



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências

VICTOR LUCAS CAVALCANTI FERNANDES DA SILVA

**Genossensor eletroquímico para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de sonda do gene Rv2341 imobilizada.**

RECIFE  
2024

VICTOR LUCAS CAVALCANTI FERNANDES DA SILVA

**Genossensor eletroquímico para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de sonda do gene Rv2341 imobilizada.**

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

Orientador: José Luiz de Lima-Filho  
Co-Orientador: Valeria Visani

RECIFE  
2024

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

Silva, Victor Lucas Cavalcanti Fernandes da.

Genossensor eletroquímico para detecção de Mycobacterium tuberculosis a partir de sonda do gene Rv2341 imobilizada. / Victor Lucas Cavalcanti Fernandes da Silva. - Recife, 2024.

42 : il.

Orientador(a): José Luiz de Lima-Filho

Coorientador(a): Valéria Visani

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

1. Genossensor. 2. Tuberculose. 3. L-Lisina. 4. Azul de Metileno. 5. Eletroquímico. I. Lima-Filho, José Luiz de . (Orientação). II. Visani, Valéria. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

VICTOR LUCAS CAVALCANTI FERNANDES DA SILVA

**Genossensor eletroquímico para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de sonda do gene Rv2341 imobilizada.**

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

Aprovada em: 14/03/2024

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho  
Instituto Keizo Asami (iLIKA) - Departamento de Biotecnologia - UFPE

---

Prof. Dr. Anna Jéssica Duarte Silva  
Universidade Federal de Pernambuco / Departamento de Biotecnologia

---

Dr. Carolina Ribeiro Cordula  
Instituto Keizo Asami (iLIKA) - UFPE

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador José Luiz que inspira com seus ensinamentos e pela forma de transmitir sua sabedoria. Agradeço a minha co-orientadora, Valéria Visani, que me acompanhou em todos os momentos deste trabalho, me orientando com maestria durante a Iniciação Científica e que com cuidado me proporcionou uma ótima experiência na biotecnologia.

Agradeço ao Instituto Keizo Asami pelo suporte necessário para realização da pesquisa. Ao grupo de biossensores do laboratório de biotecnologia do iLIKA, pela oportunidade de desenvolver ciência ao lado de pesquisadores tão capacitados e conhecer pessoas tão dedicadas ao desenvolvimento tecnológico, especialmente Ian Resque. Ao CNPq e ao BRICS pelo financiamento deste projeto tão pertinente para a sociedade atual.

Aos colegas de Laboratório, que me trouxeram tanto conhecimento e tornaram o laboratório um ambiente agradável. Sempre auxiliando nos experimentos, oferecendo apoio e conselhos. Além de ajuda com a rotina diária de um laboratório. E a banca avaliadora que se disponibilizou para avaliar este trabalho.

Aos meus amigos, Anna Beatriz, Artur José, Maria Eliza e Ana Beatriz Salomoni por estarem presentes em vários momentos da minha vida acadêmica, profissional e pessoal, lutando diariamente ao meu lado. E as amigas que conquistei antes da graduação e que ainda permanecem comigo.

Aos meus mestres, desde o ensino médio até a graduação, por transbordarem seus conhecimentos em mim.

Por fim, agradeço a minha família, pilar central da minha vida. Minha mãe, Adriana Cavalcanti, meu catalizador diário e pessoa crucial para minha formação. Ao meu Pai pelo eterno apoio e carinho. Ao meu irmão pela irmandade genuína. Agradeço a minha tia, meu porto seguro. E a Deus.

*“Nenhum homem pode banhar-se duas vezes no mesmo rio... pois na segunda vez o rio já não é o mesmo, nem tão pouco o homem!”*

(Heráclito de Éfeso)

Fernandes-da-Silva, Victor Lucas Cavalcanti. **Genossensor eletroquímico para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de sonda do gene Rv2341 imobilizada**. 2024. 41. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

## RESUMO

O diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) é essencial devido à alta incidência anual de Tuberculose (TB), sendo relatado em 2022 mais de 1.3 milhões mortes. Países em desenvolvimento são os mais afetados pela bactéria, devido o difícil acesso a saúde por grande parte da população. Os métodos padrão ouro como PCR e cultura de MTB demandam tempo, custos altos e necessitam de profissionais bem treinados. Como alternativa, o desenvolvimento de métodos rápidos, de fácil manuseio e menos custosos, como biossensores, é de crucial importância no combate à tuberculose. Nessa perspectiva, uma região do gene Rv2341 foi escolhido via GenBank-NCBI, para ser usado como sonda de DNA na construção de um genossensor. Para montagem do biossensor, um sistema de eletrodo impresso foi utilizado, os eletrodos de trabalho e auxiliar foram feitos de pasta de carbono e o eletrodo de referência de pasta de prata. Sobre o eletrodo de trabalho foi produzido um filme polimérico de L-lisina, foi utilizado o glutaraldeído, conectando a extremidade da Poli-L-lisina à sonda de DNA modificada com um (-NH<sub>2</sub>) terminal. A voltametria cíclica (VC) e a espectroscopia de impedância eletroquímica foram utilizados para a caracterização eletroquímica do biossensor via espécies redox Ferri/Ferro. Como método de detecção foi utilizada a Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) com o Azul de Metileno (MB), como indicador de hibridização. As análises por VPD-MB demonstraram que eletrodos não modificados têm baixa afinidade pelo MB, resultando em uma baixa corrente (0,8µA). Após a modificação da superfície o eletrodo se torna mais eletroativo e a corrente aumenta para (3,0µA). Com a adição do glutaraldeído ocorre o isolamento da superfície do eletrodo de trabalho, reduzindo a corrente para (1,4µA). Com a imobilização da sonda, há um aumento na corrente, devido à afinidade do MB com as guaninas livres (11,0µA). Após a hibridização com a sequência complementar, há uma redução na quantidade de guaninas livres e conseqüentemente queda na corrente (4,88µA) já que a concentração de guaninas livres reduz. O biossensor foi capaz de diferenciar os alvos complementares de não complementares, já que não houve alteração na corrente após a hibridização com o alvo não complementar. Esse biossensor é o primeiro passo para levar diagnóstico rápido e eficaz de tuberculose para áreas de risco, devido a sua portabilidade e a especificidade do DNA.

**Palavras-chave:** Genossensor. Tuberculose. L-Lisina. Azul de Metileno. Eletroquímico.

Fernandes-da-Silva, Victor Lucas Cavalcanti. **Electrochemical Genosensor for *Mycobacterium tuberculosis* Detection Using Immobilized Rv2341 Gene Probe** 2023. 41. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

## ABSTRACT

Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) is essential due to the high annual incidence of tuberculosis (TB), with more than 10 million new cases reported in 2021. Developing countries are most affected by the bacterium due to difficult access to healthcare for a significant portion of the population. Gold standard methods such as PCR and MTB culture require time, high costs, and trained professionals. As an alternative, developing of rapid, user-friendly, and cost-effective methods, such as biosensors, is crucial in combating TB. From perspective, a region of the Rv2341 gene was selected via GenBank-NCBI to be a DNA probe in development of a genosensor. A printed electrode system was used for biosensor development, with working and auxiliary electrodes made of carbon paste and a silver paste for the reference electrode. A polymeric film of L-lysine was produced on the working electrode, and glutaraldehyde was used to connect the Poli-L-lysine end to the DNA probe modified with a (-NH<sub>2</sub>) terminal. Cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy were crucial for the electrochemical characterization of the biosensor via Ferri/Ferro redox species. Differential Pulse Voltammetry (DPV) with Methylene Blue (MB) as a hybridization indicator was used as the detection method. DPV-MB analyses demonstrated that unmodified electrodes have a low affinity for MB, resulting in low current (0.8 $\mu$ A). After surface modification, the electrode becomes more electroactive, and the current increases (3.0 $\mu$ A), and then with glutaraldehyde addition, surface insulation reduces the current (1.4 $\mu$ A). Upon probe immobilization, there is an increase in current due to MB's affinity with free guanines (11.0 $\mu$ A). After hybridization with the complementary sequence, there is a reduction in the number of free guanines and, consequently, a decrease in current (4.88 $\mu$ A) since the concentration of free guanines decreases. The biosensor was able to differentiate complementary from non-complementary targets, as there was no change in current after hybridization with the non-complementary target. Due to its portability and DNA specificity this biosensor is the first step towards bringing rapid and effective tuberculosis diagnosis to at-risk areas.

**Key words:** Genosensor. Tuberculosis. L-Lysine. Methylene Blue. Electrochemical.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Organizações estruturais e componentes da parede celular da MTB. ....	14
<b>Figura 2.</b> Taxa estimada de morte global causadas por TB e HIV. ....	15
<b>Figura 3.</b> Incidência global de novos casos de tuberculose em 2022. ....	16
<b>Figura 4.</b> Esquema de desenvolvimento de um biossensor. ....	18
<b>Figura 5.</b> Imobilização de biorreceptor em superfície ativada Glutaraldeído. ....	20
<b>Figura 6.</b> Diferentes tipos de Genossensores. ....	221
<b>Figura 7.</b> Gráfico representativo de leitura de Voltametria Cíclica. ....	22
<b>Figura 8.</b> Leitura via método eletroquímico Espectroscopia de Impedância. ....	23
<b>Figura 9.</b> Esquema de Voltametria de Pulso Diferencial. ....	24
<b>Figura 10.</b> Estudo da Eletropolimerização da L-Lisina. ....	29
<b>Figura 11.</b> Valores de corrente e diferença de potencial. ....	30
<b>Figura 12.</b> Impedância das diferentes eletropolimerizações. ....	31
<b>Figura 13.</b> Avaliação de tempo de imobilização. ....	32
<b>Figura 14.</b> Estudo da concentração de sonda imobilizada. ....	32
<b>Figura 15.</b> Leitura de EIE, varias etapas da construção do biossensor. ....	33
<b>Figura 16.</b> Teste de sensibilidade e especificidade do biossensor. ....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Alvo Complementar
ANC	Alvo não Complementar
Cdl	Capacitância
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
Epa	Potencial de Pico Anódico
Epc	Potencial de Pico Catódico.
Ipa	Corrente de Pico Anódico
Ipc	Corrente de Pico Catódico
MB	Azul de Metileno
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAATS	Nucleic Acid Amplification Test
POCT	Point-of-care Testing
Rct	Resistência à Transferência de Cargas
Rsol	Resistência da solução
sdTB	Sonda de Tuberculose
ssDNA	<i>single strand DNA</i>
SELEX	Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial
SPE	<i>Screen Printed Electrode</i>
TB	Tuberculose
VC	Voltametria Cíclica
VPD	Voltametria Pulso Diferencial

## SUMÁRIO

**AGRADECIMENTOS**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**LISTA DE ABREVIÇÕES**

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>13</b>
2.1	<i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> .....	13
2.1.1	Epidemiologia .....	15
2.1.2	Diagnóstico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	17
2.2	<i>BIOSENSORES</i> .....	18
2.2.1	Imobilização do Biorreceptor .....	19
2.2.2	Genossensores .....	20
2.3	ANÁLISES ELETROQUÍMICAS .....	21
2.3.1	Voltametria Cíclica .....	21
2.3.2	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica .....	22
2.3.3	Voltametria de Pulso Diferencial .....	23
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>26</b>
4.1	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS .....	26
4.2	PRODUÇÃO DE FILME POLIMÉRIACO DE L-LISINA .....	26
4.3	IMOBILIZAÇÃO DA SONDA DE DNA .....	27
4.3.1	Ativação da superfície com glutaraldeído .....	27
4.3.2	Estudo da Imobilização da Sonda de DNA.....	27
4.4	Verificação Da Especificidade e Sensibilidade do Biossensor ....	27
4.5	ANÁLISES ELETROQUÍMICAS .....	28
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>35</b>

**REFERÊNCIAS**

## 1. Introdução

Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa responsável por milhares de mortes no mundo, causada pelo bacilo gram-positivo, *Mycobacterium tuberculosis* (MT). Essa patologia pode ser transmitida através de gotículas do ar. Afeta principalmente as vias respiratórias como o pulmão, mas pode atingir outros órgãos (WHO, 2023). A tuberculose é a principal causa de mortes em pessoas portadoras do HIV/AIDS. No ano de 2019, cerca de 10 milhões de pessoas adoeceram por TB, dentre essas, aproximadamente 1,5 milhões morreram (Acharya et al., 2020). O diagnóstico tardio acarreta o aumento da morbidade, mortalidade e transmissão contínua da doença.

O diagnóstico de TB pode ser realizado por meios de cultura, ensaios imunológicos ou por métodos moleculares, como PCR (Nataranjan et al., 2020). Essas técnicas diagnósticas apresentam várias limitações: o método de cultura para identificação do MT, apesar de ser considerado o padrão ouro pela World Health Organization (WHO), necessita de um longo período de tempo para o crescimento da bactéria e possui pequena sensibilidade (Nurwidya et al., 2018).

