magnético durante 4 horas até tornar-se uma cor verde claro.

Exemplo 2: Síntese de ácido de grafeno (AG)

A obtenção do ácido de grafeno parte do óxido de grafite. Para isso, foi utilizado o método de Hummers modificado. Inicialmente, em um béquer de 1 L foram

adicionados 50 mL de ácido sulfúrico, 2 gramas de grafite e 2 gramas de nitrato de sódio. Essa mistura foi transferida para um banho de gelo, seguido da adição de 6 gramas de permanganato de potássio, o qual foi adicionado vagarosamente para evitar aquecimento. O sistema foi mantido em repouso por 10 minutos e, em seguida, foi transferido para um banho maria a 42° C e mantido sob agitação por 60 minutos. Em sequência, foram adicionados 95 mL de água deionizada e mantido sob agitação por mais 30 minutos, seguido de adição com 285 mL de água deionizada. Foram adicionados, ainda, 20 mL de peróxido de hidrogênio (30% v/v) visando consumir o excesso de agente oxidante.

O sistema foi agitado por mais 10 minutos e resfriado a temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi centrifugada numa rotação de 9000 rpm por 15 minutos por três vezes e o material sedimentado foi lavado com água deionizada. O material obtido foi seco a 50°C, macerado e armazenado em eppendorf para uso posterior. Para a obtenção do ácido de grafeno (AG), 10 mg de óxido de grafite foi disperso em 5 mL de água deionizada e sonicado por duas horas. Após esse tempo, foi adicionado na solução 1,2 g hidróxido de sódio (NaOH) e colocado sob ultrassom por 7 minutos. Em seguida, foi adicionado 1,0 g de ácido cloroacético (ClCH₂CO₂H) ficando sob ultrassom por 4 horas.

A solução de ácido de grafeno obtida foi neutralizada com solução de HCl 0,5 M e foi purificada por lavagens repetidas com água deionizada após centrifugação a 2000 rpm. Esse procedimento foi realizado até que as lavagens se tornassem neutras. Finalmente, o AC obtido foi seco durante a noite a 45°C.

Exemplo 3: Impressão e desenho de eletrodos *screen-printed* de carbono (SPCE)

A impressão dos eletrodos screen-printed desenvolvidos neste trabalho foi feita em lâminas de PVC transparente, de dimensões: 150x200x0,5 mm, previamente lavadas com sabão e álcool e aquecidas a 60 °C por 30 minutos. Após, foi aplicada tinta de prata, descrita na patente BR 10 2013 001459 1 A2, através da tela de serigrafia (77 fios) contendo o design das trilhas e do eletrodo de referência. Posteriormente, é aplicada sobre a folha tinta de carbono (Electrodag 423SS, Acheson Colloids Company) utilizando a tela de serigrafia (77 fios) com o

design referente aos eletrodos de trabalho e auxiliar. Após cada etapa de impressão a folha de PVC foi aquecida a 60 °C por 30 minutos.

A deposição dos nanomateriais na plataforma do biossensor foi feita da seguinte forma: 3 camadas de CuNPs sintetizadas pela síntese verde e, em sequência, uma camada de solução de ácido de grafeno. Inicialmente, foram gotejados 5µL de solução de CuNPs na superfície do eletrodo de trabalho, e colocados em forno por 7 min a 55° C, sem deixar secar a superfície. Esse procedimento foi repetido 2 vezes mais até completar 3 camadas. Na última camada de CuNP, o eletrodo foi encubado por 20 minutos na mesma temperatura.

A solução de OG-COOH M 1.2: 1 mg/1 ml (0,001 g de OG-COOH 1.2 em 1mL de água deionizada) foi preparada e colocada em banho de ultrassom por 2 horas. Posteriormente, foram gotejados 5µL de solução no eletrodo de trabalho e os eletrodos foram deixados secar no forno 30 minutos a 55° C.

Exemplo 4: Pré-condicionamento dos bioeletrodos

Para garantir a reprodutibilidade dos resultados, a primeira etapa é o polimento eletroquímico e a ativação eletroquímica dos eletrodos, processos estes conhecidos como pré-condicionamento. Para tanto, a voltametria cíclica foi realizada em ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,5 mol L⁻¹ e tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,4) como eletrólitos suporte. A faixa de potencial trabalhada foi de 0,00 a +1,00 V em três velocidades: 0,5 (20 ciclos), 0,1 (10 ciclos) e 0,05 (5 ciclos) V/s. Os eletrodos que apresentaram o mesmo perfil foram selecionados para etapas posteriores.

Exemplo 5: Imobilização da biomolécula poli GA sobre os eletrodos modificados.

Para a imobilização de poli GA, foram gotejados 5 µL de uma solução desta biomolécula na concentração 1×10^{-6} mol L⁻¹. Os eletrodos foram acondicionados em um recipiente hermeticamente fechado durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Após esse tempo, os eletrodos foram lavados por imersão em solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,4) por 7 segundos e a superfície de cada eletrodo foi seca por capilaridade com papel absorvente.

Exemplo 6: Bloqueio da superfície dos eletrodos modificados após a imobilização de poli GA

Foram gotejados 3 μL de uma solução de bloqueio glicina 10 m mol L^{-1} sobre a superfície dos eletrodos modificados após a imobilização da sonda de poli GA, os eletrodos foram acondicionados em recipiente hermeticamente fechado com câmara úmida durante 60 minutos, em temperatura ambiente.

Após esse tempo, os bioeletrodos foram lavados por imersão em solução tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} , pH 7,4) por 7 segundos e a superfície de cada eletrodo foi seca por capilaridade com papel absorvente.

Exemplo 7: Detecção eletroquímica de Poli GA-Poli CT

Para o procedimento de hibridização do DNA alvo (Poli CT) foram gotejados 5 μL de uma solução de alvo na concentração $7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ sobre a superfície dos eletrodos e acondicionados em um recipiente hermeticamente fechado com câmara úmida e incubados por 30 minutos, em uma temperatura de 47°C . Os eletrodos foram lavados por imersão em solução tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} , pH 7,4) por 7 segundos.

