

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

MARINES STEINMETZ

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO DE DNA COM
SILSESQUIOXANO PARA DETECÇÃO *LABEL-FREE* DO VÍRUS ZIKA

PONTA GROSSA
2019

MARINES STEINMETZ

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO DE DNA COM
SILSESQUIOXANO PARA DETECÇÃO *LABEL-FREE* DO VÍRUS ZIKA

Dissertação apresentada para a obtenção do título
de Mestre em Química Aplicada no Programa de
Pós-Graduação em Química Aplicada da
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof. Dra. Karen Wohnrath
Coorientadora: Profa. Dra. Christiana Andrade
Pessoa

PONTA GROSSA
2019

S823 Steinmetz, Marines
Desenvolvimento de um biossensor impedimétrico de DNA com silsesquioxano para detecção *label-free* do vírus zika. / Marines Steinmetz. Ponta Grossa, 2019.
89 f.

Dissertação (Mestrado em Química Aplicada - Área de Concentração: Química), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Karen Wohnrath.

Coorientadora: Profa. Dra. Christiana Andrade Pessoa.

1. Diagnóstico vírus zika. 2. Biossensor impedimétrico. 3. Nanopartículas de ouro. 4. Silsesquioxano. I. Wohnrath, Karen. II. Pessoa, Christiana Andrade. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Química. IV.T.

CDD: 547

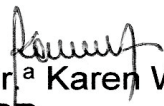
TERMO DE APROVAÇÃO

MARINES STEINMETZ

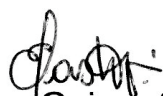
“DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO DE DNA COM SILSESQUIOXANO PARA DETECÇÃO LABEL-FREE DO VÍRUS ZIKA”.

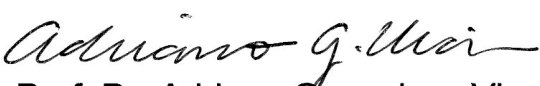
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientadora :


Prof^a. Dr.^a Karen Wohnrath
UEPG/PR


Prof^a. Dr.^a Christiana Andrade Pessôa
UEPG/PR


Prof^a. Dr.^a Eryza Guimarães de Castro
UNICENTRO/PR


Prof. Dr. Adriano Gonçalves Viana
UEPG/PR

Ponta Grossa, 28 de fevereiro de 2019.

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha família, pais e irmãos pelo apoio durante todos esses anos de estudo e por acreditarem em mim sempre.

As minhas lindas sobrinhas que amo muito, Hannah, Mathea e Agnes, por chegarem a dar mais cor e alegria em nossas vidas.

Ao Pablo, meu companheiro de grandes momentos de felicidade e compaixão durante este período. Obrigada pela paciência e empatia.

À minha orientadora Karen Wohnrath e Coorientadora Christiana A. Pessoa pela orientação e ensinamentos que contribuíram muito para meu crescimento e realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Rafael Mazer Etto pela orientação e auxílio para um melhor entendimento sobre questões bioquímicas deste projeto.

Aos meus amigos do mestrado Leticia e Joslaine.

Aos meus amigos do laboratório Dhésmon, Luma, Cleverson, Ellen e aos demais integrantes do GDEM por me ajudarem na resolução das minhas dúvidas e também pelas conversas descontraídas.

À banca examinadora: Prof. Dr. Adriano Viana e Eryza Castro pela disponibilidade de participação e contribuição neste trabalho.

Agradeço à Fundação Araucária/Secretaria da Saúde do Estado do Paraná pelo financiamento do projeto (073/2016) e concessão de bolsa de mestrado.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-Labmu) pela realização das análises que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

E, acima de tudo, o meu maior agradecimento, a Deus.

Muito obrigada!

RESUMO

A detecção do vírus Zika (ZIKV) tornou-se um desafio de saúde global nos últimos anos devido sua rápida expansão geográfica associada ao aumento de anomalias neurológicas como a síndrome de Guillain-Barré e a Microcefalia. Atualmente, as técnicas de diagnóstico para o ZIKV requerem trabalho intenso, são caros, demorados, necessário o uso de equipamentos sofisticados, além de proporcionarem resultados falsos positivos. Este presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um biossensor impedimétrico de DNA para detecção *label-free* desse vírus. Para tanto, obteve-se uma plataforma constituída por um eletrodo de carbono vítreo oxidado (ox-ECV) modificado com nanopartículas de ouro funcionalizadas pelo polieletrólito cloreto de 3-n-propilpiridínico silsesquioxano (AuNPs-SiPy). Esse nanohíbrido foi caracterizado por medidas de UV-VIS, DLS, FTIR, Raman e DRX, e o eletrodo de carbono vítreo modificado com o nanohíbrido, ox-ECV-[AuNPs-SiPy] por técnicas eletroquímicas. Após a imobilização de um oligonucleotídeo sintético específico do genoma do ZIKV com grupamento tiol (ZIKV1) sobre este eletrodo, formou-se o biossensor ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1, cujas etapas de modificação foram otimizadas através de análises univariadas e multivariada. O biossensor otimizado foi caracterizado por espectroscopia de impedância eletroquímica, voltametria cíclica e microscopia de força atômica. O reconhecimento do ssDNA alvo do ZIKV foi monitorado pela variação da resistência à transferência de carga (ΔR_{ct}) do marcador eletroquímico utilizado ($[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$) e pela rugosidade (R_q) da superfície do eletrodo. Este biossensor apresentou um limite de detecção (LOD) de $0,41 \text{ pmol L}^{-1}$ com faixa linear de $1,0 \times 10^{-12}$ - $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. O dispositivo proposto também apresentou ser estável até 90 dias (98,02 % da resposta inicial), sensível e seletivo para quantificar o alvo do ZIKV em amostras de soro, sendo portanto, uma ferramenta promissora para o diagnóstico precoce do ZIKV.

Palavras chaves: diagnóstico vírus Zika, biossensor impedimétrico, nanopartículas de ouro, silsesquioxano.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) detection has become a global health challenge in recent years due to its rapid geographical expansion associated with the increase of neurological abnormalities such as Guillain-Barré syndrome and Microcephaly. Currently, the techniques for ZIKV diagnosis require labor intense, costly and lengthy tests using sophisticated equipment; moreover, false positives occur. This work aimed to develop an impedimetric DNA biosensor for label-free detection of this virus. For this, a platform consisting of an oxidized glassy carbon electrode (ox-ECV) modified with gold nanoparticles functionalized by the polyelectrolyte 3-n-propylpyridine chloride silsesquioxane (AuNPs-SiPy) was obtained. This nanohybrid was characterized by UV-VIS, DLS, FTIR, Raman and XRD measurements, and the nanohybrid modified carbon glass electrode, ox-ECV-[AuNPs-SiPy] by electrochemical techniques. After the immobilization of a specific synthetic oligonucleotide of the ZIKV genome with thiol grouping (ZIKV1) on this electrode, the biosensor ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1 was formed, whose modification steps were optimized through univariate and multivariate. The optimized biosensor was characterized by electrochemical impedance spectroscopy, cyclic voltammetry and atomic force microscopy. The recognition of the ZIKV target ssDNA was monitored by the variation transfer resistance (ΔR_{ct}) of the electrochemical marker used ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$) and the roughness (R_a) of the electrode surface. This biosensor presented a detection limit (LOD) of 0.41 pmol L^{-1} with a linear range of $1.0 \times 10^{-12} - 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. The proposed device also presents to be stable for 90 days (98.02 % of the initial response), sensitive and selective to quantify the target of ZIKV in serum samples, and is therefore a promising tool for the early diagnosis of ZIKV.

Key-words: diagnosis of Zika virus, impedimetric biosensor, gold nanoparticles, silsesquioxane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição histórica mundial do ZIKV documentados durante o período 1947 a 2016.....	19
Figura 2 – Ilustração representativa (A) da estrutura do ZIKV, (B) RNA genômico, proteínas estruturais e não-estruturais presentes na composição do vírus.....	20
Figura 3 – Principais componentes presentes em um biossensor.....	24
Figura 4 – (A) Formação da ligação fosfodíester entre os nucleotídeos formando a ssDNA. (B) Pareamento das bases nitrogenadas entre duas ssDNA formando a dsDNA definido por Watson e Crick.....	25
Figura 5 – Ilustração do pareamento do cDNA e sua respectiva síntese.....	25
Figura 6 – Representação esquemática do (A) diagrama de Nyquist. (B) Circuito de Randles, C_{dl} = elemento de fase constante, descreve a capacitância de camada dupla no eletrodo / interface de solução; W = elemento de Warburg, representa o processo difussional em baixas frequências.....	28
Figura 7 – Representação esquemática do funcionamento de um genossensor impedimétrico.....	29
Figura 8 – Representação esquemática da construção do biossensor pra detecção de DNA alvo.....	30
Figura 9 – Representação esquemática das etapas de preparação do genossensor para detecção do DNA do DENV.....	31
Figura 10 – Representação esquemática das etapas de construção do genossensor <i>label free</i> para HIV.....	32
Figura 11 – Estratégias de biofuncionalização das AuNPs.....	33
Figura 12 – Representação esquemática das etapas de preparação do biossensor para detecção de oligonucleotídeos.....	34
Figura 13 – Procedimento empregado para a construção do biossensor de DNA impedimétrico para detecção do vírus da Hepatite B.....	35
Figura 14 – Representação esquemática das etapas de construção do biossensor para Leishmaniose.....	35
Figura 15 – Representação esquemática das etapas de preparação do biossensor ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1 e hibridação do ssDNA alvo.....	41
Figura 16 – Espectros de absorção na região do UV-Vis das dispersões de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, NaBH_4 , SiPy e AuNPs-SiPy, obtidos em solução aquosa.....	44

Figura 17 – (A) Histograma da distribuição do tamanho hidrodinâmico obtido para as AuNPs-SiPy; (B) estabilidade das AuNPs-SiPy analisadas em função do tamanho hidrodinâmico <i>versus</i> o tempo (meses).....	46
Figura 18 – Espectros vibracionais na região do infravermelho do SiPy e AuNPs-SiPy liofilizado, obtidos em pastilhas de KBr.....	47
Figura 19 – Espectros de espalhamento Raman obtidos para o sólido SiPy e AuNPs-SiPy liofilizado, em $\lambda = 632,8$ nm.....	48
Figura 20 – Difrátogramas de raios X do SiPy no estado sólido e do nanocompósito AuNPs-SiPy liofilizado.....	49
Figura 21 – Voltamogramas cíclicos para os ECV, ox-ECV, ox-ECV-[SiPy] e ox-ECV-[AuNPs-SiPy], obtidos em $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ a $50,0 \text{ mVs}^{-1}$	51
Figura 22 – Estabilidade de resposta do ox-ECV-[AuNPs-SiPy] analisado em termos de (A) I_{pc} e (B) E_{pc} em função do número de ciclos voltamétricos.....	52
Figura 23 – Voltamogramas cíclicos dos ECV, ox-ECV ox-ECV-[SiPy] e ox-ECV-[AuNPs-SiPy] obtidos em $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ do tampão PBS, a $50,0 \text{ mVs}^{-1}$	53
Figura 24 – (A) Voltamogramas cíclicos (velocidade de varredura: $50,0 \text{ mV s}^{-1}$) e (B) diagramas de Nyquist (potencial de circuito aberto OCP); faixa de frequência: $10,0 \text{ kHz}$ to $0,1 \text{ Hz}$; amplitude: 10 mV) obtidos para os ECV, ox-ECV, ox-ECV-[SiPy] e ox-ECV-[AuNPs-SiPy] em $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão PBS (pH 7,4) na presença de $5,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4\text{Fe(CN)}_6/\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$, a 20°C	54
Figura 25 – Voltamogramas cíclicos dos ECV, ox-ECV, ECV-[SiPy] e ECV-[AuNPs-SiPy] obtidos em $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão PBS (pH 7,4) na presença de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do marcador redox ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$).....	55
Figura 26 – Efeito da quantidade das AuNPs-SiPy empregadas na construção do biossensor em função do valor da ΔR_{ct}	57
Figura 27 – Gráfico de Pareto para o efeito resultante da otimização da variável por planejamento fatorial completo 3^2 (com 95% de nível de confiança).....	59
Figura 28 – Gráfico da superfície de resposta para ΔR_{ct} em função de $[\text{ZIKV1}]$ e tempo _{inc}	60
Figura 29 – Efeito da temperatura em função da ocorrência da hibridação e resposta do biossensor.....	61
Figura 30 – (A) Voltamogramas cíclicos (velocidade de varredura: $50,0 \text{ mV s}^{-1}$ e (B) diagramas de Nyquist (OCP; faixa de frequência: $10,0 \text{ kHz}$ to $0,1 \text{ Hz}$; amplitude: 10 mV) para as etapas da construção do biossensor de ZIKV, em $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ tampão PBS (pH 7,4) na presença de $5,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4\text{Fe(CN)}_6/\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$, temperatura para hibridação: 37°C , $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ZIKV1 e ZIKV2/no ZIKV2.....	62

- Figura 31 – Representação esquemática da quebra da ligação dissulfeto presente no ssDNA sonda e respectiva formação da ligação covalente (S-Au) com as AuNPs presente na superfície do eletrodo.....64
- Figura 32 – Diagramas de Nyquist do ox-ECV-[AuNps-SiPy] na presença e ausência de cistamina obtidos em tampão PBS 0,5 mol L⁻¹ (pH 7,4) na presença 5,0 mmol L⁻¹ K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆, temperatura ambiente (OCP; faixa de frequência: 10,0 kHz á 0,1 Hz; amplitude: 10 mV).....65
- Figura 33 – Representação esquemática da formação da ligação covalente entre cistamina e ouro. (A) Aproximação do cistamina na superfície de ouro. (B) Quando os átomos de enxofre e ouro estão próximos suficiente, ocorre o rompimento da ligação S-S ao mesmo tempo em que duas ligações tiol-Au se formam. Em (C) ocorre a formação da ligação tiol-Au e (D) as moléculas se auto organizam.....65
- Figura 34 – Diagramas de Nyquist do ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1 na ausência e presença de ZIKV2 e presença da mistura de ZIKV2 + no-ZIKV2, obtidos em 0,5 mol L⁻¹ tampão PBS (pH 7,4) contendo 5,0 mmol L⁻¹ de K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆, temperatura de hibridação: 37 °C (OCP; faixa de frequência: 10,0 kHz a 0,1 Hz; amplitude: 10 mV).....67
- Figura 35 – Diagramas de Nyquist para ox-ECV-[AuNPs-SiPy] modificado pela incubação de 2 h ou 2 h 50 min em [Fe(CN)₆^{4-/3-}], obtidos em 0,5 mol L⁻¹ tampão PBS (pH 7,4) na presença de 5,0 mmol L⁻¹ K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆, à temperatura ambiente (OCP; faixa de frequência: 10,0 kHz a 0,1 Hz; amplitude: 10 mV).....69
- Figura 36 – Diagramas de Nyquist referente as configurações (A) ox-ECV/ZIKV1, (B) ox-ECV-[SiPy]/ZIKV1 e (C) ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1 analisadas frente ao ssDNA alvo ZIKV2. Obtidos em 0,5 mol L⁻¹ tampão PBS (pH 7,4) na presença de 5,0 mmol L⁻¹ K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆, temperatura de hibridação 37 °C (OCP; faixa de frequência: 10,0 kHz a 0,1 Hz; amplitude: 10 mV).....70
- Figura 37 – Imagens de AFM para (A) ox-ECV, (B) ox-ECV-[AuNPs-SiPy], (C) ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1, (D) ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1/ZIKV2 e (E) ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1/no-ZIKV2.....72
- Figura 38 – (A) Curvas analíticas obtidas dos diagramas de Nyquist para ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1 após a hibridação com diferentes [ZIKV2]: (a) ZIKV1, (b) 1,0 x 10⁻¹² mol L⁻¹ (c) 1,0 x 10⁻¹¹ mol L⁻¹, (d) 1,0 x 10⁻¹⁰ mol L⁻¹, (e) 1,0 x 10⁻⁹ mol L⁻¹, (f) 1,0 x 10⁻⁸ mol L⁻¹, (g) 1,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹, (h) 1,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹. (B) Curva de regressão linear, R= 0.99391, ΔR_{ct} (%) = 9.2477 + 11,055 C_[ZIKV2]. Diagramas obtidos em 0,50 mol L⁻¹ tampão PBS (pH 7,4) na presença de 5,0 mmol L⁻¹ K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆, temperatura de hibridação: 37 °C, 5 μmolL⁻¹ de ZIKV1, (OCP; faixa de frequência: 10,0 kHz a 0,1 Hz; amplitude: 10 mV).....73

Figura 39 – Relação entre ΔR_{ct} e o número de dias para avaliar a estabilidade no armazenamento a longo prazo do biossensor ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1 desenvolvido.....77

Figura 40 – Diagramas de Nyquist do ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1 após (A) 1 dia e (B) 27 dias de preparo (curva de bolinha), na presença de ZIKV2 (curva de quadrado) e no-ZIKV2 (curva de triângulo), obtidos em $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão PBS (pH 7,4) contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4\text{Fe(CN)}_6/\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$, temperatura de hibridação: 37°C (OCP; faixa de frequência: 10,0 kHz a 0,1 Hz; amplitude: 10 mV).....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Faixa de cópias de RNA presente em 1 mL de fluido corporal em pacientes sintomáticos.....	22
Tabela 2 – Valores dos níveis das variáveis empregados na otimização do biossensor ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1 via planejamento fatorial 3 ²	42
Tabela 3 – Modos vibracionais e respectivos valores de números de onda para região do infravermelho do SiPy e AuNPs-SiPy liofilizado, obtidos em pastilhas de KBr...	47
Tabela 4 – Valores de I _{pa} , I _{pc} , ΔI _p , E _{pa} , E _{pc} , ΔE _p , R _s , R _{ct} e erro R _{ct} obtidos por medidas de VC e EIE para o ECV e os ECVs modificados. O erro R _{ct} corresponde a porcentagem de erro que a análise de EIE proporciona.....	54
Tabela 5 – Valores de I _{pa} , I _{pc} , ΔI _p , E _{pa} , E _{pc} e ΔE _p , obtidos por medidas de VC para o ECV e os ECVs modificados preparadas em tampão PBS (pH 7,4) 0,5 mol L ⁻¹ na presença de 5,0 mmol L ⁻¹ ([Ru(NH ₃) ₆] ^{2+/3+}).....	56
Tabela 6 – Matriz do planejamento fatorial completo 3 ² utilizada para a otimização das variáveis envolvidas na preparação do biossensor. Os níveis das variáveis estudados foram: [ZIKV1] = 1 (-), 5,5 (0) e 10 μmol L ⁻¹ (+); e tempo de incubação = 90 (-), 120 (0) e 150 min (+).....	58
Tabela 7 – Resultados ANOVA do modelo quadrático para otimização do biossensor.....	60
Tabela 8 – Valores de I _{pa} , I _{pc} , ΔI _p , E _{pa} , E _{pc} e ΔE _p obtidos por medidas de VC para os ECV e ECVs modificados em cada etapa de construção do biossensor.....	62
Tabela 9 – Valores de R _s , R _{ct} , erro R _{ct} , C _{dl} e W obtidos por medidas de EIE para os ECV e ECVs modificados em cada etapa de construção do biossensor.....	63
Tabela 10 – Valores de R _s , R _{ct} e ΔR _{ct} obtidos por medidas de EIE para os ECVs modificados para o estudo da especificidade do ssDNA alvo.....	68
Tabela 11 – Valores de R _s , R _{ct} , erro R _{ct} obtidos por medidas de EIE para os ECVs modificados para o estudo do efeito do marcador redox empregado.....	69
Tabela 12 – Valores de ΔR _{ct} obtidos após a hibridação entre as fitas de DNA para três diferentes configurações de eletrodo de trabalho.....	70
Tabela 13 – Valores de R _q e ΔR _q obtidos para cada etapa da construção do biossensor <i>versus</i> valor de R _{ct} e ΔR _{ct} obtido na caracterização eletroquímica do sensor.....	73
Tabela 14 – Comparação do biossensor de DNA proposto com outros sensores reportados na literatura utilizados na detecção de ZIKV.....	75
Tabela 15 – Valores de ΔR _{ct} do biossensor ox-ECV-[AuNPs-SiPy] empregado na detecção de amostra de soro contaminados com ZIKV.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔR_{ct} – Variação percentual da resistência à transferência de carga
 ΔR_q – Variação percentual da rugosidade
 λ – Comprimento de onda
AFM – Microscopia de força atômica
AG/AB – Antígeno/Anticorpo
AuNPs – Nanopartículas de ouro
AuNPs-SiPy – Nanopartículas de ouro estabilizadas em cloreto de 3-n-propilpiridínico silsesquioxano
 C_{dl} – Elemento de fase constante, descreve a capacitância de camada dupla no eletrodo
cDNA – DNA simples fita complementar
CHI – Quitosana
CHIKV – Vírus Chikungunya
DENV – Vírus da Dengue
Dig – dioxigênio
DLS – Espalhamento dinâmico da luz
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DRX – Difractometria de raios X
dsDNA – *Double stranded DNA* (DNA de dupla fita)
dsRNA – *Double stranded RNA* (RNA de dupla fita)
DTSP – Ditiobis(succinimidil-propionato)
DTT – Ditioneitol
ECV – Eletrodo de carbono vítreo
EDC-NHS – (Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) e N-hidroxissuccinimida
EIE – Espectroscopia de impedância eletroquímica
ELISA – Ensaio de imunoadsorção enzimática de captura de anticorpos
EPC – Eletrodo de pasta de carbono
FMR – Ressonância ferromagnética
FTIR – Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho
FTO – Óxido de estanho dopado com flúor
GDEM – Grupo de desenvolvimento de eletrodos modificados
GPS – 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano
HIV – Vírus da imunodeficiência
HPLC – *High performance liquid chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)
HRP – Enzima peroxidase de rábano
 I_{pa} – Corrente de pico anódico
 I_{pc} – Corrente de pico catódico
IUPAC – União Internacional da Química Pura e Aplicada
LAMP – Ampliação isotérmica mediada por loop
LbL – *Layer-by-layer* (camada por camada)
LOD – Limite de detecção
MB – Azul de metileno
MNPs – Nanopartículas metálicas
NiTsPc – Tetrasulfoftalocianina de níquel (II)
no-ZIKV2 – DNA alvo não complementar
NTC – Nanotubos de carbono
Olig. – oligonucleotídeos

PANI/AuNPs – Matriz de polianilina contendo nanopartículas de ouro
PBS – Tampão fosfato
PFU – Unidades formadoras de placa
PRNT – Método de neutralização pela redução de placas
PVS – Ácido polivinil sulfônico
qRT-PCR – Reação em cadeia de polimerase por transcrição reversa quantitativa em tempo real
RAMAN – Espectroscopia Raman
 R_{ct} – Resistência à transferência de carga
RNA – Ácido ribonucleico
 R_q - Rugosidade
 R_s – Resistência da solução
RPS – Ressonância de plásmon de superfície
SAM – monocamadas automontadas
SD – Desvio padrão das medidas em branco (ausência do analito)
SiPy – Cloreto 3-n-propilpiridínico silsesquioxano
ssDNA – *Single stranded DNA* (DNA simples fita)
 $Tempo_{inc}$ – tempo de incubação da sonda
Tiol-Au – ligação covalente entre o grupo tiol e ouro
TMSPT – 3-(trimetilsilano)-1-propanotiol
UV-VIS – Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta visível
VC – Voltametria cíclica
W – Componente de Wamburg
YFV – Vírus da febre amarela
ZIKV – *Zika virus* (Vírus Zika)
[ZIKV1] – concentração do DNA sonda
ZIKV1 – DNA sonda com agrupamento tiol
ZIKV2 – DNA alvo complementar
ZnO/Pt-Pd – Óxido de zinco/platina-paládio
 ΔE_p – Variação do potencial aplicado
 ΔI_p – Variação da corrente de pico aplicada
 ζ – Potencial zeta
 ν – Estiramento
 λ – Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	VÍRUS ZIKA (ZIKV).....	18
2.2	BIOSENSORES ELETROQUÍMICOS DE DNA	23
2.2.1	Biossensores impedimétricos de DNA	27
2.3	NANOPARTÍCULAS DE OURO APLICADAS NA CONSTRUÇÃO DE BIOSENSORES IMPEDIMÉTRICOS	32
2.4	BIOSENSORES PARA ZIKV	35
3	OBJETIVOS	38
3.1	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4	PARTE EXPERIMENTAL	39
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	39
4.2	METODOLOGIA	39
4.2.1	Síntese e caracterização do nanohíbrido AuNPs-SiPy	39
4.2.2	Etapas de preparação do biossensor de DNA	40
4.2.3	Otimização do biossensor de ZIKV	41
4.2.4	Medidas eletroquímicas	42
4.2.5	Caracterização do biossensor.....	43
4.2.6	Análise da amostra real e estudo da estabilidade.....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS AuNPs-SiPy	44
5.2	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS ELETRODOS ECV, ox-ECV, ox- ECV-[SiPy] e ox-ECV-[AuNPs-SiPy]	50
5.3	ETAPAS DE OTIMIZAÇÃO DO BIOSSENSOR DE DNA	56
5.4	CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSENSOR DE DNA.....	61
5.5	EFEITO DA ESPECIFICIDADE DO DNA ALVO	67
5.6	EFEITO DO MARCADOR REDOX EMPREGADO	68
5.7	A INFLUÊNCIA DAS AuNPs-SiPy NA COMPOSIÇÃO DO BIOSSENSOR.....	69
5.8	CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DO BIOSSENSOR.....	71
5.9	CURVA ANALÍTICA.....	73
5.10	DETECÇÃO DO ZIKV EM SORO E ESTABILIDADE DO BIOSSENSOR	75
6	CONCLUSÃO	79
7	PERSPECTIVAS.....	80
	REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV) consiste de um *Flavivírus* transmitido por mosquitos originários da Floresta de Zika em Uganda. Desde sua descoberta em 1947, esse vírus tem-se propagado e apresentado efeitos de mutação, tornando-se um importante desafio de saúde global (MUSSO; GUBLER, 2016). No qual, alcançou a Micronésia (2007), Polinésia Francesa (2013) e países da América e Ásia (2015/2016) (DUFFY et al., 2009; ANTHONY et al., 2016). Somente em 2015, o Ministério da Saúde do Brasil estimou em torno de 1,3 milhão de casos suspeitos, que foram reportados (PETERSEN et al., 2016). Em 2016, a Organização Mundial de Saúde declarou essa virologia de emergência de saúde pública de interesse nacional (DOWALL et al., 2017). A longa exposição ao ZIKV pode vir a causar efeitos de anormalidades cerebrais em recém-nascidos denominado de Microcefalia ou, em adultos, pode vir a desencadear uma doença autoimune grave denominada Guillain-Barré (DE ARAUJO et al., 2016; AMORIM, 2019; SREATON; MONGKOLSAPAYA, 2017; RUBIN; GREENE; BADEN, 2016). No momento, os recursos disponíveis para monitorar e controlar infecções causadas pelo ZIKV são limitados e insuficientes devido à falta de responsabilidade; falta de organização; e indisponibilidade de drogas, vacinas e ferramentas de diagnóstico (KAUSHIK et al., 2017).

O diagnóstico de indivíduos infectados pelo ZIKV é desafiador, pois aproximadamente 80% dos sintomas clínicos não são específicos e apresentam semelhança com outros *Flavivírus* como a Dengue (DENV) e Chikungunya (CHIKV) (MARTINEZ; GARZA; CUELLAR-BARBOZA, 2019). As técnicas de diagnóstico geralmente empregadas na detecção do ZIKV são: reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa quantitativa em tempo real (qRT-PCR) (MOUREAU et al., 2007), amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP), ensaio de imunoadsorção enzimática de captura de anticorpo Zika IgM/IgG (ELISA) e método de neutralização pela redução de placas (PRNT). Apesar do bom desempenho, essas técnicas requerem equipamentos onerosos, manuseio profissional, o diagnóstico leva dias ou em alguns casos podem apresentar diagnóstico falso positivo ou negativo (SINGH et al., 2018). Deste modo, são necessários novos métodos de prevenção e de controle de epidemias as quais possuam alta sensibilidade, sejam de baixo custo, rápido e de diagnóstico preciso.

O desenvolvimento de biossensores eletroquímicos de DNA tem se mostrado uma recente alternativa de diagnóstico simples desse agente infeccioso (HUANG et al., 2017). A maioria desses sensores baseiam-se na imobilização de um DNA sonda simples fita (ssDNA) sobre uma superfície de eletrodo. Frente a capacidade de reconhecimento do DNA alvo

complementar formando o DNA dupla fita (dsDNA) ou um híbrido DNA/RNA. Desta maneira, a sensibilidade e a precisão são determinadas pela hibridação específica entre a sonda e as sequências dos ácidos nucleicos presentes no DNA alvo (JUSTINO et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015; CHAO et al., 2016). As etapas do desenvolvimento do sensor podem ser monitoradas por técnicas voltamétricas (variação de valores de corrente de pico, I_p) ou impedimétricas (variação de valores de resistência à transferência de carga, R_{ct} representada por ΔR_{ct}). Em ordem de simplificar e diminuir o custo dos biossensores, recentemente as plataformas propostas na literatura se baseiam na metodologia *lable free*. Ou seja, trata-se do uso de fitas de DNA livres, não rotulados por enzimas, desta maneira não dependem de reações secundárias para avaliar a resposta do sensor.

