



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODO BIOSSENSÍVEL  
BASEADO EM POLIPIRROL E NANOESTRUTURAS DE  
GRAFENO PARA O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE HPV**

**LUIZA GABRIELLE TAVARES DOS SANTOS**

**RECIFE  
2025**

**LUIZA GABRIELLE TAVARES DOS SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODO BIOSSENSÍVEL  
BASEADO EM POLIPIRROL E NANOESTRUTURAS DE  
GRAFENO PARA O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE HPV**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Danielly  
Lima de Oliveira**

**Coorientadores: Prof. Dr. César  
Augusto Souza de Andrade**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karen Yasmim Pereira dos  
Santos Avelino**

**RECIFE  
2025**

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Santos, Luiza Gabrielle Tavares Dos.

Desenvolvimento de eletrodo biossensível baseado em polipirrol e nanoestruturas de grafeno para o diagnóstico diferencial de HPV / Luiza Gabrielle Tavares Dos Santos. - Recife, 2025.

137f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2025.

Orientação: Maria Danielly Lima de Oliveira.

Coorientação: César Augusto Souza de Andrade.

Coorientação: Karen Yasmim Pereira dos Santos Avelino.

Inclui referências.

1. Biossensor; 2. Diagnóstico; 3. Papilomavírus humano; 4. Pontos quânticos de grafeno; 5. Voltametria cíclica. I. Oliveira, Maria Danielly Lima de. II. Andrade, César Augusto Souza de. III. Avelino, Karen Yasmim Pereira dos Santos. IV. Título.

UFPE-Biblioteca Central

LUIZA GABRIELLE TAVARES DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE ELETRODO BIOSSENSÍVEL BASEADO EM  
POLIPIRROL E NANOESTRUTURAS DE GRAFENO PARA O  
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE HPV

Dissertação apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Danielly Lima de Oliveira (Presidente)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Alberto Galdino da Silva Júnior  
Universidade Federal de Pernambuco

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Aos meus pais, ao meu irmão, ao meu avô e a todos da minha família,  
dedico.

## AGRADECIMENTOS

Ao Maravilhoso, Majestoso, Conselheiro, Abrigo, Inigualável, Gracioso, Melhor amigo, meu alento nos momentos de aflição e companheiro na felicidade: Jesus. Dono do universo e do meu coração. Gratidão a Ti, Senhor, pelo respirar e por me dar o vigor necessário para correr atrás dos meus objetivos. Sem Tua presença em minha vida, nada conseguiria realizar.

Aos meus pais, Léa e Aldo. Mainha, pelo exemplo de fé, perseverança, amor, compreensão e incentivo. Painho, pelo ensino, cuidado, trabalho duro e esforço. Ao ser que me atazana desde o primeiro respirar, meu irmão, Thiago. Minha parceria para vida toda. Sou grata pelo apoio e incentivo, mesmo diante de tantas circunstâncias difíceis, e por acreditarem em mim.

A família Tavares, minhas tias, primas e madrinha. Por todo incentivo, carinho, apoio e compreensão nas minhas ausências nas festas familiares. Em especial, ao meu avô, Luiz Tavares, que sempre com muita humildade e compaixão nunca mediu esforços para o meu crescimento e foi fonte inexplicável de inspiração para mim.

À minha avó, Zulmira (*in memoriam*), por, de forma tão ímpar, ter passado ensinamentos tão singulares que carregarei comigo eternamente, deixando o seu legado por ser uma mulher tão guerreira, sábia e cheia de fé. Saudades eternas, Vó!

Aos meus amigos mais próximos, Adrian, Bruna, Ellen, Camila, Jailton, Karine, Vitória, Ricardo e João Henrique que, mesmo que de longe, me apoiaram desde o início e vibraram com as conquistas ao meu lado. Amo vocês!

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Maria Danielly e ao Prof. Dr. César Andrade. Vocês têm a minha admiração e foram importantíssimos na minha vida profissional e pessoal, sempre através de bons ensinamentos. A Profa. Danielly por ter acreditado no meu potencial e me incentivado a buscar novos caminhos e ultrapassar limites. Orientando com extrema sensatez, ética, elegância e bondade, transbordando sabedoria e experiência. Prof. César, obrigado por ter aberto as portas do BioNano para mim. Sua atitude foi fundamental para que eu pudesse estar findando essa etapa, sou imensamente grata, tenho um grande apreço e o considero uma mente brilhante e de sabedoria sem igual. Serei eternamente grata a vocês pelos conselhos, ensinamentos, oportunidade e confiança.