A detecção indireta foi realizada pela adição de 5 μL de solução de brometo de etídio ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) na superfície do eletrodo. Após 30 minutos, os eletrodos acondicionados em um recipiente hermeticamente fechado com câmara úmida à temperatura ambiente e sem luz, foram lavados por imersão em solução tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} , pH 7,4) por 7 segundos. Empregou-se a técnica eletroquímica Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) para as detecções utilizando uma solução tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} , pH 7,4).

Exemplo 8: Imobilização da sonda específica do vírus Zika (ZIKV1) sobre os eletrodos modificados

Para a imobilização da sonda específica do vírus Zika (ZIKV1) (5'-CCG CTG CCC AAC ACA AG-3'), gotejou-se 5 μL de uma solução desta biomolécula na concentração $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Os eletrodos foram acondicionados em um recipiente hermeticamente fechado durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Após esse tempo, foram lavados por imersão em solução tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} , pH 7,4) por 7 segundos.

Exemplo 9: Bloqueio da superfície dos eletrodos modificados após a imobilização da sonda específica do vírus Zika (ZIKV1)

Gotejou-se 3 μL de uma solução de bloqueio glicina 10 mol L^{-1} sobre a superfície dos eletrodos modificados após a imobilização da sonda do vírus Zika (ZIKV1) e acondicionados em recipiente hermeticamente fechado com câmara úmida durante 60 minutos, em temperatura ambiente. Após esse tempo, os eletrodos foram lavados por imersão em solução tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} , pH 7,4) por 7 segundos. A superfície de cada eletrodo foi seca capilaridade com papel absorvente após esse processo.

Exemplo 10: Detecção eletroquímica do oligonucleotídeo específico do vírus Zika

Após a imobilização da sonda do ZIKV1 no bioeletrodo, para o procedimento de hibridização do alvo ZIKV2 RNAg (5'- CTT GTG TTG GGC AGC GG -3'), foram gotejados 5 μL de uma solução de alvo na concentração $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, acondicionados em um recipiente hermeticamente fechado com câmara úmida e incubados por 30 minutos a 57 °C. Cada um dos eletrodos foi lavado por imersão em solução tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} , pH 7,4) por 7 segundos.

A detecção indireta foi realizada pela adição de 5 μL de solução de brometo de etídio ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) na superfície do eletrodo. Após 30 minutos, os eletrodos acondicionados em um recipiente hermeticamente fechado com câmara úmida à temperatura ambiente e sem luz, foram lavados por imersão em solução tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} , pH 7,4) por 7 segundos. Foi empregada a técnica eletroquímica Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) para as detecções utilizando uma solução tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} , pH 7,4).

Exemplo 11: Curva de calibração

A concentração de alvo complementar foi variada em 5×10^{-5} , 3×10^{-5} , 2×10^{-5} , 1×10^{-5} e $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e analisada por voltametria de pulso diferencial, monitorando o pico de oxidação do brometo de etídio. O valor da resposta de corrente apresenta relação linear com o logaritmo das concentrações e o limite de detecção foi de $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, sendo a menor concentração do alvo detectada pelo bioeletrodo da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

- 1) **“FABRICAÇÃO DE NANOCOMPÓSITO DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE/ÁCIDO DE GRAFENO PARA APLICAÇÃO EM BIOCENSORES ELETROQUÍMICOS”**, caracterizado por compreender as seguintes etapas:
 - a) Síntese modificada de nanopartículas de cobre reduzidas e estabilizadas pelos biocompostos presentes no gengibre obtidos pela extração com terc-butanol;
 - b) Síntese de ácido de grafeno obtido pelo método modificado de Hummers e a agregação de hidróxido de sódio e ácido cloroacético;
 - c) Impressão e desenho de eletrodos *screen-printed* de carbono;
 - d) Modificação da superfície de trabalho com o nanocompósito de nanopartículas de cobre e ácido de grafeno de um biossensor eletroquímico;
 - e) Construção de bioeletrodo para oligonucleotídeos.
 - f) Detecção eletroquímica de oligonucleotídeos utilizando indicador intercalante de DNA Brometo de etídio.
- 2) **NANOCOMPÓSITO** de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** usar extrato de gengibre, sendo usado como agente redutor e estabilizante para a síntese de CuNPs em um tempo limite de 4 horas, com diferentes tamanhos e potencial biotecnológico; podendo alterar a proporção do gengibre, assim como modificar a fonte do agente redutor, podendo ser substituído por biocompostos presentes no gengibre (curcumina, 6-gingerol, 6-shogaol e 6-paradol) e outros extratos de plantas como o cravo.
- 3) **NANOCOMPÓSITO** de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** usar o terc-butanol para a extração de biocompostos presentes no gengibre. Poderá ser substituído por acetonitrila, acetona, metanol, etanol, propanol, álcool isopropílico (2-propanol), 1-butanol, 2-butanol ou misturas entre eles.
- 4) **NANOCOMPÓSITO** de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar ácido de grafeno obtido pelo método Hummers modificado e a agregação de hidróxido de sódio e ácido cloroacético nas condições de pH e tempo descritas no trabalho para a funcionalização dos grupos carboxílicos.

Os reagentes podem ser substituídos por ácidos halogenados na posição alfa em relação a carbonila, como o ácido 2-cloropropanóico, ácido 2-clorobutanóico ou ácido 2-cloropentanóico.

- 5) **ELETRODO** de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar como eletrodos de trabalho, eletrodos de carbono, eletrodos de prata, e eletrodos impressos, também podendo ser modificados com nanomateriais como nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono e seus derivados, grafeno e seus derivados, polímeros, contendo diferentes áreas de trabalho, como microeletrodos e nanoeletrodos.
- 6) **NANOCOMPÓSITO** de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ser amplificador de sinal eletroquímico composto por 3 camadas de nanopartículas de cobre e uma camada de ácido de grafeno, sendo aplicado na superfície do eletrodo de trabalho de biossensores eletroquímicos.
- 7) **BIOELETRODO** de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por ser** utilizado como nanomaterial para imobilizar sequências de oligonucleotídeos como Poli GA e Poli CT. Poderá ser substituído por qualquer elemento específico de reconhecimento biológico, como sondas de DNA/RNA, anticorpos, enzimas, proteínas.
- 8) **BIOSSENSOR** de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar Brometo de etídio como indicador intercalante de DNA para a detecção eletroquímica de oligonucleotídeos. Pode ser substituído por azul de metileno, rodamina, Hoechst 33258, aminoantipirina, brometo de propídio e hexaminorutênio.