A fim de melhorar a resposta eletroquímica de um biossensor, diferentes tipos de nanomateriais, como grafeno, nanotubos de carbono, *quantum dots* e nanopartículas de metais nobres são utilizados na superfície do eletrodo (SAHA et al., 2012; HOLZINGER; LE GOFF; COSNIER, 2014; YANG et al., 2015). O uso desses materiais condutores proporciona várias vantagens na construção de biossensores, principalmente no aumento da área superficial e auxilia na orientação para a imobilização e reconhecimento do DNA (LIU et al., 2010). Especialmente as nanopartículas de ouro (AuNPs) são aplicadas para a construção de biossensores eletroquímicos devido às suas inúmeras propriedades, tais como a alta condutividade elétrica, alta área superficial, ser de fácil preparo, a possibilidade de funcionalização e biocompatibilidade (SAHA et al., 2012; ALEX; TIWARI, 2015). A interação entre AuNPs e biomoléculas pode ocorrer por meio de ligações covalentes, forças de van der Waals ou interações eletrostáticas, que permitem o seu uso em diferentes plataformas. A ligação covalente que ocorre por meio de grupos específicos pode proporcionar maior estabilidade e reprodutibilidade. Um exemplo são as ligações tiol-metal, que são eficientemente utilizadas para aderir oligonucleotídeos às superfícies de nanopartículas (AUSTIN et al., 2014), obtendo sensores com desempenho eletroanalítico ultrasensível para a detecção de analitos relacionados às doenças.

Até o momento, na literatura foram reportados exemplos de biossensores para a detecção de ZIKV compostos por antígenos/anticorpos (AG/AB) e o vírus inteiro (KAUSHIK et al., 2018; AFSABI et al., 2018; TANCHAROEN et al., 2018). A nosso conhecimento, somente existe um sensor de DNA para ZIKV reportado na literatura (FARIA; ZUCOLOTO, 2019). Visando preencher essa lacuna, o objetivo principal deste trabalho consiste no

desenvolvimento de um novo biossensor de DNA *label-free* para detecção de oligonucleotídeos do ZIKV, baseado em uma plataforma sensibilizada por AuNPs estabilizadas no polímero cloreto 3-n-propilpiridínico silsesquioxano (SiPy), sobre um eletrodo de carbono vítreo (ECV).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

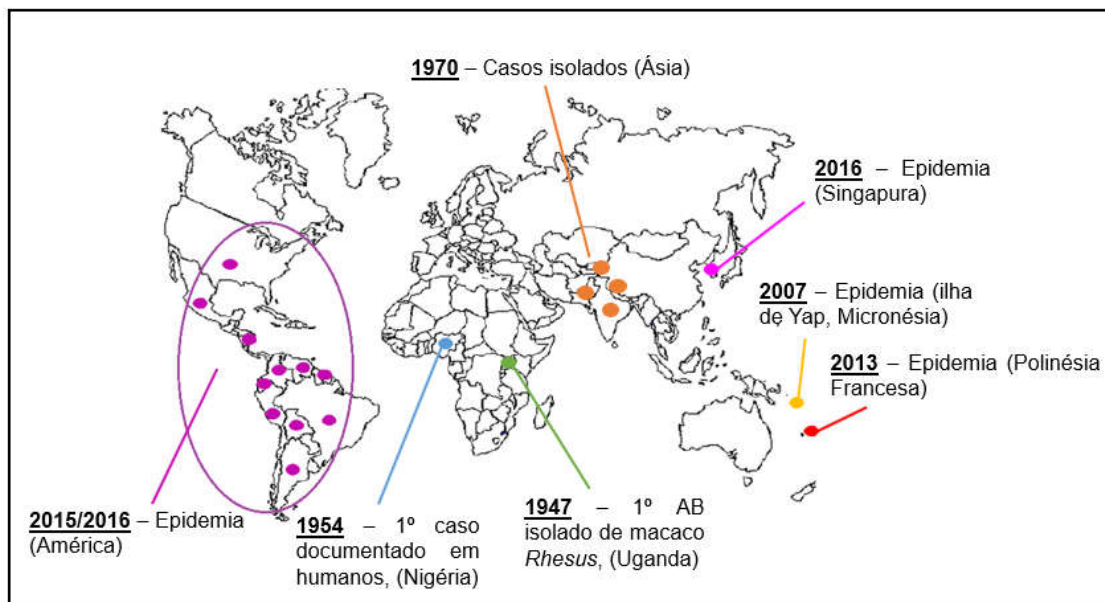
2.1 VÍRUS ZIKA (ZIKV)

Os vírus são organismos únicos que possuem alta capacidade de multiplicação em células hospedeiras (microrganismos, plantas e animais incluindo seres humanos) (VAN REGENMORTEL; MAHY, 2004). Desde o início da história, vírus e outros seres vivos tem se afetado mutuamente, levando à evolução de organismos avançados, assim como do sistema imunológico. Devido à evolução do vírus ser rápida, ao aumento da disseminação da globalização e ao desenvolvimento de sistemas de transportes, o surgimento de vírus mutados e mais resistentes foi intensificado (LEE et al., 2018). Um vírus de RNA que apresenta taxas altas de mutação e que tem chamado atenção nesses últimos anos é o ZIKV. Esse vírus foi acidentalmente descoberto e isolado no ano de 1947, a partir da coleta de soro de uma espécie de macacos conhecida como *Rhesus* (cepa africana MR-766) na floresta de Zika, em Uganda. Posteriormente, em 1948 (Uganda) e 1966 (Malásia), esse vírus foi identificado em mosquitos *Aedes africanus* e *aegypti*, respectivamente, sugerindo estes como possíveis hospedeiros. Porém, somente em 1954 foi documentado as manifestações clínicas desse patógeno em humanos na Nigéria (PLOURDE; BLOCH, 2016; MUSSO; GUBLER, 2016; GUBLER; VASILAKIS; MUSSO, 2017). Desde então, até o início do ano 2000 somente 14 casos isolados foram registrados. No entanto, em 2007 ocorreu a primeira grande epidemia, na ilha de Yap (Micronésia), no qual 5005 pessoas foram infectadas pelo vírus. Os sintomas reportados foram: febre, hemorragia, erupção cutânea e conjuntivite, sendo estes diferentes dos apresentados para a DENV (DUFFY et al., 2009).

Em 2013, a Polinésia Francesa foi lugar de outra epidemia, onde atingiu 32000 pessoas. Dentre esse número, 73 casos foram diagnosticados com complicações neurológicas, isto é, a relação do vírus com a síndrome de Guillain-Barré, a qual trata-se de uma doença autoimune grave que afeta o sistema nervoso central e ocorre, em sua maioria, em adultos (ANTHONY et al., 2016; CAO-LORMEAU et al., 2016). Porém, a maior das epidemias estaria por vir em 2015 e 2016, onde muitos países da América e Ásia, inclusive o Brasil foram infectados pelo ZIKV proveniente da cepa de linhagem asiática (PETERSEN et al., 2016). Através de especulações a origem da entrada do vírus no Brasil estaria relacionada às viagens internacionais para o país, como: a visita do Papa em julho de 2013 na Jornada Mundial da Juventude, que trouxe jovens católicos da Ásia e África; a Copa do Mundo em 2014, em cujo

evento reuniu-se milhares de pessoas de outros países em diversas regiões do Brasil; e o Campeonato Mundial de Canoagem em 2014, que envolveu participantes dos países do Pacífico (MUSSO, 2015). Diante de todos esses eventos, consequentemente em 2015, foram registrados 1,3 milhão de casos autóctones (natural do país em que habita) no Brasil, e 4,3 mil casos de microcefalia em 2016 (ARAUJO; SILVA; ARAUJO, 2016; DE ARAUJO et al., 2016; DEL CAMPO et al., 2017). A relação do vírus com essa doença foi comprovada através da pesquisa de Calvet e colaboradores (2016), aos quais relataram a presença de anticorpos IgM antivírus presentes em amostra de líquido amniótico, confirmando a relação do patógeno com a microcefalia. Ou seja, o vírus possui a capacidade de ultrapassar a barreira placentária e causar dano ao tecido cerebral durante o desenvolvimento do feto (LATHROP et al., 2018). Devido ao surgimento da microcefalia e ao aumento do número de casos, as autoridades governamentais deram atenção ao cuidado da erradicação do ZIKV. Dessa maneira, em fevereiro de 2016 a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou alerta mundial à saúde pública a infecção ocorrida por meio do patógeno (GULLAND, 2016). A Figura 1 ilustra a distribuição histórica mundial do ZIKV no período de 1947 a 2016.

Figura 1 – Distribuição histórica mundial do ZIKV documentados durante o período 1947 a 2016.



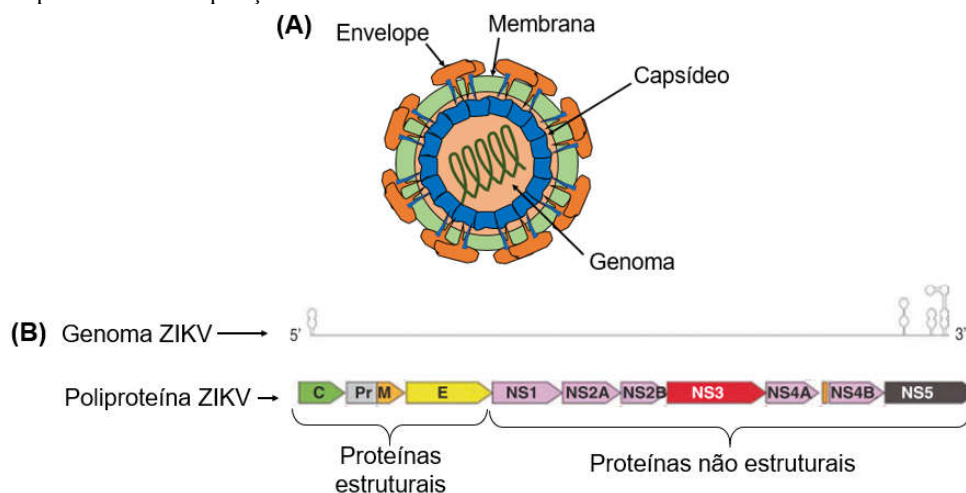
Fonte: Adaptado de BAUD et al., 2017.

Após a última epidemia apenas alguns casos isolados foram reportados (AMORIM, 2019). De acordo com o Ministério da Saúde (2016), no ano de 2017, as doenças agudas pelo ZIKV passaram a ser classificadas como doenças de notificação compulsória (registro

empregado para rápido controle de eventos). Nesse mesmo ano, foram confirmados laboratorialmente dois óbitos por ZIKV. Em relação às gestantes no país, em 2018, foram registrados 869 casos prováveis, sendo 330 confirmados por critério clínico e laboratorial, segundo dados do Boletim Epidemiológico das Secretaria de Vigilância em Saúde e o Ministério da Saúde (2018).

Como ilustrado na Figura 2, estruturalmente o ZIKV caracteriza-se por ser um vírus envelopado composto de RNA genômico com cerca de 11.000 bases rodeadas por uma capa icosaedrica. O RNA é simples fita e de polaridade positiva (considera o próprio ssRNA como RNA mensageiro – RNAm, para a síntese proteica na célula hospedeira), o qual é responsável por codificar uma única poliproteína que é clivada em três proteínas estruturais: capsídeo (C), envelope (E), precursor de membrana (prM) e por sete proteínas não estruturais (NS), que são essenciais para a replicação e montagem do vírus (AMORIM, 2019; BARZON et al., 2016).

Figura 2 – Ilustração representativa (A) da estrutura do ZIKV, (B) RNA genômico, proteínas estruturais e não estruturais presentes na composição do vírus.



Fonte: Adaptado de AMORIM, 2019 e BARZON et al., 2016.

O ZIKV é classificado como um arbovírus, ou seja, é um vírus transmitido por artrópodes, nesse caso por mosquitos da espécie *Aedes*. O qual também se faz presente na família *Flaviviridae*, sendo do mesmo gênero dos vírus da DENV, Febre amarela (YFV) e CHIKV (MUSSO; GUBLER, 2016).

Em sua maioria, a infecção ocorre por meio de picada de mosquitos. Não obstante, há também casos por infecção congênita (BRASIL et al., 2016), por contato sexual (MUSSO et al., 2015), através da urina, leite materno, transfusão sanguínea e saliva (GRISCHOTT et al., 2016).

Cerca de 80% dos indivíduos que são contaminados com ZIKV não apresentam sintoma para a virologia (MARTINEZ; GARZA; CUELLAR-BARBOZA, 2019). Porém, quando sintomáticos as manifestações clínicas consistem de: erupção cutânea, febre (37,4 – 38 °C), artralgia, mialgia, fadiga, dor de cabeça e conjuntivite (PLOURDE; BLOCH, 2016). Além disso, indivíduos infectados a longo prazo podem apresentar complicações neurológicas, tal como a síndrome de Guillain-Barré (MUSSO; GUBLER, 2016).

O diagnóstico do ZIKV ainda é de difícil avaliação clínica, devido os primeiros sintomas serem inespecíficos, haver reatividade cruzada dos anticorpos com outros *Flavivírus* e o período de incubação ser de 3-14 dias semelhante a outros vírus (PETERSEN et al., 2016; KROW-LUCAL; BIGGERSTAFF; STAPLES, 2017). Entretanto, os métodos de diagnósticos mais comumente utilizados e os respectivos valores de cópias de RNA por mL⁻¹ em fluidos corporais são descritos abaixo:

a) o método ELISA, consiste na incubação da amostra de sangue em uma placa composta de anticorpos contra IgM. Se houver anticorpo IgM na amostra, ocorrerá a ligação aos anticorpos presentes na placa seguida pela reação com o anticorpo marcado com a enzima peroxidase de rábano (HRP). A presença do ZIKV IgM é indicada por um sinal detectável que pode ser lido e medido usando espectrofotômetro (HERRADA et al., 2018). Ao todo essas etapas levam em torno de 2,5 dias para serem realizadas (PAWLEY et al., 2018).

b) o método PRNT, envolve uma série de diluições, as quais são adicionadas às suspensões virais de ZIKV, misturadas e incubadas ao lado de cultura de células. Se os AG contra ZIKV estiverem presentes no soro, haverá uma diminuição na quantidade de unidades formadoras de placa (PFU). Trata-se de um teste mais específico usado para diferenciar os anticorpos de vírus e possui uma especificidade maior que a técnica ELISA. No entanto, este teste é trabalhoso, envolve o manuseio de vírus vivo, demora em torno uma semana para ser realizado e requer reagentes padronizados (HERRADA et al., 2018; PETERSEN et al., 2016).

c) a técnica molecular de qRT-PCR constitui-se da transcrição reversa do RNA genômico em DNA simples fita complementar (cDNA), seguido pela conversão em dsDNA e amplificação do DNA, sendo estas etapas realizadas em uma mesma reação. Ou seja, é um método que combina à amplificação por PCR com uma sonda fluorescente e a detecção do produto amplificado na mesma reação (MUSSO; GUBLER, 2016; HERRADA et al., 2018). Os limites de detecção alcançados por meio dessa técnica dependem das amostras de fluidos

corporais utilizadas na análise, sendo para o sangue 120 cópias /mL ,soro 30 cópias /mL plasma e urina 40 cópias /mL (SINGH et al., 2018).

d) técnica molecular LAMP, é um método baseado no isolamento e purificação do ácido nucleico até à amplificação e detecção do RNA viral, em uma câmara fechada de modo isotérmico. À medida que ocorre a amplificação, um dos reagentes sofre uma reação redox que faz com que ele se torne violeta na presença do produto amplificado. A vantagem do uso do ensaio LAMP é sua capacidade de apresentar LOD próximos da técnica qRT-PCR (PETERSEN et al., 2016).

Na Tabela 1 é descrita a faixa de quantidade de RNA viral presente em diferentes fluidos corporais (cópias de RNA por mL⁻¹), os quais foram determinados por meio de técnicas moleculares.

Tabela 1 – Faixa de cópias de RNA presente em 1 mL de fluido corporal em pacientes sintomáticos.

Fluído corporal	cópias de RNA mL ⁻¹	Ref.
Sangue	7,3 x 10 ⁶ – 9,3 x 10 ⁸	(MUSSO; GUBLER, 2016)
Soro	9,2 x 10 ² – 7,6 x 10 ⁶	(LANCIOTTI et al., 2008)
soro – RN*	6 x 10 ⁶	(BESNARD et al., 2014)
Urina	3,8 x 10 ³ – 2,2 x 10 ⁸	(GOURINAT et al., 2015)
Sêmen	1,1x 10 ⁴ - 8,6 x 10 ¹⁰	(MUSSO; GUBLER, 2016) (FRANK et al., 2016)
leite materno	2,9 x 10 ⁴ – 2,0 x 10 ⁶	(MUSSO; GUBLER, 2016) (BESNARD et al., 2014)

*RN = recém-nascidos.

Recomenda-se na fase aguda (os 7 primeiros dias) da virologia somente o diagnóstico por técnicas moleculares, visto que até nesse período há pouca quantidade de anticorpos IgM presentes nas amostras os quais podem ser detectáveis pelos métodos sorológicos. Após esse período é indicado para casos positivos atrelar os resultados obtidos por duas técnicas distintas (MUSSO; GUBLER, 2016; PETERSEN et al., 2016). Apesar do bom desempenho, esses métodos de diagnósticos requerem manuseio profissional, o diagnóstico pode levar dias, possui custo elevado (qRT-PCR e LAMP) e alguns casos pode apresentar resultados falso positivo ou negativo (ELISA e PRNT) (SINGH et al., 2018).

Atualmente, não há nenhum método de tratamento disponível no mercado e as vacinas para a virologia encontram-se em 1^a/ 2^a fase de triagem clínica (KENNEDY et al., 2019), sendo

que a 1ª fase consiste da triagem dos pacientes e a busca de reprodutibilidade dos testes pré-clínicos (ensaios de teste de dose e de toxicidade realizados em células e animais), nesta fase começam a ser identificados os antígenos relevantes e a relação entre dose e eficiência. Na 2ª fase são avaliados alguns parâmetros como segurança da vacina, resposta do organismo e efeitos colaterais. (MADEIROS; ANDRADE, 2014)

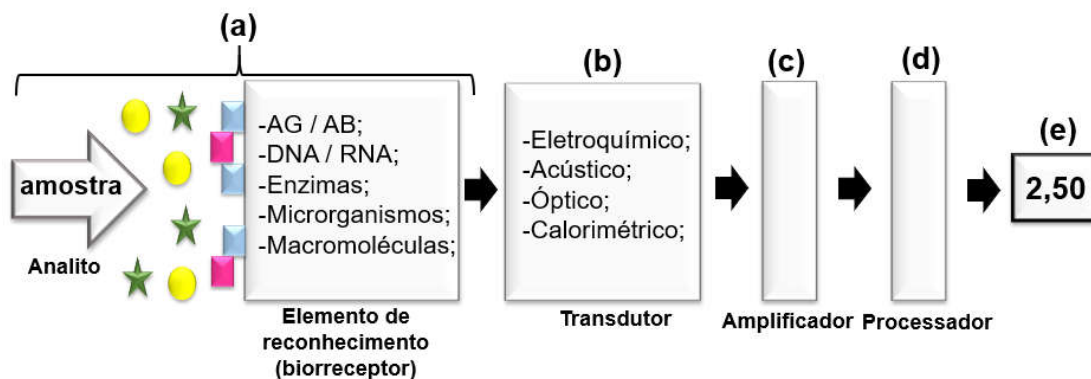
Baseado no exposto, de modo a atingir um diagnóstico bem-sucedido para prevenção e controle do vírus precocemente evitando maiores complicações, tem-se a necessidade do desenvolvimento de técnicas e/ou dispositivos capazes de, além de detectar, discriminar num único ensaio os interferentes (DENV, YKV, CHIKV), ser de rápida detecção, sensíveis, fáceis de operar e menos onerosos, visto que a maior parte das epidemias ocorre em países com recursos limitados. Neste sentido, o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos vem sendo uma alternativa aos diagnósticos tradicionais, pois apresentam as características desejadas, atendendo a essas expectativas.

2.2 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS DE DNA

Os biossensores têm testemunhado um crescente interesse nos últimos tempos, tanto nos campos de pesquisa e comercial. No qual o sensor mais comercializado consiste no sensor de glicose, porém no mercado já se encontram variedades de sensores para outros fins. Isso ocorre por apresentarem características analíticas promissoras como: simplicidade operacional, baixo custo, seletividade, detecção rápida em tempo real e miniaturização.

De um modo geral, um biossensor caracteriza-se por ser um dispositivo analítico composto por cinco unidades básicas: (a) biorreceptor, biomolécula que irá reconhecer especificamente determinado analito contido na amostra de interesse; (b) transdutor, converte o sinal da reação bioquímica em um sinal mensurável; (c) amplificador, amplifica o sinal obtido do transdutor; (d) processador, responsável por produzir sinais que possam ser interpretados por um *software* para exibição dos dados (e), como ilustrado na Figura 3 (GRIESHABER et al., 2008).

Figura 3 – Principais componentes presentes em um biossensor.



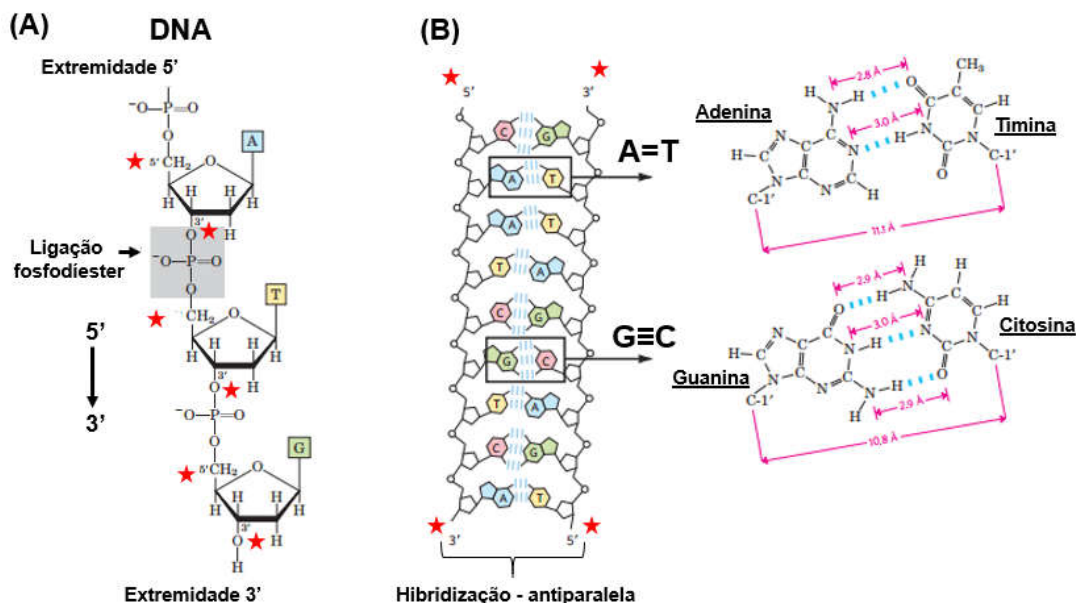
Fonte: Adaptado de BANDODKAR; WANG, 2014.

Devido à sua alta seletividade e especificidade de ligação, moléculas de DNA estão sendo comumente exploradas no desenvolvimento de biossensores para detecção e quantificação da concentração de analitos que contenham seu respectivo cDNA, como em amostras clínicas, ambientais ou industriais.

Esses dispositivos denominados de biossensores de DNA ou genossensores baseiam-se diretamente no evento de hibridação, isto é, interação de duas fitas complementares de ssDNA formando dsDNA. O ssDNA é composto por nucleotídeos (bases nitrogenadas) consecutivos as quais são ligados covalentemente por “pontes” através do grupo fosfato, ou seja, extremidade 5’- fosfato de uma unidade de nucleotídeo se liga a extremidade 3’-hidroxila do próximo nucleotídeo, criando desta maneira a ligação fosfodiéster, Figura 4 (A). Se o ssDNA formado apresentar até 50 nucleotídeos em sua composição, este pode ser denominado de oligonucleotídeo.

Por outro lado, a hibridação ocorre por meio de ligações de hidrogênio, que se formam sempre entre as bases púricas e pirimídicas, ligando a adenosina à timina (A=T) e a guanina á citosina (G≡C) de maneira específica, Figura 4 (B) (NELSON; COX, 2014).

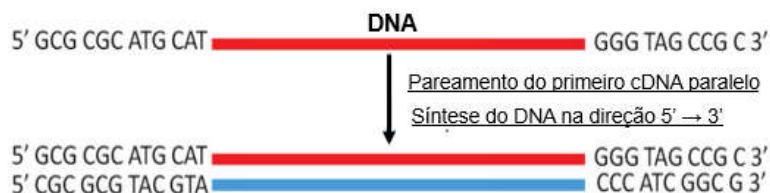
Figura 4 – (A) Formação da ligação fosfodiéster entre os nucleotídeos formando a ssDNA. (B) Pareamento das bases nitrogenadas entre duas ssDNA formando a dsDNA definido por Watson e Crick.



Fonte: Adaptado de NELSON; COX, 2014.

Para a formação da dupla hélice tem-se a necessidade de duas ssDNA estarem em orientações antiparalelas. Isto é, a primeira ssDNA deve estar em direção ($5' \rightarrow 3'$) e a segunda ssDNA ($3' \rightarrow 5'$) e serem complementares entre si, conforme prediz o modelo de Watson e Crick proposto em 1953 (NELSON; COX, 2014). Uma exceção a este modelo foi apresentada no trabalho de Bhardwaj e Sharma (2014), no qual comprovou-se que a hibridação do oligonucleotídeo também pode ocorrer via orientação complementar paralela (Figura 5). Além disso, foi evidenciado que o pareamento das bases ocorre somente para oligonucleotídeos constituído de até 50 nucleotídeos em sua composição. Dessa forma, a partir desse estudo, uma alternativa de hibridação pode ser proposta entre ssDNAs para a construção de biossensores.

Figura 5 – Ilustração do pareamento do cDNA e sua respectiva síntese.



Fonte: Adaptado de BHARDWAJ; SHARMA, 2014.

A especificidade de interação entre bases nitrogenadas na hibridação pode ser avaliada por meio do emprego de um transdutor que proporcionará uma variação de sinal tais como, alteração na coloração (biossensor calorimétrico); alteração na frequência de um cristal quartzo

como resultado da variação da massa (biossensor piezoelétricos); absorção/emissão de luz (biossensor ópticos) e alteração de grandezas elétricas (biossensores eletroquímicos) (VIGNESHVAR et al., 2016; RAFIQUE et al., 2018).

No caso dos biossensores eletroquímicos de DNA, o ssDNA sonda é imobilizado em um transdutor, ou seja, um eletrodo composto por material condutor, tal como sobre o carbono (BENVIDI et al., 2016; MOHAMMADIAN; FARIDBOD, 2018), ouro (MIODEK et al., 2015; AKAGI et al., 2006) e óxido metálico (óxido de zinco, óxido de grafeno entre outros) (SINGHAL; PUNDIR; NARANG, 2017; AFSABI et al., 2018). O modo de imobilização deste oligonucleotídeo poderá consistir da adsorção (interações iônicas, eletrostáticas, físicas), ligação covalente (ligações tiol-metal, ativação da superfície utilizando o agente de ligação (cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) com N-hidroxissuccinimida (EDC-NHS) para formar uma ligação amida ou formação do complexo avidina-biotina (ligação da glicoproteína avidina a qual possui elevada afinidade pela coenzima biotina, o qual forma um complexo que tem sido largamente empregado em técnicas de imuno-histoquímicas como por exemplo ELISA) sobre o transdutor. Dentre essas técnicas de imobilização o emprego de ligações covalentes garante uma maior reprodutibilidade na construção de um sensor. A imobilização da amostra de DNA é essencial para desenvolver um biossensor. O controle desta etapa é essencial para garantir alta reatividade, orientação, acessibilidade e estabilidade da amostra confinada à superfície e evitar a ligação não específica (SASSOLAS; LECA-BOUVIER; BLUM, 2008).

Dependendo da variedade do sinal gerado pelo eletrodo, os biossensores eletroquímicos de DNA podem ser classificados em potenciométricos (investigam as reações que geram um potencial mensurável ou acúmulos de cargas), amperométricos (investigam as reações que geram uma corrente mensurável), condutométricos (exploram as alterações mensuráveis das propriedades condutivas de um meio entre os eletrodos) ou impedimétricos (baseiam-se na variação da impedância do sistema) (GRIESHABER et al., 2008).

Com intuito de ser uma técnica não destrutiva, alguns trabalhos na literatura têm empregado a técnica impedimétrica na construção de biossensores. Esse fato se deve, pela natureza da interação entre as biomoléculas e também da sensibilidade que o sensor apresenta (GONG; WANG; YANG, 2017; MASHHADIZADEH; TALEMI, 2016).

2.2.1 Biossensores impedimétricos de DNA

Os biossensores eletroquímicos impedimétricos, se baseiam na técnica denominada de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), a qual consiste da aplicação de uma onda senoidal (variação do potencial e corrente pelo tempo) em uma frequência fixa, seguida da medição da impedância (Equação 1):

$$Z = \frac{E}{I} \quad (1)$$

onde, E = frequência dependente do potencial, I = frequência dependente da corrente e Z = impedância.