Ensaio imunológicos como o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) também apresentam baixa sensibilidade, uma vez que dependem da resposta imunológica de cada indivíduo e por esse motivo não são recomendados como métodos diagnósticos para indivíduos HIV-positivos, devido à imunossupressão (Mwaba et al., 2020); O ensaio por PCR apresenta uma ótima especificidade e sensibilidade, rápida detecção, é capaz de identificar mutações. Entretanto, são necessários profissionais qualificados para o manejo, além de ser um método de alto custo o que dificulta o seu acesso, principalmente em lugares com poucas condições financeiras (Nurwidya et al., 2018). Avaliando as limitações dos métodos diagnósticos padronizados para tuberculose, testes de fácil acesso, fácil manuseio e baixo custo, como *point-of-care tests* (POCT) são alternativas promissoras para levar o diagnóstico da TB a regiões de difícil acesso e assim controlar sua disseminação (Gupta et al, 2021).

Biossensores são dispositivos analíticos que utilizam um elemento de reconhecimento biológico (biorreceptor) acoplado a um transdutor (eletrodo de trabalho), que traduz a resposta biológica gerada entre a interação do biorreceptor com o alvo, em um sinal mensurável (Khan et al., 2020). Entre os diversos tipos de transdutores, os eletroquímicos são os que apresentam mais vantagens, pois possuem um baixo custo, são de fácil manuseio, podem ser portáteis, e são de simples construção (Ronkainen et al., 2010). Dentre os vários tipos de biorreceptores, os que utilizam ácido nucleico apresentam maior especificidade e sensibilidade e são classificados como genossensores (Labuda et al., 2010).

A principal etapa do desenvolvimento de um biossensor é a imobilização do elemento de bio-reconhecimento sobre o transdutor, uma vez que, se o biorreceptor não for imobilizado de forma eficiente ao transdutor, pode perder alguma propriedade inerente ao reconhecimento do alvo, diminuindo a sensibilidade do biossensor, resultando em uma performance ineficiente (Rashid et al. 2017).

Alguns estudos mostram que o biorreceptor pode ser imobilizado diretamente no transdutor, sem perder sua especificidade e sensibilidade (Campos-Ferreira et al., 2016; Oliveira et al., 2015). No entanto, muitos estudos estão focados na busca e caracterização de agentes químicos, como aminoácidos que possam ser capazes de produzir filmes finos na superfície do transdutor, com o objetivo de melhorar seu desempenho analítico (Souza et al. 2011; Bezerra et al, 2019).

Um dos fatores cruciais no processo de imobilização é o mecanismo de ligação entre o biorreceptor e a superfície transdutor (Naresh et al., 2021). Existem vários métodos de imobilização descritos na literatura, no entanto, o método de imobilização covalente demonstra uma maior estabilidade e flexibilidade (Frey et al., 2020). Esse método permite que o biorreceptor seja imobilizado com uma orientação vertical, o que permite um melhor acesso ao alvo e conseqüentemente maior sensibilidade e desempenho analítico do biossensor (Oberhaus et al., 2020).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

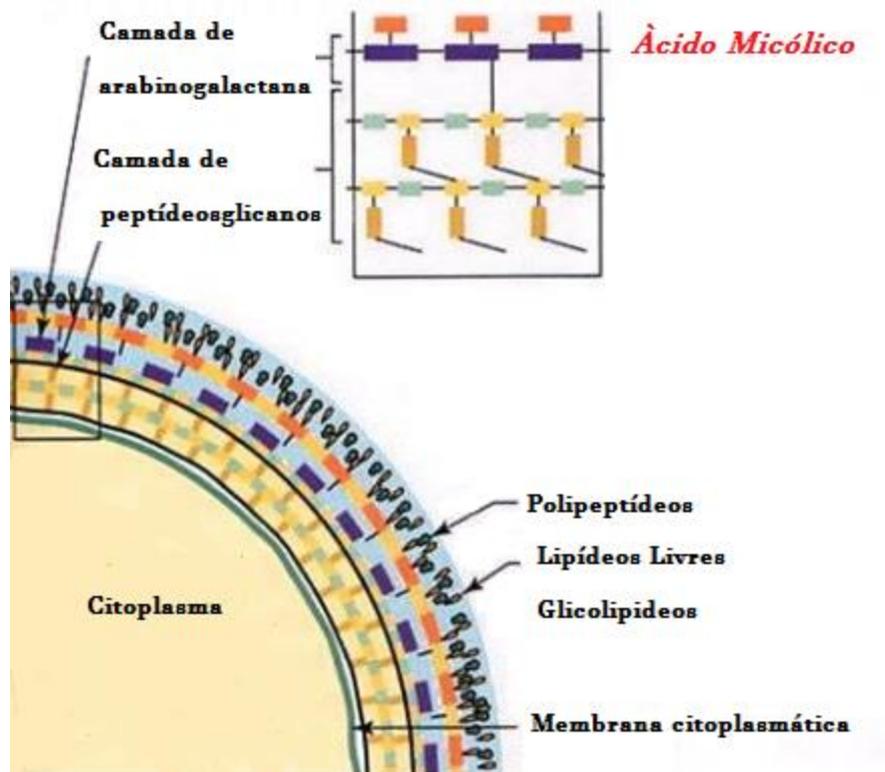
Tuberculose (TB) é uma antiga doença da humanidade, causada por um microrganismo patogênico, *Mycobacterium tuberculosis*, que evoluiu e se adaptou a humanidade (Hershkovitz et al., 2015). TB é uma doença mortal, seus reflexos na humanidade causam desequilíbrios ambientais, na saúde e socioeconômicos, principalmente em países emergentes.

A causa da TB só foi descoberta em 1882, pelo microbiologista Dr. Robert Kock. A principal forma de disseminação do bacilo agente causador da tuberculose é através do ar, quando pessoas doentes lançam partículas contendo o agente por meio da tosse. Afeta primariamente os pulmões, porém pode se espalhar pelo organismo, levando a uma tuberculose extrapulmona (Sakula et al., 1982).

A TB é causada por membros do grupo *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTCB); *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), o agente etiológico em humanos; *M. africanum*, que causa TB em humanos de algumas regiões do continente africano; *M. bovis*, *M. caprae* e *M. pinnipedii*, causando TB em animais domésticos. (Delogu et al., 2013)

MTB é uma micobactéria de crescimento lento. Enquanto a maioria das bactérias levam 24h, MTB leva semanas em condições favoráveis. Uma das principais características da *M. tuberculosis* é a sua parede celular, que lhe proporciona uma barreira para agentes nocivos do ambiente bem como para antibióticos, desempenhando um papel fundamental em sua virulência, (Hoffmann et al., 2008). A **Figura 1** representa um modelo esquemático da parede celular da *M. tuberculosis*. Micobactérias possuem uma membrana externa, funcionalmente semelhante às encontradas em bactérias GRAM-negativas, consistindo em uma bicamada lipídica de ácidos graxos na parte interna (ácido micólico) e glicolípídeos e

componentes cerosos na camada externa. Entre a membrana externa e interna forma-se o espaço periplasmático, com uma camada de peptidoglicanos ligados a arabinogalactana na porção mais interna, se ligando aos ácidos micólicos (Zuber et al., 2008).



**Figura 1.** Organizações estruturais e componentes da parede celular da MTB, adaptado de Martynov et al., 2016.

O gene Rv2341, é um gene conservado encontrado na cepa H37Rv, uma das cepas mais extensivamente estudadas de MTB, mas também está presente em diversas outras cepas de MTB. A classe Rv desempenha diversas funções na fisiologia da MTB. A conservação de um gene como o Rv2341 sugere que provavelmente desempenha um papel na biologia básica da bactéria ou na patogênese da mesma (Cole et al., 1998; Beg, 2018). Estudos mostram que a categoria do gene Rv2341 está relacionada com a integralidade da parede celular da bactéria, na produção de lipoproteínas (Mycobrowser, 2024). O estudo de genes conservados serve como forma de descobrir novos alvos moleculares com potencial de serem utilizados no diagnóstico e intervenções terapêuticas, incluindo o desenvolvimento de drogas ou o design de vacinas (Beg, 2018).

A patogênese da *Mycobacterium tuberculosis*, é complexa e envolve uma série de interações entre o microrganismo e o sistema imunológico do hospedeiro. Após a inalação das bactérias, estas alcançam os pulmões, onde são fagocitadas por macrófagos alveolares. No entanto, a capacidade intrínseca da *M. tuberculosis*

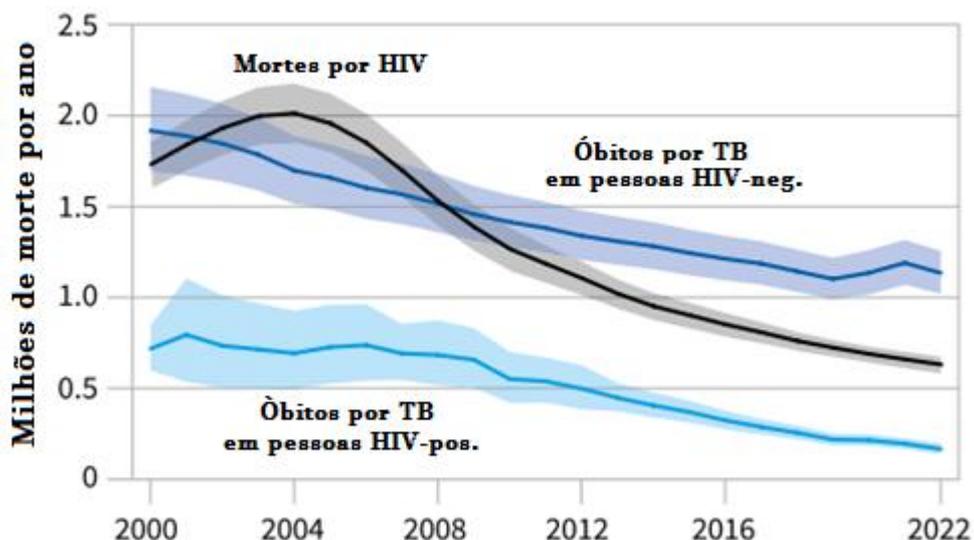
de sobreviver e multiplicar-se dentro dessas células fagocíticas permite a sua disseminação dentro do organismo. O processo de formação do granuloma, uma estrutura inflamatória complexa, é crucial na patogênese da tuberculose, pois permite a contenção do patógeno e a modulação da resposta imunológica (Delogu, 2013).

Em alguns casos, a infecção latente pode persistir por longos períodos sem causar sintomas, mas se houver uma queda na imunidade do hospedeiro, como ocorre em situações de estresse ou comorbidades, a infecção pode reativar-se, levando ao desenvolvimento da forma ativa da doença (Bell; Noursadeghil, 2018).

A tuberculose é uma doença altamente contagiosa que pode se espalhar facilmente através do ar. Um diagnóstico precoce é essencial para reduzir o impacto da tuberculose na saúde individual e coletiva, facilitando a implementação de medidas de controle e prevenção eficazes. Quanto mais cedo o diagnóstico for feito, mais rapidamente o tratamento pode ser iniciado, o que melhora as chances de recuperação do paciente, interrompendo a cadeia de transmissão da doença (WHO, 2023).

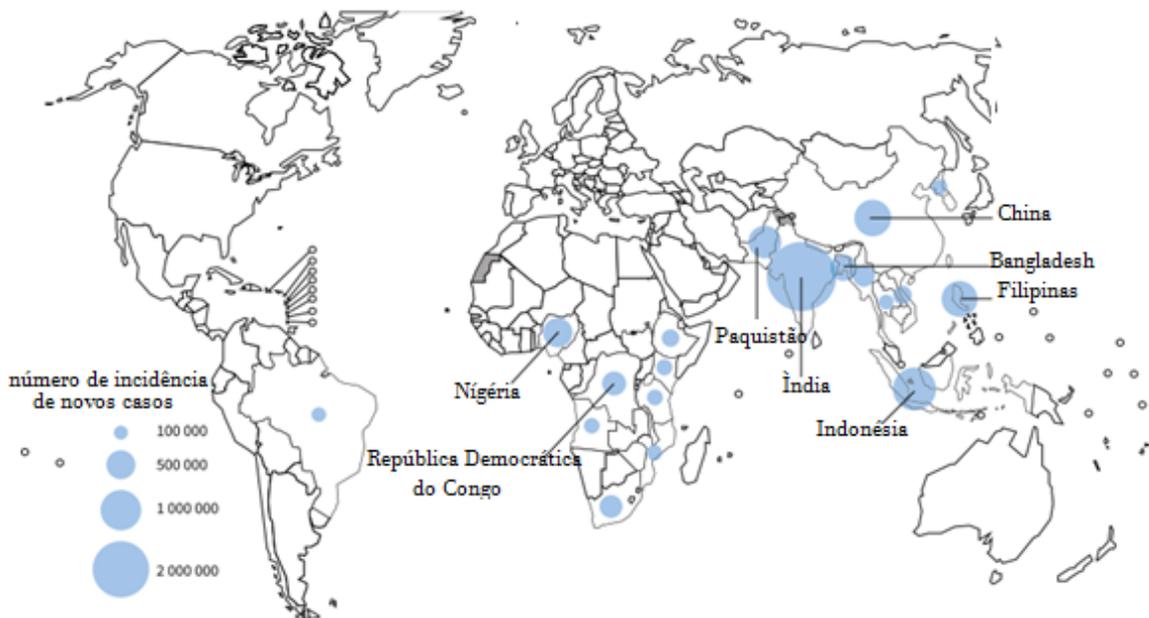
### 2.1.1 Epidemiologia

Globalmente em 2022, mais de 7.5 milhões de novos casos de TB foram notificados, superior aos registros de novos casos no período pré-COVID, (7.1 milhões em 2019). O número total de mortes ocasionadas por TB (incluindo pessoas vivendo com HIV) foi de 1.3 milhões, em 2022, (WHO, 2023). Na **Figura 2** observa-se observar os números de mortes causadas por TB e HIV entre 2000-2022. O número de óbitos relacionados à TB foi significativamente maior do que os causados apenas por AIDS/HIV (0.6 milhões), indicando uma maior taxa de mortalidade, principalmente impactada pela pandemia de COVID-19 (UNAIDS, 2023).