Aos meus companheiros de laboratório, imprescindíveis para o alívio do fardo da pesquisa e responsáveis por deixar mais leve uma rotina que é tão árdua através dos nossos momentos de descontração. Agradeço imensamente a Vitória, Sthefany, Antônio, San Miris, Raiza, Brenda, Heloisa e Beatriz. Em especial, agradeço a Alberto por ter me acolhido, ensinando pacientemente, se dedicado junto a mim ao desenvolvimento dessa pesquisa e por me ensinar valores imprescindíveis, não tenho palavras suficientes para agradecê-lo (apesar de nossos temperamentos ímpares conseguimos não nos matar, risos). Agradeço também a Maurília, carinhosamente chamada de mãe Maurília (risos), obrigada pela paciência, amor, compreensão e por sempre me orientar de forma doce e amigável.

À Profa. Dra. Norma Lucena do Laboratório de Imunogenética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz pela importante colaboração e gentileza no fornecimento das amostras de HPV.

À FACEPE pelo fomento na pesquisa e apoio financeiro.

A todos os professores que tive a honra de estudar, minha gratidão pela presteza e conhecimentos passados. E também a todos os funcionários do Departamento de Bioquímica e do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia pela educação, gentileza, compreensão e por serem tão prestativos.

“<sup>1</sup>Ora, a fé é o firme fundamento das coisas que se esperam, e a prova das coisas que não se veem.  
<sup>2</sup>Porque por ela os antigos alcançaram bom testemunho.  
<sup>3</sup>Pela fé entendemos que os mundos foram criados pela palavra de Deus; de modo que o visível não foi feito daquilo que se vê.”

Hebreus 11:1-3

## RESUMO

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é uma das Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST's) mais frequentes no mundo. O HPV é um vírus de DNA não envelopado que possui mais de 200 genótipos catalogados divididos em genótipos de alto e baixo risco oncogênico. A frequente infecção pelo HPV pode desencadear o câncer de colo uterino e a utilização de novos mecanismos de diagnóstico podem ser atrativos para o melhor rastreio desse processo oncogênico. Nesse sentido, objetivou-se construir eletrodos biossensíveis baseados em polipirrol (PPy) e pontos quânticos de grafeno (GQDs) para o diagnóstico diferencial de HPV. Inicialmente foi utilizado um eletrodo convencional de ouro, no qual foi realizada a eletropolimerização do polímero condutor pirrol e, posteriormente, para a obtenção dos grupos carboxílicos necessários, à adsorção dos pontos quânticos de grafeno. Em seguida, a sonda de oligonucleotídeos aminada MY09 foi imobilizada por meio da ligação covalente aos GQDs. O bloqueio dos sítios ativos livres e inespecíficos foi realizado pela albumina do soro bovino (BSA), logo em seguida, amostras contendo HPV de alto (HPV16, 18, 31, 58) risco oncogênico foram testadas para observação dos eventos de reconhecimento e hibridização através de plasmídeos recombinantes contendo o gene L1 do capsídeo viral. Técnicas eletroanalíticas, como a voltametria cíclica e análises topográficas, através microscopia de força atômica, foram realizadas na caracterização do sistema sensor. Através da nanoestruturação da plataforma sensora, foi possível observar a assertiva estabilidade do sistema em cada etapa de construção, sendo a mesma reprodutível e apresentando perfis de respostas eletroquímicas expressando diferentes padrões para os diferentes genótipos de HPV testados. As alterações da superfície sensora observadas topograficamente por microscopia de força atômica comprovaram aspectos de rugosidade característicos em cada etapa da nanoestrutura, bem como as análises de FTIR e UV-Vis demonstraram as diferentes interações químicas ocorridas a partir dos do PPy e GQDs. Dessa forma, os protótipos foram capazes de identificar a presença do HPV em quantidades ínfimas, de 2 $\mu$ L, em diferentes concentrações, de 1pg/ $\mu$ L<sup>-1</sup> a 75pg/ $\mu$ L<sup>-1</sup>, por meio de rápidas respostas analíticas que foram obtidas através de um tempo de 5 minutos de análise. Portanto, o sensor proposto foi capaz de identificar os diferentes tipos de HPV em amostras plasmidiais e de cDNA.