FIGURAS

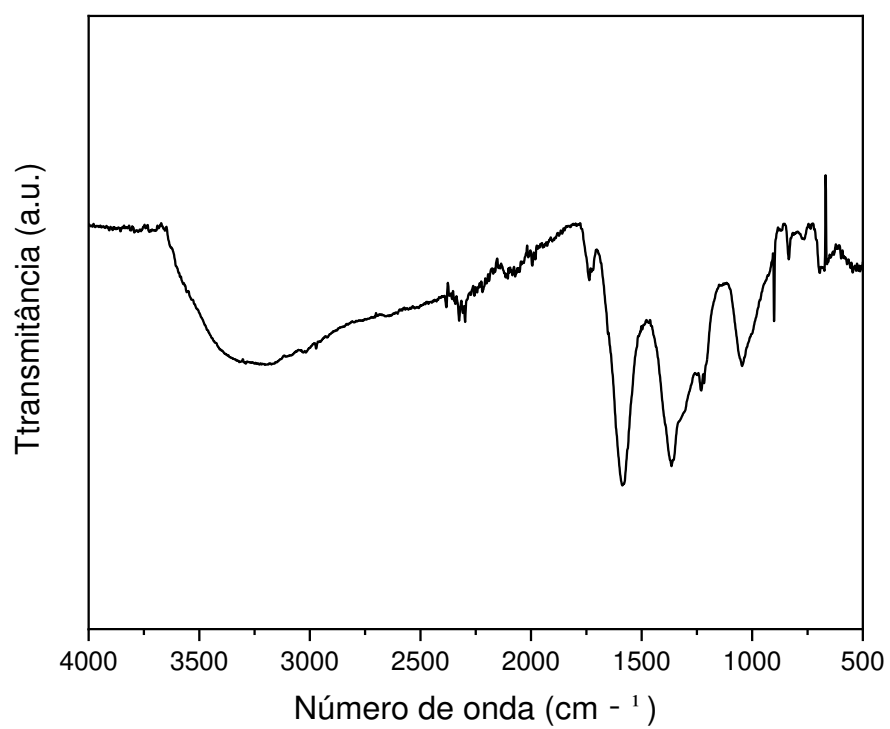
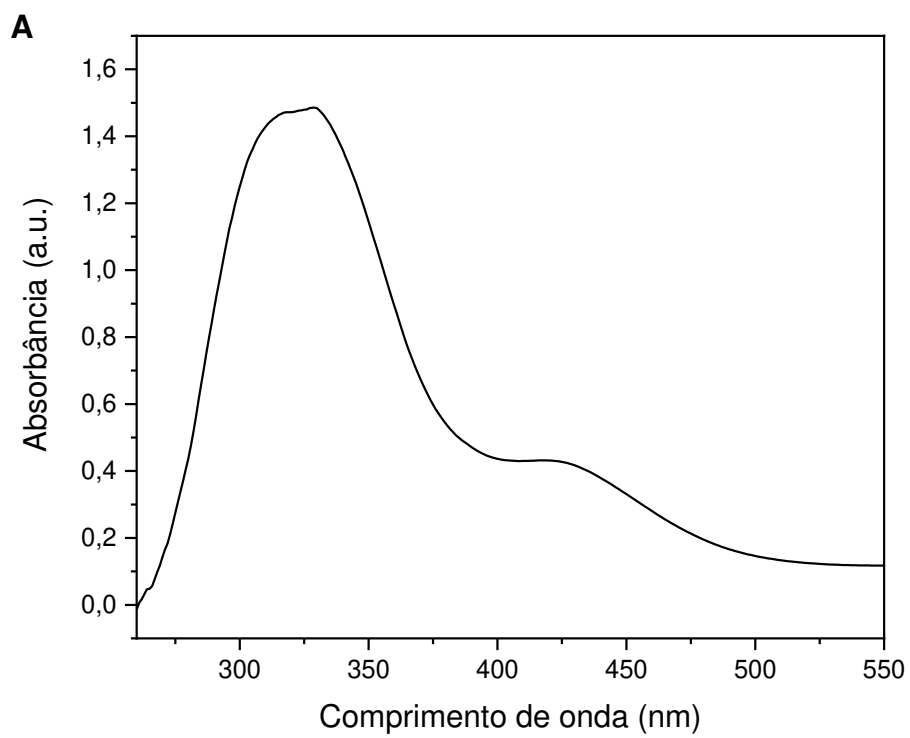
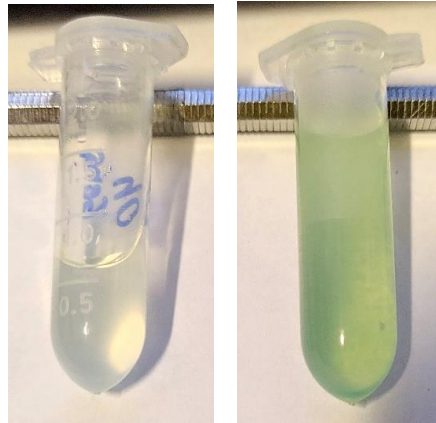


FIGURA 1.