**Figura 2.** Taxa estimada de mortes globais causadas por TB e HIV, adaptado de WHO, 2023.

Índices de TB são particularmente altos em áreas urbanas. A principal explicação para o aumento das taxas de transmissão é o aumento da densidade populacional, assim como a situação econômica mais humilde. Uma alimentação pobre em nutrientes aumenta o risco de infecção e do estabelecimento da doença, (Lönnroth et al., 2009). Na **Figura 3** a principal incidência de novos casos de tuberculose se encontra em países classificados como emergentes.



**Figura 3.** Incidência global de novos casos de tuberculose em 2022, adaptado de WHO, 2023.

A incidência da TB no Brasil varia ao longo do tempo e entre diferentes regiões do país. Segundo dados do Ministério da Saúde, a tuberculose continua sendo um importante problema de saúde pública no Brasil, com cerca de 70 mil novos casos notificados anualmente (BRASIL, 2021). Embora tenha havido uma redução geral na incidência da doença nas últimas décadas, o Brasil ainda enfrenta desafios significativos especialmente em áreas urbanas densamente povoadas e em comunidades com condições socioeconômicas desfavoráveis. O coeficiente de incidência de TB no Brasil diminuiu de 41,9 casos por 100 mil habitantes, em 2001, para 37 casos por 100 mil habitantes em 2018 (7,9%), com estabilização em 2019. Quanto ao coeficiente de mortalidade os estados do Amazonas (4,1/100 mil hab.), de Pernambuco (3,9/100 mil hab.) e do Rio de Janeiro (3,8/100 mil hab.) destacam-se com os maiores valores (BRASIL, 2021).

Sem tratamento adequado, os níveis de mortes causadas por TB são maiores que 50%. Com o uso de medicamentos anti-TB por 4-6 meses a taxa de cura chega a ser maior que 85%. O número de pessoas que são infectadas com *Mycobacterium tuberculosis*, desenvolve a doença e morrem devido à tuberculose, está intrinsecamente ligado a vários fatores. Este número pode ser reduzido por ações multi setoriais, através de cuidados rápidos, democratização do conhecimento sobre TB, prevenção e um diagnóstico precoce (Tiemersa et al, 2011).

### 2.1.2 Diagnóstico

Testes diagnósticos para tuberculose têm aumentado substancialmente nos últimos anos, com a liberação de testes moleculares recomendados pela WHO, para diagnóstico inicial de TB. Tais testes podem ser utilizados para auxiliar pessoas vivendo com HIV, pois possuem variações que detectam resistência a uma variedade de medicamentos utilizados contra o MTB. O método de microscopia de escarro ainda continua sendo utilizado largamente por laboratórios com poucos recursos, mas vem sendo substituído por testes rápidos. (WHO, 2021)

Semeio para o crescimento de cultura de MTB continua sendo o padrão ouro para o diagnóstico, importante para identificar a presença de *Mycobacterium tuberculosis* em amostras clínicas como escarro, lavado broncoalveolar, líquido pleural, entre outros. Este método envolve o crescimento e a identificação das bactérias em meio de cultura específico. Além disso, é o meio recomendado para detectar resistência a drogas, bem como um teste confirmatório e de acompanhamento de pacientes em tratamento (WHO, 2023). No entanto, o processo de cultivo da *Mycobacterium tuberculosis* é mais lento em comparação a outros micro-organismos, geralmente levando de 2 a 5 semanas para que as colônias bacterianas se tornem visíveis. É válido ressaltar que esse método requer infraestrutura laboratorial especializada. Por isso, em alguns casos, outros métodos de diagnóstico rápidos, como testes moleculares, podem ser utilizados em conjunto com a cultura, (Palomino et al., 2008).

Com o passar do tempo, os métodos para diagnosticar tuberculose vem se desenvolvendo na forma de testes moleculares, como os *Nucleic Acid Amplification Test* (NAATs). Esses testes amplificam uma região específica do genoma do *M. tuberculosis*, tipicamente por PCR. NAATs ainda podem detectar genes relacionados à resistência aos fármacos (Acharya et al, 2020).

Testes moleculares para marcadores de MTB desempenham um papel fundamental no diagnóstico precoce da TB, fornecendo resultados sensíveis e precisos. A proteína MPT64 é exclusiva do *Mycobacterium tuberculosis*, tem sido utilizada como marcador em testes moleculares, permitindo diferenciar a MTB de outras micobactérias. (Cao et al, 2021). LAM (lipoarabinomanana) é um componente da parede celular da *Mycobacterium tuberculosis*, a presença do antígeno LAM na urina de pacientes é um indicativo de tuberculose disseminada, especialmente em pacientes com HIV/AIDS (Mcivor et al, 2021). O GeneXpert é uma plataforma diagnóstico molecular baseada na técnica de PCR, sendo usado para detectar a tuberculose (TB) e a possível resistência a rifampicina, indicativo de Tuberculose Multidroga-resistente (TB-MDR), esta metodologia é capaz de liberar resultados em menos de 5h (Cepheid, 2024).

Embora os testes moleculares demonstrem alta especificidade e sensibilidade, é necessário o manejo por profissionais qualificados. Além disso, seu custo é elevado, dificultando o acesso, especialmente em áreas com recursos financeiros limitados (Nurwidya et al, 2018).

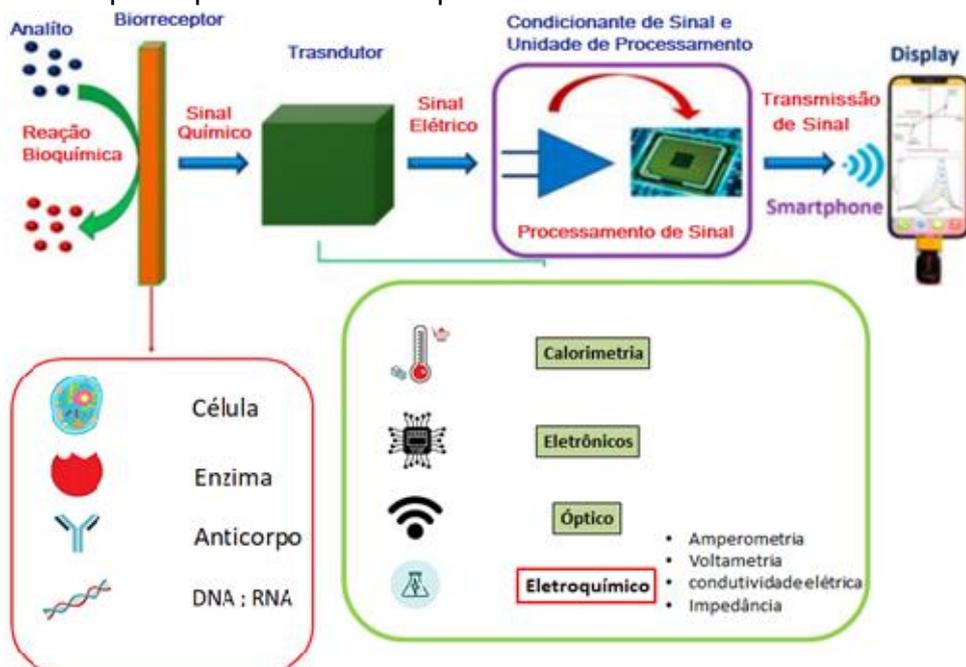
O diagnóstico rápido é um pilar fundamental para acabar com a (TB). Os testes no local de atendimento (POCT) facilitam a detecção precoce, o tratamento imediato e a redução da transmissão da tuberculose. Com a utilização de biossensores para MTB capazes de detectar baixas concentrações de marcadores, baixo custo, sem necessidade de pessoal especializado, seria possível revolucionar o diagnóstico precoce e o monitoramento da tuberculose, especialmente em áreas com poucos recursos, melhorando significativamente as taxas de detecção, tratamento e controle da doença (Gupta et al, 2021).

## 2.2. BIOCENSORES

Biossensores são dispositivos que combinam um componente biológico específico com um componente de detecção, geralmente um transdutor, para converter um sinal biológico em um sinal mensurável. Esses dispositivos são utilizados para detectar a presença ou concentração de substâncias como proteínas, ácidos nucleicos, microrganismos ou mesmo íons e metais pesados, em amostras biológicas ou ambientais (Roukainen et al., 2010).

Podem ser projetados para uma ampla variedade de aplicações, incluindo diagnóstico médico, monitoramento ambiental, detecção de patógenos em alimentos, controle de qualidade em indústrias farmacêuticas e de alimentos (Rubab et al., 2018; Bezerra et al., 2019; Pilevar; Kim; Lee, 2021; Singh et al., 2023).

A **Figura 4** ilustra o desenvolvimento geral de um biossensor, um componente biológico (enzima, anticorpo, ácido nucleico ou célula) é imobilizado em uma superfície sólida ou membrana. Quando a substância-alvo se liga ao componente biológico, ocorre uma reação bioquímica catalítica ou não catalítica que gera um sinal, esse sinal será detectado por um transdutor que o converte em algo mensurável para que o sistema de processamento transforme o sinal em dados.



**Figura 4.** Esquema de desenvolvimento de um biossensor, adaptado de Kulkarni et al, 2022.

Os transdutores de biossensores desempenham um papel fundamental na operação e funcionalidade desses dispositivos, convertendo sinais biológicos em sinais mensuráveis que podem ser interpretados e quantificados. Esses transdutores podem assumir diversas formas e operar em diferentes princípios físicos, como elétrico, óptico ou piezoelétrico (Campos-Ferreira et al., 2016; Do Nascimento et al., 2017; Bekmurzayeva et al., 2021). A escolha do transdutor adequado depende da aplicação específica do biossensor e das propriedades da substância-alvo ao serem detectadas, visando sempre obter a máxima sensibilidade, especificidade e precisão nas medições (Kulkarni et al., 2022).

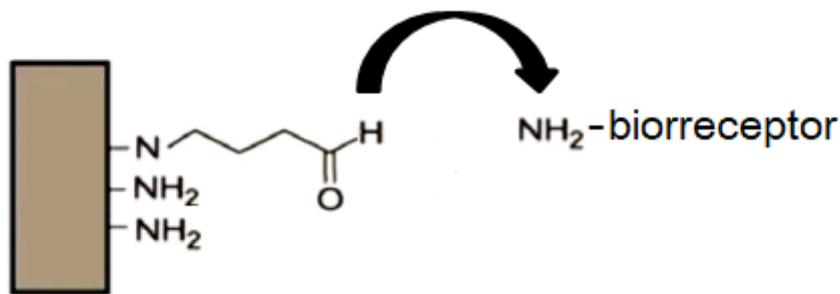
Os eletroquímicos são uma classe de transdutores que convertem sinais químicos em sinais elétricos mensuráveis. São frequentemente empregados em biossensores devido à sua sensibilidade, precisão e facilidade de miniaturização. A interação entre o componente biológico e a substância-alvo produz uma mudança no fluxo de elétrons, detectada pelo transdutor eletroquímico (Uludag et al., 2016). Os mais comuns são eletrodos de carbono vítreo, eletrodos de platina e eletrodos de ouro. Esses transdutores podem detectar mudanças na corrente elétrica (amperometria), na voltagem (voltametria) ou na impedância elétrica (espectroscopia de impedância eletroquímica), dependendo do princípio de detecção (Ronkainen et al., 2010).

### 2.2.1 Imobilização do Biorreceptor

A imobilização é o método pelo qual um componente biológico se liga ao transdutor, mantendo sua atividade biológica natural. A detecção do alvo de interesse está diretamente ligada à imobilização adequada do biorreceptor. Essa etapa garante uma parte ativa e acessível para os alvos, proporcionando alta estabilidade conformacional e bioatividade (Naresh et al., 2021). Entre as diversas técnicas de imobilizar uma molécula, temos a adsorção física, adsorção química, ligação covalente (Frey et al., 2020) e aprisionamento (Huertas et al., 2019)

Uma das técnicas mais comuns e eficazes para a imobilização de biorreceptores em biossensores é a formação de ligações covalentes entre a superfície modificada do transdutor e o biorreceptor. Essa ligação é frequentemente irreversível, proporcionando estabilidade e orientação para as biomoléculas imobilizadas. Durante esse processo, grupos funcionais presentes nas cadeias de certos aminoácidos, como hidroxila, amino, carboxílico e tiol, são utilizados para criar as ligações covalentes (Frey et al., 2020). O EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) e o NHS (N-hidroxisuccinimida) são reagentes comumente usados na bioquímica para promover a formação de ligações covalentes entre grupos funcionais, como carboxilas e aminas. O EDC atua como um agente de acoplamento, ativando os grupos carboxila, enquanto o NHS estabiliza o intermediário de ativação, tornando a reação mais eficiente (Gicli et al., 2022).