Sendo esta equação repetida para uma faixa de frequência selecionada. Desta maneira, obtêm-se os dados da impedância complexa (Z), que consiste na soma dos componentes da impedância real (Z') e imaginária (Z''), do sistema em função de um ângulo de fase (proveniente da onda senoidal = ϕ). Portanto, a EIE combina a análise dos componentes reais e imaginários da impedância, ou seja, a resistência elétrica e a reatância (GRIESHABER et al., 2008), conforme mostrado na Equação 2:

$$Z = \frac{E\omega}{I\omega} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t - \phi)} = Z' + Z'' \quad \omega = 2\pi f \quad (2)$$

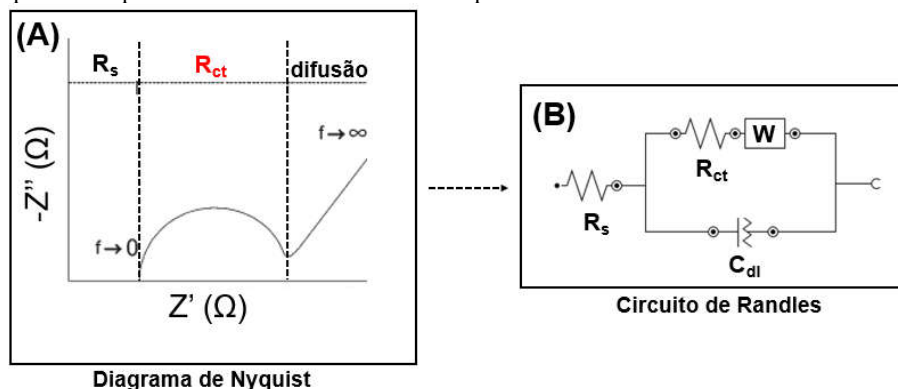
onde, ω = frequência angular, ϕ = fase, t = tempo, f = frequência.

A EIE é uma técnica complexa que possui a capacidade de estudar qualquer propriedade de material intrínseco ou processos específicos que possam influenciar a condutividade/resistividade ou capacidade de um sistema eletroquímico. Como ter a capacidade de distinguir entre duas ou mais reações; identificar reações de difusão limitada; oferecer informações sobre o comportamento capacitivo de um sistema e informações sobre a taxa de transferência de elétrons de uma interface eletrodo/solução, ou seja permitir a análise tanto da resistência quanto das propriedades capacitivas dos materiais (LVOVICH, 2012; BARSOUKOV; ROSS, 2005).

A medida de EIE fornece dois diagramas, o de Bode e Nyquist (mais utilizado), sendo este último composto por três regiões (Figura 6 (A)). A primeira região representa a soma das resistências da solução, os contatos elétricos e o material eletródico (R_s). A segunda compõe de uma parte semicircular que representa a resistência à transferência de carga na interface eletrodo/solução (R_{ct}). A terceira representa o processo difussional dos íons em baixas

frequências (difusão), elemento de Warburg (W). Os valores de cada etapa são ajustados através de um circuito equivalente denominado de Circuito de Randles-Sevcik (Figura 6 (B)) (DE CARVALHO; DE ANDRADE; BUENO, 2006; LVOVICH, 2012; BARSOUKOV; ROSS, 2005; BRETT; BRETT, 1993; BARD; FAULKNER, 2001).

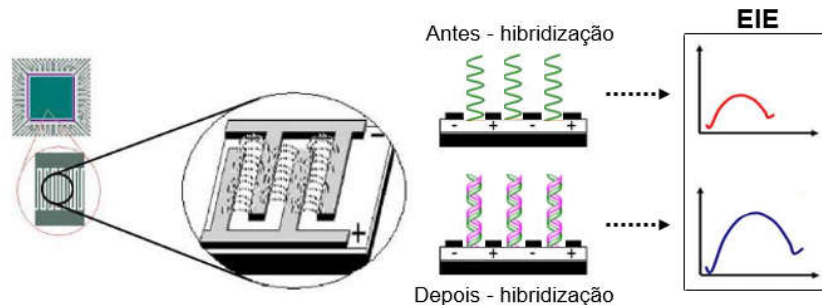
Figura 6 – Representação esquemática do (A) diagrama de Nyquist. (B) Circuito de Randles, C_{dl} = elemento de fase constante, descreve a capacitância de camada dupla no eletrodo / interface de solução; W = elemento de Warburg, representa o processo difussional em baixas frequências.



Fonte: Adaptado de CARVALHO; ANDRADE; BUENO, 2006.

A detecção eletroquímica via EIE é muito utilizada para monitorar mudanças decorrentes de eventos de bioreconhecimento nas superfícies de eletrodos modificados (GRIESHABER et al., 2008). Por exemplo, no trabalho de Hang e Guiseppi-Elie (2004) empregaram medidas de resistência à transferência de carga (R_{ct}) para cada etapa da construção de um eletrodo interdigitado de Pt modificado com 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPS), NH_2 -ssDNA sonda e em seguida com ssDNA alvo, formando a dsDNA. Nessas duas etapas, eles constataram um aumento na impedância R_{ct} após o processo de hibridação, em relação ao apresentado para o sistema apenas com ssDNA. Essa variação no valor de R_{ct} (ΔR_{ct}), ocorreu devido as biomoléculas ssDNA e dsDNA não serem eletroativas, as quais dificultam a aproximação da molécula sonda para o processo de transferência de elétrons, e consequentemente aumentam a resistividade do sensor a cada etapa de imobilização (Figura 7). Em sua maioria, os biossensores impedimétricos reportados na literatura apresentam a resposta como exemplificado acima.

Figura 7 – Representação esquemática do funcionamento de um genossensor impedimétrico.



Fonte: Adaptado de GONG et al., 2015 e HANG; GUISEPPI-ELIE, 2004.

A técnica EIE também pode estar associada ao sistema de detecção conhecido como um semiconductor eletrólito-isolador, o qual pode ser usado para medir as mudanças na impedância capacitiva como resultado da hibridização de ssDNAs. A detecção ocorre quando a espessura da camada dielétrica aumenta com o resultado da hibridização do ssDNA sonda com ssDNA alvo na interface do eletrodo. Consequentemente, a capacitância medida diminui de acordo com a Equação 3, (GRIESHABER et al., 2008).

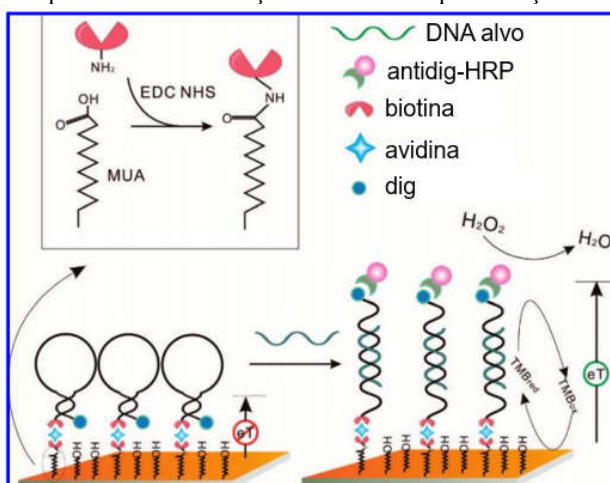
$$C = \epsilon \epsilon_0 \frac{A}{d} \quad (3)$$

onde, C é a capacitância, ϵ é a constante dielétrica no vácuo, ϵ_0 é a constante dielétrica da camada, A é a área ativa e d é a espessura da camada dielétrica.

Além disso, os biossensores eletroquímicos impedimétricos de DNA também podem ser classificados em *labeled assay* ou *label free assay*. Um sistema *labeled assay* é baseado em uma reação secundária que gera a resposta relacionada à presença do analito estudado em uma dada amostra. Então, nesse caso, o sinal obtido está indiretamente relacionado ao principal evento biológico que ocorre no sistema. Como uma nova etapa química ou bioquímica é necessária para produzir a resposta analítica (por exemplo, usando anticorpos secundários conjugados com enzimas ou outras estruturas rotuladas), esses métodos são mais caros e usam um número maior de etapas durante o processo de detecção, comparado aos métodos que são caracterizados como livres de rótulo (SASSOLAS; LECA-BOUVIER; BLUM, 2008). De acordo com a literatura, as plataformas *labeled assay* com oligonucleotídeos em sua composição, são marcados com uma enzima ou um indicador eletroquímico, como o ferroceno, complexos de metais catiônicos ou intercaladores orgânicos (azul de metileno, nanopartículas) para o evento de hibridização (SIN; MACH; WONG, 2014).

Liu e colaboradores (2008) demonstram o emprego de um sensor baseado em eletrodo de Au modificado com ácido 1-mercapodecanóico, seguida pela enzima biotina via EDC NHS. Sequencial, adição da avidina, formado um complexo (biotina-avidina) e imobilização do DNA marcado com biotina e dioxigênio (dig) em extremidades diferentes. A detecção do DNA alvo e adição de antidig-HRP, no qual a enzima HRP proporciona à amplificação da resposta do sensor e catalisa milhares de reações de redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água. Nessa última etapa foi utilizado um marcador eletroquímico 3,3',5,5' tetrametilbenzeno (TBM) como um sítio de elétrons para vincular ao catalizador HRP (Figura 8). A hibridação, consistiu da diminuição do valor de R_{ct} , visto que nessa última etapa ocorre uma reação secundária. A faixa linear empregada para o sensor foi de 1×10^{-9} - 1×10^{-15} e o LOD obtido foi de 1×10^{15} . Essa plataforma se mostrou ser sensível e seletiva para a detecção do DNA alvo estudado.

Figure 8 – Representação esquemática da construção do biossensor pra detecção de DNA alvo.

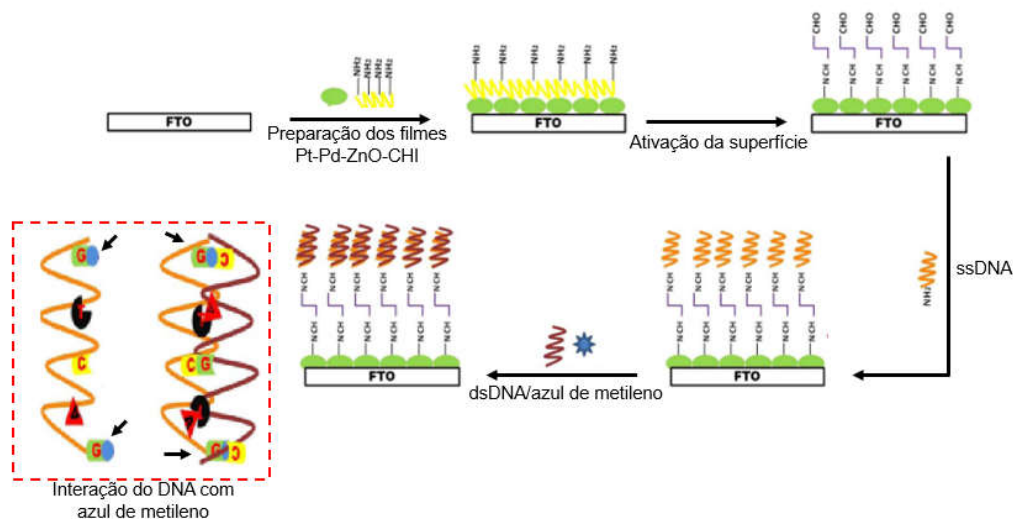


Fonte: Adaptado de LIU et al., 2008.

Singhal, Pundir e Narang (2017) apresentam um biossensor impedimétrico para detecção do DENV à base de um eletrodo de óxido de estanho dopado com flúor (FTO) modificado com um filme de nanocompósito composto de óxido de zinco/platina-paládio (ZnO/Pt-Pd) e quitosana (CHI). Para a imobilização do NH_2 -ssDNA de DENV, a superfície do eletrodo modificado foi ativada com glutaraldeído. Sequencialmente, a detecção de sequências de dsDNA da DENV consistiu do uso do intercalante azul de metileno (MB) (Figura 9). Esse intercalante atuou como um indicador de oxirredução, o qual reagiu diferentemente com ssDNA e dsDNA. A resposta do sensor aumentou quando o MB interagiu com ssDNA, devido a sua afinidade pelas bases de guanina livre, mas diminuiu com o evento de hibridação, devido à

difficuldade de interação do MB as guaninas da dupla hélice do dsDNA. O sensor apresentou um intervalo linear de 1×10^{-6} a $100 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com limite de detecção (LOD) de $4,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e foi seletivamente e especificamente aplicado para sorotipos de DENV.

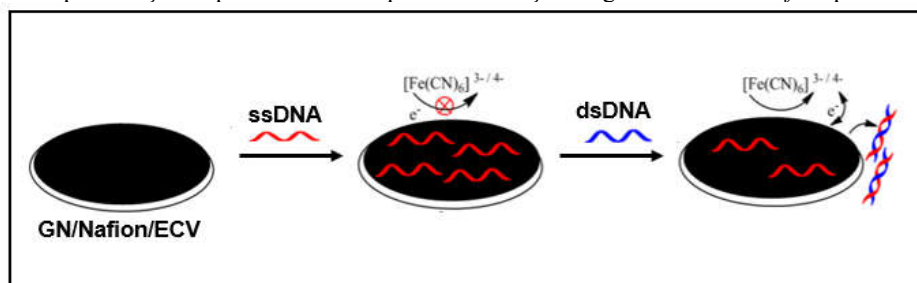
Figura 9 – Representação esquemática das etapas de preparação do genossensor para detecção do DNA do DENV.



Fonte: Adaptado de SINGHAL; PUNDIR; NARANG, 2017.

Por outro lado, os biossensores *label free* consistem de uma abordagem alternativa, uma vez que não há biomoléculas marcadas e reações secundárias para gerar o sinal analítico. Ou seja, caracteriza-se de uma plataforma simplificada, na qual emprega-se uma menor quantidade de reagentes (baixo custo) e de rápida detecção (SIN; MACH; WONG, 2014). Nesta perspectiva, Gong e colaboradores (2017) desenvolveram um genossensor impedimétrico *label free* para detecção do vírus da imunodeficiência humana (HIV) o qual foi baseado na modificação de um ECV com um filme de grafeno e Nafion[®]. Sobre essa superfície modificada, foi imobilizado o DNA sonda via interação π - π^* , Figura 10. Cada etapa de modificação desse genossensor foi monitorada pela variação da resposta de R_{ct} da sonda eletroquímica $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ utilizada. Na presença do ssDNA, observou-se um aumento no valor de R_{ct} , uma vez que a biomolécula dificulta o processo de transferência de elétrons da sonda eletroquímica na superfície do biossensor. Porém, para a hibridação, ocorreu a saída do ssDNA sonda da superfície do biossensor para solução, formando o dsDNA, e consequentemente observou-se a diminuição do valor de R_{ct} . Esse biossensor impedimétrico pode detectar o gene do vírus HIV na faixa de $1,0 \times 10^{-13}$ a $1,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$, com LOD de $2,3 \times 10^{-14} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 10 – Representação esquemática das etapas de construção do genossensor *label free* para HIV.



Fonte: Adaptado de GONG; WANG; YANG, 2017.

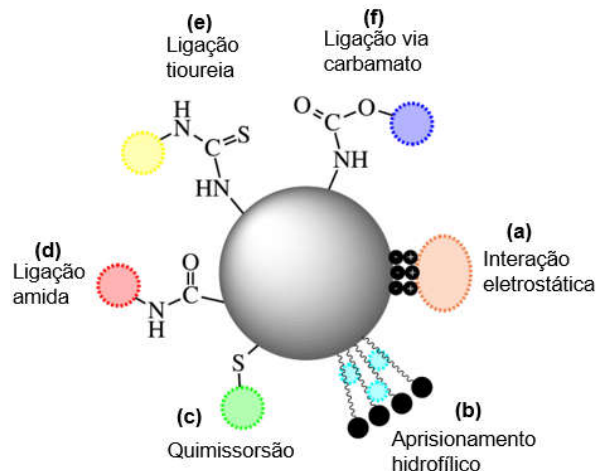
2.3 NANOPÁRTICULAS DE OURO APLICADAS NA CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES IMPEDIMÉTRICOS

A incorporação de nanomateriais como nanotubos de carbono (NTC) (BENVIDI et al., 2016), grafeno (YE et al., 2018) e nanopartículas metálicas (MNPs) (MASHHADIZADEH; TALEMI, 2016) na construção de biossensores impedimétricos pode maximizar o sinal de resposta do dispositivo, como também auxiliar na imobilização dos elementos de bioreconhecimento, aumentando desta forma, a sensibilidade e robustez do dispositivo frente ao analito de interesse (CHAO et al., 2016). Destacando as nanopartículas de ouro (AuNPs), essas constituem um dos nanomateriais mais utilizados na construção de genossensores. Sua vasta utilização está atrelada às inúmeras vantagens que esta classe de material proporciona, tais como: a biocompatibilidade, a facilidade de obtenção, alta área superficial, possibilidade de funcionalização e elevada condutividade elétrica (SAHA et al., 2012). De modo especial, a biocompatibilidade consiste da interação com biomoléculas por meio de interações eletrostáticas, forças de van der Waals ou covalente a grupos específicos sem que haja a desnaturação das mesmas. Dessa forma, após a interação a biomolécula não perde sua bioatividade, podendo ser utilizada em um dispositivo (AUSTIN et al., 2014; KHAN; VISHAKANTE; SIDDARAMAIAH, 2013).

As biomoléculas podem ser imobilizadas de diferentes maneiras sobre as AuNPs, como ilustra a Figura 11, por: a) via interação eletrostática (cargas positivas e negativas); b) aprisionamento hidrofílico, utilizando moléculas surfactantes (as quais apresentam uma parte da molécula hidrofílica e outra hidrofóbica); c) quimissorção, adsorção que envolve a troca ou partilha de elétrons entre as moléculas do adsorvato e a superfície do adsorvente, resultando em uma reação química (NACIMENTO et al., 2014); d) ligação amida, utilizando um EDC-NHS para ativação da superfície; e) ligação tioureia, forma-se pela afinidade do enxofre/grupo amina

do grupo tioureia (CSNH_2NH_4) com o ouro; f) ligação via carbamato, a molécula de carbamato $-\text{NH}(\text{CO})\text{O}-$ liga-se covalentemente pelo grupo $\text{NH}-$ (AUSTIN et al., 2014).

Figura 11 – Estratégias de biofuncionalização das AuNPs.



Fonte: Adaptado de AUSTIN et al., 2014.

Dentre estas, destaca-se a quimissorção porque trata-se de uma adsorção altamente específica e localizada, a qual ocorre somente em sítios ativos. Um exemplo é a ligação de elevada afinidade formada entre o Au e grupos tióis (SH).

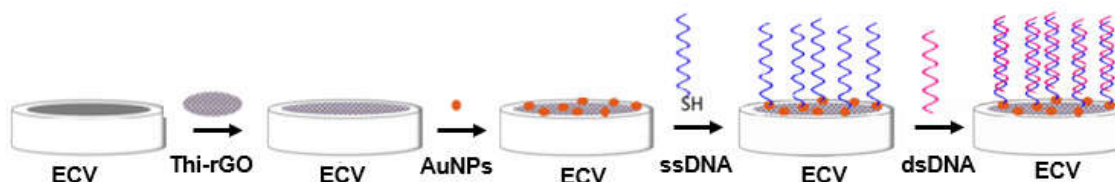
Como consequência das vantagens das AuNPs, há diversas maneiras de atrelar o seu uso na construção de um biossensor eletroquímico de DNA, como: marcadores eletroquímicos, mediadores da transferência de elétrons, amplificadores de sinal, portadores de moléculas eletroativas, catalisadores, modificador de superfícies e AuNPs modificadas com materiais carbonáceos (RASHEED; SANDHYARANI, 2017).

Dentre as estratégias de incorporação das AuNPs em superfícies condutoras destacam-se a eletrodeposição, a obtenção de monocamadas automontadas (SAM), a técnica *drop-coating*, *spin coating* e *layer-by-layer* (PUTZBACH; RONKAINEN, 2013).

A eletrodeposição tem sido frequentemente utilizada na construção de biossensores, pela facilidade da técnica. Ye e colaboradores (2018) desenvolveram um dispositivo para a detecção de oligonucleotídeos. O dispositivo foi baseado na modificação de um ECV com óxido de grafeno reduzido com tionina e sequencial eletrodeposição de AuNPs e sobre as quais, ocorreu a imobilização do ssDNA e posterior hibridação dsDNA (Figura 12). Pela técnica de EIE monitorou-se o aumento de R_{ct} a cada biomolécula imobilizada com auxílio da sonda eletroquímica $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. O sensor desenvolvido detectou o DNA alvo na faixa de $1,0 \times 10^{-17}$

a $1,0 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$, com LOD de $4,28 \times 10^{-19} \text{ mol L}^{-1}$, cujo valor é comparável a LOD da técnica de qRT-PCR.

Figura 12 – Representação esquemática das etapas de preparação do biossensor para detecção de oligonucleotídeos.



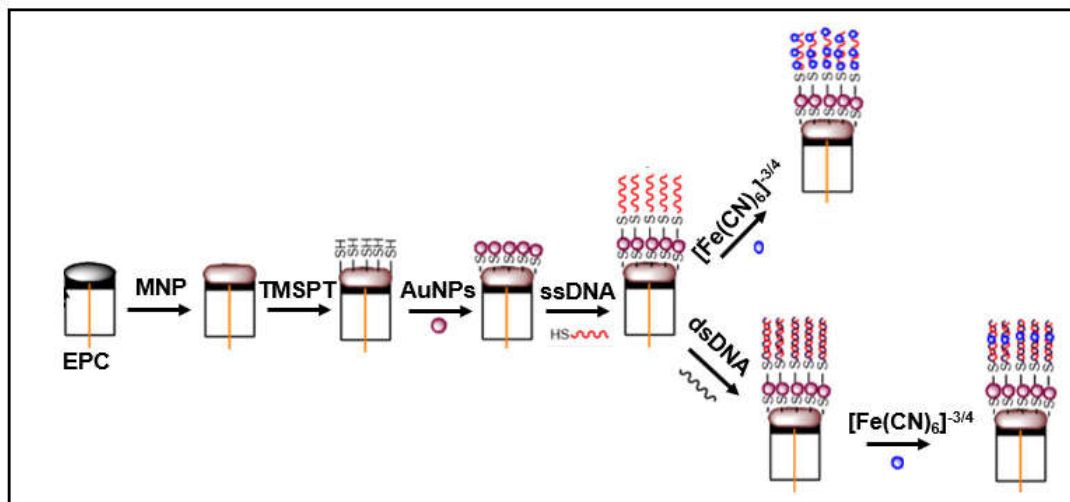
Fonte: Adaptado de YE et al., 2018.

O emprego de monocamadas automontadas contendo grupos tióis em eletrodos de ouro é comum para construção de biossensores de DNA, por ser uma ligação covalente de alta afinidade, por proporcionar organização, estabilidade e ainda a ligação com biomoléculas (FERREIRA et al., 2009). Um exemplo é a utilização de HS-ssDNA contendo agrupamento tiol para ligação direta com AuNPs, como mostrado na semi-reação (1) (RASHEED; SANDHYARANI, 2017; SASSOLAS; LECA-BOUVIER; BLUM, 2008). Além disso, a utilização de AuNPs junto com essa técnica pode promover o aumento da sensibilidade frente ao sensor.



Mashhadizadeh e Talemi (2016) obtiveram um biossensor de eletrodo pasta de carbono (EPC) para detecção do vírus da Hepatite B. Esse sensor consistiu de um EPC contendo uma suspensão de MPs, 3-(trimetilsilano)-1-propanotiol (TMSPT) e AuNPs. No qual, a imobilização da SH-ssDNA sonda ocorreu via ligação covalente com as AuNPs e sequencial hibridação com ssDNA alvo com aumento nos valores de R_{ct} (Figura 13). A partir da diferença entre os valores de R_{ct} foi obtida a curva analítica na faixa de $8,3 (\pm 0,1) \times 10^{-13}$ a $6,4 (\pm 0,2) \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, com LOD de $3,1 (\pm 0,1) \times 10^{-13} \text{ mol L}^{-1}$. A detecção dos oligonucleotídeos foi seletiva e reprodutível nas amostras de urina e plasma sanguíneo.

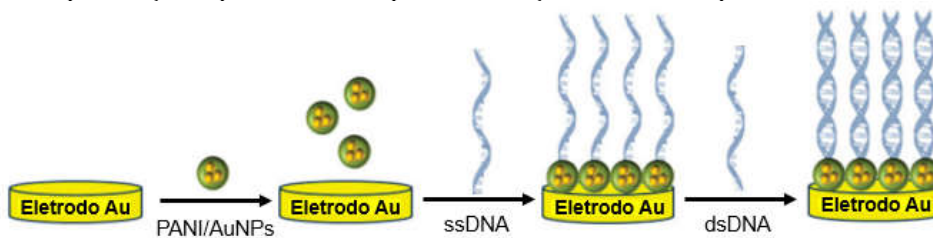
Figura 13 – Procedimento empregado para a construção do biossensor de DNA impedimétrico para detecção do vírus da Hepatite B.



Fonte: Adaptado de MASHHADIZADEH; TALEMI, 2016.

A deposição direta de AuNPs pela técnica de *drop-coating* também é uma alternativa versátil na construção de um biossensor, devido à sua simplicidade e praticidade. Garcia e colaboradores (2016) demonstraram isso pela imobilização da ssDNA sobre uma superfície de eletrodo de ouro recoberto por uma matriz de polianilina contendo nanopartículas de ouro (PANI/AuNPs) para detecção de Leishmaniose (Figura 14). Os resultados do EIE demonstraram evidências de detecção específica do dsDNA baseada em interações entre oligonucleotídeos e genoma, com LOD de $0,01 \text{ pg mL}^{-1}$, obtido numa faixa linear de $0,01 \text{ pg mL}^{-1}$ a $0,10 \text{ ng mL}^{-1}$.

Figura 14 – Representação esquemática das etapas de construção do biossensor para Leishmaniose.



Fonte: Adaptado de GARCIA et al., 2016.

2.4 BIOSSENSORES PARA ZIKV

No momento, a nosso conhecimento, não há muitas plataformas de biossensores eletroquímicos para ZIKV citadas na literatura, e as encontradas utilizam outras variedades de

biomoléculas (AG/AB, RNA e DNA) em sua composição. A seguir, segue-se um breve resumo das plataformas reportadas na literatura.

Afsahi e colaboradores (2018) demonstram um biossensor a base de um chip com uma fina camada de grafeno passivado com titânio/platina (Ti/Pt), o qual foi utilizado para a imobilização de proteínas monoclonais, AG e em seguida AB de ZIKV, formando um imuno complexo AG-AB estável. A cada etapa de imobilização houve uma diminuição na resposta de capacitância, visto que as biomoléculas não são eletroativas. O sensor desenvolvido foi sensível e seletivo ao ZIKV e obteve um LOD de $0,45 \text{ nmol L}^{-1}$.

Kaushik e colaboradores (2018) também desenvolveram um biossensor a base de AG/AB, ou seja, um imunossensor. Neste trabalho, o sensor empregado consistiu de um eletrodo de ouro interdigitado modificado com ditiobis(succinimidil-propionato) (DTSP) formando uma SAM, ao qual foi imobilizado as biomoléculas AG e AB. As etapas de construção do sensor foram avaliadas via EIE, pelo aumento do valor de R_{ct} , a faixa linear estuda foi de $10,0 \text{ pmol L}^{-1}$ a $1,0 \text{ nmol L}^{-1}$ e um LOD de $10,0 \text{ pmol L}^{-1}$.

Tancharoen e colaboradores (2018) mostram o emprego do vírus inteiro, o qual foi imobilizado sobre um eletrodo interdigitado de ouro modificado com óxido de grafeno e polímero em gel. Após imobilização, a plataforma formada foi exposta a luz ultravioleta e submetida a 65°C para polimerização. Em seguida, realizou-se a lavagem do eletrodo com o intuito de remover os vírus que estariam imobilizados. A remoção das biomoléculas proporcionou o surgimento de cavidades na superfície do eletrodo, ou seja, “a memória do vírus”. O biossensor proposto foi imerso em uma solução contendo vírus, o qual imobilizou-se nas cavidades do eletrodo e promoveu a diminuição dos valores de R_{ct} . A diminuição, ocorre visto que a sonda eletroquímica $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ utilizada também é imobilizada junto. O sensor proposto apresentou-se ultrasensível e seletivo as amostras soro sanguíneo infectado por ZIKV obtendo LOD de 6 vírus por mL, ou seja, $1,03 \times 10^{-20} \text{ mol L}^{-1}$, sendo esses valores de detecção próximos à técnica de qRT-PCR.

Faria e Zucolotto (2019) demonstram em seu trabalho o emprego um eletrodo baseado em substratos de polietileno tereftalato (PET) cobertos com uma camada nanométrica de ouro fabricada em configurações de três contatos, a qual foi realizada a imobilização dos oligonucleotídeos de DNA, seguida da hibridação com o RNA do ZIKV. As etapas de construção desse biossensor foram avaliadas via análise de EIE. O sensor apresentou faixa

linear de $54 - 340 \text{ nmol L}^{-1}$ e LOD de 25 nmol L^{-1} e mostrou ser sensível e seletivo na detecção do vírus em amostra de soro humano.