B FIGURA 2. **C**

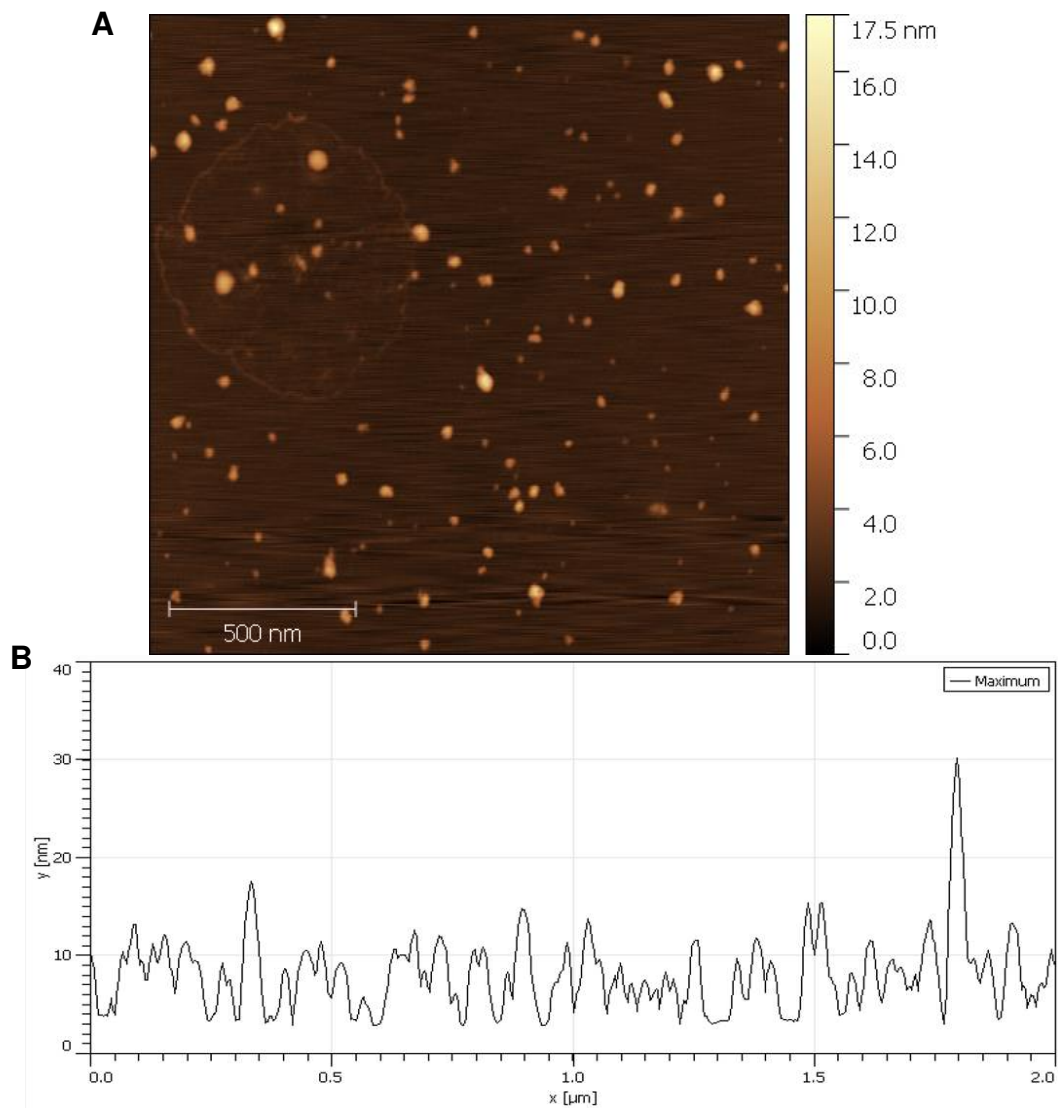


FIGURA 3.

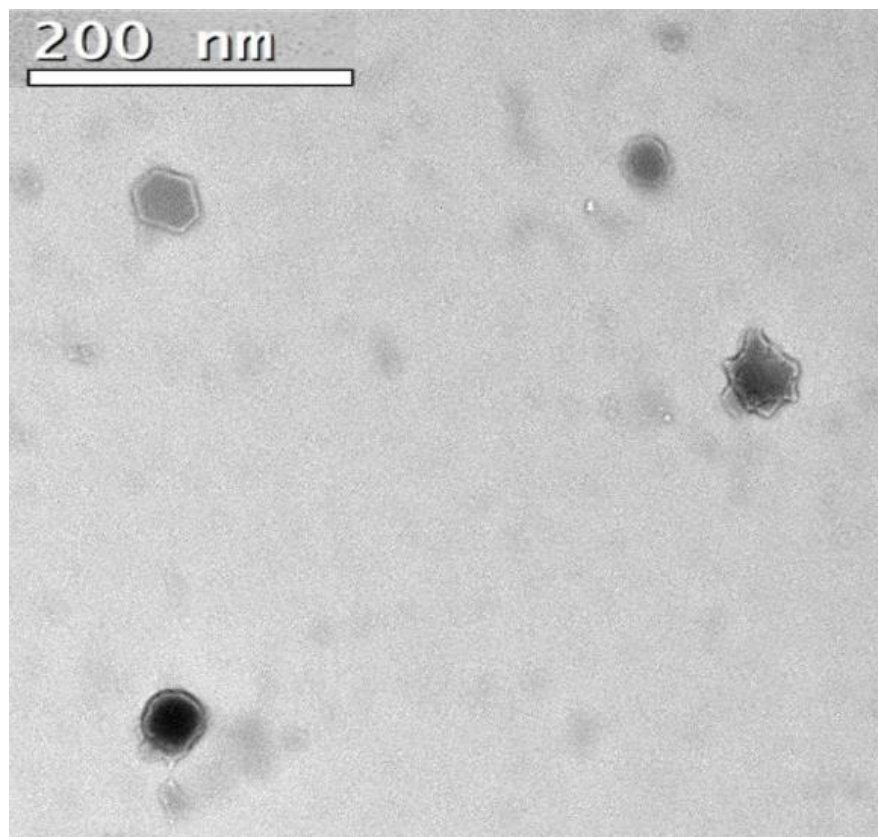


FIGURA 4.