Outro reagente de bioconjugação bastante utilizado é o glutaraldeído. É um agente de reticulação de estrutura linear amplamente utilizado na biotecnologia devido à sua capacidade de formar ligações covalentes entre grupos funcionais aminas, presentes em moléculas biológicas (**Figura 5**). Essas ligações covalentes resultam em uma ligação estável, que pode imobilizar biomoléculas em superfícies sólidas ou estabilizar estruturas biológicas (Reddy; Reddy; Jiang, 2015). Grupos -NH<sub>2</sub> disponíveis na superfície podem se ligar ao glutaraldeído devido à presença de grupo aldeído (-COH) em suas extremidades. O glutaraldeído ativa a superfície ligando uma de suas extremidades ao grupo amina presente na superfície e o outro grupo aldeído conecta a uma molécula de DNA modificada com um terminal -NH<sub>2</sub> (Mohy eldin et al., 2014).

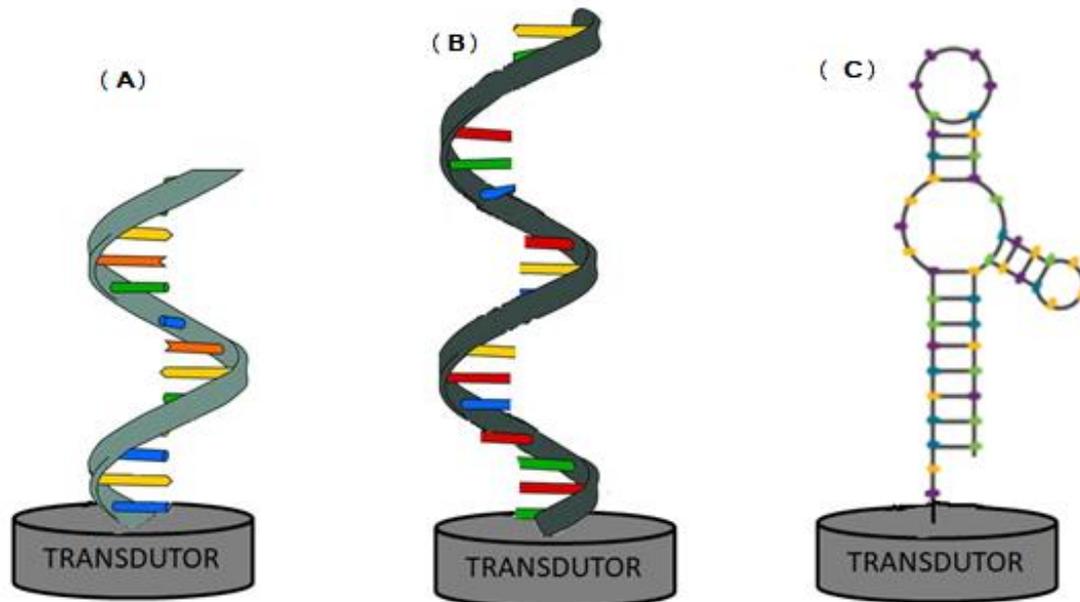


**Figura 5.** Imobilização de biorreceptor em superfície ativada com glutaraldeído, Autor 2024.

### 2.2.2 Genossensores

Com o intuito de mitigar algumas limitações observadas em determinados biossensores, como a falta de precisão e reprodutibilidade, foram desenvolvidas genossensores que estão emergindo como uma alternativa promissora. Esses biossensores surgiram como uma abordagem atrativa para aprimorar a sensibilidade e robustez dos dispositivos eletroquímicos, proporcionando as características de biomoléculas de DNA como a especificidade (Paniel et al., 2013).

Os genossensores são utilizados na detecção de sequências específicas de oligonucleotídeos empregando como moléculas de biorreconhecimento, sondas de fita simples de DNA (ssDNA), mRNA ou aptâmeros, como visto na **Figura 6**. O objetivo de utilizar tal biorreceptor é a hibridização entre a molécula imobilizada na superfície do transdutor e sua sequência complementar (alvo), a sensibilidade e especificidade estão relacionadas ao número de pares de bases complementares do alvo. Ao adquirir a conformação de dupla hélice (dsDNA), um sinal proporcional é gerado detectando o alvo na amostra analisada. A detecção é seletiva e resulta das propriedades específicas da interação das bases nitrogenadas presentes nos oligonucleotídeos, com criação de pontes de hidrogênio (Huang et al., 2018; Babaei et al., 2022). Um estudo prévio para definir a sequência de nucleotídeos que irão compor a sonda de DNA deve ser realizado, para garantir a especificidade e condições de estabilidade da sonda (Xu et al., 2020).



**Figura 6.** Diferentes tipos de Genossensores. (A) miRNA (B) ssDNA (C) Aptâmero Autor, 2024.

A detecção de forma direta sonda de DNA, consiste em detectar os componentes da molécula (Richard et al., 2023) ou de maneira indireta, por indicadores. O sinal eletroquímico pode ser medido com auxílio de marcadores de hibridização que se ligam a sonda de DNA, como o caso do Azul de Metileno, do inglês *Metileno Blue* (MB) e do Brometo etileno (Honorato et al., 2014).

A interação entre o azul de metileno e o DNA é amplamente estudada devido às suas aplicações em técnicas de coloração e análise de ácidos nucleicos, bem como em estudos de interações moleculares. O azul de metileno é capaz de intercalar-se entre as bases nitrogenadas do DNA, inserindo-se entre as hélices da dupla fita de DNA (Sun et al., 2012). Mas em outras condições o sinal do azul de metileno se mostra bastante elevado em ssDNA, indicando uma interação com as guaninas da fita simples (Ozkan et al., 2002). É importante notar que a interação entre o azul de metileno e o DNA pode variar dependendo das condições experimentais, como pH, concentração de sal e temperatura. Portanto, esses fatores devem ser considerados ao realizar experimentos que envolvam essa interação (Vardevanyan et al., 2013).

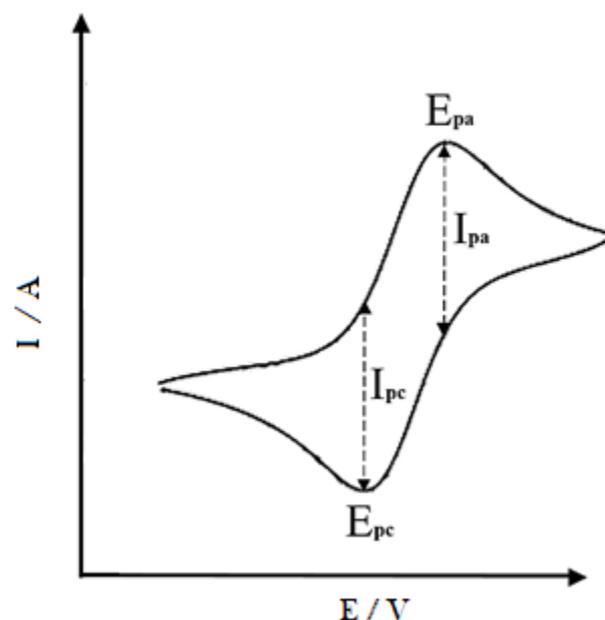
A compreensão de que ácidos nucleicos podem assumir estruturas secundárias estáveis levou à seleção ao desenvolvimento dos aptâmeros. Aptâmeros são oligonucleotídeos curtos selecionados por meio de um método de Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX). Capazes de se ligar a uma molécula alvo com alta afinidade e especificidade. Além dessas vantagens os aptâmeros são moléculas de alta estabilidade, flexibilidade estrutural 3D e de produção e modificações versáteis, tais características tornam essas moléculas próprias para aplicações no desenvolvimento de biossensores (Ding et al., 2022).

### 2.3 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

As análises eletroquímicas desempenham um papel crucial em uma variedade de campos, desde a ciência dos materiais até a biologia e a medicina. Essas técnicas utilizam as propriedades elétricas das substâncias para investigar uma ampla gama de fenômenos. Métodos como voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) são os principais métodos para identificar compostos e estudar reações redox em sistemas (Zoski et al, 2007). O desenvolvimento de dispositivos portáteis amplia o alcance das análises eletroquímicas para aplicações em campo, auxiliando no diagnóstico médico através da detecção e quantificação de biomarcadores (Lu et al., 2020) e no monitoramento ambiental de substâncias tóxicas (Stortini et al., 2020). Essas técnicas desempenham um papel fundamental na compreensão e no avanço de diversas áreas científicas, promovendo inovação e desenvolvimento na ciência.

#### 2.3.1 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica poderosa utilizada para investigar a cinética de reações redox, determinar coeficientes de difusão, identificar espécies eletroativas e caracterizar sistemas eletroquímicos. A **Figura 7** representa os principais parâmetros fornecidos pela curva voltamétrica onde  $I_{pa}$  = corrente de pico anódico,  $I_{pc}$  = corrente de pico catódico,  $E_{pa}$  = potencial de pico anódico e  $E_{pc}$  = potencial de pico catódico.



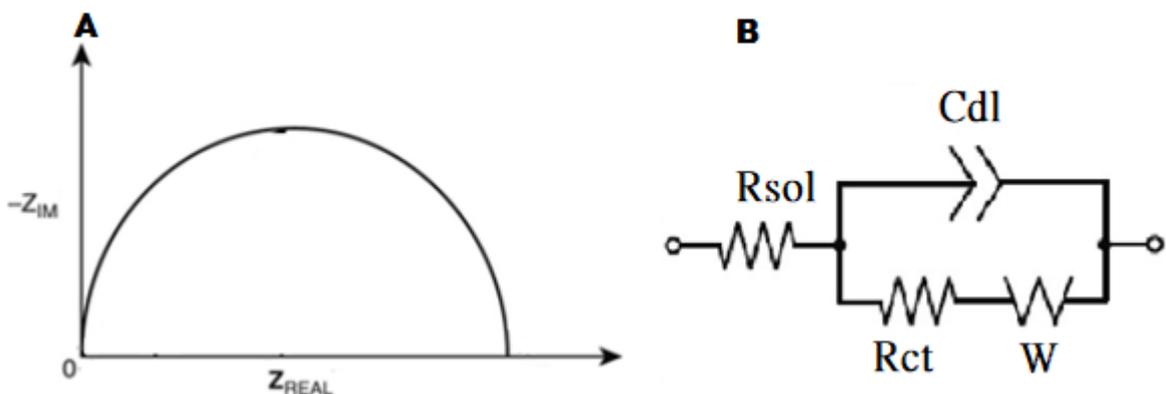
**Figura 7.** Gráfico representativo de leitura de VC  $I_{pa}$  = corrente de pico anódico,  $I_{pc}$  = corrente de pico catódico,  $E_{pa}$  = potencial de pico anódico e  $E_{pc}$  = potencial de pico catódico. Adaptado de Nascimento et al, 2011.

Nessa técnica, a corrente elétrica é medida enquanto a voltagem aplicada é deslocada de forma cíclica em uma faixa de varredura. Durante a varredura, a solução sobre os eletrodos sofre constantes oxidações e reduções de moléculas eletroativas presentes no meio, gerando correntes de pico característicos no gráfico de VC (Zoski et al, 2007). Além disso, essa técnica pode ser utilizada para modificar a superfície de transdutores por meio da eletropolimerização, onde monômeros conhecidos são submetidos a uma variação de potenciais em volts (V), que oxidam e reduzem as moléculas da solução. A carga resultante do processo anódico e catódico estimula as moléculas presentes na solução, gerando ligações covalentes entre essas moléculas e a produção de polímeros (Eloi et al., 2020).

A voltametria cíclica fornece uma riqueza de informações sobre a cinética das reações eletroquímicas, incluindo potencial característico do eletrodo em estudo, coeficientes de transferência de carga e comportamento de reações reversíveis e irreversíveis. A técnica é utilizada em várias áreas eletroquímicas, como química analítica, eletroquímica de materiais e biossensores (Power et al., 2018).

### 2.3.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é uma técnica utilizada para investigar as propriedades elétricas de plataformas eletroquímicas. Ela envolve a aplicação de uma baixa amplitude de sinal alternado à uma célula eletroquímica em uma ampla faixa de frequências. A resposta elétrica da célula, medida em termos de impedância, é então registrada e analisada. A partir dos dados de impedância, é possível extrair parâmetros fundamentais, como resistências, capacitâncias e indutâncias, que são importantes para entender os mecanismos de reação e a cinética eletroquímica (Lasia, 2014). A expressão de impedância é dividida em uma parte real e uma parte imaginária. Quando a parte real ( $Z_{real}$ ) é representada no eixo X e a parte imaginária ( $Z_{imag}$ ) é representada no eixo Y, forma-se um "Gráfico de Nyquist", **Figura 8**.