**Palavras-chave:** Biossensor; Diagnóstico; Papilomavírus humano; Pirrol; Pontos quânticos de grafeno; Voltametria cíclica.

## ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) infection is one of the most common sexually transmitted infections (STIs) in the world. HPV is a non-enveloped DNA virus with more than 200 cataloged genotypes divided into high and low oncogenic risk genotypes. Frequent HPV infection can trigger cervical cancer and the use of new diagnostic mechanisms may be attractive for better screening of this oncogenic process. In this sense, the objective was to build biosensitive electrodes based on polypyrrole (PPy) and graphene quantum dots (GQDs) for the differential diagnosis of HPV. Initially, a conventional gold electrode was used, in which the electropolymerization of the conductive polymer pyrrole was performed and, subsequently, to obtain the necessary carboxylic groups, for the adsorption of graphene quantum dots. Then, the aminated oligonucleotide probe MY09 was immobilized by covalent binding to GQDs. The free and nonspecific active sites were blocked by bovine serum albumin (BSA). Then, samples containing high-risk HPV (HPV16, 18, 31, 58) were tested to observe recognition and hybridization events through recombinant plasmids containing the L1 gene of the viral capsid. Electroanalytical techniques, such as cyclic voltammetry and topographic analysis, through atomic force microscopy, were performed to characterize the sensor system. Through the nanostructuring of the sensor platform, it was possible to observe the assertive stability of the system at each construction stage, which was reproducible and presented electrochemical response profiles expressing different patterns for the different HPV genotypes tested. The changes in the sensor surface observed topographically by atomic force microscopy confirmed characteristic roughness aspects in each stage of the nanostructure, and the FTIR and UV-Vis analyses demonstrated the different chemical interactions that occurred from PPy and GQDs. Thus, the prototypes were able to identify the presence of HPV in tiny amounts, from 2 $\mu$ L, in different concentrations, from 1pg/ $\mu$ L-1 to 75pg/ $\mu$ L-1, through rapid analytical responses that were obtained through a 5-minute analysis time. Therefore, the proposed sensor was able to identify the different types of HPV in plasmid and cDNA samples.