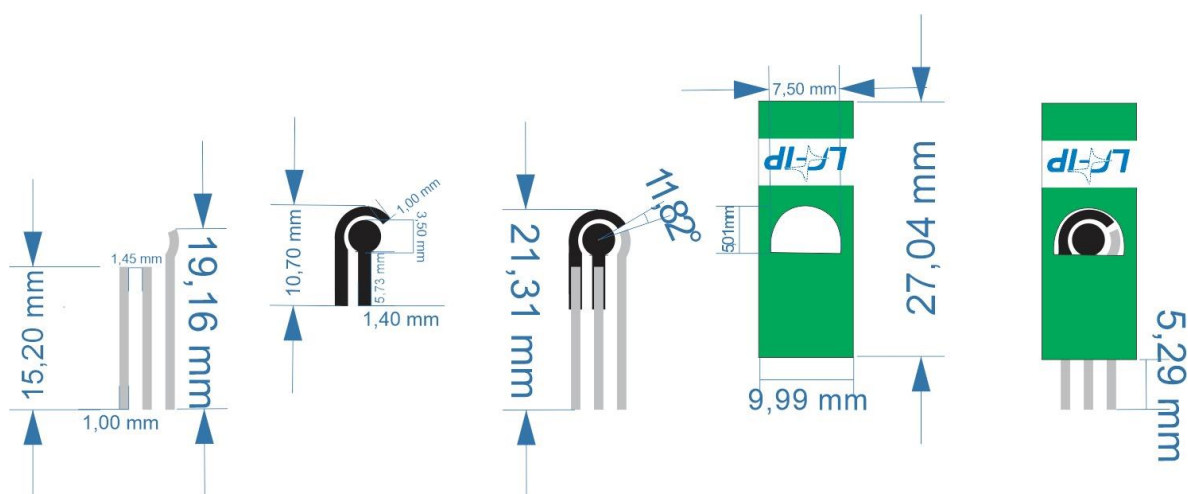


FIGURA 5.

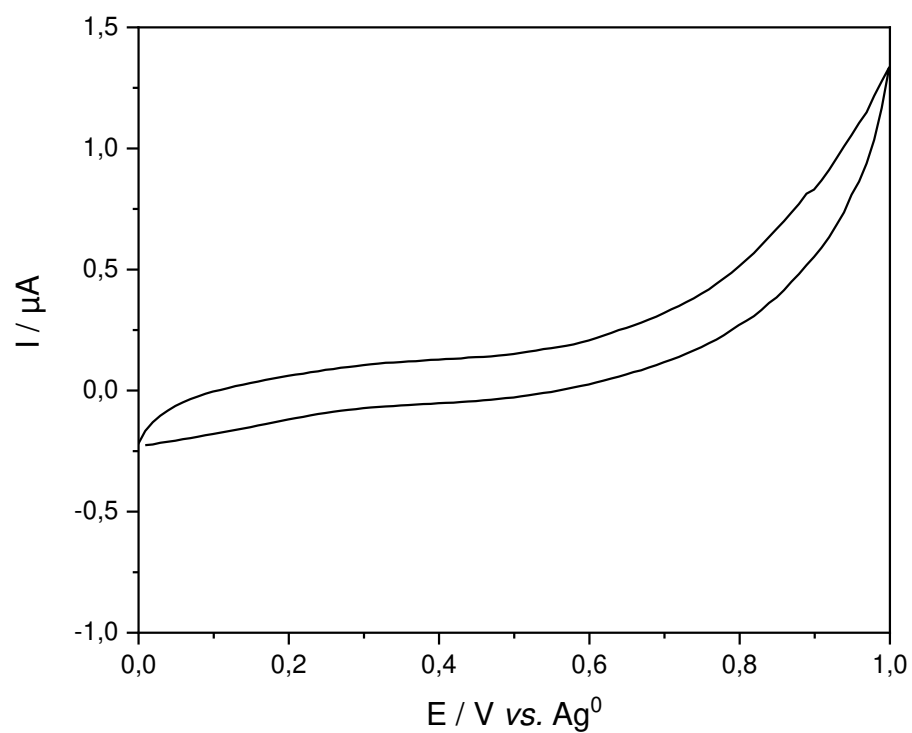
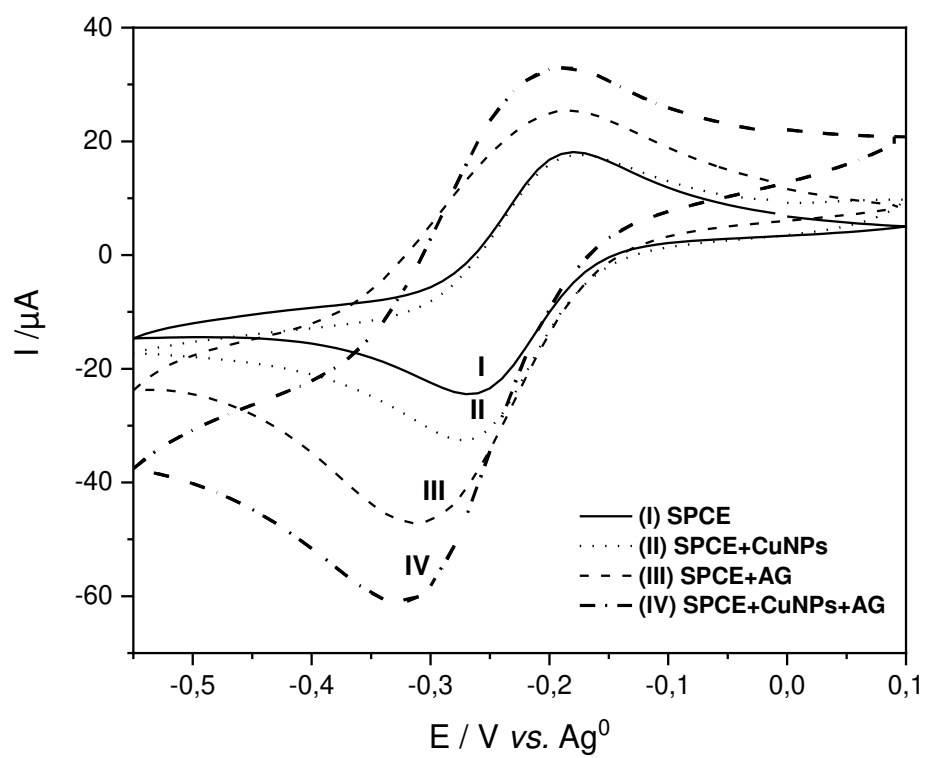


FIGURA 8.



GURA 9.