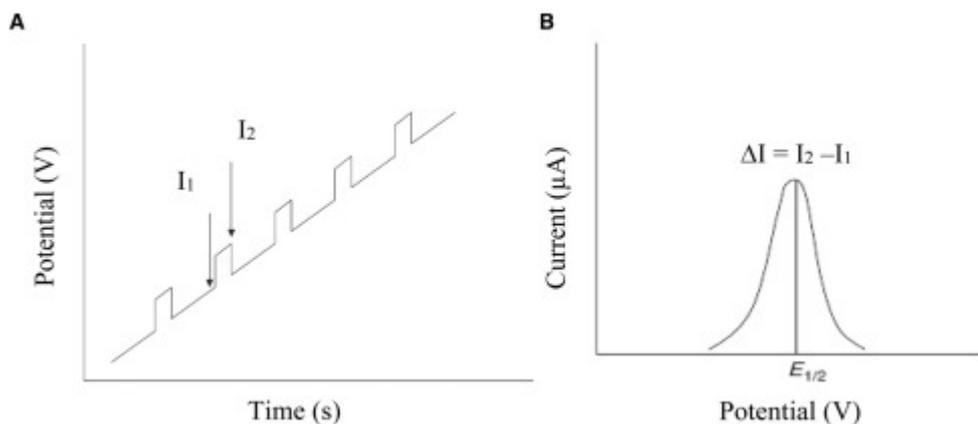
**Figura 8.** Leitura via método eletroquímico EIE. **(A)** Gráfico de Nysquit **(B)** Circuito de Randles.  $R_{sol}$ = resistância da solução ;  $R_{ct}$  = resistância a transferência de cargas;  $C_{dl}$  = capacitância;  $W$  = Warburg. Adaptado de Magar et al, 2021.

Os processos eletroquímicos associados à interface eletrolítica e às reações de oxidação e redução são simulados/computados como um circuito elétrico (circuito

equivalente) envolvendo componentes elétricos (resistores, capacitores, indutores). A resistência da solução ( $R_s$ ), a capacitância de dupla camada na superfície do eletrodo ( $C_{dl}$ ), a resistência de transferência de carga ( $R_{ct}$ ) e a resistência de Warburg ( $Z_w$ ) são simplificadas nos circuitos equivalentes de Randles (Katz et al., 2003; Magar et al., 2021).

### 2.3.3 Voltametria de Pulso Diferencial

A voltametria de pulso diferencial (VPD) é uma técnica eletroquímica amplamente utilizada para análise de amostras eletroativas em solução. Ela é baseada na aplicação de uma série de pulsos de potencial em um eletrodo de trabalho e na medição da corrente resultante após cada pulso. A diferença entre as correntes medida no início e no final de cada pulso é registrada em função do potencial, portanto a corrente representada no gráfico é a ( $\Delta I$ ) diferença da corrente capacitiva ( $I_1$ ) e a faradiaca ( $I_2$ ). **Figura 9** (Xu et al., 2020a).



**Figura 9.** (A) Variação do potencial aplicado no VPD (B) Típico gráfico, resultante do VPD (Venton; DiScenza, 2020).

A VPD é útil para a determinação quantitativa de espécies eletroativas em solução, pois permite a detecção de picos de corrente em baixas concentrações, minimizando a interferência do ruído de fundo. Além disso, essa técnica oferece uma boa seletividade e sensibilidade, podendo ser aplicada em sistemas de amostras biológicas ou ambientais (Albishri et al., 2019; Farahani et al., 2019).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver um genossensor eletroquímico para diagnóstico da TB.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Modificar o eletrodo do trabalho com filme polimérico de L-lisina;
- Viabilizar a ligação covalente da sonda com a superfície do eletrodo modificado utilizando o glutaraldeído como agente de bioconjugação;
- Estudar a concentração ideal de sonda de DNA sobre o eletrodo;
- Avaliar a detecção do alvo complementar por VPD;
- Avaliar a especificidade do biossensor com o uso de sequência não complementares;
- Caracterizar as etapas de modificação e imobilização;

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

A solução tampão de PBS 10x pH 7,4 foi comprado pela Gibco e tampão TRIS comprado pela Sigma-Aldrich. Azul de metileno foi adquirido pela Sigma-aldrich e preparado em TRIS-HCl 20 mM pH 7,4 na concentração de 500 $\mu$ M. L-lisina foi adquirida da Sigma-Aldrich, e posteriormente solubilizada em PBS 1x pH 7,4. Glutaraldeído comprado pela Sigma-Aldrich em concentração de 25% em solução aquosa. Ferrocianeto de potássio e Ferricianeto de potássio 5mM obtidos da Sigma-Aldrich e preparados em solução de KCl 0,1M. A sonda de DNA do gene Rv2341 para MTB (NH<sub>2</sub>-C6-5'- ACG GCA ACG GGT CGC GCA TCC AGA-3') e sua sequência complementare, chamada de alvo (5'- TCT GGA TGC GCG ACC CGT TGC CGT-3'), foram fornecidas liofilizadas pelo laboratório Integrated DNA Technologies (IDT), e ressolubilizadas em água Mili-Q em concentrações de 200  $\mu$ M e 100  $\mu$ M, para sonda e alvo complementar (AC). Essas soluções estoques foram armazenados em freezer a -20°C e diluídos posteriormente em suas concentrações de trabalho, a sonda em PBS 1x e o alvo em TRIS 10mM. Uma sequência de DNA de ZIKA foi fornecida pela EXXTEND foi utilizada como alvo não complementar (ANC) para análise de especificidade.

Um sistema impresso de três eletrodos foram confeccionados (SPE, do inglês, *screen printed electrode*) foi utilizado nos experimentos, contendo um eletrodo produzido com tinta de Ag/AgCl como eletrodo de referência, eletrodo auxiliar e eletrodo de trabalho produzidos com tinta de carbono. As tintas de prata e carbono utilizadas para confecção dos SPEs foram adquiridas pela SunChemical e Loctite, respectivamente. Como substrato para a produção dos eletrodos, foram utilizadas folhas de poliéster, adquiridas da empresa Isotek Brasil Indústria e Comércio Ltda.

Um potenciostato autolab PGSTAT128N da Metrohm foi utilizado para realização das análises eletroquímicas de VC, EIE e VPD. Uma câmara de hibridização (combi-H12, FINEPCR) contendo uma plataforma móvel foi utilizada para promover as análises de hibridização.

### 4.2 FORMAÇÃO DO FILME DE POLI-L-LISINA

Com a finalidade de avaliar a faixa de potencial mais apropriada para a formação do filme de poli-L-lisina por VC, fundamental para a imobilização do biorreceptor na superfície do biossensor, três faixas de potencial foram investigadas: -2V a +2 V; -1V a +2V e -0,2V a +2V. Para isso, a eletropolimerização da L-lisina a 1mM em PBS 1X pH 7,4 foi realizada com a velocidade de varredura de

100 mV s<sup>-1</sup>, por 10 ciclos, parâmetros bem descritos na literatura científica (Bezerra et al., 2019; Dalkiran et al., 2019; Wang et al., 2019). Após a eletropolimerização, os eletrodos foram lavados com 1000µL de água Mili-Q. Os filmes formados nas três faixas de potencial foram avaliados por VC e EIE, por meio do seu comportamento em solução de Fe(II)/Fe(III)(CN)<sub>6</sub>.

### 4.3 ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE SONDA DE DNA

#### 4.3.1 Ativação da Superfície com Glutaraldeído

Após a etapa de eletropolimerização da L-lisina é realizada a ativação da superfície do transdutor com o glutaraldeído sobre o eletrodo modificado com o filme polimérico. O estudo do glutaraldeído envolveu um olhar crítico sobre a literatura disponível nas principais fontes de dados científicos atuais, PubMed, SciencDirect, Scielo e IEEE Xplore, usando como descritivos: imobilização; ativação de superfície e ligação covalente. Ao todo foram revisados 35 artigos, dos quais 19 foram utilizados para avaliação. Como resultado, as condições determinadas para o uso do glutaraldeído foram: Deposição de 5 µL de glutaraldeído a 2,5% diluído em água Milli Q em temperatura ambiente, lavado com água MilliQ após 30min.

#### 4.3.2 Estudo da Imobilização da Sonda de DNA para Detecção da *Mycobacterium tuberculosis*

Após a ativação com glutaraldeído o eletrodo foi lavado com água MilliQ e deixado secar a temperatura ambiente. 5µL da sonda de TB (sdTB) na concentração 10µM, modificada com um grupo amino terminal 5' foram adicionados na superfície dos eletrodos de trabalho. Para promover o processo de ligação covalente, o eletrodo foi deixado em repouso por 1h, 3h, 16h e 24h à temperatura ambiente. Ao fim do tempo de imobilização os eletrodos são lavados com TRIS-HCl 20mM pH 7,4. Após o estabelecimento do tempo de imobilização, houve o estudo da concentração ideal de sdTB. As seguintes concentrações foram avaliadas: 1µM; 5µM; 7,5µM; 10µM e 15µM. Ambas as variáveis, tempo de imobilização e concentração da sonda, foram avaliadas por meio da técnica de VPD-MB, empregando o MB como indicador de hibridização.

### 4.4 ESTUDO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO BIOSENSOR

Definidas as etapas de modificação da superfície e imobilização da sonda, iniciou-se o estudo de hibridização entre a sonda (sdTB) e o alvo (sequência complementar). Além disso, foi avaliada a especificidade do biossensor, utilizando como alvo não complementar a sequência ssDNA de ZIKA (5'-CGA TAA CCC AAG TAC GGT GTC TAC C-3').

Nesse estudo, foi utilizado como tampão de diluição para os alvos TRIS-HCl 10mM pH 7,4. Ambos os alvos, complementares e não complementares foram diluídos nas concentrações de 50nM e 500nM e todas as diluições foram feitas menos de 24h antes da hibridização. Realizou-se a hibridização ao depositar 5 $\mu$ L dos alvos complementares sobre a área do eletrodo de trabalho, na temperatura de 60°C por 10min. Ao final do processo, os eletrodos foram lavados com 1mL de TRIS-HCl 20mM pH 7,4. As análises com alvo não complementar seguiram o mesmo procedimento. Todas as análises foram realizadas pela técnica de VPD-MB.

#### 4.5 ANÁLISES ELETROQUÍMICAS

A caracterização do sistema foi realizada através de análises de VC e EIE, com o intuito de diferenciar cada etapa da construção do biossensor e avaliar o comportamento destas etapas. A análise por VC foi realizada em uma faixa de potencial de -0,8V a 0,8 V vs Ag/AgCl, durante três ciclos em uma velocidade de 100 mV s<sup>-1</sup>. A EIE foi realizada em uma faixa de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz, com amostragem de 10 pontos por década, aplicando o potencial de 0,16 V(vs Ag/AgCl) e uma amplitude de potencial de 0,01 V. Ambas as análises foram efetuadas com eletrólito suporte de KCl 0,1 M e a espécie redox Fe(II)/Fe(III)(CN)<sub>6</sub> na concentração de 5 mM.

Para avaliar a imobilização da sdTB e a hibridização o método escolhido foi a adsorção do MB sobre sua superfície e a corrente referente à sua oxidação registrada pelo método de VPD (VPD-MB). Para isso, 5  $\mu$ L da solução de MB foi adicionada sobre a área de trabalho de diâmetro de 3mm por 5 minutos. Após esse período, todos os eletrodos foram lavados com 1000  $\mu$ L de solução Tris-HCL (pH 7,4) em concentração de 20 mM para a retirada de MB não adsorvido. Para a leitura do MB adsorvido sobre a área de trabalho, foram utilizados 50  $\mu$ L do tampão TRIS a 20 mM e pH 7,4. A varredura foi realizada entre -0,6V e 0 V e a velocidade de varredura de 20 mV s<sup>-1</sup>.

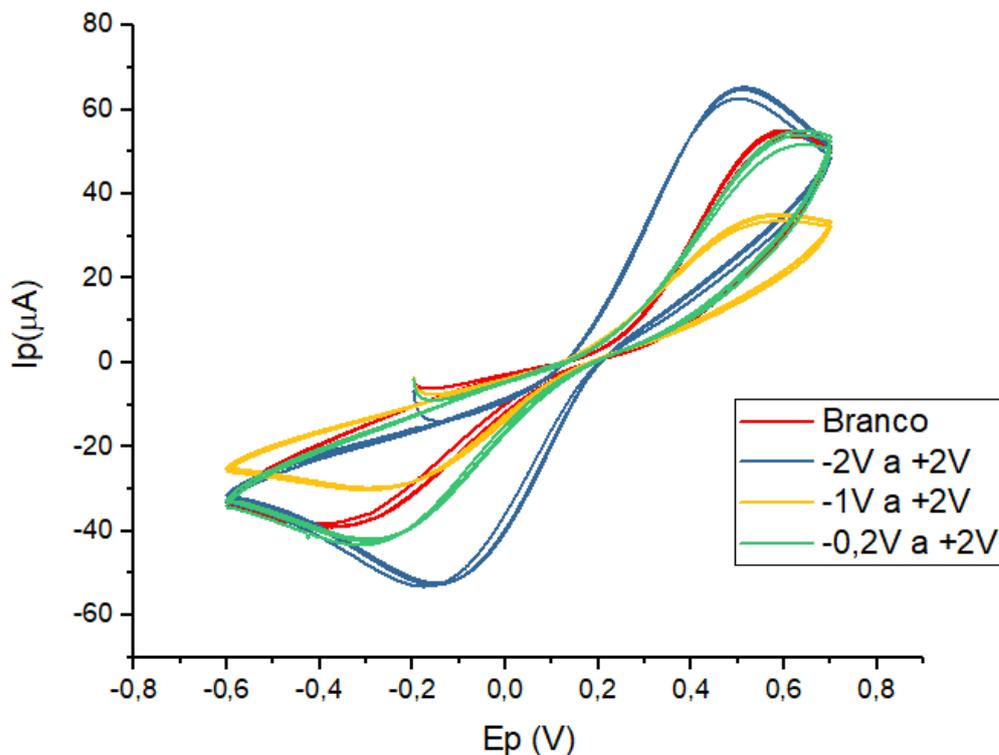
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

- ESTUDO DA FAIXA DE POTENCIAL PARA ELETROPOLIMERIZAÇÃO DA L-LISINA

A partir do processo de eletropolimerização da L-lisina é formado um filme polimérico na superfície da área de trabalho, com grupos amino disponíveis. Estes grupos funcionais advindos do polímero serão utilizados como “âncora” para a imobilização do biorreceptor na superfície, por meio do glutaraldeído. Para isso, foram estudadas as faixas de potencial  $-2V+2V$ ,  $-1V+2V$  e  $-0,2V+2V$  para a eletropolimerização da L-lisina.