Através das técnicas expostas, pode-se dizer que o emprego de biomoléculas de DNA em um biossensor frente a AG/AB e RNA possui vantagens como: serem moléculas mais estáveis em relação ao RNA e possuem baixo custo comparado às amostras monoclonais de AG/AB, e também são fáceis de serem manuseadas.

Além das técnicas reportadas na literatura, no mercado já se comercializa alguns testes imunocromatográficos para detecção de anticorpos IgG e IgM do ZIKV (DIAGNÓSTICA, 2016). Porém, esses ensaios apresentam uma alta probabilidade de ocorrer reações cruzadas com outros flavivírus o que se trata de uma desvantagem dessa técnica.

Diante da pesquisa reportada, é possível verificar que até o momento há um trabalho reportado na literatura (FARIA; ZUCOLOTTI, 2019), no qual utiliza-se de uma plataforma composta de DNA para detecção do ZIKV. Visando contribuir com essa lacuna, o presente trabalho, visa o desenvolvimento de um novo biossensor impedimétrico de DNA para detecção precoce de ZIKV, utilizando AuNPs estabilizadas em um polímero inorgânico silsesquioxano.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo propor o desenvolvimento de um biossensor impedimétrico de DNA para o diagnóstico do ZIKV, baseado em uma plataforma condutora composta por AuNPs estabilizadas no polímero inorgânico da classe dos silsesquioxano. Sendo este, o primeiro realizado pelo Grupo de Desenvolvimento de Eletrodos Modificados (GDEM) a empregar moléculas DNA na construção de um sensor.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar AuNPs estabilizadas no polímero inorgânico SiPy;
- Caracterizar o nanohíbrido AuNPs-SiPy por técnicas espectroscópicas;
- Desenvolver a plataforma formada pelo ECV modificado com o nanohíbrido AuNPs-SiPy (ox-ECV-[AuNPs-SiPy]);
- Caracterizar a plataforma ox-ECV-[AuNPs-SiPy] por técnicas eletroquímicas;
- Imobilizar as biomoléculas ssDNA sonda e ssDNA alvo/ssDNA não-alvo do ZIKV sobre a plataforma ox-ECV-[AuNPs-SiPy] e avaliar as etapas por meio de análises univariadas e multivariadas;
- Caracterizar as etapas de construção do biossensor otimizado com técnicas eletroquímicas (VC e EIE) e morfológicas (AFM);
- Construir uma curva analítica para o biossensor proposto;
- Analisar amostras de ssDNA alvo do ZIKV presentes em amostras de soro sanguíneo;
- Realizar um estudo da estabilidade do biossensor proposto (ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1).

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico, sem purificação prévia. Os reagentes hexacianoferrato de potássio (II) trihidratado ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$), hexacianoferrato de potássio (III) ($K_3[Fe(CN)_6]$), ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido tetracloroaúrico trihidratado ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$) foram adquiridos da marca Sigma-Aldrich. Para estudos de detecção, utilizou-se a solução tampão fosfato (PBS) $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, a qual foi preparada com $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl, $7,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2HPO_4 e $2,8 \text{ mmol L}^{-1}$ de NaH_2PO_4 em pH 7,4. O SiPy empregado como estabilizante das AuNPs foi cedido pelo Grupo de desenvolvimento de materiais inorgânicos (GDMIT), o qual foi obtido de uma mesma síntese.

Os oligonucleotídeos de DNA purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram sintetizados pela *Integrated DNA Technologies*. Os ssDNA utilizados nesse trabalho foram: (i) ZIKV1: uma sonda específica para ZIKV tiolada com a sequência 5'-ThioMC6-D-GCCATGACCGACACCACACCGT-3' Zhang e colaboradores (2016) ; (ii) ZIKV2: oligonucleotídeo alvo livre de enxofre complementar e paralelo ao ZIKV1 (5'-TCGGTACTGGCTGTGGTGTGGCA-3'); e (iii) no-ZIKV2: , oligonucleotídeo livre de enxofre e não complementar ao ZIKV1, obtido a partir região intergênica próxima do gene ETR1 presente no genoma do morango cuja sequência: 5'-GAGAGGTACCCGAACTGCAAC-3', empregado neste trabalho como um controle negativo.

Todos os materiais e soluções empregados nesse trabalho, foram previamente esterilizados em autoclave e preparadas com água de alta pureza ($18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$, Milli-Q), respectivamente. As soluções dos oligonucleotídeos foram armazenadas a -20°C . As amostras de soro humano foram usadas como matriz real, obtidos de uma pessoa saudável, de acordo com as políticas institucionais de ética. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 62060616.2.0000.0105).

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Síntese e caracterização do nanohíbrido AuNPs-SiPy

As AuNPs foram sintetizadas de acordo com um procedimento pré estabelecido da literatura (CALAÇA et al., 2017). Resumidamente a síntese consistiu da redução química do

$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) por NaBH_4 ($18 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) na presença do estabilizante SiPy (12 g L^{-1}), sob agitação magnética e banho de gelo durante 2 h. Após a síntese, a solução coloidal obtida foi armazenada em um frasco âmbar a 4°C . O nanohíbrido foi caracterizado por UV-VIS (espectrofotômetro Varian, modelo Cary 50), potencial Zeta, DLS (equipamento Malvern, modelo NanoZ590), espectroscopia FTIR, Raman e difratometria de raios X (DRX). Os espectros de FTIR foram obtidos por meio do equipamento SHIMADZU 8400 em modo absorvância em pastilhas de KBr com SiPy e AuNPs-SiPy liofilizado (em liofilizador Liotop, modelo L202). Os espectros foram realizados na faixa de 400 a 4.000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 64 varreduras. Os espectros de Raman foram obtidos através do equipamento Stray Raman, modelo Bruker Senterra em modo transmitância. Os espectros foram realizados em quintuplicata ($n = 5$) na faixa de 400 a 3000 cm^{-1} com comprimento de onda (λ) de $632,8 \text{ nm}$ para os sólidos SiPy e AuNPs liofilizado, os quais foram depositados sobre uma lâmina de vidro para microscópio. Os difratogramas de raios X foram obtidos em um difratômetro Rigaku Ultima IV operando a 40 kV com corrente de 30 mA e com fonte de radiação $\text{Cu K}\alpha$ de λ igual a $0,154 \text{ nm}$, para as amostras sólidas SiPy e AuNPs-SiPy. Os dados foram coletados para valores de 2θ na faixa de 10° a 80° , a uma velocidade de varredura igual a 2° min^{-1} . Todos esses equipamentos foram disponibilizados pelo Complexo de Laboratórios Multiusuários da UEPG (CLABMU-UEPG).

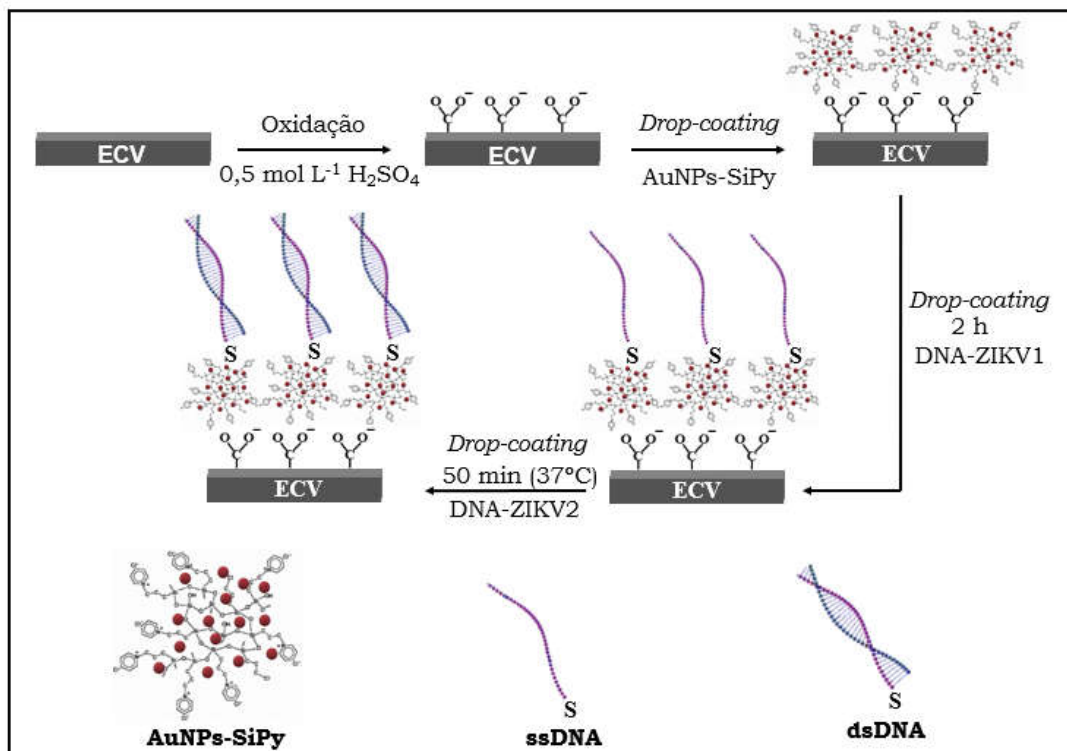
4.2.2 Etapas de preparação do biossensor de DNA

Os ECVs (com área de $3,14 \text{ mm}^2$) foram primeiramente limpos em H_2SO_4 de alto grau de pureza (PA) por 2 min, polidos mecanicamente em suspensão de alumina (granulometria $0,3 \mu\text{m}$) sobre um pano de polimento metalográfico apropriado e umedecido. Sequencialmente, os eletrodos foram lavados com água Milli-Q, imersos em solução de álcool isopropílico e mantidos durante 5 min em banho de ultrassom.

Uma vez limpa, a superfície do ECV foi pré-condicionada em meio de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 através da aplicação de 30 ciclos de voltametria cíclica numa faixa de $-0,3 \text{ V}$ a $1,5 \text{ V}$, a 100 mV s^{-1} . A superfície oxidada do ECV (ox-ECV) foi modificada pela deposição de $5 \mu\text{L}$ de AuNPs-SiPy via *drop-coating* e seca à temperatura ambiente por 24 h. A construção do biossensor de DNA consistiu da deposição de $15 \mu\text{L}$ de ZIKV1 ssDNA sonda ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) sobre o ox-ECV-[AuNPs-SiPy] e incubação durante 2 h para a formação da ligação covalente tiol-Au. Subsequentemente, a superfície foi imersa em tampão PBS para remoção dos

oligonucleotídeos não adsorvidos por 6 s. Para avaliar a especificidade de hibridação, 15 μL de ZIKV2 ssDNA alvo ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) ou no-ZIKV2 ssDNA não alvo ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram incubados sobre o biossensor ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1 durante 50 min a 37 °C. Em seguida, a superfície do eletrodo foi imersa em tampão PBS novamente, (Figura 15).

Figura 15 – Representação esquemática das etapas de preparação do biossensor ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1 e hibridação do ssDNA alvo.



Fonte: A autora.

4.2.3 Otimização do biossensor de ZIKV

A quantidade de AuNPs-SiPy (2, 5 10 e 15 μL) utilizada na construção do biossensor foi otimizada por análise univariada. Sequencialmente, a concentração da sonda ($[\text{ZIKV1}]$) e tempo de incubação da sonda ($\text{tempo}_{\text{inc}}$) foram otimizadas usando uma abordagem multivariada com planejamento fatorial 3^2 . A resposta foi avaliada por meio da variação percentual da resistência à transferência de carga (ΔR_{ct}), obtida nas medidas do EIE após a realização de ensaios eletroquímicos com concentração fixa de ZIKV2 ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$). Para o cálculo do ΔR_{ct} , utilizou-se a Equação 4:

$$\Delta R_{ct} = \left(\frac{R_{ct(hib)} - R_{ct(bios)}}{R_{ct(bios)}} \right) \cdot 100\% \quad (4)$$

sendo que, $R_{ct(hib)}$ e $R_{ct(bios)}$ se referem aos valores de R_{ct} obtidos após e antes do ensaio de hibridação, respectivamente. O processamento de dados foi realizado através do *software* Statistica® 13.0. Os níveis das variáveis estudadas foram baseados em testes preliminares apresentados na Tabela 2:

Tabela 2 – Valores dos níveis das variáveis empregados na otimização do biossensor ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1 via planejamento fatorial 3².

Variável	(-)	(0)	(+)
[ZIKV1] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	1,0	5,0	10,0
tempo _{inc} (min)	90	120	150

Fonte: A autora.

Em todos os ensaios de hibridação, a temperatura foi mantida constante a 25 °C.

A temperatura de hibridação foi analisada separadamente por uma análise univariada, entre 25, 37 e 50 °C. Todas as medidas foram avaliadas pelo valor de ΔR_{ct} obtido.

As condições experimentais otimizadas foram então empregadas para obtenção de curvas analíticas para detecção do ssDNA alvo, na faixa de 1 pmol L⁻¹ a 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.2.4 Medidas eletroquímicas

Todos os experimentos eletroquímicos foram realizados em temperatura ambiente, utilizando um sistema eletroquímico convencional de três eletrodos, sendo empregado ECV não modificado ou modificado como eletrodo de trabalho, Ag|AgCl como eletrodo de referência e um fio de platina como eletrodo auxiliar. Análises de voltametria cíclica (VC) e EIE foram realizadas em um Multipotenciostat Autolab® MAC90149 conectado a um computador com *software* Nova 2.1 (GDEM), em 0,50 mol L⁻¹ de tampão PBS como eletrólito suporte na ausência e presença da solução 5,0 mmol L⁻¹ da sonda eletroquímica K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆. Antes de todas as medições, purgou-se nitrogênio no eletrólito por 10 min para remover o O₂ dissolvido em solução. Parâmetros analíticos como o limite de detecção (LOD) e estabilidade foram determinados seguindo as diretrizes da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) (NIC; JIRAT; KOSATA, 1997).

4.2.5 Caracterização do biossensor

Todas as etapas da construção do biossensor foram caracterizadas por VC, EIS e AFM. Imagens de AFM e valores de rugosidade (R_q) foram obtidos em um microscópio Shimadzu, modelo SPM 9600 em modo sem contato, com sensor de Silício SPM (revestido de alumínio) (NANO WORD), com espessura de 4 μm , comprimento de 125 μm , largura de 30 μm , frequência 320 Hz e constante de força de 42,0 N m^{-1} .

4.2.6 Análise da amostra real e estudo da estabilidade

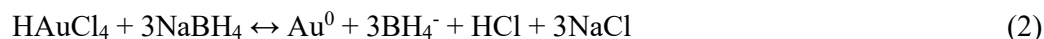
Amostras de soro sanguíneo previamente descongeladas foram enriquecidas com 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ZIKV2. Sequencialmente, a mistura foi diluída para as concentrações 1000,0, 1,0 e 0,001 nmol L^{-1} do ssDNA alvo.

A estabilidade do biossensor proposto foi avaliada por meio do acondicionamento de três eletrodos modificados ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1 a 8 °C que foram avaliados durante um intervalo de tempo (0 a 90 dias) frente à hibridação específica com ZIKV2. Para cada experimento analisado no 1º, 2º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º, 60º e 90º dia, foi necessário a limpeza dos eletrodos (em suspensão de alumina sobre um pano de polimento metalográfico apropriado, sequencial lavagem com água Milli-Q, imersos em solução de álcool isopropílico e mantidos durante 5 min em banho de ultrassom) seguida da construção de uma nova plataforma.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS AuNPs-SiPy

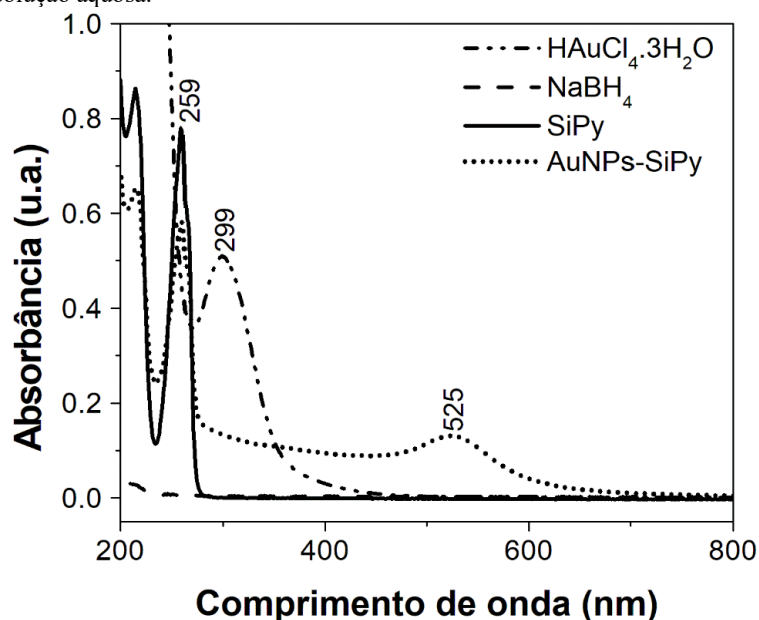
A formação das AuNPs ocorreu através da redução do precursor AuCl_4^- com NaBH_4 e a estabilização da mesma com o polímero SiPy, foi evidenciada pela mudança de coloração da dispersão de amarelo para avermelho intenso. Cujas colorações estiveram atreladas ao final do processo de redução dos íons AuCl_4^- a Au^0 e a obtenção das nanopartículas (Reação 2).



A escolha do polímero SiPy utilizado nessa síntese deve-se a este material agir como um nanoreator, ou seja, este apresenta a capacidade de incorporar o precursor do complexo AuCl_4^- na estrutura complexa do polímero, possibilitando a formação de AuNPs estáveis e bem dispersas com tamanho entre 11 a 6,1 nm, segundo a literatura. (CALAÇA et al., 2017; DE MENEZES et al., 2012; DA SILVA et al., 2014).

A formação das AuNPs também foi evidenciada pela alteração dos espectros de absorção dos precursores (AuCl_4^- e SiPy) em relação ao espectro do nanohíbrido AuNPs-SiPy (Figura 16).

Figura 16 – Espectros de absorção na região do UV-Vis das dispersões de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, NaBH_4 , SiPy e AuNPs-SiPy, obtidos em solução aquosa.



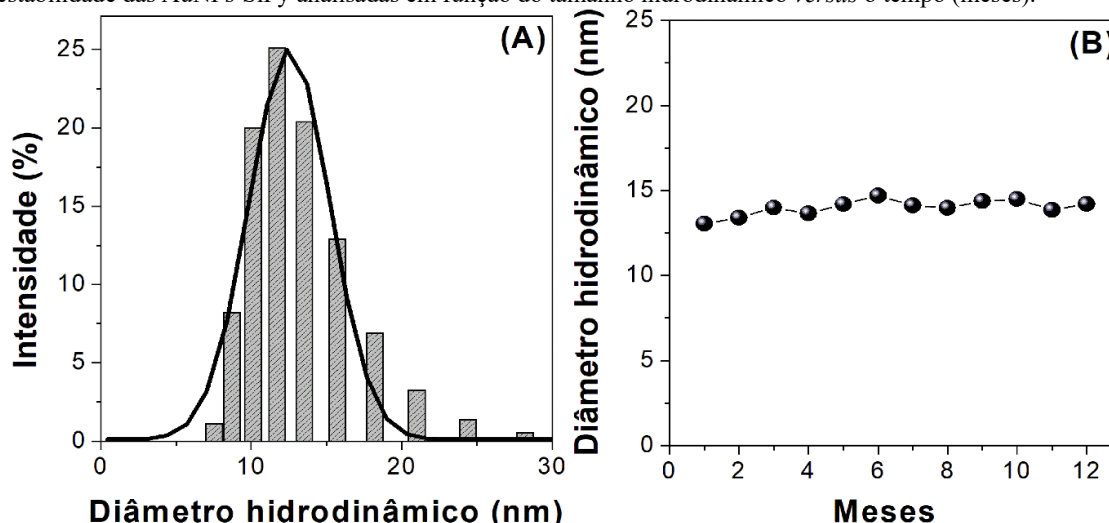
Fonte: A autora.

A redução de $\text{Au}^{3+} + 3\text{e}^- \rightarrow \text{Au}^0$ foi demonstrada por meio da diminuição da banda em 299 nm referente à transferência de carga metal-ligante (TCLM) e o surgimento da banda em 525 nm no espectro do nanohíbrido, relacionada ao efeito característico de ressonância de plásmon de superfície (RPS) presente em AuNPs com tamanho inferior a 20 nm (YGUERABIDE; YGUERABIDE, 1988). Esse fenômeno caracteriza-se da interação do campo magnético incidente com a oscilação coletiva dos elétrons livres presente na banda de condução das AuNPs. A qual, proporciona um deslocamento do equilíbrio, ou seja, ocasiona uma separação de cargas ou polarização dos elétrons em toda a superfície das AuNPs. A energia associada a esse fenômeno corresponde a um determinado comprimento de onda (λ) e absorção na região do visível do espectro eletromagnético, o qual justifica a intensa coloração apresentada dessas suspensões coloidais (GHOSH; PAL, 2007).

O espectro do nanohíbrido também exibiu uma banda em 259 nm relacionadas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos grupos piridínicos do SiPy. Essa banda foi, da mesma forma, observada em solução composta somente do polímero. Em ambas as soluções não se observou o deslocamento das bandas mesmo com a incorporação das AuNPs na estrutura do SiPy (RIBICKI et al., 2018).

A estabilidade da suspensão coloidal de AuNPs-SiPy foi avaliada por meio da determinação do potencial zeta (ζ). Este apresentou valor positivo de +35,3 mV, o qual confirmou a presença de grupos com carga positiva na estrutura nanohíbrido obtido. Uma vez que o valor obtido excedeu o limite típico de suspensões instáveis (-30 mV a + 30 mV) (ŠEGOTA; HEIMER; TEŽAK, 2006), pode-se afirmar que as AuNPs-SiPy apresentam a princípio, uma boa estabilidade e pequena tendência de sofrerem coalescência. Devido esse valor de ζ ser menor do que apresentado para o polímero SiPy (+42 mV), é indicativo de que a presença das AuNPs utiliza parte dessa carga para sua estabilização no polímero (CALAÇA et al., 2017). O histograma do nanohíbrido evidenciou uma distribuição modal do tamanho hidrodinâmico de diâmetro das AuNPs com 13,05 +/- 3,674 nm (Figura 17 (A)), o qual está de acordo com a literatura (CALAÇA et al., 2017). Como pode ser observado no gráfico ilustrado na Figura 17 (B) do tamanho hidrodinâmico de diâmetro das AuNPs em função dos meses de estocagem da solução, durante um ano, a suspensão coloidal foi monitorada e não apresentou qualquer agregação sendo assim, essa é muito estável para o seu uso nos filmes a serem obtidos.

Figura 17 – (A) Histograma da distribuição do tamanho hidrodinâmico obtido para as AuNPs-SiPy; (B) estabilidade das AuNPs-SiPy analisadas em função do tamanho hidrodinâmico *versus* o tempo (meses).

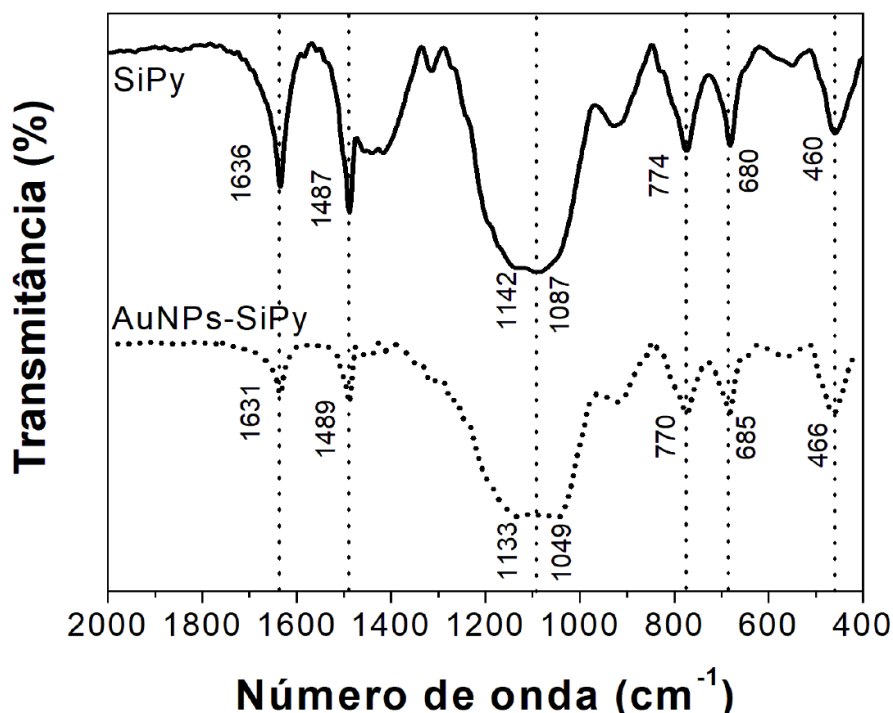


Fonte: A autora.

A Figura 18 ilustra os espectros vibracionais de FTIR do polímero SiPy e AuNPs-SiPy, respectivamente. Para o composto SiPy foram observadas bandas em 1636 e 1487 cm^{-1} que correspondem aos estiramentos (ν) do anel piridínico, em 680 cm^{-1} (SANTOS et al., 2016) relacionada à deformação angular do grupo Si-H e em $1142/1087$ e $768/460\text{ cm}^{-1}$ que foram atribuídas aos $\nu(\text{Si-O-Si})$ assimétrico e simétrico, respectivamente (SANTOS et al., 2014; CALAÇA et al., 2017; RIBICKI et al., 2018). A incorporação das AuNPs no SiPy proporcionou um espectro semelhante ao polímero precursor, porém com pequenos deslocamentos (Tabela 3), o que indica a ocorrência de interação química no nanohíbrido analisado (SANTOS et al., 2016). As bandas em 1142 e 1087 cm^{-1} referentes $\nu(\text{Si-O-Si})$ assimétrico, as quais também são atribuídas a vibração de gaiola e rede do polímero, respectivamente. Essas bandas apresentaram um deslocamento mais significativo para 1133 e 1049 cm^{-1} para o nanohíbrido, evidenciando desta maneira a ocorrência de interação química (SANTOS et al., 2012).

O espectro de AuNPs-SiPy também apresentou aparente diminuição na intensidade das bandas, que está atrelada a estabilização das AuNPs que causa um impedimento nos modos vibracionais da estrutura do polímero, diminuindo os graus de liberdade (MOSSANHA et al., 2017).

Figura 18 – Espectros vibracionais na região do infravermelho do SiPy e AuNPs-SiPy liofilizado, obtidos em pastilhas de KBr.



Fonte: A autora.

Tabela 3 – Modos vibracionais e respectivos valores de números de onda para região do infravermelho do SiPy e AuNPs-SiPy liofilizado, obtidos em pastilhas de KBr.

Modos vibracionais	Número de onda (cm ⁻¹)			Ref.
	SiPy	AuNPs-SiPy	Ref.	
v anel piridínico	1636	1631	1633	(SANTOS et al., 2016)
	1487	1489	1486	
v _s (Si-O-Si)	774	770	768	(CALAÇA et al., 2017)
	460	466	470	(RIBICKI et al., 2018)
v _{ass} (Si-O-Si) gaiola	1142	1133	1130	(SANTOS et al., 2012)
v _{ass} (Si-O-Si) rede	1087	1049	1054	(SANTOS et al., 2014)
δ Si-H	680	685	610	(SANTOS et al., 2016)

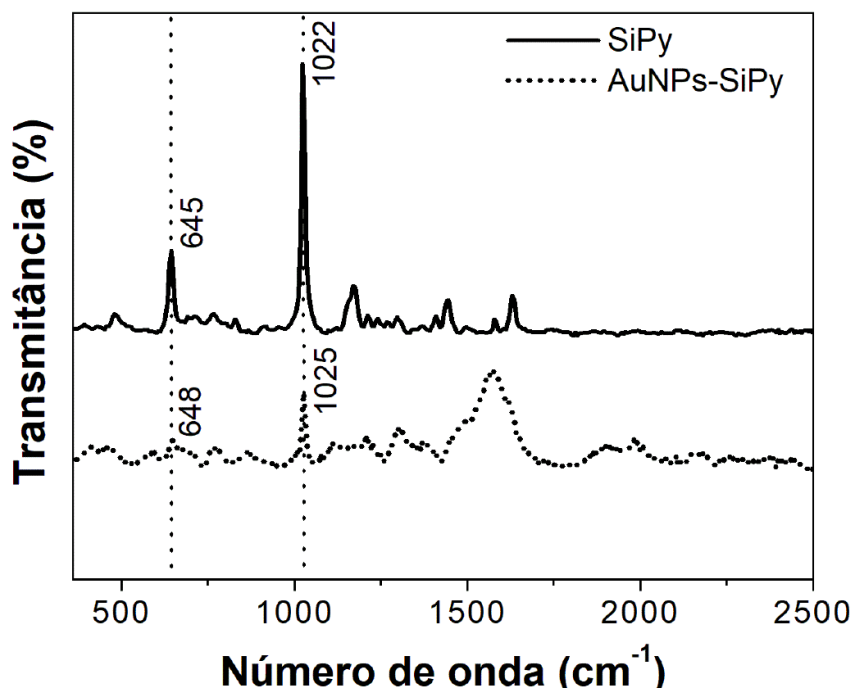
^asim. = simétrico, ^bass. = assimétrico

Fonte: A autora.