**Keywords:** Biosensor; Diagnostics; Human papillomavirus; Pyrrole; Graphene quantum dots; Cyclic voltammetry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diversidade da árvore filogenética do papilomavírus.....	21
Figura 2 - Organização típica do genoma do papilomavírus humano.....	22
Figura 3 - Estruturas em que o HPV pode desencadear processos cancerígenos.	29
Figura 4 - Esquema da infecção pelo HPV através do tecido cervical.....	30
Figura 5 - Metodologias convencionais de diagnóstico de HPV.....	31
Figura 6 - Escala manométrica.....	36
Figura 7 - Principais avanços no desenvolvimento de biossensores ao longo dos anos.....	37
Figura 8 - Principais componentes de um biossensor.....	38
Figura 9 - Representação ilustrativa de célula eletroquímica com sistema de três eletrodos: eletrodo de referência, eletrodo de trabalho e contra eletrodo.....	42
Figura 10 - Representação de componentes de um sistema eletroquímico e as principais técnicas empregadas, consistindo em voltametria cíclica (a), voltametria de pulso diferencial (b), voltametria de onda quadrada (c) e espectroscopia de impedância eletroquímica.....	43
Figura 11 - Classificação dos principais biossensores eletroquímicos de acordo com o biorreceptor.....	45
Figura 12 - Métodos de imobilização de biomoléculas. ....	46
Figura 13 - Dupla-fita de DNA, o emparelhamento das bases, a representação da regra de Chargaff e estrutura química dos nucleotídeos.....	50
Figura 14 - Mecanismos de imobilização da sonda de DNA.....	52
Figura 15 - Estrutura química de alguns polímeros condutores utilizados em processos eletroquímicos.....	54
Figura 16 - Mecanismo de Eletropolimerização do PPy.....	56
Figura 17 - Formas dos diferentes alótropos do carbono.....	57
Figura 18 - Abordagens top-down e bottom-up para a síntese dos GQDs.....	63
Figura 19 - A forma de aplicação do potencial e o voltamograma obtido por voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada .....	65
Figura 20 - Exemplo de um voltamograma cíclico clássico obtido a partir de análises eletroquímicas.....	67
Figura 21 - Representação geral do gráfico Nyquist (a), gráfico impedimétrico de sistema com resistência zero (b) e circuito equivalente de Randles (c).....	70
Figura 22 - Representação esquemática do mecanismo de funcionamento da espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier.....	73
Figura 23 - Representação ilustrativa do processo de funcionamento de um microscópio de força atômica.....	75
Figura 24 - Representação esquemática do mecanismo de funcionamento da espectroscopia de UV Visível - UV/Vis.....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Requisitos necessários para o desenvolvimento de um biossensor altamente eficaz e capaz.....	38
Tabela 2 – Elementos comumente encontrados no circuito elétrico e a respectiva interpretação física.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ab-Ag	Antígeno-anticorpo
ASC-H	do inglês, <i>Atypical Squamous Cells, HSIL cannot be excluded</i>
ASC-US	do inglês, <i>Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance</i>
AFM	do inglês, <i>atomic force microscopy</i>
ASCCP	do inglês, <i>American Society for Colposcopy and Cervical Pathology</i>
BSA	Albumina de soro bovino
CA	Corrente Alternada
CCU	Câncer de colo de útero
Cdl	Capacitância de dupla camada elétrica
CNFs	Nanofitas de carbono
CNTs	Nanotubos de Carbono
DCE	Dupla camada elétrica
dsDNA	do inglês, <i>double-stranded DNA</i>
E	do inglês, <i>early</i>
E	Potencial
EC	Esfregaço cervical
EDC	1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
f	Frequência
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
GQDs	do inglês, <i>graphene quantum dots</i>
GO	Óxido de grafeno
GOx	Glicose oxidase
GR	Grafeno
HPV	Papilomavírus Humano
HRM	do inglês, <i>high resolution melt</i>
HSIL	do inglês, <i>high-grade squamous intraepithelial lesion</i>
I	Corrente
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
If	Corrente do processo faradaico
I <sub>p</sub>	Corrente de pico
I <sub>pa</sub>	Corrente de pico anódica
I <sub>pc</sub>	Corrente de pico catódica
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
L	do inglês, <i>late</i>
LCR	do inglês, <i>long control region</i>
LOC	do inglês, <i>Lab-on-chip</i>
LOD	Limite de detecção
LSIL	do inglês, <i>low-grade squamous intraepithelial lesion</i>
ne <sup>-</sup>	Número de elétrons
NHS	N-hidroxisuccinimida
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NIC 2	Neoplasia Intraepitelial Cervical 2
NIC 3	Neoplasia Intraepitelial Cervical 3
nm	Nanômetros
O	Forma oxidada
ORF	do inglês, <i>open reading frame</i>

OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PNI	Programa Nacional de Imunizações
PPy	Pirrol
Q	Carga
R	Forma reduzida
rGO	Óxido de grafeno reduzido
Rct	Resistência à transferência de carga
Rp	Resistência de polarização
Rs	Resistência da solução eletrolítica
ssDNA	DNA de cadeia simples
SERS	do inglês, <i>surface-enhanced Raman scattering</i>
SI	Sistema imune
SPR	do inglês, <i>surface plasmon resonance</i>
STM	do inglês, <i>scanning tunneling microscope</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TME	do inglês, <i>tumor microenvironment</i>
UV-vis	Espectroscopia UV/visível
V	Potencial Aplicado
VC	Voltametria Cíclica
VLPs	do inglês, <i>virus like particles</i>
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
Z	Impedância
Z'	Eixo real da impedância
Z''	Eixo Imaginário da Impedância