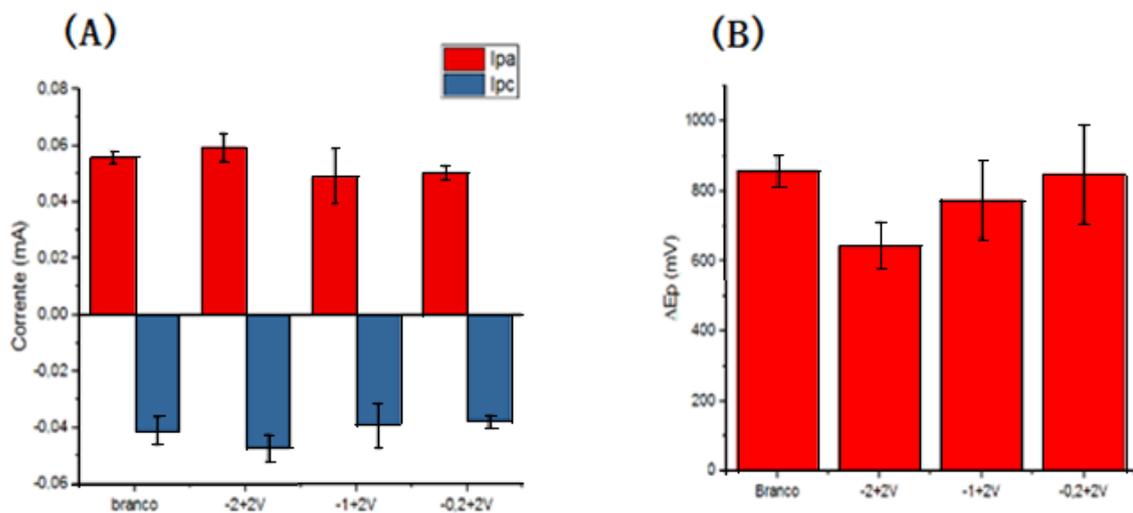
Através da VC se observa o comportamento do nosso sistema. A diferença de potenciais dos picos catódicos e anódicos,  $\Delta E_p$  (mV), e alturas das correntes de pico anódicos e catódicos ( $I_{pa}, I_{pc}$ ) são medidas que nos ajudam a determinar a reversibilidade das reações redox (Jara-Palacios et al., 2017). Para reações reversíveis o valor ideal da  $\Delta E_p$  é de **59 mV**, entretanto, o tipo de substrato, a pasta de carbono e a velocidade de varredura são fatores que influenciam neste resultado, afastando o comportamento do ideal (Uçar et al., 2004).

Conforme observado na **Figura 10**, a faixa de potencial que obteve maior diferença de comportamento entre o eletrodo sem modificações (branco) e o eletropolimerizado foi de **-2V a 2 V**, demonstrando também maiores correntes de picos catódico e anódico.



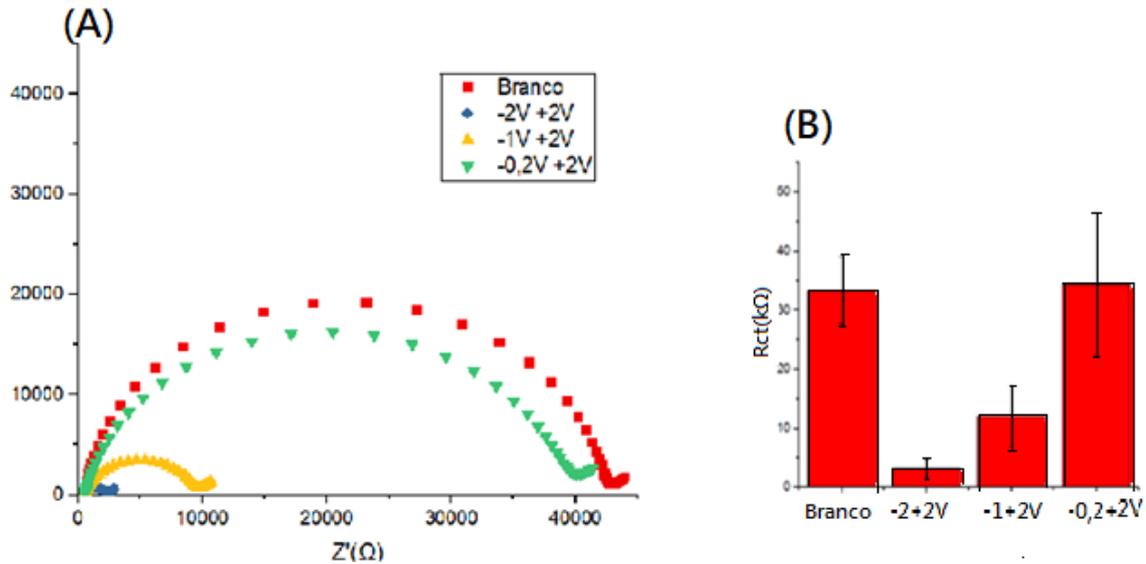
**Figura 10.** Eletropolimerização da L-Lisina a 1mM em diferentes faixas de potenciais (**-2V a 2V; -1V a 2V e -0,2V a 2V**). Resultados de Voltametria Cíclica em 5mM  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  em 0,1M KCl. Branco - eletrodo sem modificação.  $N=5$ .

Na **Figura 11**, observamos as correntes de picos anódicas, catódicas e a diferença entre os potenciais ( $\Delta E_p$ ) obtidas para as diferentes faixas de potencial utilizadas para polimerização da L-lisina. A faixa de -2V a +2V demonstrou **Figura 11A** valores de corrente anódica e catódica mais elevadas do que as correntes obtidas pelos eletrodos brancos e as demais faixas, portanto um filme mais condutivo foi formado em sua superfície. Avaliando também a **Figura 11B**, a menor diferença entre os potenciais dos picos foi obtido na faixa de -2V a 2V, demonstrando assim, uma maior tendência à reversibilidade da reação redox.



**Figura 11.** Resultados de (A) Correntes de pico catódicos e anódicos ( $I_{pc}$  e  $I_{pa}$ ) em (mA) e (B) Diferenças de potenciais,  $\Delta E_p$  (mV). **N=5**.

A EIE é uma técnica muito sensível empregada para monitorar a resposta elétrica de um sistema sujeito à aplicação de um sinal periódico de corrente alternada de pequena amplitude. A análise de sua resposta fornece informações relativas à ocorrência de eventuais reações na interface eletrodo/solução. Aplicando um circuito de Randles, representado na **Figura 8B**, é possível obter a resistência à transferência de cargas ( $R_{ct}$ ). Cada etapa de construção do biossensor se comporta de maneira a reduzir ou aumentar a  $R_{ct}$  permitindo caracterizar essas modificações e avaliar condições experimentais (De Carvalho et al., 2020). Nesse sentido, foram realizadas análises de EIE (**Figura 12**) para investigar os comportamentos eletrodos. Os eletrodos sem modificações apresentaram uma alta  $R_{ct}$  ( **$33,24k\Omega \pm 6,59$** ) devido à baixa condutividade encontrada na pasta de carbono. A faixa de -0,2V a +2V para a polimerização da L-lisina não demonstrou diferença significativa em relação ao branco ( **$35,06k\Omega \pm 9,33$** ), diferentemente da maior faixa de varredura -2V a +2V onde houve uma redução acentuada da  $R_{ct}$  ( **$4,86k\Omega \pm 1,82$** ). A faixa intermediária também apresentou valores reduzidos de  $R_{ct}$ , ( **$12,78k\Omega \pm 4,89$** ). Esses comportamentos podem ser visualizados nos diagramas de Nyquist apresentados na **Figura 12 A**.



**Figura 12.** Diagrama de Nyquist **(A)** Resistência a transferência de carga ( $R_{ct}$ ) em ( $k\Omega$ ) **(B)** para eletrodos brancos e polimerizados com 1 mM de L-lisina em PBS 1x pH 7,4, nas faixas de potencial de -2V a 2V, -1V a 2V e -0,2V a 2V.  $N=5$ .

Analizados os resultados obtidos com a variação da faixa de potencial utilizada na eletropolimerização da L-lisina, foi determinado que a melhor faixa foi -2V a 2V, pois o filme polimérico apresentou maiores correntes de pico, indicando maior condutividade, menor  $\Delta E_p$  que está relacionado com a maior reversibilidade da reação e menor  $R_{ct}$ , complementando assim os dados de VC (Tripathy et al., 2017).

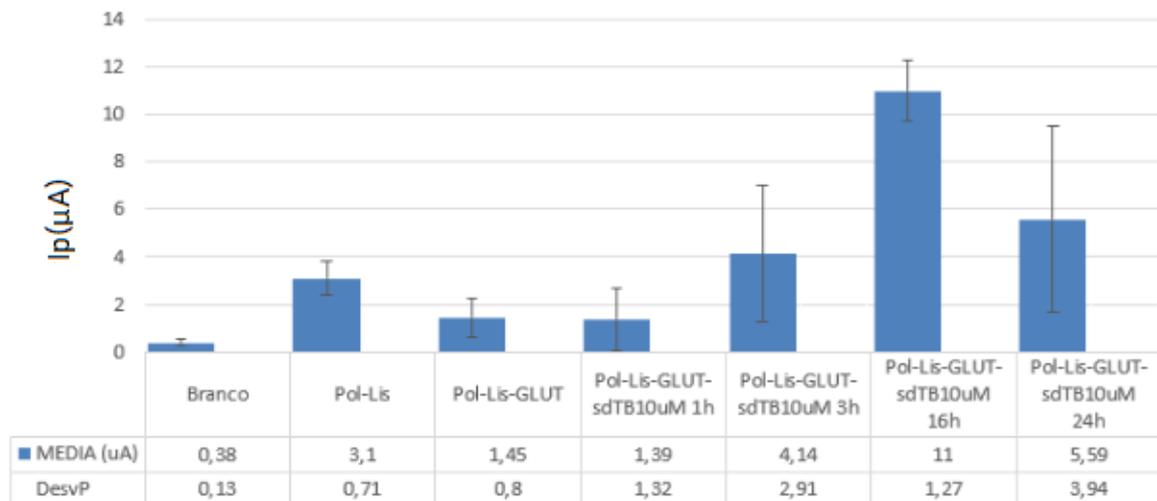
- PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE SDTB

Como descrito na metodologia, a otimização do processo de imobilização envolveu o estudo do tempo de imobilização e concentração da sonda. Para início da otimização, foram avaliados as correntes de picos de VPD obtidos em diferentes tempos de imobilização, mantendo constante a concentração da sdTB (10  $\mu M$ ).

Sobre o eletrodo modificado com o filme de poli-L-lisina foram adicionados 5 $\mu L$  de glutaraldeído a 2,5% diluído em água MilliQ em temperatura ambiente, por 30min. A função do glutaraldeído é se ligar aos grupos amina livres presentes no polímero por uma extremidade e se ligar ao grupo amino da sdTB pela outra extremidade, formando assim, uma ligação covalente entre a superfície modificada e a sonda de DNA. (Wang et al., 2019)

A molécula de biorreconhecimento foi deixada imobilizando sobre o transdutor modificado com poli-L-lisina e ativado com o glutaraldeído, à temperatura ambiente, por períodos de 1h, 3h, 16h e 24h. Depois de imobilizadas as sondas não ligadas covalentemente foram removidas por lavagem com 1000 $\mu L$  de TRIS-HCl 20 $\mu M$  pH 7,4 à temperatura ambiente. Nesta superfície foi depositada uma solução de MB por 5 min e posteriormente o eletrodo foi lavado com TRIS 20 mM pH 7,4, para retirar o

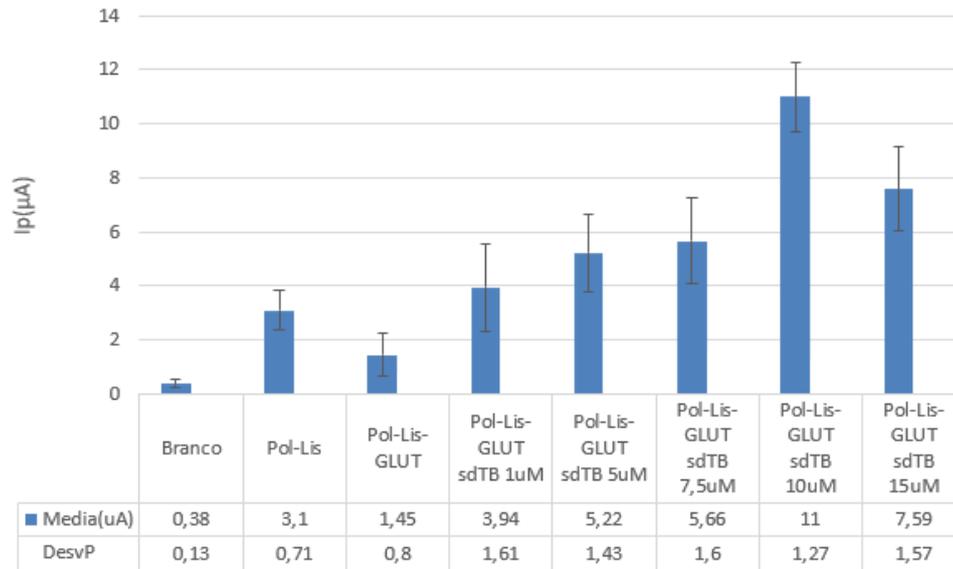
MB excedente. A leitura foi realizada por VPD, podendo-se observar uma maior corrente após 16h **Figura 13** e um menor desvio padrão, indicando maior adsorção de MB e conseqüentemente, maior concentração de sonda imobilizada na superfície do transdutor, visto que o MB apresenta afinidade pelas guaninas (Farjami et al., 2010).