Com o intuito de complementar a análise de FTIR, medidas de espalhamento Raman do SiPy (Figura 19) revelaram no espectro bandas em 1022 (forte) e 645 (média) cm⁻¹, as quais referem-se ao modo de respiração do anel piridínico e a deformação no plano do anel, respectivamente (DOS SANTOS et al., 2012; DOLLISH; FATELEY; BENTLEY, 1991). A

presença das AuNPs na estrutura do polímero proporcionou uma diminuição na intensidade e um alargamento dessas bandas em 1025 e 648 cm^{-1} , indicando novos modos vibracionais proporcionados pela interação do ouro e do polímero.

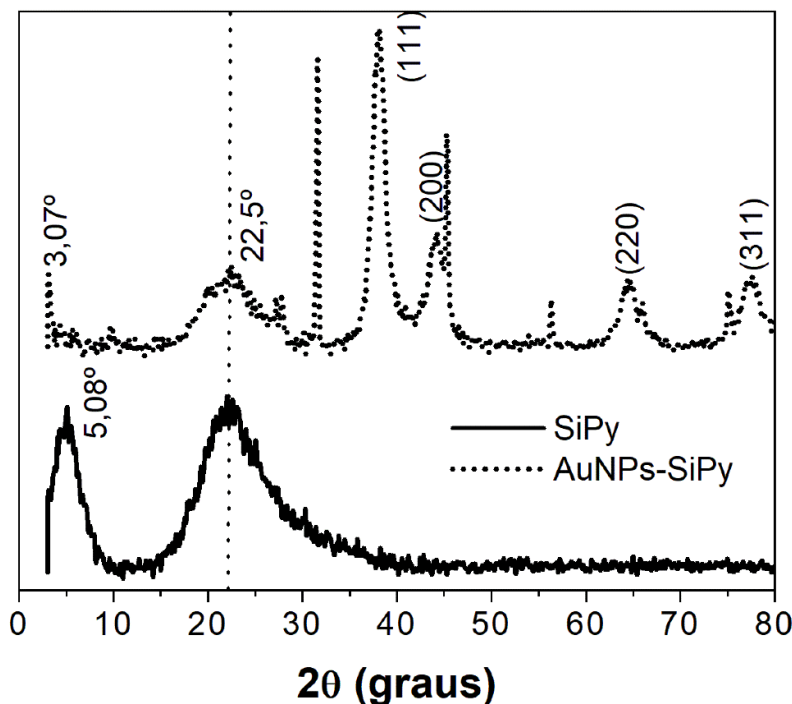
Figura 19 – Espectros de espalhamento Raman obtidos para o sólido SiPy e AuNPs-SiPy liofilizado, em $\lambda = 632,8$ nm.



Fonte: A autora.

A natureza cristalina do SiPy e do AuNPs-SiPy foi confirmada por análise de DRX (Figura 20). O difratograma para o SiPy exibiu dois picos alargados em $5,08^\circ$ e $22,50^\circ$, os quais estão atribuídos à distância periódica intramolecular de cadeia a cadeia e a contribuição das unidades de Si-O-Si na estrutura, respectivamente. Entretanto, o difratograma do AuNPs-SiPy apresentou o pico em $22,50^\circ$, porém menos intenso, confirmando a incorporação dos AuNPs na estrutura do polímero (RIBICKI et al., 2018). Pode-se verificar também a presença de outros quatro picos característicos de um difratograma de material nanoparticulado em $30,06^\circ$; $44,20^\circ$; $64,70^\circ$ e $77,30^\circ$ os quais são referentes aos planos (111), (200), (220) e (311), respectivamente, e estão relacionados à estrutura cristalina cúbica de face centrada (fcc) do ouro. O pico de maior intensidade de difração (111) revelou que os nanocristais são orientados principalmente ao longo deste plano. A constante de rede calculada para o pico de difração (111) foi de 4,0910 Å para AuNPs-SiPy, o que está de acordo com o valor descrito na literatura ($a = 4,0786$ Å) (SEN; MAITY; ISLAM, 2013).

Figura 20 – Difratogramas de raios X do SiPy no estado sólido e do nanocompósito AuNPs-SiPy liofilizado.



Fonte: A autora.

O tamanho médio de cristalito das AuNPs-SiPy na amostra analisada por DRX foi estimado utilizando-se a equação de Scherrer (Equação 5), a qual relaciona o alargamento dos picos de difração à dimensão dos cristalitos presentes por meio da razão:

$$D = \frac{K\lambda}{B \cdot \cos \theta} \quad (5)$$

onde D é tamanho médio dos cristalitos (em metros), K é uma constante numérica adimensional que depende da forma do cristalito (geralmente, 0,93), λ é o comprimento de onda da radiação incidente (em metros), B é a largura à meia altura do pico mais intenso do difratograma subtraída da largura à meia altura do pico devido a efeitos instrumentais (em radianos), e θ é o ângulo de Bragg do referido pico (em graus) (HOLZWARTH; GIBSON, 2011; BURTON et al., 2009). Empregando-se os parâmetros referentes ao pico do plano (111), o tamanho médio calculado para os cristalitos de AuNPs-SiPy foi igual a 5,2 nm. A uma certa discrepância observada entre este valor e o diâmetro obtido por DLS (13,05 nm), o qual já era esperado, uma vez que a medida de DLS fornece o tamanho hidrodinâmico das partículas em suspensão enquanto o valor fornecido pela equação de Scherrer consiste de uma estimativa do tamanho dos cristalito formadores de cada uma das partículas.

Outros picos presentes no difratograma estão relacionados à presença de NaCl cristalino, provavelmente formados pelo processo de liofilização. A presença dos íons Na^+ pode ser justificada pela adição do agente redutor NaBH_4 e a presença dos íons Cl^- possivelmente originados pelo processo de redução do sal de ouro ($\text{AuCl}_4^- + 1\text{e}^- \rightarrow \text{Au}^0$) ou pela solubilização do polímero SiPy.

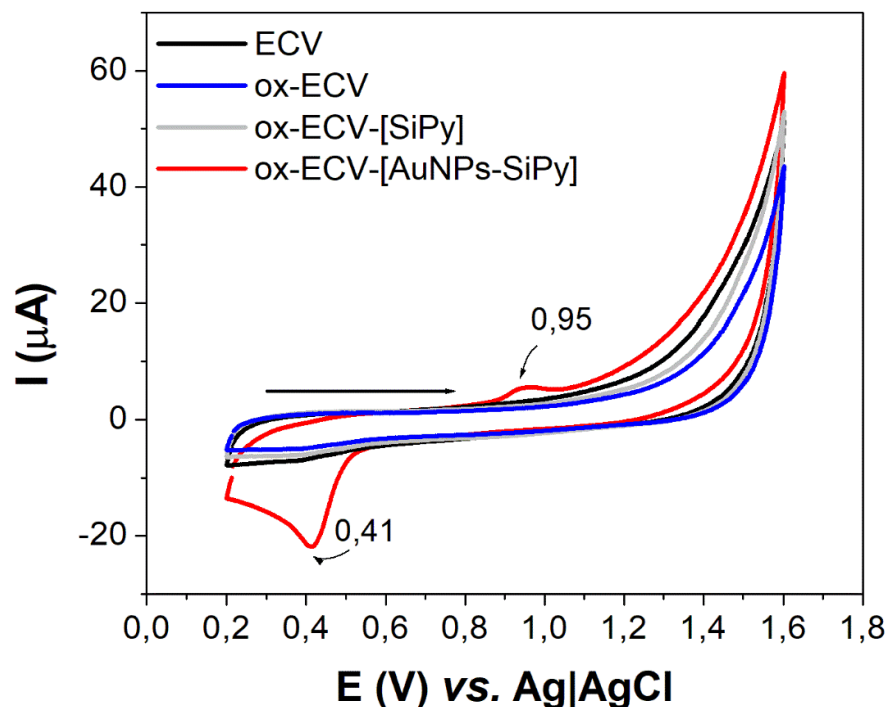
5.2 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS ELETRODOS ECV, ox-ECV, ox-ECV-[SiPy] e ox-ECV-[AuNPs-SiPy]

O emprego do polímero SiPy como polieletrólito catiônico na automontagem de filmes *Layer-by-layer* (LbL) consiste de uma abordagem muito aplicada na literatura, a qual já vem sendo obtida no nosso grupo (GDEM) atrelado ao uso dos poliânions azul da prússia (CALAÇA et al., 2017), ácido polivinil sulfônico (PVS) (SANTOS et al., 2012) e tetrasulfoftalocianina de níquel (II) (NiTsPc) (SANTOS et al., 2014). A aplicabilidade dessa metodologia se deve, pela capacidade de se obter filmes nanoestruturados por uma técnica simples e estes apresentarem novas propriedades distintas dos filmes de seus materiais precursores (RICHARDSON; BJÖRNMALM; CARUSO, 2015). Entretanto, o SiPy também pode ser empregado diretamente na superfície do eletrodo. Um exemplo é a pesquisa de Mossanha e colaboradores (2017) que demonstraram a utilização do AuNPs-SiPy imobilizado sobre um ECV junto ao uso do ácido tiolado na obtenção de uma SAM.

Desta forma, no presente trabalho empregou-se o nanohíbrido AuNPs-SiPy como modificador da superfície do ECV, o qual foi oxidado em ácido, com intuito de formar grupos oxidados negativos na superfície do eletrodo (JAROCKA et al., 2014; DEKANSKI et al., 2001), para então por meio de interação eletrostática ligar-se aos grupos piridínicos (positivos) presente no AuNPs-SiPy, obtendo o ox-ECV-[AuNPs-SiPy].

Sequencialmente, o comportamento eletroquímico das AuNPs imobilizadas na superfície do ox-ECV foi investigado por medidas de voltametria cíclica em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} . O voltamograma cíclico do ox-ECV-[AuNPs-SiPy], obtido pela interação eletrostática entre a carga positiva do nanohíbrido e a carga negativa do óxido formado na superfície do carbono vítreo, apresentou um potencial de pico anódico (E_{pa}) e de pico catódico (E_{pc}) em 0,41 e 0,95 V (vs. Ag|AgCl), respectivamente (Figura 21).

Figura 21 – Voltamogramas cíclicos para os ECV, ox-ECV, ox-ECV-[SiPy] e ox-ECV-[AuNPs-SiPy], obtidos em $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ a $50,0 \text{ mVs}^{-1}$.



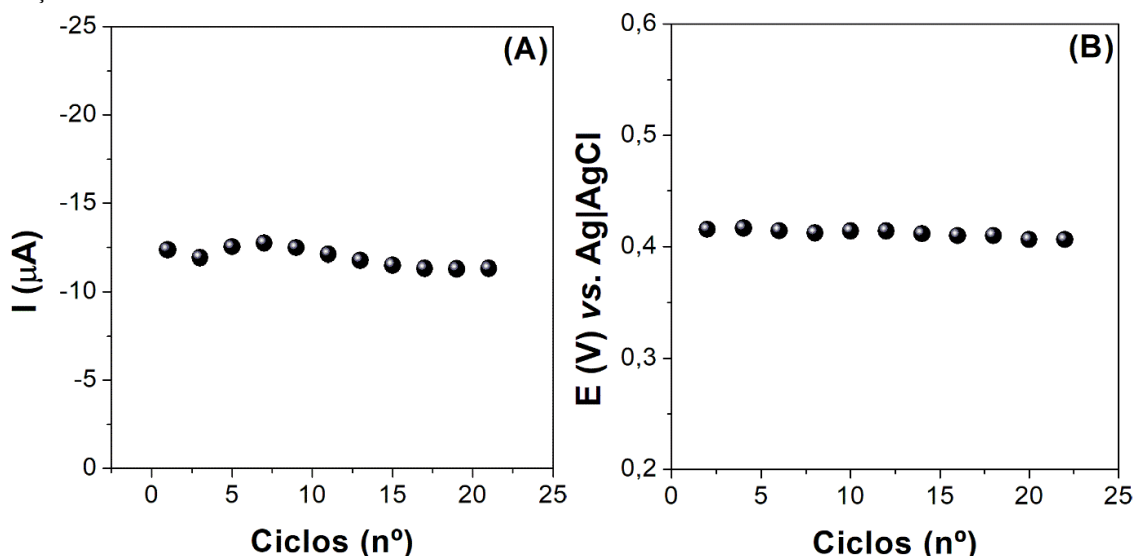
Fonte: A autora.

De acordo com a literatura (WANG et al., 2013; BURKE; NUGENT, 1997), os processos redox típicos para um eletrodo de ouro ocorrem com um pico anódico em torno de +1,18 V e um pico catódico em +0,85 V (vs. Ag|AgCl). Esses processos estão associados à formação de óxidos de ouro ($\text{O}=\text{Au}-(\text{H}_2\text{O})_{\text{ads}}$ e $\text{Au}=\text{O}$) durante a varredura anódica, que permanecem absorvidos na superfície eletródica durante a varredura reversa. O fato de que neste trabalho, os potenciais de pico apresentaram-se em valores menores, deve-se provavelmente à facilidade do processo de transferência de elétrons proporcionado pelas AuNPs estabilizadas na estrutura tridimensional do silsesquioxano.

Com o intuito de avaliar o papel das AuNPs na superfície do ox-ECV, obteve-se um eletrodo formado apenas pelo polieletrólito SiPy, obtido a partir do gotejamento da solução de SiPy sobre a superfície de carbono oxidada, o qual denominamos de filme *drop-coating* ox-ECV-[SiPy]. Notou-se nos voltamogramas cíclicos ilustrados na Figura 21 que esse eletrodo, sem AuNPs, assim como ox-ECV e ECV, não apresentaram corrente faradáica sob as mesmas condições eletroquímicas que o ox-ECV-[AuNPs-SiPy], confirmando que a presença dos picos observados é devido às AuNPs imobilizadas sobre a superfície do ECV.

Em estudo posterior, a estabilidade do ox-ECV-[AuNPs-SiPy] foi avaliada por sucessivas varreduras de potencial (22 ciclos) entre 0,2 e 1,6 V. De acordo com os valores de corrente de pico catódica (I_{pc}) e E_{pc} dos respectivos voltamogramas (Figura 22 A e B) permaneceram praticamente inalterados, ou seja, para valores de I_{pc} observou-se uma variação de (1,34 %) e para E_{pc} não ocorreu variação.

Figura 22 – Estabilidade de resposta do ox-ECV-[AuNPs-SiPy] analisado em termos de (A) I_{pc} e (B) E_{pc} em função do número de ciclos voltamétricos.

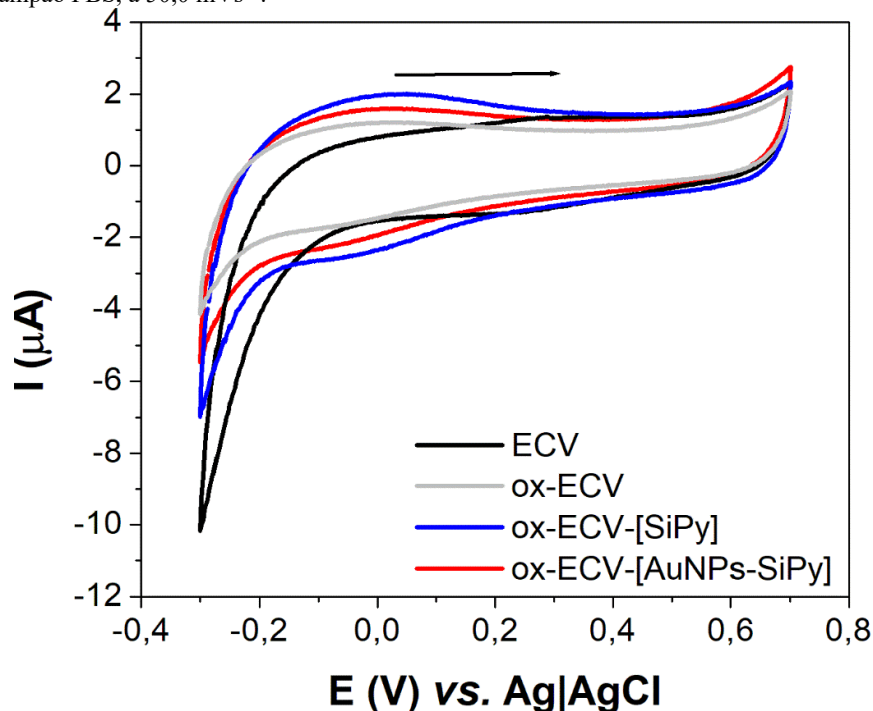


Fonte: A autora.

Esses resultados sugerem que as AuNPs estabilizadas no polímero SiPy permanecem estáveis na superfície do eletrodo de carbono vítreo, mesmo que não seja empregado um poliânion para estabilizá-la nessa superfície eletródica como realizado no trabalho de Mossanha e colaboradores (2017).

Após esse estudo, realizou-se a mudança do eletrólito suporte para tampão PBS 0,50 mol L⁻¹, visto que estudos seguintes foram realizados na presença de biomoléculas de DNA como também em amostras de soro sanguíneo. Desta forma, tem-se a necessidade do emprego de um meio tamponado em pH 7,4 (pH fisiológico) para simular as condições normais do corpo humano e comparar com outras técnicas. Os voltamogramas cíclicos do ECV, ox-ECV, ox-ECV-[SiPy] e ox-ECV-[AuNPs-SiPy] foram realizados em tampão PBS (Figura 23), nos quais verificou-se a ausência de processo faradáico para os quatro sistemas eletroquímicos analisados.

Figura 23 – Voltamogramas cíclicos dos ECV, ox-ECV ox-ECV-[SiPy] e ox-ECV-[AuNPs-SiPy] obtidos em 0,5 mol L⁻¹ do tampão PBS, a 50,0 mVs⁻¹.

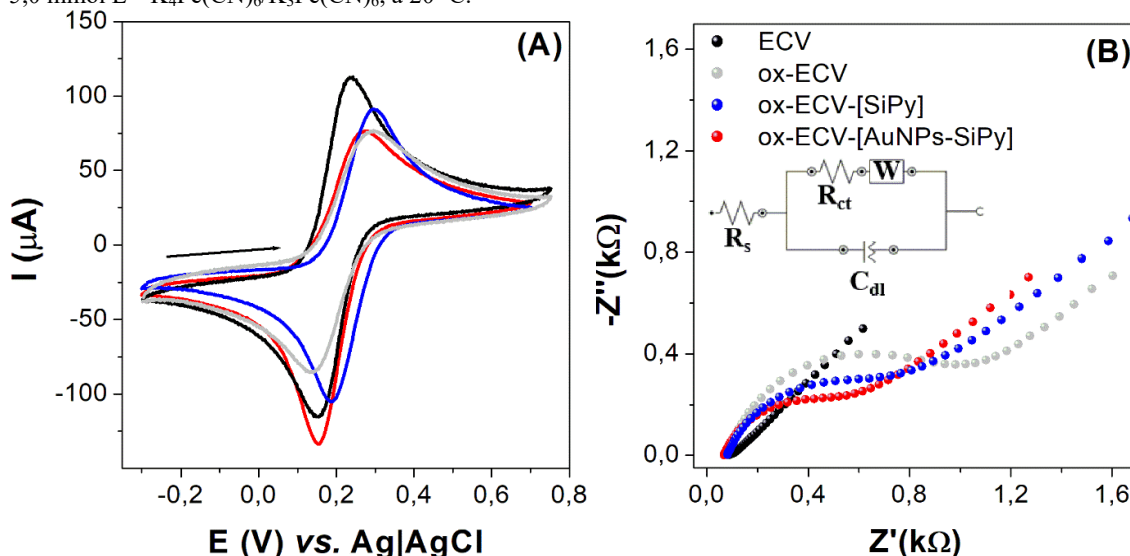


Fonte: A autora.

Devido à presença apenas da corrente capacitiva em todos os eletrodos estudados, e com o intuito de monitorar as propriedades do processo de transferência de elétrons a cada etapa da construção do biossensor a ser desenvolvido, as medidas eletroquímicas seguintes foram realizadas na presença do marcador redox 5,0 mmol L⁻¹ K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆], a qual é comumente empregado na caracterização de biossensores (YE et al., 2018; GONG; WANG; YANG, 2017; MASHHADIZADEH; TALEMI, 2016).

As plataformas ECV, ox-ECV, ox-ECV[SiPy] e ox-ECV-[AuNPs-SiPy] foram caracterizadas por medidas VC e EIE (cujas cores dos gráficos correspondem entre si). Na Figura 24 (A) são ilustrados os voltamogramas cíclicos dos eletrodos estudados, os quais apresentam um processo quase reversível em torno de 0,2 V (Tabela 4) atribuído ao marcador redox ([Fe(CN)₆]^{4-/3-}) utilizado. De outro modo, a Figura 24 (B) ilustra os diagramas de impedância eletroquímica, representados na forma de gráficos de Nyquist, que exibem duas regiões: uma parte semicircular, correspondente ao processo limitado por transferência de elétrons e um segmento linear representando o processo difussional dos íons [Fe(CN)₆]^{4-/3-} (BRETT; BRETT, 1993; BARD; FAULKNER, 2001). Todos os valores de R_{ct} (Tabela 4) foram obtidos pelo *software* Nova 2.1 através de um círculo equivalente.

Figura 24 – (A) Voltamogramas cíclicos (velocidade de varredura: 50,0 mV s⁻¹) e (B) diagramas de Nyquist (potencial de circuito aberto OCP); faixa de frequência: 10,0 kHz to 0,1 Hz; amplitude: 10 mV) obtidos para os ECV, ox-ECV, ox-ECV-[SiPy] e ox-ECV-[AuNPs-SiPy] em 0,5 mol L⁻¹ de tampão PBS (pH 7,4) na presença de 5,0 mmol L⁻¹ K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆, a 20 °C.



Fonte: A autora.

Tabela 4 – Valores de I_{pa} , I_{pc} , ΔI_p , E_{pa} , E_{pc} , ΔE_p , R_s , R_{ct} e erro R_{ct} obtidos por medidas de VC e EIE para o ECV e os ECVs modificados. O erro R_{ct} corresponde a porcentagem de erro que a análise de EIE proporciona.

Etapa	I_{pa} (μA)	I_{pc} (μA)	ΔI_p (μA)	E_{pa} (mV)	E_{pc} (mV)	ΔE_p (mV)	R_s (Ω)	R_{ct} (Ω)	Erro R_{ct} (%)
1	103,4	-102,4	102,9	0,2	0,2	0,2	98,5	50,2	1,8
2	68,3	-75,8	72,0	0,3	0,1	0,2	104,5	851,8	1,9
3	85,5	-99,3	92,4	0,3	0,2	0,2	102,2	502,3	1,7
4	74,6	-122,3	98,4	0,3	0,1	0,2	101,3	402,6	2,0

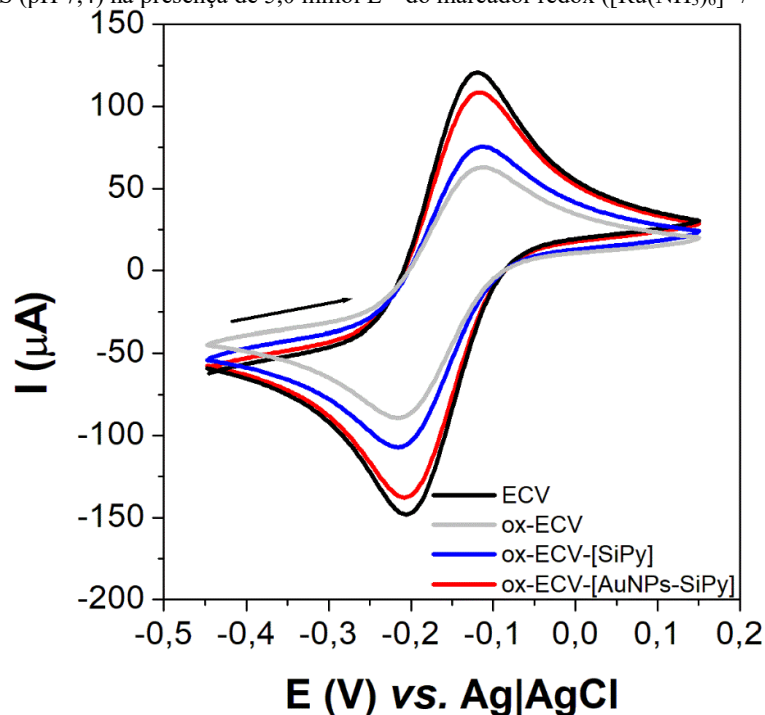
* 1: ECV; 2: ox-ECV; 3: ox-ECV-[SiPy]; 4: ox-ECV-[AuNPs-SiPy].

Fonte: A autora.

O voltamograma cíclico do ECV registrado na presença do íon ferricianeto (curva preta) apresentou um perfil típico de um sistema reversível ($E_{pa} = 0,2$ V; $E_{pc} = 0,2$ V) envolvendo a transferência de 1 elétron, que é o esperado para o par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Esse eletrodo, também apresentou valor de corrente de pico (ΔI_p) relativamente alto de 102,9 μA, característico desse material. A presença dos grupos oxidados (JAROCKA et al., 2014); DEKANSKI et al., 2001) na superfície do ox-ECV fez com que o processo redox se tornasse menos definido ($E_{pa} = 0,3$ V; $E_{pc} = 0,1$ V), interferindo no processo de transferência eletrônica da molécula sonda negativa para interface eletrodo/solução. Dessa forma, o valor de ΔI_p (72,0 μA) mostrou-se menor que para ECV. A imobilização das AuNPs na superfície do eletrodo através de ligações eletrostáticas (ox-ECV-[AuNPs-SiPy]) apresentou ΔI_p de 98,4 μA, valor

maior do que a etapa anterior, devido as propriedades que esse material oferece (SAHA et al., 2012). Porém, o perfil voltamétrico observado apresentou-se menos reversível para o polímero com as AuNPs, quando comparado ao ox-ECV-[SiPy] ΔI_p 92,4 μA , o que não era esperado devido à presença das AuNPs. Uma possível explicação para este comportamento é que devido à interação entre o marcador redox com as AuNPs presentes no nanohíbrido carregado positivamente, o transporte de massa que passa através do filme é dificultado. Esse fato, foi confirmado pelo emprego de um marcador eletroquímico positivo, tal como o hexaminrutênio II e III ($[Ru(NH_3)_6]^{2+/3+}$). Como observado na Figura 25, o maior valor de ΔI_p obtido foi (116,6; 63,7; 78,0 e 107,4 μA , respectivamente para ECV, ox-ECV, ox-ECV-[SiPy] e ox-ECV-[AuNPs-SiPy]) (Tabela 5). A melhora do perfil do voltamograma contendo AuNPs ocorre devido à falta de interação da carga positiva do marcador redox com a carga positiva do nanohíbrido.

Figura 25 – Voltamogramas cíclicos dos ECV, ox-ECV, ECV-[SiPy] e ECV-[AuNPs-SiPy] obtidos em 0,5 mol L^{-1} de tampão PBS (pH 7,4) na presença de 5,0 mmol L^{-1} do marcador redox ($[Ru(NH_3)_6]^{2+/3+}$).



Fonte: A autora.

Tabela 5 – Valores de I_{pa} , I_{pc} , ΔI_p , E_{pa} , E_{pc} e ΔE_p , obtidos por medidas de VC para o ECV e os ECVs modificados preparadas em tampão PBS (pH 7,4) $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$).

Etapas	$I_{pa} (\mu\text{A})$	$I_{pc} (\mu\text{A})$	$\Delta I_p (\mu\text{A})$	$E_{pa} (\text{mV})$	$E_{pc} (\text{mV})$	$\Delta E_p (\text{mV})$
1	86,6	-146,3	116,6	-0,1	-0,2	-0,2
2	43,8	-83,5	63,7	-0,1	-0,2	-0,2
3	51,6	-104,4	78,0	-0,1	-0,2	-0,2
4	78,9	-135,9	107,4	-0,1	-0,2	-0,2

* 1: ECV; 2: ox-ECV; 3: ox-ECV-[SiPy]; 4: ox-ECV-[AuNPs-SiPy].

Fonte: A autora.

O Diagrama de Nyquist (Figura 24 (B)) para ECV evidenciou a presença de um pequeno semicírculo ($R_{ct} = 50,2 \Omega$), associado à rápida cinética de transferência de elétrons desse material. Por outro lado, após oxidação voltamétrica do eletrodo em H_2SO_4 (ox-ECV) apresentou um aumento para R_{ct} ($851,8 \Omega$), consequência da presença dos grupos oxidados na superfície os quais interferem no processo de transferência eletrônica do marcador eletroquímico negativo para interface eletrodo/solução. A ligação eletrostática entre o nanohíbrido AuNPs-SiPy com ox-ECV, forneceu uma diminuição no R_{ct} ($402,6$), o que está associado às propriedades elétricas das AuNPs (SAHA et al., 2012). Na plataforma ox-ECV-[SiPy] foi observado um pequeno aumento no R_{ct} ($502,3 \Omega$) comparado à plataforma com AuNPs.