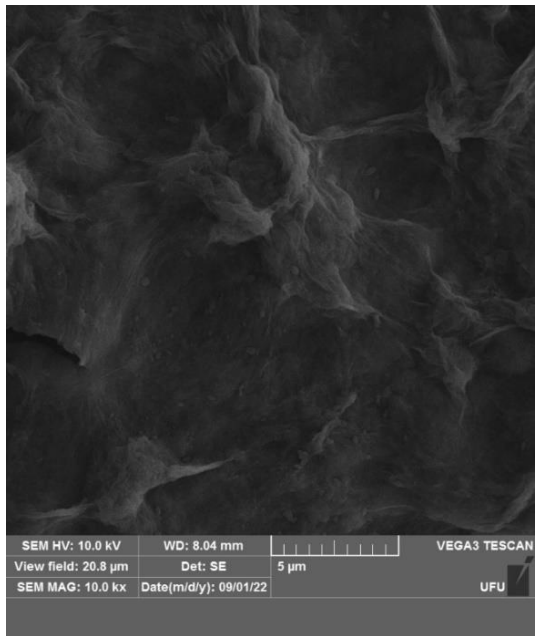


FIGURA 10 A.

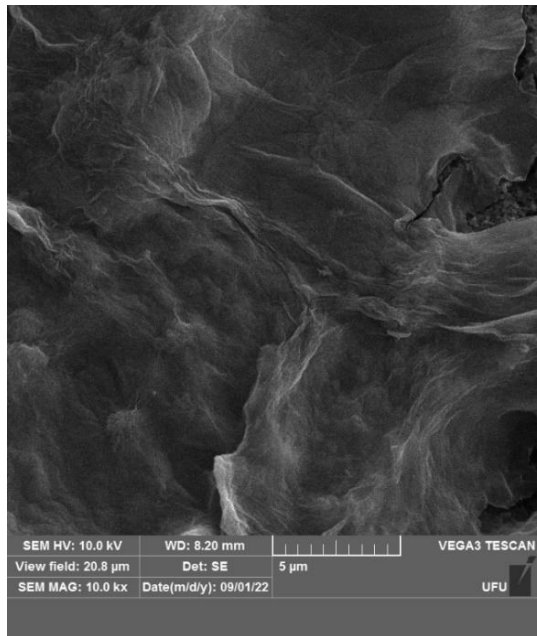


FIGURA 10 B.

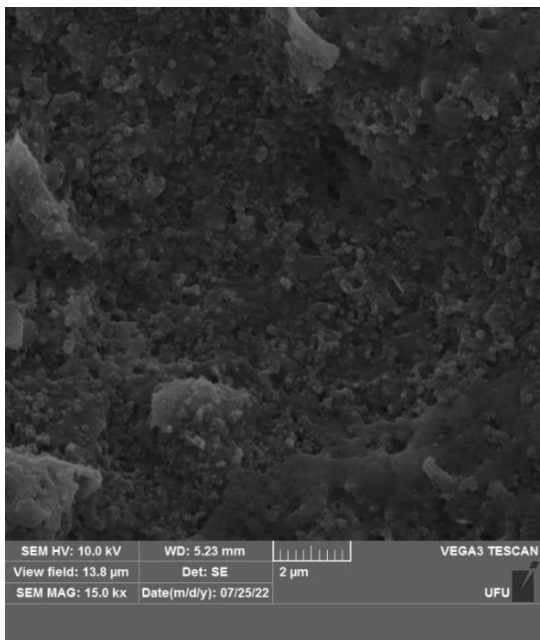


FIGURA 10 C.

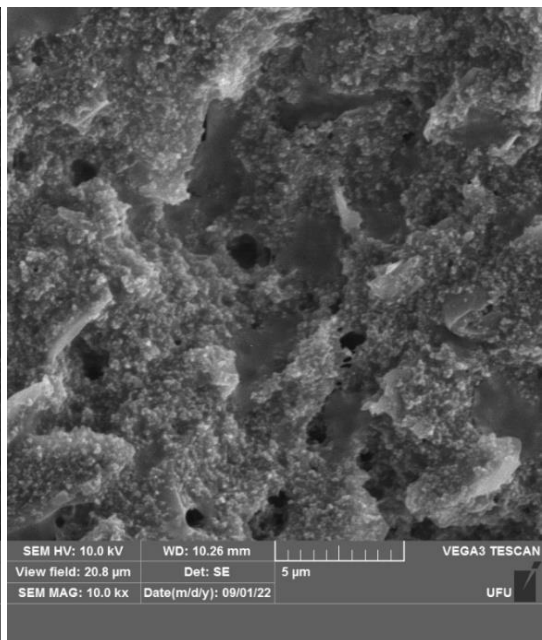


FIGURA 10 D.

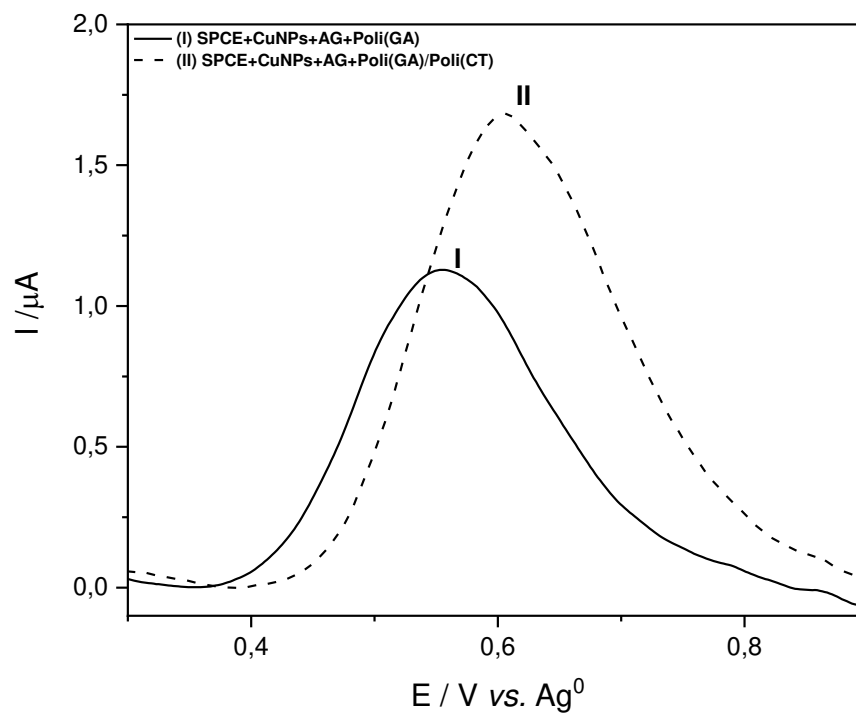


FIGURA 11A.