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
<b>2.1 Papilomavírus Humano.....</b>	<b>19</b>
2.1.1 Fatores Históricos.....	19
2.1.2 Taxonomia do Vírus.....	20
2.1.3 Genoma do HPV.....	21
2.1.4 Ciclo de vida do HPV.....	23
2.2 Fisiopatologia da infecção por Papilomavírus Humano.....	24
2.2.1 Epidemiologia do Contágio.....	25
2.3 Formas de Prevenção.....	26
2.3.1 Vacinas e Adesão Vacinal.....	27
2.4 Carcinogênese mediada por HPV.....	28
2.4.1 Rastreamento do Câncer de Colo Útero.....	30
2.5 Metodologias Convencionais de Diagnóstico da Infecção pelo HPV.....	31
2.5.1 Papanicolau.....	32
2.5.2 Colposcopia.....	32
2.5.3 Biologia Molecular.....	33
2.6 Nanotecnologia e dispositivos inovadores para diagnóstico clínico.....	35
<b>2.6.1 Biossensores.....</b>	<b>36</b>
2.6.1.2 Aplicações dos Biossensores em Diagnósticos.....	39
<b>2.6.2 Eletroquímicos.....</b>	<b>41</b>
2.6.3 Classificação dos Biossensores Eletroquímicos de acordo com o mecanismo de biorrecepção.....	45
<b>2.6.3.1 Genossensores.....</b>	<b>49</b>
2.7 Materiais Utilizados na Construção de Biossensores Eletroquímicos.....	52
2.7.1 Polímeros Condutores.....	53
<b>2.7.1.1 Pirrol.....</b>	<b>55</b>
2.7.2 Alótropos de Carbono.....	56
<b>2.8 Grafeno.....</b>	<b>58</b>
<b>2.8.1 Pontos Quânticos de Grafeno.....</b>	<b>60</b>
2.8.1.2 Pontos quânticos de grafeno aplicados em biossensores eletroquímicos..	62
2.8.1.3 Principais métodos de síntese dos pontos quânticos de grafeno.....	63
2.9 Técnicas de Caracterização Analítica de Eletrodos Modificados.....	64
2.9.1 Voltametria.....	65
<b>2.9.1.1 Voltametria Cíclica.....</b>	<b>66</b>
2.9.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	69
2.9.3 Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier – FTIR.....	72
<b>2.9.4 Microscopia de Força Atômica – AFM.....</b>	<b>74</b>
2.9.5 Espectroscopia UV Visível - UV/Vis.....	76

3. OBJETIVOS.....	77
3.1. Geral.....	77
3.2. Específicos.....	77
4. ARTIGO 1 - NANOSTRUCTURED GENOSENSOR PLATFORM BASED ON POLYPYRROLE FILM AND GRAPHENE QUANTUM DOTS FOR THE DETECTION OF HIGH-RISK HPV.....	79
5. CONCLUSÃO.....	116
6. REFERÊNCIAS.....	117

## 1. INTRODUÇÃO

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus sexualmente transmissível que possui um genoma de DNA circular, com cerca de 8 mil pares de bases. A infecção sexual pelo HPV é considerada uma das mais frequentes em todo o mundo, podendo variar em números de acordo com o grupo etário e a população (Podgorski et al., 2019; Glehn et al., 2023). A propagação do vírus se dá através do contato direto entre o epitélio e a mucosa, mas o acometimento pelo HPV também pode ocorrer através da via vertical, mesmo em menor incidência, devido a auto inoculação ou a utilização de objetos contaminados (Calumby et al., 2020; Padilha et al., 2022).

O HPV tem notável tropismo por determinados epitélios, o caracterizando com um vírus epiteliotrópico. O sistema imune pode reagir de forma inibitória, mesmo a ação do vírus sendo mantida de forma persistente por um período longo, estendendo-se a anos e sendo capaz de desencadear lesões precursoras e câncer (Martins; Fridman; Magno, 2021).

Assim, sabe-se que mais de 200 tipos diferentes do HPV já foram identificados e classificados de acordo com a sua oncogenicidade, ou seja, da capacidade do tipo viral desencadear à transformação neoplásica das células (Monteiro et al., 2019). Dentre os genótipos do vírus HPV já catalogados, 40 deles estão relacionados com infecções do epitélio do trato anogenital e, a depender da capacidade imunológica do hospedeiro e do potencial oncogênico viral, a resposta imune pode ser suficiente para controlar a infecção (Costa, 2019).