Os resultados apresentados nesse tópico evidenciam que a plataforma proposta ox-ECV-[AuNPs-SiPy] é promissora e qualifica-se como um material a ser empregado na construção de biossensores, visto que exibiu excelentes respostas eletroquímicas e as AuNPs mostram-se estáveis para serem utilizadas na superfície do eletrodo.

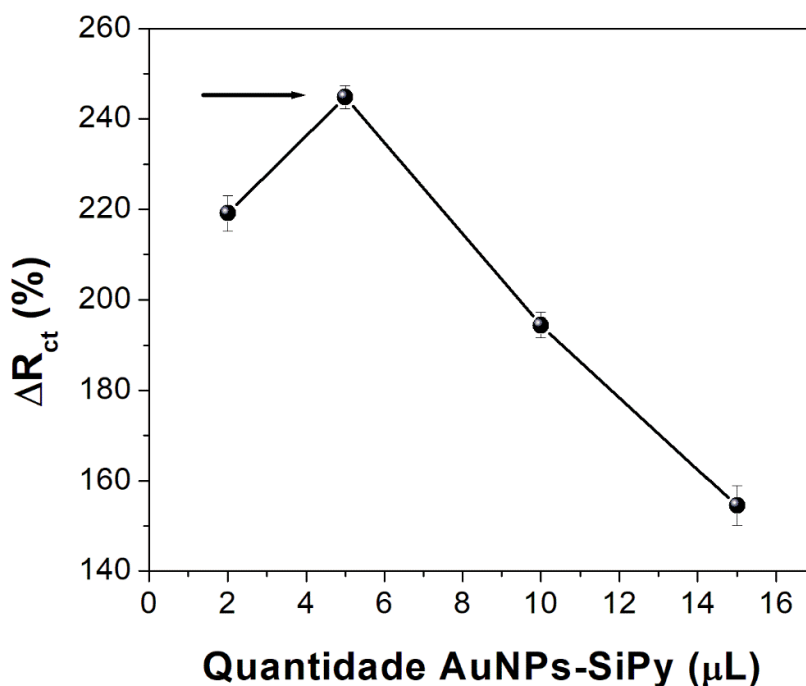
5.3 ETAPAS DE OTIMIZAÇÃO DO BIOCSENSOR DE DNA

Nesta etapa, sobre a plataforma ox-ECV-[AuNPs-SiPy] procedeu-se primeiramente com a imobilização do ssDNA tiolado - ZIKV1. Ou seja, a quimissorsão, formação da ligação covalente entre o Au do nanohíbrido com o S presente no DNA sonda, formando uma espécie de SAM. Essa ligação caracteriza-se por ser uma ligação química forte, a qual proporciona um sensor com maior sensibilidade e reprodutibilidade (AUSTIN et al., 2014). Sequencialmente, realizou-se a hibridação com o ssDNA alvo – ZIKV2 e ambas etapas foram avaliadas via EIE. Com intuito de maximizar a resposta da formação da hibridação entre as ssDNA sonda e alvo

sobre a biossensor para detecção do ZIKV, alguns parâmetros foram selecionados tais como, quantidade de AuNPs-SiPy, tempo de incubação do eletrodo na solução do ZIKV1 ($\text{tempo}_{\text{inc}}$), concentração do ZIKV1 ($[\text{ZIKV1}]$) e temperatura de hibridação da ZIKV2. Esses fatores foram analisados por processos de otimização univariada ou multivariada ($n = 3$). Os dados foram selecionados através do maior valor de ΔR_{ct} obtido pela técnica EIE, entre a etapa de imobilização e hibridação das fitas de DNA.

A quantidade de AuNPs-SiPy foi analisada através de uma análise univariada, em uma faixa de 2 a 15 μL empregados sobre o eletrodo frente a resposta de ΔR_{ct} para as biomoléculas. A Figura 26 demonstra primeiramente um aumento dos valores ΔR_{ct} até 5 μL e sequencial decréscimo com o aumento da quantidade de AuNPs-SiPy. Dessa maneira, esse estudo sugeriu 5 μL como a quantidade mais adequada de AuNPs a ser utilizada na construção do biossensor.

Figura 26 – Efeito da quantidade das AuNPs-SiPy empregadas na construção do biossensor em função do valor da ΔR_{ct} .



Fonte: A autora.

Os parâmetros $[\text{ZIKV1}]$ e $\text{tempo}_{\text{inc}}$ a serem empregados na preparação do biossensor foram estudados em um processo de otimização multivariada empregando-se um planejamento fatorial completo 3^2 de acordo com a Tabela 2 apresentada anteriormente na seção de materiais

e métodos. Os resultados obtidos no planejamento fatorial completo 3^2 foram organizados na Tabela 6.

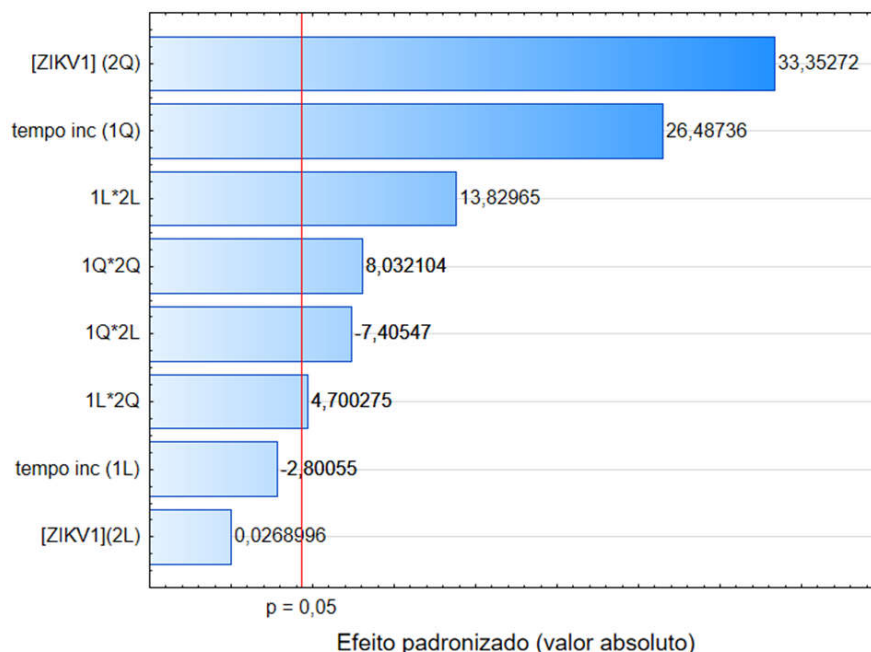
Tabela 6 – Matriz do planejamento fatorial completo 3^2 utilizada para a otimização das variáveis envolvidas na preparação do biossensor. Os níveis das variáveis estudados foram: [ZIKV1] = 1 (-), 5,5 (0) e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (+); e tempo de incubação = 90 (-), 120 (0) e 150 min (+).

tempo _{inc}	[ZIKV1]	ΔR_{ct} (%)
-	-	239,45
+	-	213,73
-	+	226,43
+	+	238,49
0	0	287,23
0	0	286,24
0	0	288,94
0	-	254,36
0	+	242,71
-	0	252,51
+	0	256,80

Fonte: A autora.

O processamento estatístico dos dados experimentais mostrou que o [ZIKV1] e o tempo_{inc} tiveram efeitos significativos na resposta ΔR_{ct} (com nível de confiança de 95%). Além disso, o efeito de interação de segunda ordem entre as duas variáveis foi estatisticamente significativo para a obtenção de uma maior sensibilidade ao biossensor, como pode ser evidenciado no gráfico de Pareto (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995) (Figura 27). Esse comportamento sugere que as variáveis influenciaram na resposta do ΔR_{ct} simultaneamente. Logo, esse resultado demonstra que o efeito de ambos os fatores não deve ser levado em conta individualmente.

Figura 27 – Gráfico de Pareto para o efeito resultante da otimização da variável por planejamento fatorial completo 3^2 (com 95% de nível de confiança).



Fonte: A autora.

Os resultados obtidos a partir do planejamento fatorial 3^2 foram ajustados para um modelo quadrático, no qual a resposta (ΔR_{ct}) foi apresentada em função do [ZIKV1] e do tempo_{inc}. A Equação (6) resultante foi:

$$\Delta R_{ct} = 72.033 + 0.308 \times \text{tempo}_{inc} - 7.823 \times (\text{tempo}_{inc})^2 + 1.965 \times [\text{ZIKV1}] - 9.108 \times ([\text{ZIKV1}])^2 - 2.372 \times \text{tempo}_{inc} \times [\text{ZIKV1}] + 2.702 \times (\text{tempo}_{inc})^2 \times [\text{ZIKV1}] + 2.545 \times (\text{tempo}_{inc})^2 \times ([\text{ZIKV1}])^2 \quad (6)$$

A validade estatística do modelo quadrático obtido foi avaliada pela aplicação da análise de variância (ANOVA) (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995), e os respectivos resultados estão apresentados na Tabela 7. Verificou-se que a regressão do modelo foi estatisticamente significativo ao nível de confiança de 95%, e que a variabilidade explicada pelo modelo foi muito próxima da variação máxima explicável ($R^2 = 0,9890$; $\text{Adj-}R^2 = 0,9633$). Além disso, não foi identificado falta de ajuste (LOF) ($F_{LOF} = 10,15 < F_{1,2,95\%} = 18,51$), o que significa que o modelo quadrático proposto teve um bom ajuste aos dados experimentais e foi capaz de prever com confiabilidade de 96,3% do comportamento da variável dependente (ΔR_{ct}) versus as variáveis independentes estudadas ([ZIKV1] e tempo_{inc}).

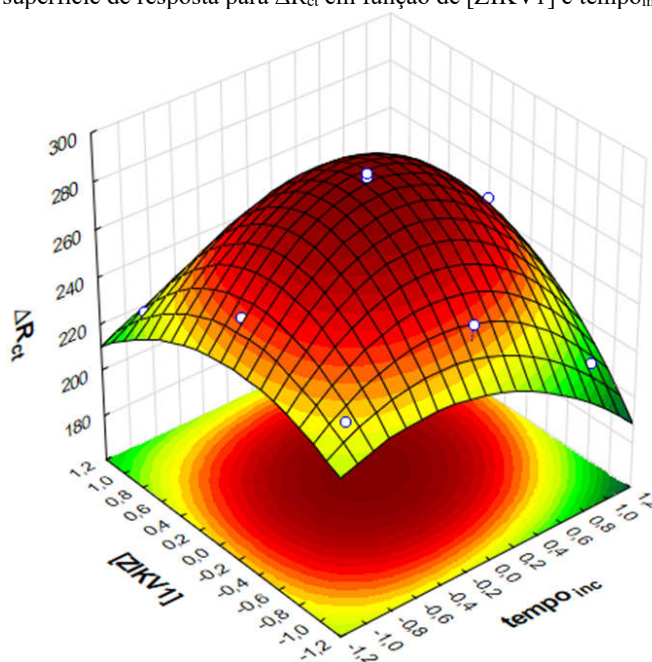
Tabela 7 – Resultados ANOVA do modelo quadrático para otimização do biossensor.

Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
[ZIKV1]	129.11	2	64.56	181.02	0.0055
tempo _{inc}	88.68	2	44.34	124.33	0.0080
[ZIKV1]*tempo _{inc}	36.35	3	12.12	33.97	0.0287
Falta de ajuste	3.62	1	3.62	10.15	0.0860
Erro puro	0.71	2	0.36		
Total	393.90	10			

Variação máxima explicável: $R^2 = 0.9164$; Variação explicável: $\text{Adj-}R^2 = 0.8329$.

Fonte: A autora.

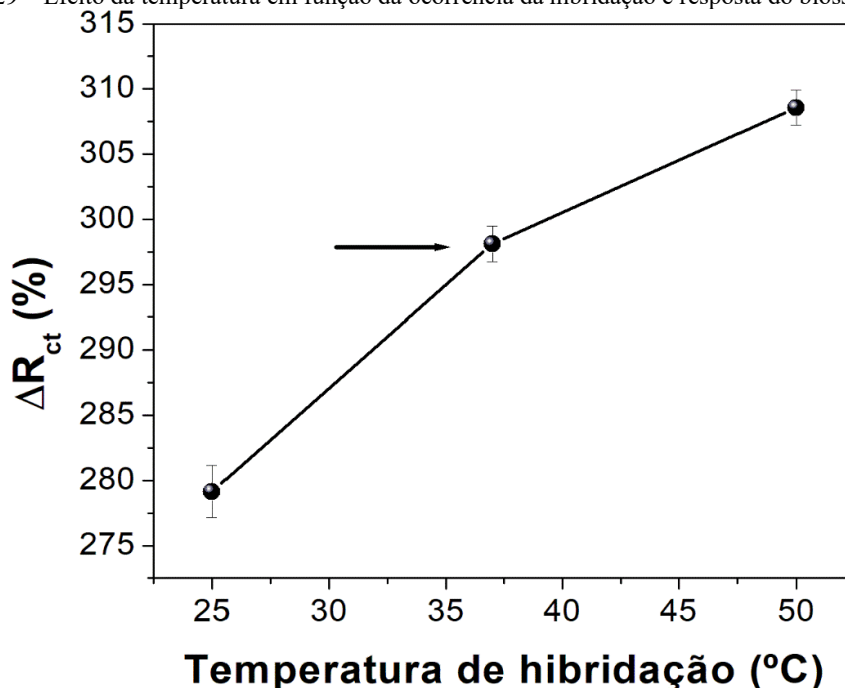
O gráfico da superfície de resposta tridimensional correspondente ao modelo quadrático está apresentado na Figura 28. Pode-se observar que, dentro do intervalo experimental estudado para ambas as variáveis, o ΔR_{ct} passa por um máximo, o que corresponde à região experimental ótima para a preparação do biossensor do DNA do ZIKV. Além disso, pode-se notar que o ponto central do planejamento fatorial 3^2 está localizado precisamente naquela região. Assim, tais condições experimentais foram adotadas como ótimas para a construção do biossensor: $[\text{ZIKV1}] = 5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e tempo = 120 min.

Figura 28 – Gráfico da superfície de resposta para ΔR_{ct} em função de [ZIKV1] e tempo_{inc}.

Fonte: A autora.

A temperatura de hibridação do ZIKV2 também foi otimizada, pois este parâmetro é importante e mostra relação ao aumento da especificidade das ssDNAs frente ao processo de hibridação (BENVIDI et al., 2015a). Desta forma, empregou-se nessa otimização a análise univariada a partir da avaliação dos dados de ΔR_{ct} obtidos dos Diagramas de Nyquist. A Figura 29 mostrou uma relação entre o aumento da temperatura com os valores de ΔR_{ct} .

Figura 29 – Efeito da temperatura em função da ocorrência da hibridação e resposta do biossensor.



Fonte: A autora.

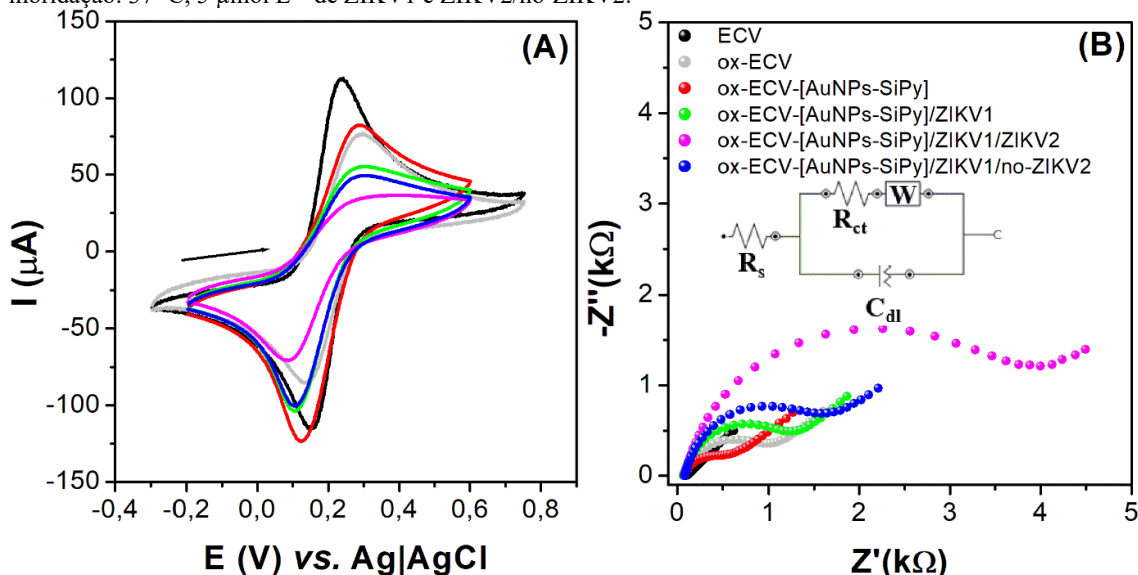
Para esse trabalho escolheu-se a temperatura de 37 °C, visto que a superfície permaneceu úmida, ou seja, somente os ssDNA alvo que hibridaram foram detectados pela técnica excluindo os oligonucleotídeos não adsorvidos. Fato não observado para a temperatura de 50 °C, que neste caso ocorreu a evaporação de todo solvente presente na solução, ou seja, verificou-se a saturação da superfície do eletrodo. Segundo dados da literatura, a temperatura normalmente emprega é de 37 °C, o que está de acordo com esse trabalho (BENVIDI et al., 2015b; SHI et al., 2014; SINGHAL; PUNDIR; NARANG, 2017).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSENSOR DE DNA

O biossensor obtido com os valores otimizados (quantidade de AuNPs = 5 μ L, tempo_{inc} = 2h, [ZIKV1] = 5 μ mol L⁻¹ e temperatura de hibridação da ssDNA alvo = 37 °C) foi

caracterizado por medidas VC e EIE a cada etapa de construção, Figura 30 (cujas cores estão atreladas entre si), Tabela 8 e 9.

Figura 30 – (A) Voltamogramas cíclicos (velocidade de varredura: 50.0 mV s^{-1} e (B) diagramas de Nyquist (OCP; faixa de frequência: $10,0 \text{ kHz}$ to $0,1 \text{ Hz}$; amplitude: 10 mV) para as etapas da construção do biossensor de ZIKV, em 0.5 mol L^{-1} tampão PBS (pH 7,4) na presença de $5,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, temperatura para hibridação: 37°C , $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ZIKV1 e ZIKV2/no-ZIKV2.



Fonte: A autora.

Tabela 8 – Valores de I_{pa} , I_{pc} , ΔI_p , E_{pa} , E_{pc} e ΔE_p obtidos por medidas de VC para os ECV e ECVs modificados em cada etapa de construção do biossensor.

Etapa	I_{pa} (μA)	I_{pc} (μA)	ΔI_p (μA)	E_{pa} (mV)	E_{pc} (mV)	ΔE_p (mV)
1	98,3	-99,8	99,1	0,2	0,1	0,2
2	68,3	-75,8	72,0	0,3	0,1	0,2
3	69,2	-112,5	90,9	0,3	0,1	0,2
4	42,3	-90,0	65,1	0,3	0,1	0,2
5	26,5	-55,1	40,8	0,3	0,1	0,2
6	40,5	-84,4	60,4	0,3	0,1	0,2

* 1: ECV; 2: ox-ECV; 3: ox-ECV-[AuNPs-SiPy]; 4: ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1; 5: ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1/ZIKV2; 6: ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1/No-ZIKV2.

Fonte: A autora.

Tabela 9 – Valores de R_s , R_{ct} , erro R_{ct} , C_{dl} e W obtidos por medidas de EIE para os ECV e ECVs modificados em cada etapa de construção do biossensor.

Etapa	R_s (Ω)	R_{ct} (Ω)	ΔR_{ct} (%)	Erro R_{ct} (%)	C_{dl} (μF^{sn-1})	W (μF^{sn-1})
1	98,5	50,2	-	1,8	211,7	1,67
2	104,5	851,8	1596,8	1,9	40,2	1,16
3	101,3	419,6	-103,0	2,1	104,0	1,28
4	105,8	1003,4	139,2	1,6	38,7	1,02
5	120,4	3994,4	298,1	2,0	28,0	0,86
6	108,9	1410,1	28,8	1,7	35,2	0,98

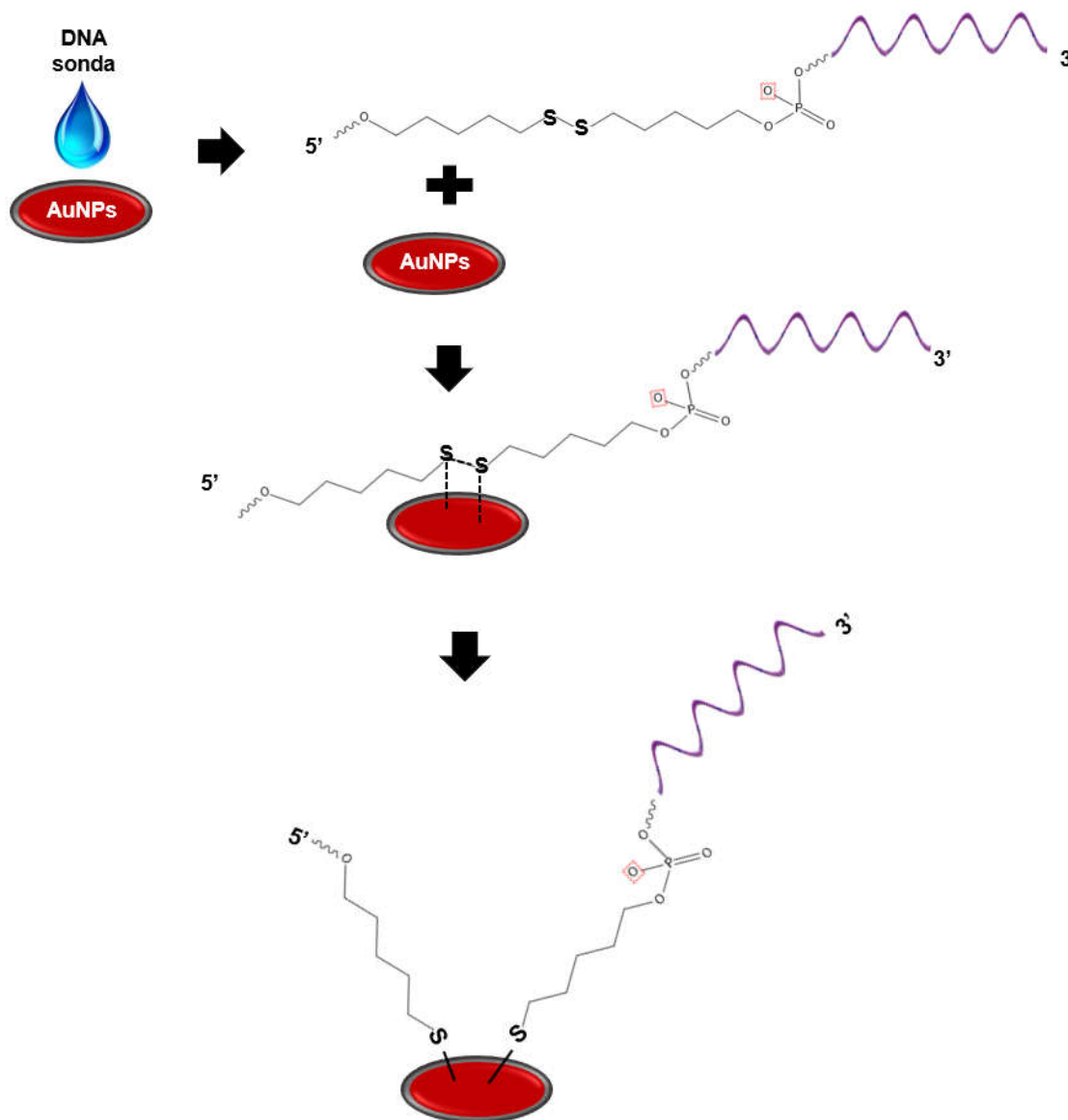
* 1: ECV; 2: ox-ECV; 3: ox-ECV-[AuNPs-SiPy]; 4: ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1; 5: ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1/ZIKV2; 6: ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1/No-ZIKV2.

Fonte: A autora.

A imobilização do ZIKV1 sobre a plataforma ox-ECV-[AuNPs-SiPy] ocorreu via quimissorsão (ligação covalente de elevada afinidade S-Au) do ssDNA sonda à superfície do eletrodo, o qual resultou na diminuição do ΔI_p (65,1 μA) e aumento do R_{ct} (1003,4 Ω). Esse resultado se deve ao comportamento isolante que a biomolécula imobilizada apresenta (DINÇKAYA et al., 2011). Porém, antes da imobilização do DNA sonda (para ocorrer a ligação covalente entre Au-S), foi necessário primeiramente a quebra da ponte dissulfeto da extremidade 5' presente no DNA sonda. A quebra dessa ligação para este trabalho foi realizada somente pela incubação da plataforma ox-ECV-[AuNPs-SiPy] na solução do ZIKV1 (Figura 31).

Dessa forma, não foi necessário o emprego de um pré-tratamento químico, o que também geraria um custo a mais e haveria perda de certa quantidade de amostra. Ou seja, esse trabalho apresenta uma nova proposta para imobilização, diferente do trabalho de (WANG et al., 2017) que utilizaram ditiotretitol (DTT) para a quebra da ponte enxofre.

Figura 31 – Representação esquemática da quebra da ligação dissulfeto presente no ssDNA sonda e respectiva formação da ligação covalente (S-Au) com as AuNPs presente na superfície do eletrodo.

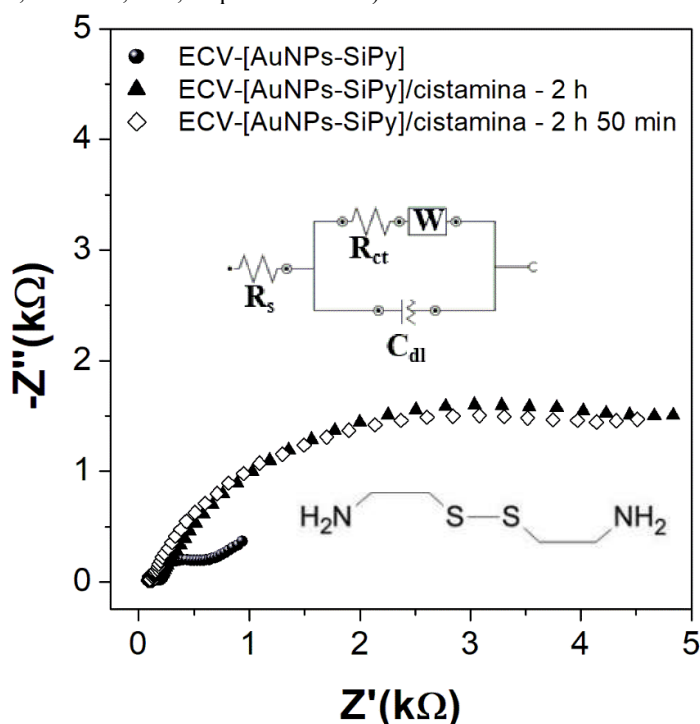


Fonte: A Autora.

Com o intuito de confirmar a ocorrência da ligação S-Au (quebra da ligação dissulfeto) sobre a superfície do eletrodo sem a utilização de qualquer pré-tratamento químico, foi realizada a imobilização com cistamina (molécula muito utilizada em SAM (MASHHADIZADEH; TALEMI, 2016), que possui a fórmula molecular $C_4H_{12}N_2S_2$) sobre ox-ECV-[AuNPs-SiPy] ao invés do ZIKV1. Nesse ensaio, a ligação covalente foi confirmada pelo aumento do valor de R_{ct} (de 493,3; 4444,1; 4402,9 Ω sequencialmente) (Figura 32), que está em concordância com a imobilização do ZIKV1 (no qual ocorre o aumento dos valores de R_{ct} , de 419 para 1003 Ω),

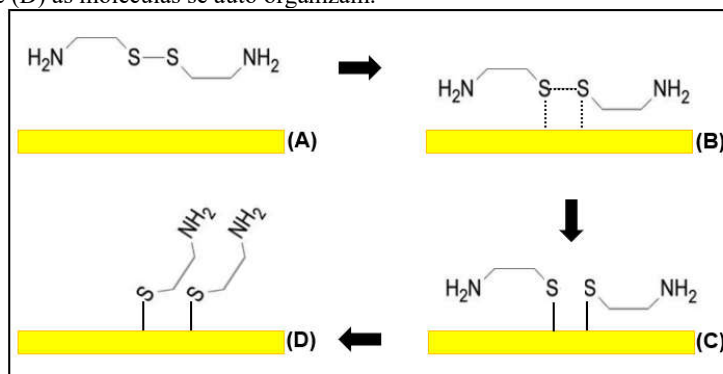
apresentado anteriormente Figura 30. Dessa forma, é possível dizer que a imobilização do DNA sonda ocorre de maneira similar à molécula de cistamina sobre as AuNPs, como apresentado o esquema na Figura 33.

Figura 32 – Diagramas de Nyquist do ox-ECV-[AuNps-SiPy] na presença e ausência de cistamina obtidos em tampão PBS 0,5 mol L⁻¹ (pH 7,4) na presença 5,0 mmol L⁻¹ K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆, temperatura ambiente (OCP; faixa de frequência: 10,0 kHz à 0,1 Hz; amplitude: 10 mV).



Fonte: A autora.