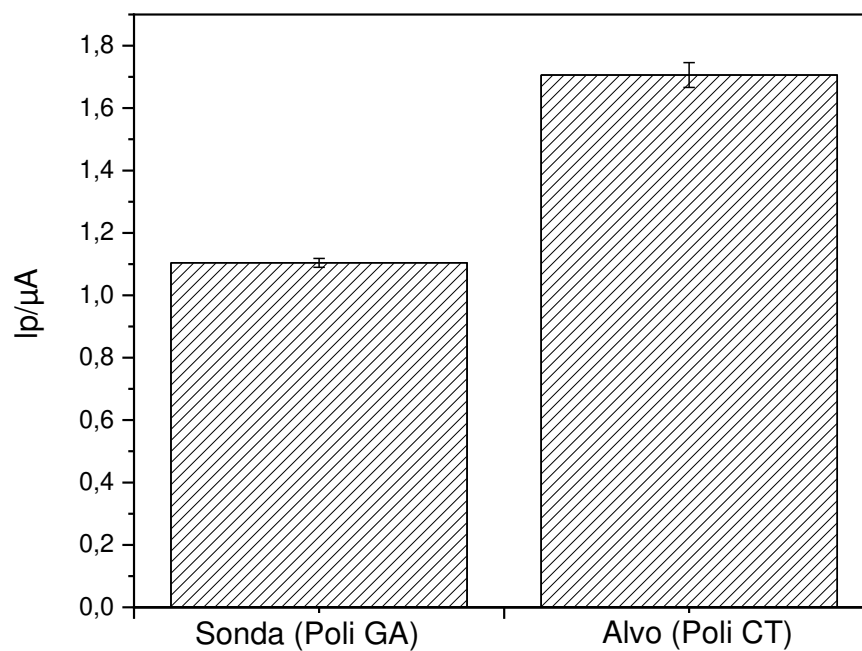


FIGURA 11B.

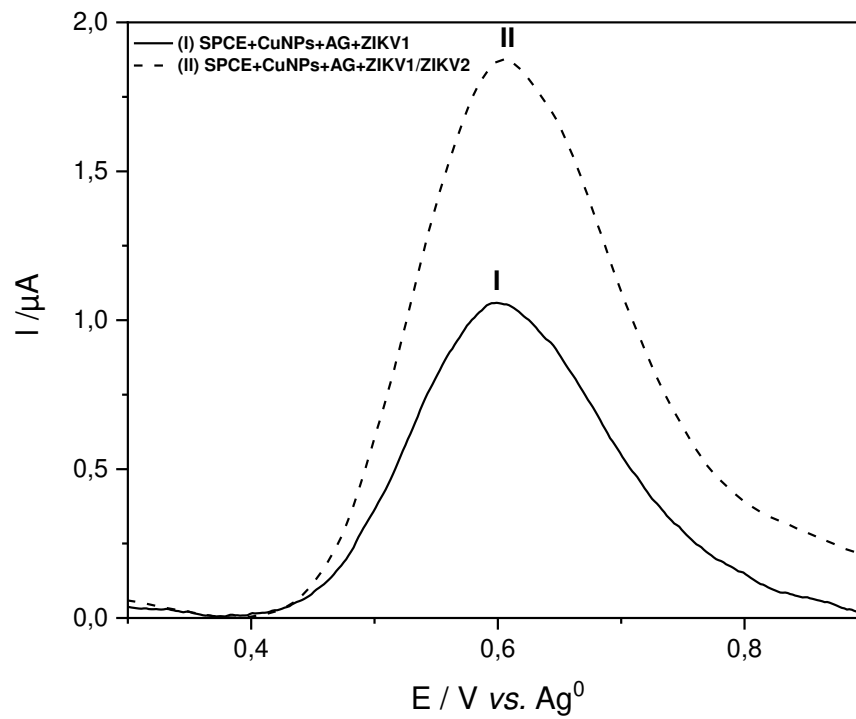


FIGURA 12A.

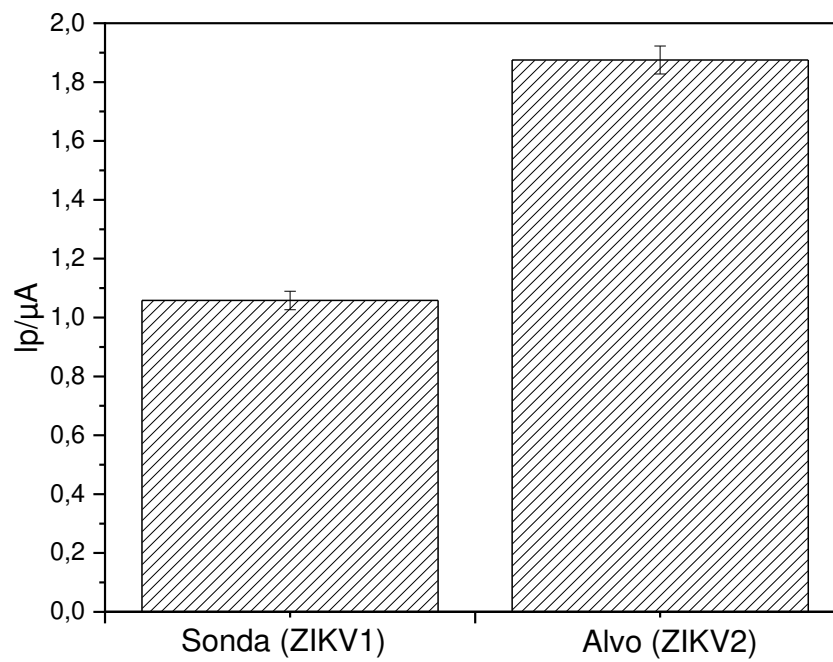


FIGURA 12B.