**Figura 13** Resultados de VPD-MB para os eletrodos brancos, modificados (Pol-Lis), ativados (Pol-Lis/GLUT) e imobilizados (Pol-Lis/GLUT/sdTB) com sdTB a 10µM, nos tempos de 1h; 3h; 16h e 24h. Tabela a baixo da figura mostrando as medias (µA) e desvios padrões. **N=5**.

Os tempos mais curtos, de 1h e 3h, não apresentaram correntes diferentes das modificações anteriores e apresentaram desvios padrão relativos maiores que 50%, indicando baixa reprodutibilidade na imobilização da sonda. Os tempos de 16h e 24h demonstraram maiores correntes (**11µA**) e (**5,59µA**) respectivamente, entretanto, no tempo de 24h houve uma queda de corrente em relação à 16h, com o aumento do desvio padrão.

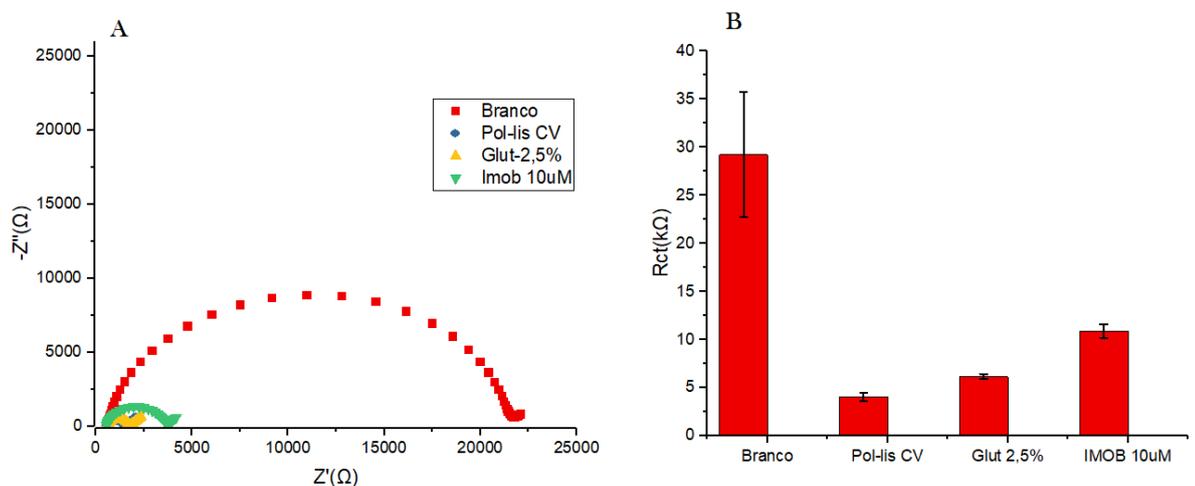
Estabelecido o tempo de imobilização de 16h, deu-se prosseguimento ao estudo de concentração da sonda. Uma baixa concentração de sonda imobilizada resulta em uma baixa corrente, o que pode prejudicar a detecção do alvo. Por outro lado, o excesso de sonda na superfície pode ocasionar um impedimento estérico, atrapalhando o processo de hibridização do biorreceptor com seu alvo complementar (AC). Logo, para avaliar a concentração mais adequada de sonda, foi depositado sobre o eletrodo Pol-Lis/GLUT 5µL de sonda em concentrações de 1µM; 5µM; 7,5µM; 10µM e 15µM, em temperatura ambiente. Análises de VPD foram realizadas, obtendo-se as correntes de pico para oxidação do MB (**Figura 13**).



**Figura 14** Resultados de VP-MB da variação da concentração de sdTB ( 1µM; 5µM; 7,5µM; 10µM e 15µM). Tabela à baixo da figura mostrando as médias (µA) e desvios padrões. **N=5**

Analisando a **Figura 14** podemos observar uma tendência do aumento da corrente em função da concentração de sonda, atingindo seu ápice em 10 µM (**11µA±1,27**), logo em seguida, na concentração de 15 µM houve queda da corrente (**7,59µA±1,57**). Esse comportamento é um indicativo de perda de eficiência da imobilização. Logo, os parâmetros escolhidos para a construção do biossensor foram: imobilização de 10 µM de sdTB, em temperatura ambiente, por 16h.

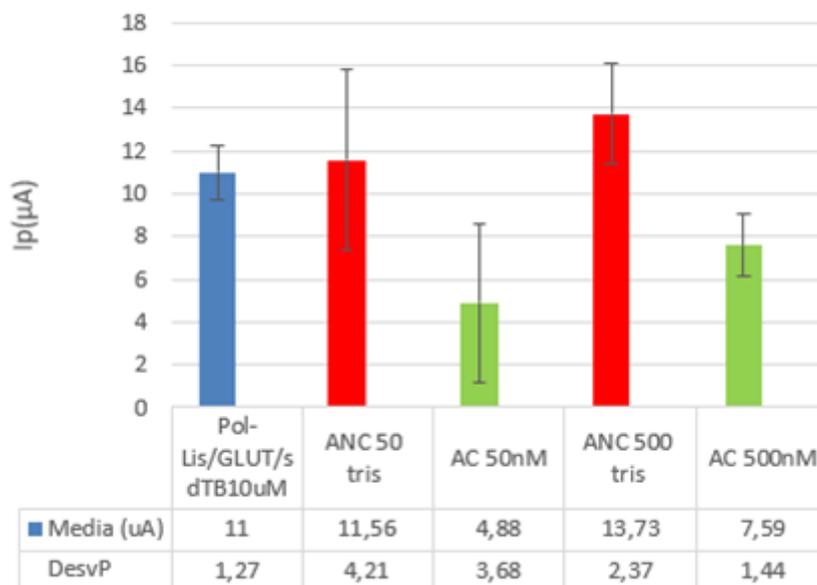
A Rct foi escolhida como parâmetro suplementar para avaliar as etapas de construção do biossensor (**Figura 15**). Eletrodos brancos tendem a uma maior Rct (**29,5kΩ ± 10,4**), e quando eletropolimerizados, a Rct diminui (**4,86kΩ ± 1,82**). Ao adicionar o glutaraldeído na superfície do eletrodo, as cargas elétricas da solução de ferricianeto/ferrocianeto tem mais dificuldade de interagir com a superfície, ocasionando aumento de Rct (**6,35kΩ ± 0,82**). A imobilização da sdTB na superfície do eletrodo aumenta ainda mais a resistência (**10,35kΩ ± 0,7**), as cargas eletricamente negativas da sequência de DNA dificultam a passagem da espécie redox, assim como o impedimento estérico do acúmulo de moléculas sobre a superfície influencia a elevação da Rct ( Wu et al., 2020).



**Figura 15** Leitura de EIE, varias etapas da construção do biossensor.

- AVALIAÇÃO DA PLATAFORMA BIOSENSORA

Após a construção e caracterização do biossensor, foram realizadas detecções com AC e ANC, para avaliar a eficiência do mesmo. Foi possível verificar uma tendência no comportamento dos alvos a detecção com MB, alvos diluídos em tampão TRIS-HCl 10 mM pH 7,4 (**Figura 16**). O ANC apresentou uma maior valor de corrente ( $13,73\mu\text{A} \pm 2,37$ ) em relação ao AC ( $7,59\mu\text{A} \pm 1,44$ ) ambos os alvos em concentração de 500nM. Esses resultados indicam uma menor quantidade de guaninas livres na superfície do eletrodo quando o alvo é complementar, caracterizando a hibridização (Farjami et al., 2010). Já quando o alvo na superfície não é a sequência de DNA complementar a corrente permanece inalterada ou aumenta devido à possível adsorção dos alvos na área do eletrodo de forma inespecífica, disponibilizando guaninas para o MB interagir (Sani et al., 2019). Além disso, os valores dos desvios se demonstraram maiores que 10% para todas as leituras de hibridização, dificultando a diferenciação entre diferentes concentrações dos AC. A provável causa é a adsorção inespecífica de alvos na superfície do eletrodo.



**Figura 16** Teste de sensibilidade e especificidade do biossensor. (Pol-Lis/GLUT/sdTB10 $\mu\text{M}$ ) com alvo não complementar ANC 50 nM e ANC 500 nM e com alvo complementar AC 50 nM e 500 nM . **N=5**.

Uma maneira de contornar esses problemas é avaliando novas formas de lavagem (utilização de tensoativos) para aumentar a eficiência na remoção de alvos adsorvidos na superfície. Agentes bloqueadores de superfície também podem ser utilizados para reduzir/impedir ligações inespecíficas, aumentando a eficiência do biossensor e, conseqüentemente, elevando sua reprodutibilidade (Marchlewicz et al., 2021).

## 6 CONCLUSÃO

Através do levantamento científico, apresentado no início do trabalho, pôde-se constatar a necessidade de um biossensor eletroquímico como forma de diagnóstico para o controle e prevenção da tuberculose, principalmente em países emergentes e com poucos recursos disponíveis. O objetivo deste trabalho visou o desenvolvimento de uma plataforma genossensora para a detecção *Mycobacterium tuberculosis* em amostras sintéticas.

A primeira fase deste desenvolvimento foi a modificação da superfície do eletrodo de trabalho do SPE pela eletropolimerização da L-lisina, produzindo um filme polimérico que serviu de suporte a imobilização do biorreceptor. VC e EIE foram capazes de diferenciar cada etapa do biossensor, bem como auxiliar nas escolhas de parâmetros da eletropolimerização, onde o filme que demonstrou um comportamento mais condutivo foi o gerado a partir da faixa de varredura de -2V a +2V (**59,3 $\mu$ A  $\pm$  8,5**) de corrente de pico anódico e com menor Rct (**4,86k $\Omega$   $\pm$  1,82**).

A imobilização da sonda é um fator crucial para o biossensor, por isso, neste estudo foram avaliadas a concentração da sdTB e o tempo de reação com a superfície. Desta forma, as condições ideais para o biossensor foram a concentração do biorreceptor de 10 $\mu$ M e o tempo de imobilização de 16h, que apresentaram maiores correntes (**11,0 $\mu$ A  $\pm$  1,27**), obtidos por VPD-MB. A caracterização da imobilização por EIE também foi de extrema importância para comprovar a imobilização de sonda de DNA, visto o aumento na Rct de **6,35k $\Omega$   $\pm$  0,82**, quando ativado, para **10,35k $\Omega$   $\pm$  0,7** quando imobilizado, indicando a ligação de sonda na superfície do eletrodo.

Apesar da distinção entre AC e ANC, comprovando a especificidade do genossensor, porém a etapa de hibridização ainda necessita de mais experimentos, devido à baixa reprodutibilidade, dificultando a diferenciação entre AC e ANC, bem como diferentes concentrações do AC. Nesse sentido, a utilização de bloqueadores de superfície como BSA (do inglês, *bovine serum albumin*), glicina e etanolamina podem reduzir problemas relacionados a ligações inespecíficas, melhorando a reprodutibilidade do sistema. Além disso, estudar condições de lavagem das etapas de construção do biossensor, melhorando sua eficiência na remoção de sondas e alvos adsorvidos inespecificamente na superfície do transdutor.