Figura 33 – Representação esquemática da formação da ligação covalente entre cistamina e ouro. (A) Aproximação do cistamina na superfície de ouro. (B) Quando os átomos de enxofre e ouro estão próximos suficiente, ocorre o rompimento da ligação S-S ao mesmo tempo em que duas ligações tiol-Au se formam. Em (C) ocorre a formação da ligação tiol-Au e (D) as moléculas se auto organizam.



Fonte: Adaptado de WATANABE; DOS SANTOS; BUENO, 2009.

Após a imobilização do ZIKV1 a obtenção do biossensor, realizou-se a incubação do ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1 na solução do DNA alvo, ZIKV2 para o processo de hibridação. No qual, essa etapa apresentou uma diminuição no valor de ΔI_p (40,8 μA) e um aumento nos valores de R_{ct} (3994,4 Ω), que evidencia a formação da dsDNA. Esta quando formada, faz com que o sistema se apresente mais resistivo, ou seja, impede o processo redox do marcador eletroquímico. (DINÇKAYA et al., 2011). É importante ressaltar que o emprego de oligonucleotídeos complementares entre si (ZIKV1 e ZIKV2) de forma paralela, evidenciou o processo de hibridação e caracteriza-se por ser uma abordagem alternativa na construção de biossensores (BHARDWAJ; SHARMA, 2014). Como as sondas de DNA usadas não foram marcadas, foi empregado $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ como marcador eletroquímico. Essa estratégia nos permitiu acompanhar as mudanças ocorridas nas propriedades interfaciais dos eletrodos após a modificação com AuNPs e as sequências de DNA, bem como a ocorrência do processo de hibridação, o que consistiu dessa forma um biossensor *lable free*.

Por outro lado, para a imobilização do controle negativo, no-ZIKV2, não observou mudança significativa nos valores de ΔI_p (60,4 μA) e R_{ct} (1410,1 Ω) comparado a última etapa. Este resultado indica a ausência da hibridação para então formação da dsDNA, comprovando a especificidade do biossensor (LIU et al., 2010). É relevante mencionar nesse trabalho não foi utilizado um controle negativo sendo de origem de outro flavivírus como DENV, CHIKV ou YFV visto que o DNA sonda utilizado foi previamente selecionado de uma região intergênica que houvesse a menor probabilidade de haver reação cruzada com outros vírus pertencentes a mesma família (ZHANG et al., 2016).

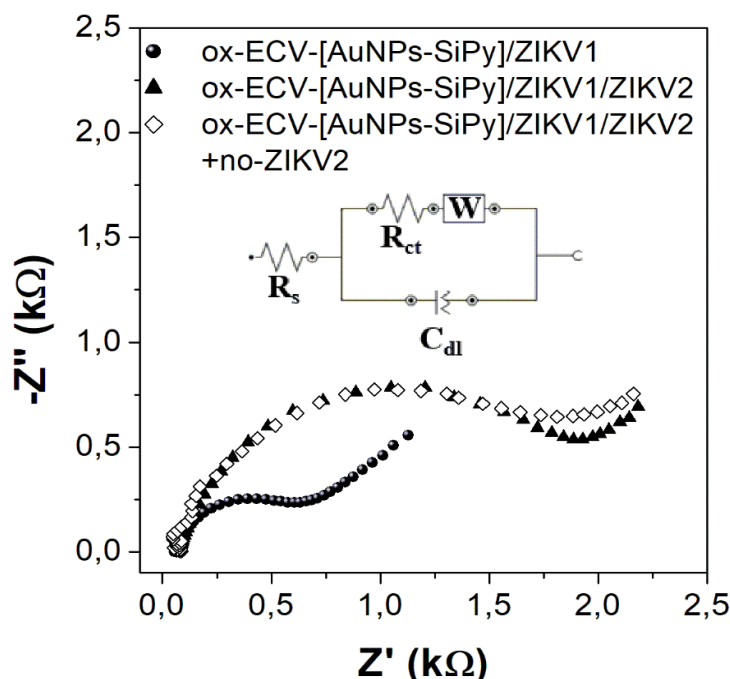
Além dos valores de R_{ct} e ΔR_{ct} , outros parâmetros foram obtidos através da EIE (Figura 30 (B)) e podem ajudar a elucidar uma melhor compreensão da construção do biossensor. A resistência presente no eletrólito, eletrodo e contatos, R_s , demonstrou um pequeno aumento (de 98,5 a 120,4 Ω) durante as etapas de construção do biossensor, devido ao efeito isolante dos oligonucleotídeos empregados. Os valores de C_{dl} , um elemento de fase constante (responsável pela capacitância de dupla camada) diminuiu de 211,7 a 28,0 μF^{sn-1} , devido haver um decréscimo da área da interface sensor/eletrólito pela imobilização de biomoléculas. Em relação aos valores de W (que relaciona o processo difussional), também sofreram uma diminuição de 1,67 a 0,86 μF^{sn-1} . Essa redução está relacionada ao armazenamento de carga na superfície do eletrodo. Logo, à medida que o processo de imobilização ocorre, o processo de transferência de

elétrons está sendo mais dificultado e a carga intercalada dentro na superfície do ECV contendo oligonucleotídeos é diminuída (GONÇALVES; PEREIRA; MARCHESI, 2017).

5.5 EFEITO DA ESPECIFICIDADE DO DNA ALVO

Assim como observado nas etapas de caracterização do biossensor, a resposta da hibridação do ZIKV2 com a ssDNA sonda foi mais significativa que em relação para no-ZIKV2. Deste modo, com intuito de observar se há influência na resposta do ssDNA alvo na presença de outro ssDNA em solução, adicionou-se os ssDNAs (ZIKV2 + no-ZIKV2). O objetivo desse estudo se deve que em uma amostra real, haverá não somente o RNA do ZIKV, porém outras biomoléculas, trata-se de uma amostra complexa. O diagrama de Nyquist (Figura 34) demonstra que a resposta do processo de hibridação com a mistura (ZIKV2+no-ZIKV2) (2366,1 Ω e 76,3%) em relação a somente ZIKV2 (2490,7 Ω e 77,1%) não é significativamente afetada (Tabela 10), respectivamente. Desta forma essa análise comprova a seletividade e especificidade entre o ZIKV1 e ZIKV2, os quais são complementares entre si.

Figura 34 – Diagramas de Nyquist do ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1 na ausência e presença de ZIKV2 e presença da mistura de ZIKV2 + no-ZIKV2, obtidos em 0,5 mol L⁻¹ tampão PBS (pH 7,4) contendo 5,0 mmol L⁻¹ de K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆, temperatura de hibridação: 37 °C (OCP; faixa de frequência: 10,0 kHz a 0,1 Hz; amplitude: 10 mV).



Fonte: A autora.

Tabela 10 – Valores de R_s , R_{ct} e ΔR_{ct} obtidos por medidas de EIE para os ECVs modificados para o estudo da especificidade do ssDNA alvo.

Etapa	$R_s (\Omega)$	$R_{ct} (\Omega)$	$\Delta R_{ct} (\%)$
1	98,5	559,5	-
2	104,5	1940,2	300,0
3	101,3	1898,7	290,8

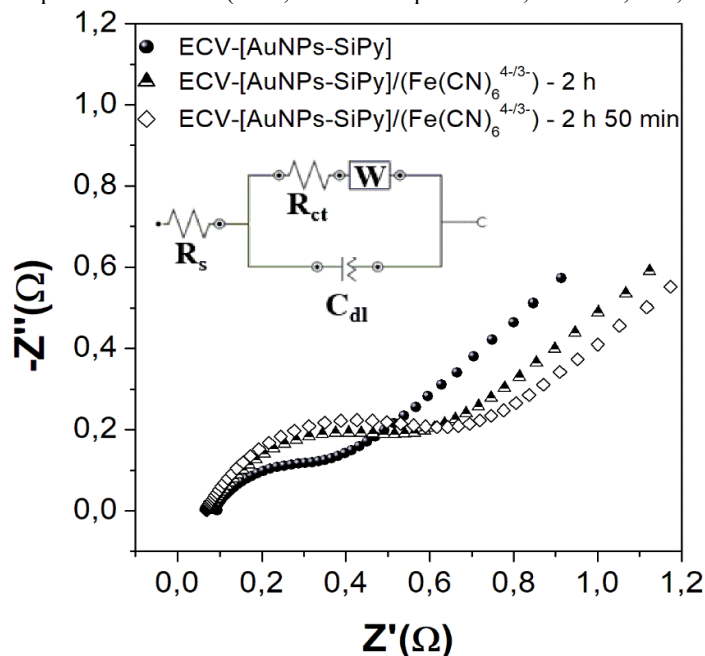
*1: ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1; 2: ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1/ZIKV2; 3: ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1/ZIKV2+No-ZIKV2.

Fonte: A autora.

5.6 EFEITO DO MARCADOR REDOX EMPREGADO

Conforme mencionado anteriormente, o marcador redox interagiu com a superfície do eletrodo, o que poderia resultar em respostas falsas positivas, uma vez que o aumento do ΔR_{ct} poderia ser devido à imobilização do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ e não das biomoléculas na superfície do biossensor. Portanto realizou-se um experimento a fim de verificar que essa interação não afetaria na resposta do eletrodo. Desta forma, optou-se pela imobilização do marcador redox ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$) na superfície de ox-ECV-[AuNPs-SiPy] no lugar das biomoléculas. Pode-se observar na Figura 35, que o diagrama de Nyquist não exibiu aumento significativo dos valores de R_{ct} (38,7 a 7,3 %) comparado com ZIKV1 (298,1%) para 2 h e 2h 50min (Tabela 11), indicando que o marcador redox usado não afetou significativamente na resposta do sensor. Desta maneira, o biossensor proposto pode ser empregado para detecção do ZIKV.

Figura 35 – Diagramas de Nyquist para ox-ECV-[AuNPs-SiPy] modificado pela incubação de 2 h ou 2 h 50 min em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, obtidos em $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ tampão PBS (pH 7,4) na presença de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, à temperatura ambiente (OCP; faixa de frequência: 10,0 kHz a 0,1 Hz; amplitude: 10 mV).



Fonte: A autora.

Tabela 11 – Valores de R_s , R_{ct} , erro R_{ct} obtidos por medidas de EIE para os ECVs modificados para o estudo do efeito do marcador redox empregado.

Etapa	$R_s (\Omega)$	$R_{ct} (\Omega)$	$\Delta R_{ct} (\%)$
1	87,48	303,26	-
2	81,45	426,95	38,7
3	78,61	473,33	7,2

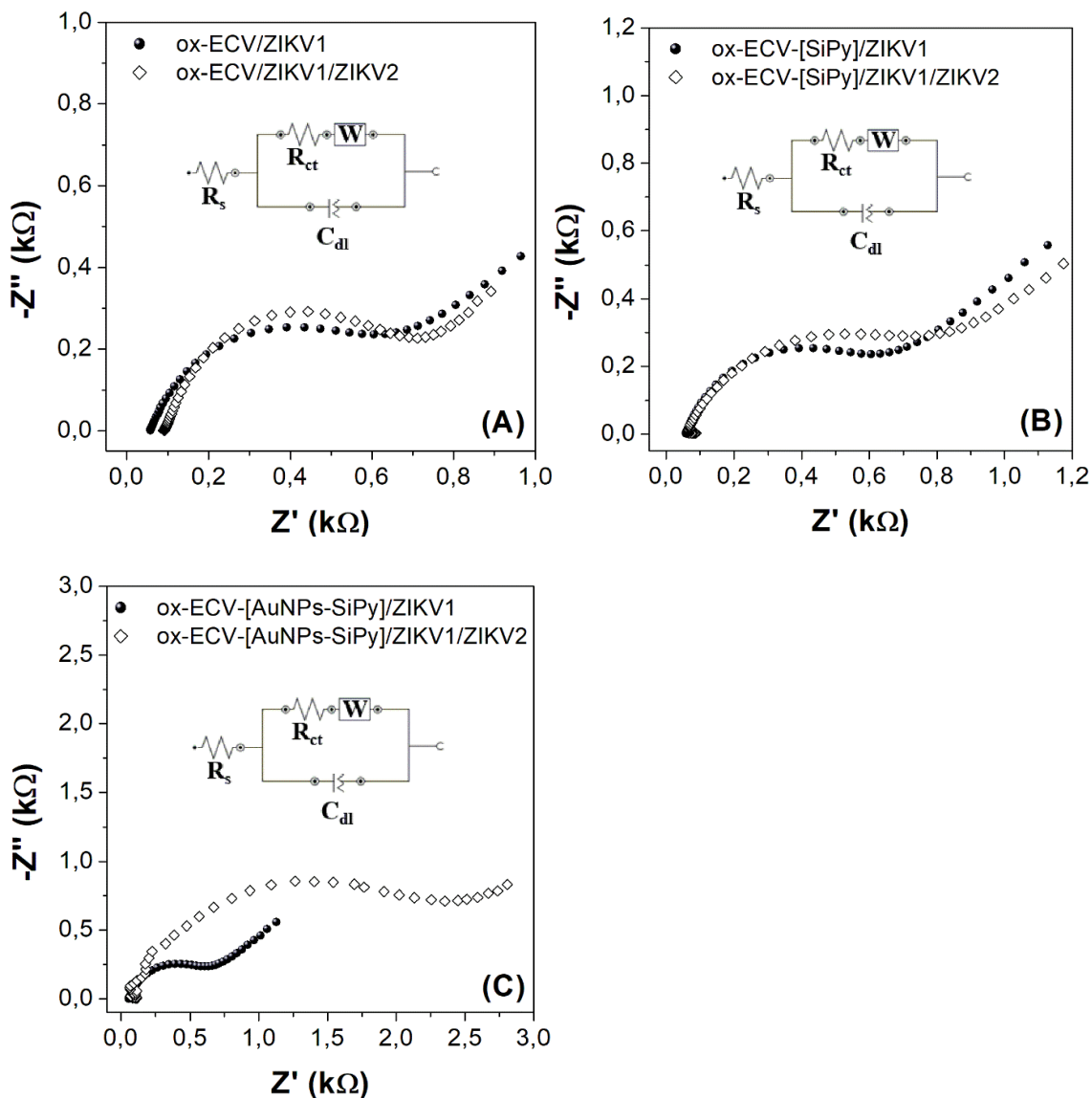
*1: ECV-[AuNPs-SiPy], 2: ECV-[AuNPs-SiPy]/ $(\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-})$ (2 h), 3: ECV-[AuNPs-SiPy]/ $(\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-})$ (2 h 50 min).

Fonte: A autora.

5.7 A INFLUÊNCIA DAS AuNPs-SiPy NA COMPOSIÇÃO DO BIOSSENSOR

Para justificar o uso das AuNPs-SiPy na formação da ligação covalente (S-Au) do grupo tiolado do ssDNA sonda ZIKV1 e consequentemente incremento de resposta do biossensor, foi realizado um estudo comparativo utilizando três configurações de plataformas para hibridar com ssDNA alvo ZIKV2: ox-ECV, ox-ECV-[SiPy] e ox-ECV-[AuNPs-SiPy], todos ligados ao probe ssDNA do ZIKV1 (Figura 36). Após a hibridação, os valores de ΔR_{ct} foram listados na Tabela 12.

Figura 36 – Diagramas de Nyquist referente as configurações (A) ox-ECV/ZIKV1, (B) ox-ECV-[SiPy]/ZIKV1 e (C) ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1 analisadas frente ao ssDNA alvo ZIKV2. Obtidos em 0,5 mol L⁻¹ tampão PBS (pH 7,4) na presença de 5,0 mmol L⁻¹ K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆, temperatura de hibridação 37 °C (OCP; faixa de frequência: 10,0 kHz a 0,1 Hz; amplitude: 10 mV).



Fonte: A autora.

Tabela 12 – Valores de ΔR_{ct} obtidos após a hibridação entre as fitas de DNA para três diferentes configurações de eletrodo de trabalho.

Plataforma	ΔR_{ct} (Ω)
ox-ECV/ZIKV1/ZIKV2	8,62
ox-ECV-[SiPy]/ZIKV1/ZIKV2	47,38
ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1/ZIKV2	277,83

Fonte: A autora.

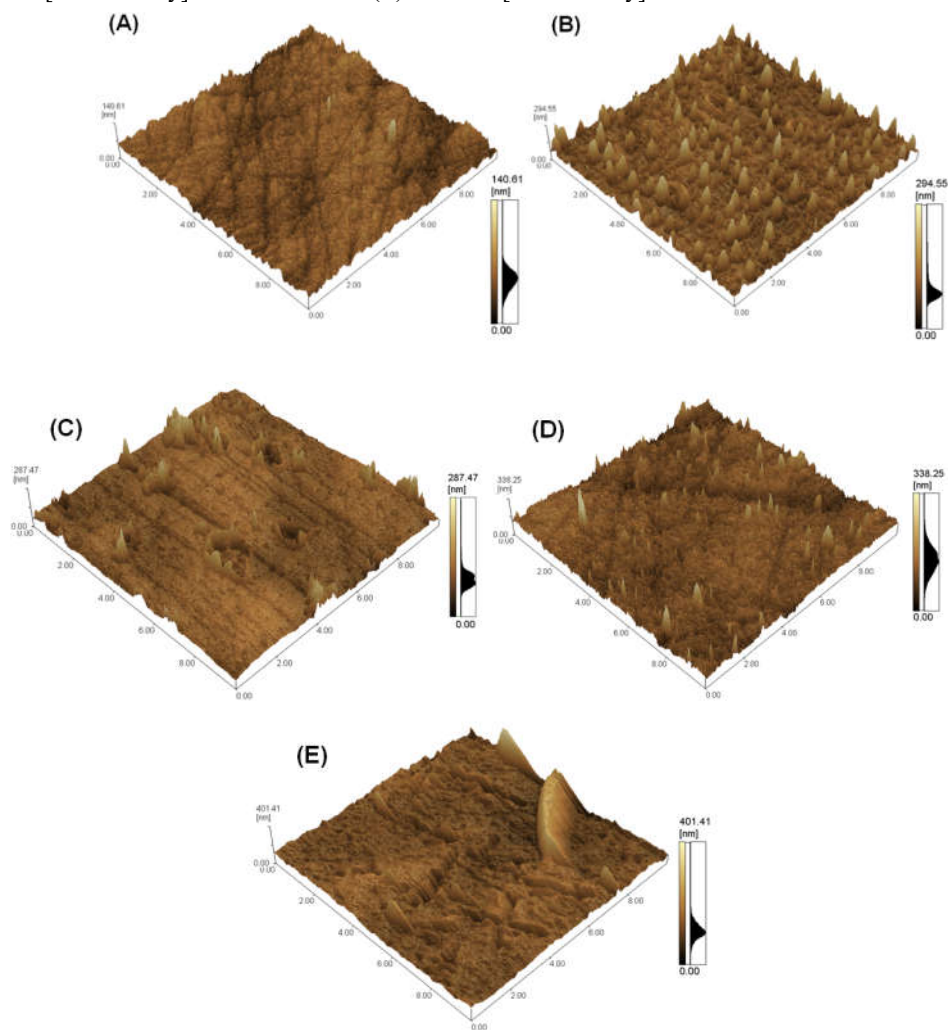
Os valores de ΔR_{ct} obtidos para ox-ECV e ox-ECV-[SiPy] são significativamente menores que para ox-ECV-[AuNPs-SiPy]. Esse fato é explicado pois, na presença da AuNPs tem-se a formação de uma ligação covalente efetiva com a ssDNA sonda. Esta ligação caracteriza-se por ser uma ligação química estável e reprodutível. Além disso, o emprego de material nanoparticulado contribui em uma maior quantidade de sítios de ligação livres, para ligação Au-S seguida pelo processo da hibridação, justificando o aumento significativos dos valores de ΔR_{ct} . Desta forma, a utilização das AuNPs-SiPy proporciona uma maior sensibilidade ao biossensor. Ao contrário, que para as outras plataformas, há um aumento não significativo, justificado pela ocorrência de interações fracas podem ocorrer entre o eletrodo modificado e as biomoléculas. Interações como van der Waals e eletrostáticas, as quais comparadas com a ligação covalente são menos estáveis e reprodutíveis. (AUSTIN et al., 2014).

5.8 CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DO BIOSENSOR

Imagens de AFM foram obtidas para cada etapa de construção do biossensor (Figura 37). Como pode ser observado, o ox-ECV revelou uma superfície lisa (Figura 37 (A)) e ox-ECV-[AuNPs-SiPy] uma superfície globular (Figura 37 (B)), sendo ambos uniformes. No entanto, foi observado um aumento nos valores de rugosidade (R_q) de ox-ECV (9,8 nm) para ox-ECV-[AuNPs-SiPy] (36,4 nm), provando a incorporação das AuNPs na superfície do ECV. Após a imobilização da ZIKV1 foi observado um aumento adicional do R_q (54,8 nm) (Figura 37 (C)), associado à imobilização do DNA sonda. A adição de alvo ZIKV2 apresentou aumento significativo dos valores de R_q (95,8 nm) possivelmente devido à formação da dsDNA (hibridação entre as ssDNA ZIKV1 e ZIKV2), a qual é mais alongada e menos flexível que a ssDNA sonda ZIKV1 (Figura 37 (D)). (OLIVEIRA et al., 2018; DE CASTRO et al., 2018). Por fim, na presença do no-ZIKV2, devido à falta da formação da hibridação, um menor aumento de R_q (69,9 nm) foi evidenciado, o que pode ser atribuído à ausência de interações específicas com o DNA sonda ou com a superfície AuNPs-SiPy (Figura 37 (E)). Nota-se, portanto a partir dos valores apresentados na Tabela 13, as imagens corroboram com os resultados obtidos pelo EIE, uma vez que o aumento do R_q está de acordo com o aumento dos valores de R_{ct} . Além disso, observa-se que a especificidade entre o DNA sonda ZIKV1 e ZIKV2 e consequentemente a não especificidade para o controle negativo, o no-ZiKV2 através dos valores de ΔR_q e ΔR_{ct} . Na primeira situação, há o aumento significativo dos valores de ΔR_q e ΔR_{ct} (74,8 e 298,1%) e

na segunda um menor aumento (27,5 e 28,8 %). Sendo o resultado deste estudo de suma importância para a aplicabilidade do sensor proposto.

Figura 37 – Imagens de AFM para (A) ox-ECV, (B) ox-ECV-[AuNPs-SiPy], (C) ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1, (D) ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1/ZIKV2 e (E) ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1/no-ZIKV2.



Fonte: A autora.

Tabela 13 – Valores de R_q e ΔR_q obtidos para cada etapa da construção do biossensor *versus* valor de R_{ct} e ΔR_{ct} obtido na caracterização eletroquímica do sensor.

Etapas	R_q (nm)	ΔR_q (%)	R_{ct} (Ω)	ΔR_{ct} (%)
1	9,8	-	851,8	-
2	36,4	271,4	419,6	-103,0
3	54,8	50,5	1003,4	139,2
4	95,8	74,8	3994,4	298,1
5	69,9	27,5	1410,1	28,8

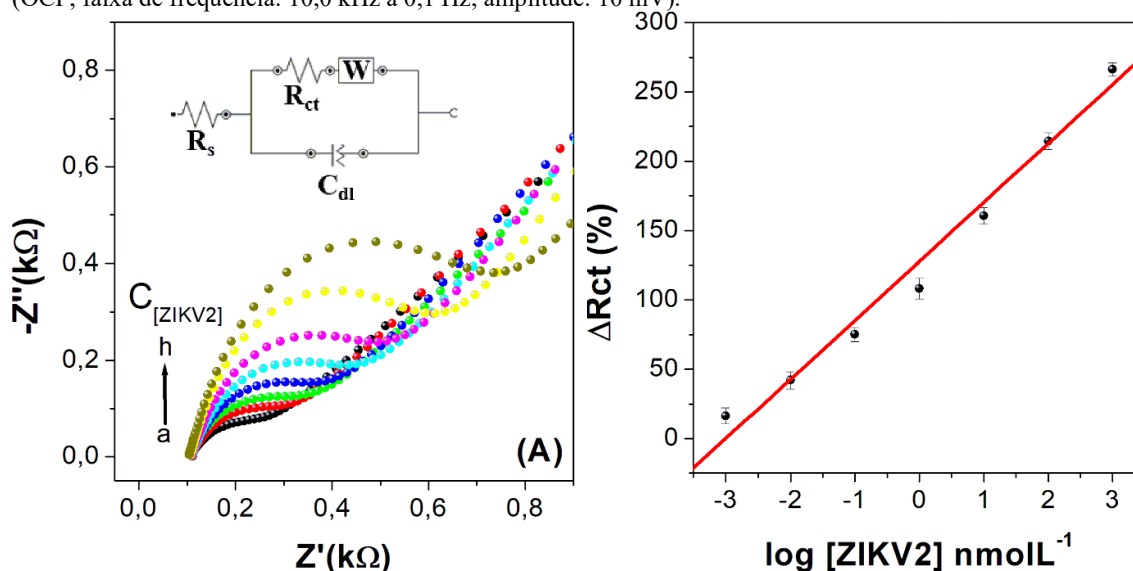
* 1: ox-ECV; 2: ox-ECV-[AuNPs-SiPy]; 3: ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1; 4: ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1/ZIKV2; 5: ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1/No-ZIKV2.

Fonte: A autora.

5.9 CURVA ANALÍTICA

Curvas analíticas foram construídas sob condições otimizadas (Figura 38 (A)), nas quais o [ZIKV1] permaneceu fixo ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) e o [ZIKV2] foi variado ($1,0 \times 10^{-12}$ a $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) para a ocorrência do processo de hibridação. O aumento da concentração alvo do ZIKV2 foi monitorado pelo aumento correspondente de ΔR_{ct} em cada medida realizada, mostrando uma linearidade entre essas variáveis. A equação de regressão obtida foi de $\Delta R_{ct}(\%) = 42,55 C_{[\text{ZIKV2}]} + 127,69$, com $R = 0,992$ (Figura 38 (B)).

Figura 38 – (A) Curvas analíticas obtidas dos diagramas de Nyquist para ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1 após a hibridação com diferentes [ZIKV2]: (a) ZIKV1, (b) $1,0 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$ (c) $1,0 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$, (d) $1,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$, (e) $1,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, (f) $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, (g) $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, (h) $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. (B) Curva de regressão linear, $R = 0,99391$, $\Delta R_{ct}(\%) = 9,2477 + 11,055 C_{[\text{ZIKV2}]}$. Diagramas obtidos em $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ tampão PBS (pH 7,4) na presença de $5,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, temperatura de hibridação: 37°C , $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ZIKV1, (OCP; faixa de frequência: $10,0 \text{ kHz}$ a $0,1 \text{ Hz}$; amplitude: 10 mV).



Fonte: A autora.

O limite de detecção foi calculado seguindo as diretrizes da IUPAC (NIC; JIRAT; KOSATA, 1997): $LOD = 3 SD/b$, onde **SD** é o desvio padrão das medidas em branco (na ausência de qualquer analito; $n = 3$) e **b** é o coeficiente de inclinação da curva analítica. O valor de $LOD = 0,41 \text{ pmol L}^{-1} = 2,3 \times 10^8 \text{ cópias mL}^{-1}$ obtido sugere que a plataforma de ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1 apresentou uma resposta analítica promissora para detecção de DNA ZIKV2, com sensibilidades e valores de LOD satisfatórios frente a sistemas encontrados na literatura (Tabela 14). Além disso, o biossensor proposto apresenta vantagens adicionais em relação a outras técnicas sensíveis apresentadas na Tabela 14. Não há necessidade de síntese de cDNA, adquirir um equipamentos especial, gastar tempo e dinheiro em treinamento, conforme exigido pelo método LAMP. Não há resultados falsos negativos e positivos e a necessidade de longos tempos de diagnóstico, de acordo exigido pelo teste sorológico AG/AB, sendo estas biomoléculas de custo elevado. O biossensor proposto consiste de uma plataforma simples, o qual tem o potencial de quantificar de maneira eficiente e específica à presença do ZIKV rapidamente e a baixo custo. Além disso, esse sensor apresentou valores de LOD menores comparados aos sistemas da literatura, que possuem materiais carbonáceos em sua composição, os quais requerem uma certa quantidade de energia para serem sintetizados. Por outro lado, o dispositivo proposto além de usar um material que seja de fácil síntese depende somente de agitação, como as AuNPs, tem-se a necessidade do emprego de uma quantidade mínima de 15 μL para a construção do biossensor.

Embora o trabalho relatado por Faria e Zucolotto (2019) mostre características interessantes como portabilidade e plataforma mais simples e descartável, destacamos que nosso sensor apresenta um menor tempo de ensaio para o processo de hibridação, uma faixa linear mais ampla, um LOD menor (permitindo detecção de ZIKV em biofluidos, Tabela 1) e não há necessidade de um passo químico para a quebra da ligação dissulfureto dos oligonucleótidos de DNA sonda tiolado.

Tabela 14 – Comparação do biossensor de DNA proposto com outros sensores reportados na literatura utilizados na detecção de ZIKV.