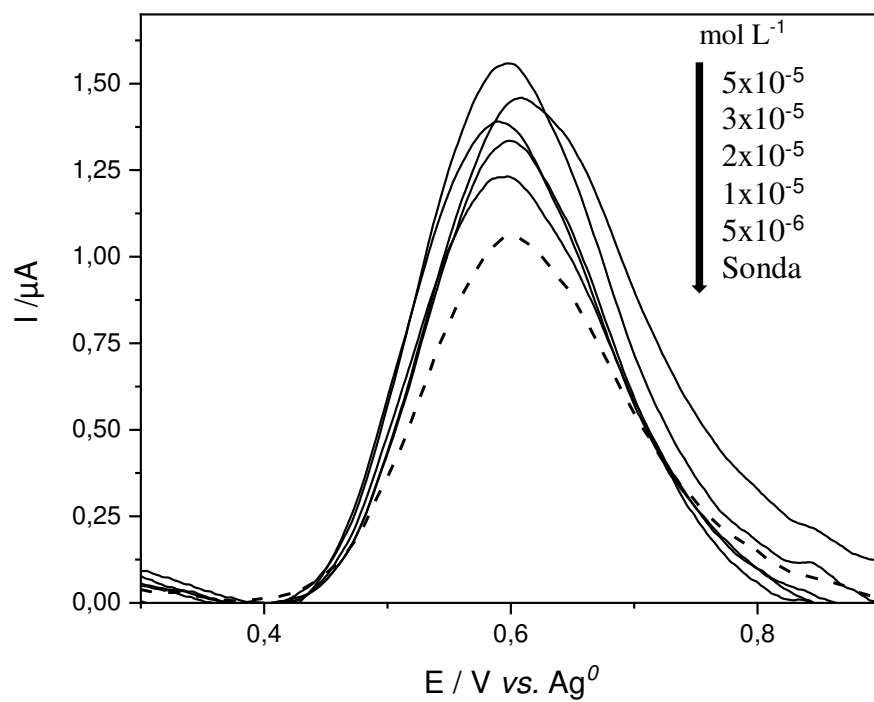


FIGURA 13A.

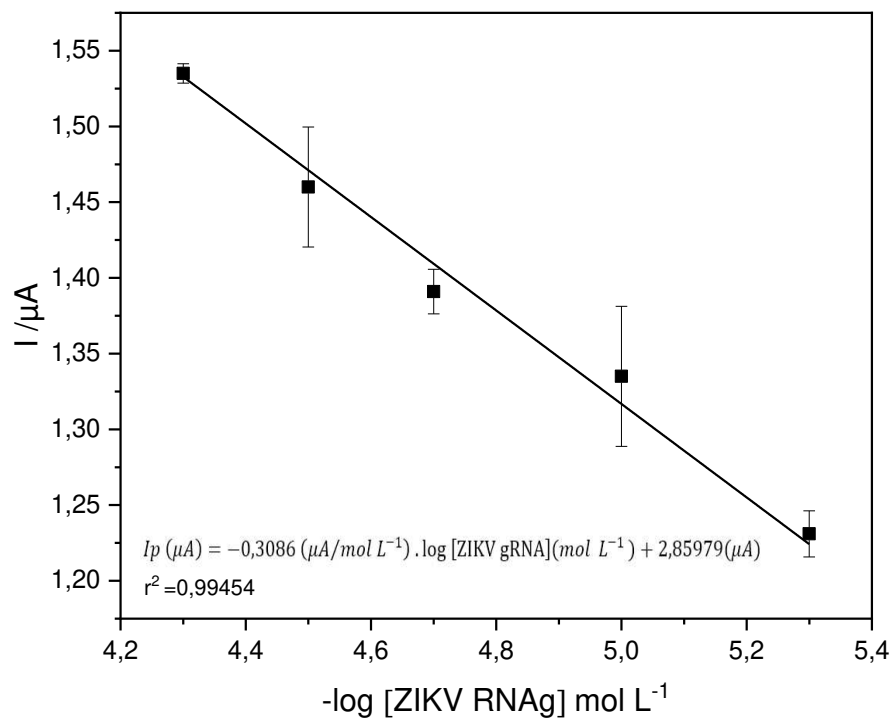


FIGURA 13B.

CONCLUSÕES

O presente trabalho objetivou o desenvolvimento e caracterização de um novo nanocompósito baseado em ácido de grafeno (AG) e nanopartículas de cobre (CuNPs) aplicado em plataformas de biossensores eletroquímicos na identificação de biomoléculas simples, como sequências de DNA Poli GA – Poli CT, e específicas, como um fragmento de DNA específico (ZIKV) para a detecção de vírus Zika.

A combinação de um eletrodo de carbono *screen-printed* de baixo custo feito em laboratório, com um derivado de grafeno seletivo e densamente funcionalizado com grupos carboxila e, nanopartículas de cobre obtidas pela síntese verde, posteriormente modificado com uma sonda de DNA de fita simples, resultou em um dispositivo de detecção promissor o qual preencheu 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 no aumento de grupos de ácidos carboxílicos na rede de carbono do OG por meio da agregação de um composto básico como NaOH (hidróxido de sódio) e ácido (ácido cloroacético), ocasionando a formação de AG, 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 com a agregação das nanopartículas de cobre apresentou melhor performance quando adicionado como nanocompósito SPCE/CuNPs/AG ao invés de apenas SPCE/AG. 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 interaja com a plataforma.

A sonda específica ao vírus Zika (ZIKV1) 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 biossensor 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 $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

¹. O presente genossensor eletroquímico tem vantagens sobre os métodos usuais, 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. Além disso, a plataforma relatada tem potencial para imobilizar uma grande variedade de elementos específicos de reconhecimento para uma infinidade de alvos, expandindo tremendamente seu potencial de aplicação nos campos biomédico, de colheita e análise de alimentos.

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, além da contribuição acadêmica científica.