## REFERÊNCIAS

- ACHARYA, B. et al. Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of Mycobacterium tuberculosis. **Molecular biology reports**, v. 47, n. 5, p. 4065–4075, 1 maio 2020.
- ALBISHRI, H. M.; ABD EL-HADY, D. Hyphenation of enzyme/graphene oxide-ionic liquid/glassy carbon biosensors with anodic differential pulse stripping voltammetry for reliable determination of choline and acetylcholine in human serum. **Talanta**, v. 200, n. March, p. 107–114, 2019.
- BABAEI, A. et al. Genosensors as an alternative diagnostic sensing approaches for specific detection of virus species: A review of common techniques and outcomes. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 155, 2022.
- BEG, M. A. et al. Structural Prediction and Mutational Analysis of Rv3906c Gene of Mycobacterium tuberculosis H37Rv to Determine Its Essentiality in Survival. **Advances in Bioinformatics**, v. 2018, 2018.
- BEKMURZAYEVA, A. et al. Label-free fiber-optic spherical tip biosensor to enable picomolar-level detection of CD44 protein. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2021.
- BELL, L. C. K.; NOURSADEGHI, M. Pathogenesis of HIV-1 and mycobacterium tuberculosis co-infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 80–90, 2018.
- BEZERRA, G. et al. Electrochemical aptasensor for the detection of HER2 in human serum to assist in the diagnosis of early stage breast cancer. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, n. 25, p. 6667–6676, 2019.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública: estratégias para 2021-2025[internet]. Brasília:MS; [citado Jan 2024] ,1ª. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/tuberculose/plano-nacional-pelo-fim-da-tuberculose-como-problema-de-saude-publica\\_-estrategias-para-2021-2925.pdf/view](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/tuberculose/plano-nacional-pelo-fim-da-tuberculose-como-problema-de-saude-publica_-estrategias-para-2021-2925.pdf/view)
- CAMPOS-FERREIRA, Danielly S et al. Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16 detection in real samples. **Analytica Chimica acta**, v. 804, p. 258-263, 2013.
- CAMPOS-FERREIRA, D. S. et al. Electrochemical DNA biosensor for the detection of human papillomavirus E6 gene inserted in recombinant plasmid. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 443–450, 2016.
- CAO, X. J. et al. MPT64 assays for the rapid detection of Mycobacterium tuberculosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 1–15, 2021.
- CEPHEID. GeneXpert System [internet]. Califórnia, (EUA). [acesso em mar 2024]. Disponível em: <https://www.cepheid.com/en/about-us/about-cepheid>. Acesso em: dia mês ano.

COLE, S. T., et al (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, 393(6685), 537–544. doi:10.1038/31159

DALKIRAN, B., et al (2019). Disposable amperometric biosensor based on poly-L-lysine and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs-chitosan composite for the detection of tyramine in cheese. **Electroanalysis**, 31(7), 1324-1333.

DE CARVALHO, M. F. et al. Electroanalysis applied to compatibility and stability assays of drugs: Carvedilol study case. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 4, p. 1–11, 2020.

DELOGU, G.; SALI, M.; FADDA, G. THE BIOLOGY OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS INFECTION. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. e2013070–e2013070, 15 nov. 2013.

DING, J. et al. Fluorescence Detection of Cancer Stem Cell Markers Using a Sensitive Nano-Aptamer Sensor. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, n. June, p. 1–9, 2022.

DO NASCIMENTO, N. M. et al. Label-free piezoelectric biosensor for prognosis and diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 90, p. 166–173, 2017.

ELOI, P. et al. Toward a point-of-care diagnostic for specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum samples. **Tuberculosis**, v. 121, p. 101919, 2020.

FARAHANI, K. Z. et al. Potentiality of PARAFAC approaches for simultaneous determination of N-acetylcysteine and acetaminophen based on the second-order data obtained from differential pulse voltammetry. **Talanta**, v. 192, p. 439–447, 2019.

FARJAMI, E. et al. DNA interactions with a Methylene Blue redox indicator depend on the DNA length and are sequence specific. **Analyst**, v. 135, n. 6, p. 1443–1448, 2010.

FREY, Steven J et al. Surface-Immobilized Biomolecules. In: **Biomaterials Science**. Academic Press, 2020. p. 539-551.

GIGLI, V. et al. Novel Amperometric Biosensor Based on Tyrosinase/Chitosan Nanoparticles for Sensitive and Interference-Free Detection of Total Catecholamine. **Biosensors**, v. 12, n. 7, 2022.

GUPTA, S.; BHATTER, P.; KAKKAR, V. Point-of-care detection of tuberculosis using magnetoresistive biosensing chip. **Tuberculosis**, v. 127, n. June 2020, p. 102055, 2021.

HERSHKOVITZ, I. et al. Tuberculosis origin: The Neolithic scenario. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 95 Suppl 1, n. S1, p. S122–S126, 1 jun. 2015.

HOFFMANN, C. et al. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**

**America**, v. 105, n. 10, p. 3963–3967, 2008.

HONORATO CASTRO, A. C. et al. Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the hepatitis B virus. **Applied Surface Science**, v. 314, p. 273–279, 2014.

HUANG, S. Y. et al. Simultaneous detections of genetic fragment and single nucleotide mutation with a three-tiered output for tuberculosis diagnosis. **Analytica Chimica Acta**, v. 1007, p. 1–9, 2018.

HUERTAS, C. S. et al. Advanced Evanescent-Wave Optical Biosensors for the Detection of Nucleic Acids: An Analytic Perspective. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. October, p. 1–25, 2019.

JOSÉ JARA-PALACIOS, M. et al. Cyclic voltammetry to evaluate the antioxidant potential in winemaking by-products. **Talanta**, v. 165, n. December 2016, p. 211–215, 2017.

KATZ, E.; WILLNER, I. Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors. **Electroanalysis**, v. 15, n. 11, p. 913–947, 2003.

KHAN, M. Z. H et al. Ultrasensitive detection of pathogenic viruses with electrochemical biosensor: State of the art. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 166, p. 112431, 2020.

KULKARNI, M. B.; AYACHIT, N. H.; AMINABHAVI, T. M. Biosensors and Microfluidic Biosensors: From Fabrication to Application. **Biosensors**, v. 12, n. 7, 2022.

LABUDA, Jan et al. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n. 5, p. 1161-1187, 2010.

LASIA, A. Electrochemical impedance spectroscopy and its applications. **Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications**, v. 9781461489, n. November 2014, p. 1–367, 2014.

LÖNNROTH, K. et al. Drivers of tuberculosis epidemics: The role of risk factors and social determinants. **Social Science and Medicine**, v. 68, n. 12, p. 2240–2246, 2009.

LU, C. et al. Electrochemical detection and point-of-care testing for circulating tumor cells: Current techniques and future potentials. **Sensors (Switzerland)**, v. 20, n. 21, p. 1–28, 2020.

MAGAR, H. S.; HASSAN, R. Y. A.; MULCHANDANI, A. Electrochemical impedance spectroscopy (Eis): Principles, construction, and biosensing applications. **Sensors**, v. 21, n. 19, 2021.

MARCHLEWICZ, K. et al. Molecular diagnostic of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strain by DNA sensor potentially suitable for electrochemical point-of-care

diagnostic. **Talanta**, v. 227, n. November 2020, 2021.

MARTYNOV AV et al. TUBERCULOSIS AS AN INFECTIOUS PATHOLOGY OF IMMUNE SYSTEM. **Annals of Mechnikov Institute**, n. September, p. 8–14, 2016.

MCIVOR, A. et al. Supplementation of sputum cultures with culture filtrate to detect tuberculosis in a cross-sectional study of HIV-infected individuals. **Tuberculosis**, v. 129, p. 102103, 2021.

MOHY ELDIN, M. S. et al. Covalent immobilization of  $\beta$ -galactosidase onto amino-functionalized polyvinyl chloride microspheres: Enzyme immobilization and characterization. **Advances in Polymer Technology**, v. 33, n. 1, 2014.

MWABA, Peter et al. Advancing new diagnostic tests for latent tuberculosis infection due to multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*—End of the road?. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 92, p. S69-S71, 2020.

Mycobrowser. Rv2341 EUA [internet]. [acesso em mar 2024]. Disponível em: <https://mycobrowser.epfl.ch/genes/Rv2341>.

NARESH, Varnakavi et al. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. **Sensors**, v. 21, n. 4, p. 1109, 2021.

NASCIMENTO, Gustavo A et al. Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 38, n. 1, p. 61-66, 2012.

NATARANJAN, Arvind et al. A systematic review on tuberculosis. *Indian Journal of Tuberculosis*, v. 67, n. 3, p. 295-311, 2020. NURWIDYA, Fariz et al. Molecular diagnosis of tuberculosis. **Chonnam medical journal**, v. 54, n. 1, p. 1-9, 2018.

OBERHAUS, Franziska V et al. Immobilization techniques for aptamers on gold electrodes for the electrochemical detection of proteins: A review. **Biosensors**, v. 10, n. 5, p. 45, 2020.

OLIVEIRA, Natália 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.

OZKAN, D. et al. DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label. **Bioelectrochemistry**, v. 58, n. 1, p. 119–126, 2002.

PALOMINO, J. C. et al. Rapid culture-based methods for drug-resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, n. 2, p. 161–166, 2008.

PANIEL, N. et al. Aptasensor and genosensor methods for detection of microbes in real world samples. **Methods**, v. 64, n. 3, p. 229–240, 2013.

PILEVAR, M.; KIM, K. T.; LEE, W. H. Recent advances in biosensors for detecting viruses in water and wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 410, n.

November 2020, p. 124656, 2021.

POWER, A. C. et al. Carbon nanomaterials and their application to electrochemical sensors: A review. **Nanotechnology Reviews**, v. 7, n. 1, p. 19–41, 2018.

RASHID, Jahwarhar et al. The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review. **Sensing and bio-sensing research**, v. 16, p. 19-31, 2017.

REDDY, N.; REDDY, R.; JIANG, Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 6, p. 362–369, 2015.

RICHARD, Y. A. et al. Label-free electrochemical detection of cancer biomarkers DNA and anti-p53 at tin oxide quantum dot-gold-DNA nanoparticle modified electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 150, n. January, p. 108371, 2023.

RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747–1763, 2010.

RUBAB, M. et al. Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 105, n. January, p. 49–57, 2018.

SAKULA, A. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. **Thorax**, v. 37, n. 4, p. 246–251, 1982.

SANI, N. D. M. et al. An electrochemical DNA biosensor for carcinogenicity of anticancer compounds based on competition between methylene blue and oligonucleotides. **Sensors (Switzerland)**, v. 19, n. 23, 2019.

SINGH, B. et al. Electrochemical Biosensors for the Detection of Antibiotics in Milk: Recent Trends and Future Perspectives. **Biosensors**, v. 13, n. 9, 2023.

SOUZA, Elaine et al. Label-free electrochemical detection of the specific oligonucleotide sequence of dengue virus type 1 on pencil graphite electrodes. **Sensors**, v. 11, n. 6, p. 5616-5629, 2011.

STORTINI, A. M. et al. Bio-and biomimetic receptors for electrochemical sensing of heavy metal ions. **Sensors (Switzerland)**, v. 20, n. 23, p. 1–29, 2020.

SUN, W. et al. Electrochemical deoxyribonucleic acid biosensor based on carboxyl functionalized graphene oxide and poly-l-lysine modified electrode for the detection of *tlh* gene sequence related to *vibrio parahaemolyticus*. **Analytica Chimica Acta**, v. 752, p. 39–44, 2012.

TIEMERSMA, E. W. et al. Natural history of tuberculosis: Duration and fatality of untreated pulmonary tuberculosis in HIV negative patients: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

TRIPATHY, S. et al. Electrospun manganese (III) oxide nanofiber based electrochemical DNA-nanobiosensor for zeptomolar detection of dengue consensus primer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 90, n. December 2016, p. 378–387, 2017.

UÇAR, M. et al. Electrochemical reduction of 1-[[4-halophenyl]imino]methyl}-2-naphthols in aprotic media. **Analytical Sciences**, v. 20, n. 8, p. 1179–1183, 2004.

ULUDAG, Y. et al. An integrated lab-on-a-chip-based electrochemical biosensor for rapid and sensitive detection of cancer biomarkers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 27, p. 7775–7783, 2016.

UNAIDS, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. The path that ends AIDS: UNAIDS Global AIDS Update 2023 [internet]. Geneva: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS; 2023 [Acesso Jan 2024]. Disponível em: <https://www.unaids.org/en/resources/documents/2023/global-aids-update-2023>

VARDEVANYAN, P. O. et al. Mechanisms for binding between methylene blue and DNA. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 80, n. 4, p. 595–600, 1 set. 2013.

WANG, A. et al. A novel electrochemical enzyme biosensor for detection of 17 $\beta$ -estradiol by mediated electron-transfer system. **Talanta**, v. 192, n. June 2018, p. 478–485, 2019.

World Health Organization. Global tuberculosis report 2021 [internet]. Geneva: World Health Organization; 2021 [Acesso em Nov 2023]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>

World Health Organization. Global tuberculosis report 2023 [internet]. Geneva: World Health Organization; 2023 [Acesso em Jan 2024]. Disponível em: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023>

WU, C. C. et al. A label-free impedimetric genosensor for the nucleic acid amplification-free detection of extracted RNA of dengue virus. **Sensors (Switzerland)**, v. 20, n. 13, p. 1–15, 2020.

XU, J. et al. The synergy of chemical immobilization and electrical orientation of T4 bacteriophage on a micro electrochemical sensor for low-level viable bacteria detection via Differential Pulse Voltammetry. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 151, n. November 2019, p. 111914, 2020a.

XU, S. et al. One DNA circle capture probe with multiple target recognition domains for simultaneous electrochemical detection of miRNA-21 and miRNA-155. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 149, n. October 2019, p. 111848, 2020b.

ZOSKI, C. G. Handbook of electrochemistry. 1. Amsterdam. Elsevier, 2007.

ZUBER, B. et al. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 16, p. 5672–5680, 2008.