Platforma	Técnica utilizada	Detecção	Alvo	Linearidade (mol L ⁻¹)	LOD (pmol L ⁻¹)	Tempo ensaio (min)	Ref.
ox-GCE- [AuNPs-SiPy]	VC, EIE	Eletroquímico Label-free	DNA	1,0 x10 ⁻¹² – 1,0 x10 ⁻⁶	0,41	50	This work
Ouro-PET	EIE, CV, VPD	Eletroquímico Label-free	RNA (NS5)	54 x10 ⁻⁹ – 340 x10 ⁻⁹	25000	90	(FARIA; ZUCOLOTT O, 2019)
¹ FMR	LAMP	Colorimétrico	DNA	7,8 x10 ⁻¹² – 250 x10 ⁻¹²	1,0	40	(TIAN et al., 2018)
Chips de grafeno	EIE	Eletroquímico Label-free	AB (NS1)	–	450	5	(AFSAHI et al., 2018)
3D Cu- MOF [Cu(Dcbcp)(bp e)] _n	³ F	Colorimétrico	RNA	50 x10 ⁻¹² – 70 x10 ⁻⁹	192	36	(XIE et al., 2018)
² IDE- DTSP	EIE	Eletroquímico Label-free	AB (NS1)	10 x10 ⁻¹² – 1,0 x10 ⁻⁹	10	30	(KAUSHIK et al., 2018)
IDE-GoxPol	VC, EIE	Eletroquímico Label-free	Virus	5,2 x10 ⁻²⁰ – 5,2 x10 ⁻¹⁵	1 x 10 ⁻⁸	–	(TANCHAR OEN et al., 2018a)

¹FMR = ressonância ferromagnética / ²IDE-DTSP = eletrodo interdigitado de ouro modificado com ditiobis (succinimidil propionato) (DTSP) / ³F = fluorescência.

Fonte: A autora.

5.10 DETECÇÃO DO ZIKV EM SORO E ESTABILIDADE DO BIOSSENSOR

A performance do biossensor de DNA proposto também foi avaliada em amostras de soro contaminadas com três concentrações distintas de ZIKV2 alvo e os valores de ΔR_{ct} obtidos encontram-se na Tabela 15. Nota-se da relação linear obtida entre a concentração de ZIKV e os valores de EIE que, além da composição complexa do fluido biológico (formado principalmente por: ácido úrico, glutamato, glicose, ácido ascórbico) (PARAÍSO et al., 2014), a resposta do bioeletrodo não foi significativamente afetada por possíveis substâncias interferentes.

Tabela 15 – Valores de ΔR_{ct} do biossensor ox-ECV-[AuNPs-SiPy] empregado na detecção de amostra de soro contaminados com ZIKV.

Amostras de soro	^a [ZIKV2] (nmol L ⁻¹) diluído	ΔR_{ct} (%)	^b [ZIKV2] (nmol L ⁻¹) detectado
A	0,001	2,9	0,0011
B	1,0	128,0	1,02
C	1000,0	254,1	933,7

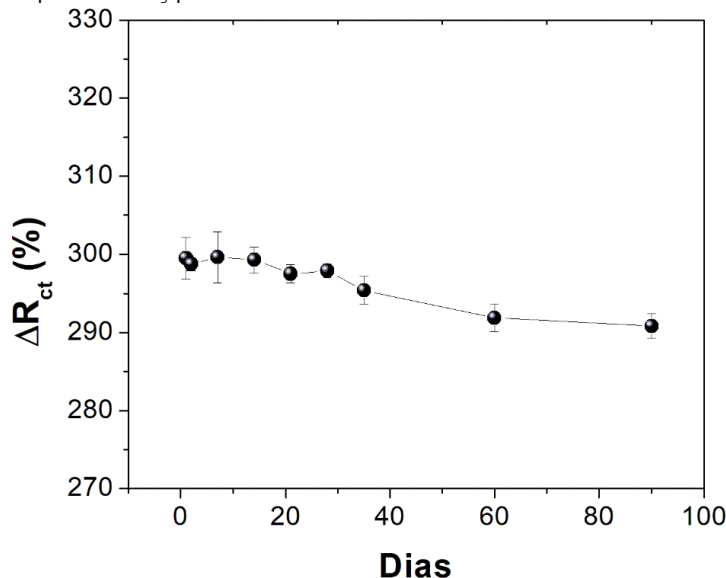
^a[ZIKV2] diluído = a concentração a qual ZIKV2 foi diluído a partir da amostra de soro e contendo ZIKV2.

^b[ZIKV2] detectado = concentração de ZIKV2 detectada por meio da técnica de EIE.

Fonte: A autora.

A estabilidade do biossensor proposto também foi um fator estudado. No qual, três biossensores ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1 foram preparados, armazenados a 8 °C e avaliados durante um intervalo de tempo (1 a 90 dias) frente a hibridação específica com ZIKV2. Após cada experimento realizado no (1°, 2°, 7°, 14°, 21°, 28°, 35°, 60° e 90°) dia, foi necessário a limpeza dos eletrodos, seguida da construção de uma nova plataforma. Este estudo mostrou que, durante o período de tempo estudado, cada biossensor manteve em média 98,02% da sua resposta de ΔR_{ct} inicial, como observado na Figura 39. Portanto, esse resultado sugere que não houve perda de sinal elétrico do biossensor com o passar do tempo. Com base nas características do biossensor de DNA apresentado, ele pode ser considerado comercializável, uma vez que é economicamente viável, apresenta uma precisão e estabilidade confiáveis (CASTRO et al., 2018).

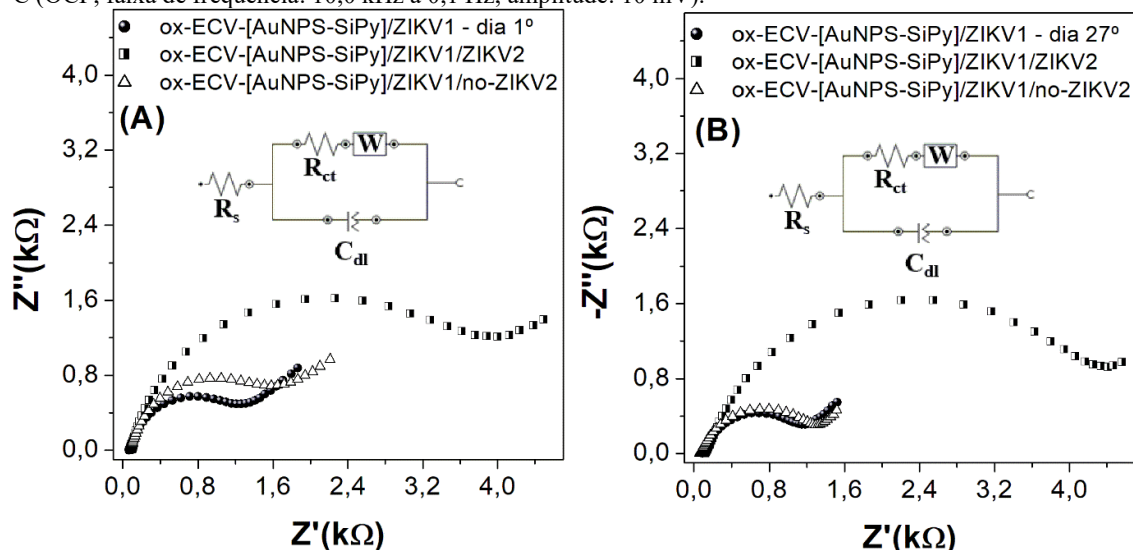
Figura 39 – Relação entre ΔR_{ct} e o número de dias para avaliar a estabilidade no armazenamento a longo prazo do biossensor ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1 desenvolvido.



Fonte: A autora.

A estabilidade do biossensor também foi avaliada frente ao controle negativo (no-ZIKV2) (Figura 40). Nota-se do Diagrama de Nyquist que após 27 dias de preparo do biossensor, a resposta frente ao no-ZIKV2 apresentou um valor de R_{ct} menor ($1004,9 \Omega$) do que esse mesmo ensaio realizado com um biossensor preparado no mesmo dia ($1410,1 \Omega$).

Figura 40 – Diagramas de Nyquist do ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1 após (A) 1 dia e (B) 27 dias de preparo (curva de bolinha), na presença de ZIKV2 (curva de quadrado) e no-ZIKV2 (curva de triângulo), obtidos em $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão PBS (pH 7,4) contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, temperatura de hibridação: 37°C (OCP; faixa de frequência: $10,0 \text{ kHz}$ a $0,1 \text{ Hz}$; amplitude: 10 mV).



Fonte: A autora.

Além disso, em relação ao ZIKV2, constatou-se no Diagrama de Nyquist (curva de triângulo) que após 27 dias de preparo do biossensor, obteve-se um valor de R_{ct} (4127,5 Ω) maior em comparação ao ensaio realizado com o biossensor recém preparado (3994,4 Ω). Portanto, propõe-se desses resultados obtidos que a melhora da variação de R_{ct} se deve provavelmente ao maior tempo de estabilização das fitas do DNA sonda na superfície do eletrodo.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, um biossensor impedimétrico de DNA promissor, simples e sensível baseado em um eletrodo de carbono vítreo oxidado modificado com AuNPs-SiPy foi desenvolvido para detecção de ZIKV em amostras de soro. As AuNPs-SiPy sintetizadas apresentaram ser estáveis e adequadas para serem empregadas sobre a superfície do eletrodo ox-ECV. Devido à alta área superficial e propriedades eletrocatalíticas das AuNPs, a quantidade de moléculas de DNA sonda imobilizadas foi aumentada, resultando em uma resposta significativamente melhorada do biossensor (ox-ECV-[AuNPs-SiPy]/ZIKV1) desenvolvido.

Esta plataforma mostrou-se bastante simples e apropriada para a imobilização do ssDNA sonda funcionalizado com grupo tiol do ZIKV1 para promover a incorporação do ssDNA sonda pelas AuNPs. Esta estratégia foi fundamental para obter uma superfície de resposta eficiente ao processo de hibridação para a detecção do ZIKV2, apresentando LOD = 0,41 pmol L⁻¹ ou 2,3 x 10⁸ cópias mL⁻¹ com faixa linear de 1,0 x10⁻¹² a 1,0 x10⁻⁶ mol L⁻¹ pela técnica EIE. A vantagem do uso desse biossensor de DNA está atrelada à simplicidade e especificidade da técnica, ao baixo custo comparado às amostras de AG/AB, não apresentar falsos positivos e a molécula de DNA ser estável em relação ao RNA, sendo assim mais fácil para aplicá-lo no sensor;

O dispositivo também provou ser preciso e suficientemente específico para o ZIKV2, permitindo quantificar o DNA alvo estudado em amostras de soro. Também exibiu uma estabilidade adequada durante de 90 dias, com 98,02% de reprodutibilidade. Assim, o biossensor proposto consiste em uma ferramenta promissora, que pode ser utilizada em amostras de soro para o diagnóstico precoce do ZIKV.

7 PERSPECTIVAS

- A fim de aumentar a eficiência da resposta, a estratégia de construção poderia ser aplicada em eletrodos interdigitados, obtendo-se dispositivos *point-of-care*. Além disso, o emprego de materiais carbonáceos nanoestruturados, podem auxiliar para o incremento da transferência eletrônica, e consequentemente, no processo de eletrocatalise das AuNPs;
- Poderiam ser realizados estudos para discriminar num único ensaio os interferentes (DENV, YKV, CHIKV);
- O biossensor pode ser utilizado para detectar o ssRNA em amostra real.

REFERÊNCIAS

- AFSAHI, S. et al. Novel graphene-based biosensor for early detection of Zika virus infection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 100, p. 85–88, 2018.
- AKAGI, Y. et al. Development of a ligation-based impedimetric DNA sensor for single-nucleotide polymorphism associated with metabolic syndrome. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 28, p. 6367–6372, 2006.
- ALEX, S.; TIWARI, A. Functionalized gold nanoparticles: synthesis, properties and applications - a review. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 3, p. 1869–1894, 2015.
- AMORIM, L. Zika Virus. In: **Blood safety - a guide to monitoring and responding to potential new threats**. 1. ed. Stanford: Springer US, 2019. p. 163–186.
- ANTHONY, S. et al. Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat. **The New England Journal of Medicine**, p. 1–3, 2016.
- ARAUJO, A. Q. C.; SILVA, M. T. T.; ARAUJO, A. P. Q. C. Zika virus-associated neurological disorders: a review. **Brain**, v. 139, n. 8, p. 2122–2130, 2016.
- ARAUJO, T. V. B. et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 12, p. 1356–1363, 2016.
- AUSTIN, L. A. et al. The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in bionanomedicine, therapy, and drug delivery. **Archives of Toxicology**, v. 88, n. 7, p. 1391–1417, 2014.
- BANDODKAR, A. J.; WANG, J. Non-invasive wearable electrochemical sensors: A review. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 363–371, 2014.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.
- BARSOUKOV, E.; ROSS, J. M. **Impedance Spectroscopy**. 2. ed. New York: Wiley-Interscience, 2005.
- BARZON, L. et al. Zika virus: from pathogenesis to disease control. **Microbiology Letters**, v. 363, n. 18, 2016.
- BAUD, D. et al. An update on Zika virus infection. **The Lancet**, v. 390, n. 10107, p. 2099–2109, 2017.
- BENVIDI, A. et al. Simple and label-free detection of DNA hybridization on a modified graphene nanosheets electrode. **Talanta**, v. 137, p. 80–86, 2015a.

BENVIDI, A. et al. Comparison of impedimetric detection of DNA hybridization on chemically and electrochemically functionalized multi-wall carbon nanotubes modified electrode. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, p. 673–682, 2015b.

BENVIDI, A. et al. Comparison of impedimetric detection of DNA hybridization on the various biosensors based on modified glassy carbon electrodes with PANHS and nanomaterials of RGO and MWCNTs. **Talanta**, v. 147, p. 621–627, 2016.

BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 13, 2014.

BHARDWAJ, V.; SHARMA, K. Parallel DNA polymerase chain reaction: Synthesis of two different PCR products from a DNA template. **F1000Research**, v. 320, p. 1–9, 2014.

BRASIL, P. et al. A young woman contemplating travel abroad: What she needs to know about Zika virus infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 56, n. 11, p. 1024–1025, 2016.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry: principles, methods, and applications**. 1. ed. New York: Oxford University Press, 1993.

BURKE, L. D.; NUGENT, P. F. The electrochemistry of gold : I. the redox behaviour of the metal in aqueous media. **Gold Bulletin**, v. 30, p. 43–53, 1997.

BURTON, A. W. et al. On the estimation of average crystallite size of zeolites from the Scherrer equation: A critical evaluation of its application to zeolites with one-dimensional pore systems. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 117, n. 1–2, p. 75–90, 2009.

CALAÇA, G. N. et al. Layer-by-Layer AuNPs-SiPy+/prussian blue nanoparticles modified electrodes: characterization and electrocatalytic effects. **Electrochimica Acta**, v. 249, p. 104–112, 2017.

CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 653–660, 2016.

CAMPO, M. DEL et al. The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 173, n. 4, p. 841–857, 2017.

CAO-LORMEAU, V. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016.

CARVALHO, L. A.; ANDRADE, A. R.; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 796–804, 2006.

CASTRO, A. C. H. et al. A new genosensor for meningococcal meningitis diagnosis using biological samples. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 22, n. 8, p. 2339–2346, 2018.

CHAO, J. et al. DNA nanotechnology-enabled biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 76, p. 68–79, 2016.

DEKANSKI, A. et al. Glassy carbon electrodes I. Characterization and electrochemical activation. **Carbon**, v. 39, n. 8, p. 1195–1205, 2001.

DIAGNÓSTICA, W. **Imuno-Rápido ZIKA IgG/IgM**. Disponível em: <<http://www.wamadiagnostica.com.br/bulas/imuno-rapido/zika-igg-igm-1.pdf>>. Acesso em: 5 fev. 2019.

DINÇKAYA, E. et al. Development of an impedimetric aflatoxin M1 biosensor based on a DNA probe and gold nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 9, p. 3806–3811, 2011.

DOLLISH, F. R.; FATELEY, W. G.; BENTELEY, F. F. **Characteristic raman frequencies of organic compounds**. New York: Wiley-Interscience, 1991.

DOWALL, S. D. et al. Lineage-dependent differences in the disease progression of Zika virus infection in type-I interferon receptor knockout (A129) mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–22, 2017.

DUFFY, M. R. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The new england journal of medicine original**, p. 2536–2543, 2009.

FARIA, H. A. M.; ZUCOLOTTI, V. Label-free electrochemical DNA biosensor for zika virus identification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 131, p. 149–155, 2019.

FERREIRA, A. A. P. et al. Electrochemical and spectroscopic characterization of screen-printed gold-based electrodes modified with self-assembled monolayers and Tc85 protein. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 634, n. 2, p. 111–122, 2009.

FRANK, C. et al. Sexual transmission of Zika virus in Germany, April 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 23, 2016.

GARCIA, M. F. K. DOS S. et al. Impedimetric sensor for Leishmania infantum genome based on gold nanoparticles dispersed in polyaniline matrix. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, n. 11, p. 2810–2816, 2016.

GHOSH, S. K.; PAL, T. Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 11, p. 4797–4862, 2007.

GONÇALVES, R.; PEREIRA, E. C.; MARCHESI, L. F. The overoxidation of poly(3-hexylthiophene) (P3HT) thin film: CV and EIS measurements. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 12, n. 3, p. 1983–1991, 2017.

GONG, Q. et al. A sensitive impedimetric DNA biosensor for the determination of the HIV gene based on electrochemically reduced graphene oxide. **Analytical Methods**, v. 7, n. 6, p.

2554–2562, 2015.

GONG, Q.; WANG, Y.; YANG, H. A sensitive impedimetric DNA biosensor for the determination of the HIV gene based on graphene-Nafion composite film. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 565–569, 2017.

GOURINAT, A. C. et al. Detection of Zika Virus in Urine. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 84–86, 2015.

GRIESHABER, D. et al. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, v. 8, p. 1400–1458, 2008.

GRISCHOTT, F. et al. Non-vector-borne transmission of Zika virus: A systematic review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 14, n. 4, p. 313–330, 2016.

GUBLER, D. J.; VASILAKIS, N.; MUSSO, D. History and emergence of Zika virus. **The journal of infectious diseases**, v. 216, p. 1–12, 2017.

GULLAND, A. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. **BMJ**, v. 352, n. February, p. 657, 2016.

HANG, T. C.; GUISEPPI-ELIE, A. Frequency dependent and surface characterization of DNA immobilization and hybridization. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 11, p. 1537–1548, 2004.

HERRADA, C. et al. Advances in Diagnostic Methods for Zika Virus Infection. **Journal of Medical Devices**, v. 12, n. 4, p. 1–11, 2018.

HOLZINGER, M.; GOFF, A. LE; COSNIER, S. Nanomaterials for biosensing applications: a review. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, p. 1–10, 2014.

HOLZWARTH, U.; GIBSON, N. The Scherrer equation versus the “Debye-Scherrer equation”. **Nature Nanotechnology**, v. 6, n. 9, p. 534–534, 2011.

HUANG, Y. et al. Disease-related detection with electrochemical biosensors : a review. v. 17, n. 10, p. 1–30, 2017.

JAROCKA, U. et al. Electrochemical immunosensor for detection of antibodies against influenza A virus H5N1 in hen serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 55, p. 301–306, 2014.

JUSTINO, C. I. L. et al. Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 68, p. 2–17, 2015.

KAUSHIK, A. et al. Electrochemical Biosensors for Early Stage Zika Diagnostics. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 4, p. 308–317, 2017.

KAUSHIK, A. et al. A sensitive electrochemical immunosensor for label-free detection of Zika-virus protein. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 3–7, 2018.

KENNEDY, R. B. et al. Zika Vaccines: Current State. **Vaccinations**. St. Louis: Elsevier, 2019. p. 75–88.

KHAN, M.; VISHAKANTE, G. D.; SIDDARAMAIAH, H. Gold nanoparticles: A paradigm shift in biomedical applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 199–200, p. 44–58, 2013.

KROW-LUCAL, E. R.; BIGGERSTAFF, B. J.; STAPLES, J. E. Estimated Incubation Period for Zika Virus Disease. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 841–844, 2017.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and Serological Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.

LATHROP, E. et al. The Zika Contraception Access Network: a feasibility programme to increase access to contraception in Puerto Rico during the 2016–17 Zika virus outbreak. **The Lancet Public Health**, v. 3, n. 2, p. e91–e99, 2018.

LEE, T. et al. Recent Advances in AIV Biosensors Composed of Nanobio Hybrid Material. **Micromachines**, v. 9, n. 12, p. 1–17, 2018.

LIU, G. et al. An enzyme-based E-DNA sensor for sequence-specific detection of femtomolar DNA targets. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 21, p. 6820–6825, 2008.

LIU, S. et al. Development of electrochemical DNA biosensor based on gold nanoparticle modified electrode by electroless deposition. **Bioelectrochemistry**, v. 79, n. 1, p. 37–42, 2010.

LVOVICH, V. F. **Impedance Spectroscopy: Applications to Electrochemical and Dielectric Phenomena**. 2. ed. New York: Wiley, 2012.

M.S. **Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças**. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0204_17_02_2016.html>. Acesso em: 4 jan. 2019.

MADEIROS, C.; ANDRADE, S. C. Novas vacinas: tecnologia e burocracia no caminho da inovação. **ComCiência**, v. 162, 2014.

MARTINEZ, J. D.; GARZA, J. A. C.; CUELLAR-BARBOZA, A. Going viral 2019: Zika, Chikungunya, and Dengue. **Dermatologic Clinics**, v. 37, n. 1, p. 95–105, 2019.

MASHHADIZADEH, M. H.; TALEMI, R. P. Synergistic effect of magnetite and gold nanoparticles onto the response of a label-free impedimetric hepatitis B virus DNA biosensor. **Materials Science and Engineering C**, v. 59, p. 773–781, 2016.

MENEZES, E. W. et al. Gold nanoparticle / charged silsesquioxane films immobilized onto Al / SiO₂ surface applied on the electrooxidation of nitrite. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 16, p. 3703–3713, 2012.

MIODEK, A. et al. E-DNA Sensor of Mycobacterium tuberculosis Based on Electrochemical Assembly of Nanomaterials (MWCNTs/PPy/PAMAM). **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 18, p. 9257–9264, 2015.

MOHAMMADIAN, N.; FARIDBOD, F. ALS genosensing using DNA-hybridization electrochemical biosensor based on label-free immobilization of ssDNA on Sm₂O₃NPs-rGO/PANI composite. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 275, p. 432–438, 2018.

MOSSANHA, R. et al. Construction of a biosensor based on SAM of thiolactic acid on gold nanoparticles stabilized by silsesquioxane polyelectrolyte for catechol determination. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 252, p. 747–756, 2017.

MOUREAU, G. et al. A Real-Time RT-PCR Method for the Universal Detection and Identification of Flaviviruses. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 4, p. 467–478, 2007.

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

MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015.

MUSSO, D.; GUBLER, D. Zika virus. **American Society for Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 10–20, 2016.

NACIMENTO, R. F. . . et al. **Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais**. Fortaleza: Imprensa, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Nova York: Artmed, 2014.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Unicamp, 1995.

NIC, M.; JIRAT, J.; KOSATA, B. **Compendium of chemical terminology - IUPAC gold book**. Disponível em: <<https://goldbook.iupac.org/html/B/B00663.html>>. Acesso em: 27 fev. 2018.

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.

OLIVEIRA, N. et al. A sensitive and selective label-free electrochemical DNA biosensor for the detection of specific dengue virus serotype 3 sequences. **Sensors**, v. 15, n. 7, p. 15562–15577, 2015.

PARAÍSO, L. F. et al. Bioelectrochemical Detection of Alanine Aminotransferase for Molecular Diagnostic of the Liver Disease. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, p. 1286–1297, 2014.

PAWLEY, D. . et al. **Zika virus: current methods of detection and corresponding limitations**. Disponível em: <<https://www.clinlabint.com/detail/clinical-laboratory/zika-virus-current-methods-of-detection-and-corresponding-limitations/#prettyPhoto>>. Acesso em: 8 jan. 2019.

PETERSEN, L. R. et al. Zika virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552–1563, 2016.

PLOURDE, A. R.; BLOCH, E. M. A Literature Review of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 7, p. 1185–1192, 2016.

PUTZBACH, W.; RONKAINEN, N. J. Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. **Sensors**, v. 13, p. 4811–4840, 2013.

RAFIQUE, B. et al. Electrochemical DNA biosensors: a review. **Sensor Review**, p. 1–21, 2018.

RASHEED, P. A.; SANDHYARANI, N. Electrochemical DNA sensors based on the use of gold nanoparticles: a review on recent developments. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 4, p. 981–1000, 2017.

RIBICKI, A. C. et al. Sol gel synthesis of 3- n -propyl (4-aminomethyl) pyridinium silsesquioxane chloride and the enhanced electrocatalytic activity of LbL films. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, p. 1–14, 2018.

RICHARDSON, J. J.; BJÖRNMALM, M.; CARUSO, F. Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms. **Science**, v. 348, n. 6233, 2015.

RUBIN, E. J.; GREENE, M. F.; BADEN, L. R. Zika virus and microcephaly. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 12, p. 1331–1332, 2016.

S. V. S.; M. S. **Boletim Epidemiológico 29 - Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 20 de 2018**. 2018.

SAHA, K. et al. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. **Chemical reviews**, v. 112, p. 2739–2779, 2012.

SANTOS, C. S. et al. The influence of organization of LbL films containing a silsesquioxane polymer on the electrochemical response of dopamine. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 44, n. 9, p. 1047–1058, 2014.

SANTOS, M. . et al. Development of an electrochemical sensor based on LbL films of Pt nanoparticles and humic acid. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 163, n. 9, p. 499–506, 2016.

SANTOS, V. . et al. Platinum nanoparticles incorporated in silsesquioxane for use in LbL films for the simultaneous detection of dopamine and ascorbic acid. **Journal of Nanoparticle**

Research, v. 14, n. 9, 2012.

SASSOLAS, A.; LECA-BOUVIER, B. D.; BLUM, L. J. DNA Biosensors and Microarrays. **Chemical reviews**, v. 108, p. 109–139, 2008.

SCREATON, G.; MONGKOLSAPAYA, J. Evolution of neurovirulent Zika virus. **Science**, v. 358, n. 6365, p. 12–14, 2017.

ŠEGOTA, S.; HEIMER, S.; TEŽAK, D. New catanionic mixtures of dodecyldimethylammonium bromide/sodium dodecylbenzenesulphonate/water: I. Surface properties of dispersed particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 274, n. 1–3, p. 91–99, 2006.

SEN, I. K.; MAITY, K.; ISLAM, S. S. Green synthesis of gold nanoparticles using a glucan of an edible mushroom and study of catalytic activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 518–528, 2013.

SHI, A. et al. A sensitive electrochemical DNA biosensor based on gold nanomaterial and graphene amplified signal. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 200, p. 206–212, 2014.

SILVA, P. S. et al. Gold nanoparticles hosted in a water-soluble silsesquioxane polymer applied as a catalytic material onto an electrochemical sensor for detection of nitrophenol isomers. **Journal of Hazardous Materials**, v. 273, p. 70–77, 2014.

SIN, M. L.; MACH, K. E.; WONG, P. K. Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 14, n. 2, p. 225–244, 2014.

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.

SINGHAL, C.; PUNDIR, C. S.; NARANG, J. A genosensor for detection of consensus DNA sequence of Dengue virus using ZnO/Pt-Pd nanocomposites. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 97, n. May, p. 75–82, 2017.

TANCHAROEN, C. et al. An electrochemical biosensor based on surface imprinting for Zika virus detection in serum. **ACS Sensors**, v. 4, p. 69–75, 2018a.

TANCHAROEN, C. et al. An Electrochemical Biosensor Based on Surface Imprinting for Zika Virus Detection in Serum. **ACS Sensors**, p. 1–7, 2018b.

TIAN, B. et al. Ferromagnetic resonance biosensor for homogeneous and volumetric detection of DNA. **ACS Sensors**, v. 3, p. 1093–1101, 2018.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; MAHY, B. W. J. Emerging Issues in Virus Taxonomy. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 8–13, 2004.

VIGNESHVAR, S. et al. Recent Advances in Biosensor Technology for Potential Applications

– An Overview. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 4, p. 1–9, 2016.

WANG, L. et al. A sensitive DNA capacitive biosensor using interdigitated electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 646–653, 2017.

WANG, Y. et al. Surface oxidation of gold nanoparticles supported on a glassy carbon electrode in sulphuric acid medium: contrasts with the behaviour of ‘macro’ gold. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 2, p. 3133–3136, 2013.

WATANABE, A. M.; SANTOS, A.; BUENO, P. R. Harmonical oscillator and electro-mechanical analogy: An interdisciplinary experiment to high precision mass variation measurements. **Eclética Química**, v. 34, n. 3, p. 57–75, 2009.

XIE, B.-P. et al. Simultaneous detection of Dengue and Zika virus RNA sequences with a three-dimensional Cu-based zwitterionic metal–organic framework, comparison of single and synchronous fluorescence analysis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 254, p. 1133–1140, 2018.

YANG, C. et al. Recent trends in carbon nanomaterial-based electrochemical sensors for biomolecules: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 887, p. 17–37, 2015.

YE, Y. et al. A label-free electrochemical DNA biosensor based on thionine functionalized reduced graphene oxide. **Carbon**, v. 129, p. 730–737, 2018.

YGUERABIDE, J.; YGUERABIDE, E. E. Light-scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications. **Analytical Biochemistry**, v. 262, p. 137–156, 1988.

ZHANG, N. et al. Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 1, p. 120–126, 2016.