Sendo assim, o HPV é classificado em HPV de alto e baixo riscos oncogênico e, somado a isto, cada tipo é denominado por um número, os tipos 6, 11, 42, 43 e 44 são considerados genótipos de baixo risco oncogênico, enquanto os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 70, de alto risco (Sá; Colombo, 2018; Pereira et al., 2021). Devido às semelhanças morfológicas encontradas no epitélio orofaríngeo e genital, a infecção pelo HPV também pode desencadear processos neoplásicos não apenas nas estruturas anogenitais, mas também na faringe, nasofaringe e laringe (Melo et al., 2021). Dentre os classificados como de alto risco oncogênico, o HPV do tipo 16 é datado como o mais carcinogênico, enquanto o HPV 18 é o responsável em causar uma maior proporção dos casos de cânceres (Meneses, 2021).

A grande maioria dos casos de câncer de colo uterino (CCU) tem como desencadeador principal a infecção pelo papilomavírus humano. Observa-se que 530 mil casos por ano são identificados (Zerlotti et al., 2018). Contudo, alguns genótipos, segundo os achados clínicos, não promovem a progressão para malignidade, apenas condilomas genitais e papilomas laríngeos são constatados, destacando-se os genótipos de baixo risco (Calumby et al., 2020).

A frequente persistência das múltiplas infecções pelo HPV é o principal fator para o câncer no trato genital inferior feminino. O CCU é caracterizado como um problema de saúde pública e o rastreamento é realizado no Brasil por meio da citologia oncótica. O diagnóstico da infecção é realizado habitualmente por métodos já estabelecidos como exames citopatológicos, colpocitologia oncótica do colo do útero e testes de DNA (Oliveira et al., 2021).

Com o avanço dos estudos biotecnológicos, novas metodologias de diagnóstico das infecções virais são incentivadas. Com essa percepção, o emprego da nanotecnologia em diagnósticos clínicos promove o desenvolvimento e aprimoração dos métodos de diagnóstico, como tecnologias portáteis (*point-of-care*) e vestíveis (Qin et al., 2022). Dispositivos, como os biossensores, permitem a simplificação, aceleração na testagem dos pacientes e descentralização do atendimento. Esses dispositivos expressam baixo custo, precisão, confiabilidade, miniaturização, e novos materiais funcionais são empregados visando o aperfeiçoamento científico-tecnológico desses dispositivos (Oliveira; Martinez; Fazzio, 2022).

Do ponto de vista inovador e tecnológico, nos biossensores eletroquímicos baseados em DNA, também denominados de genossensores, a reação do processo consiste na produção de uma corrente reativa devido aos eventos de complementaridade das bases nitrogenadas e identificação. Ou seja, se referem a reações de hibridização entre sequências de nucleotídeos complementares, sob um potencial regulado. Os genossensores são construídos através da funcionalização da superfície do eletrodo de trabalho com diversos compostos, tais como biopolímeros, nanopartículas metálicas e alótropos de carbono (Eskiköy Bayrakepe; Yildiz; Yazan, 2023; Garcia-Melo et al., 2024).

A combinação de polímeros condutores, como o polipirrol (PPy), com alótropos de carbono, especificamente os pontos quânticos de grafeno, potencializa

a performance dos sistemas de biossensoriamento, graças a processos relevantes de transferência de carga entre esses materiais, aprimorando a detecção do analito. A nanoestruturação da fase polimérica provoca um crescimento notável no fluxo de íons na interface, associado aos pontos quânticos de grafeno, que são derivados do grafeno com hibridização sp<sup>2</sup>, tornando-o um material regular e mais reativo (Wilczewska et al., 2022).

No presente trabalho, foi desenvolvida uma plataforma sensora nanoestruturada tomando como base um eletrodo convencional de ouro com eletropolimerização do polímero condutor pirrol PPy e adsorção dos GQDs, preparado a partir da pirólise do ácido cítrico, que forneceu os grupos carboxílicos importantes para a imobilização da sonda de oligonucleotídeos degenerada MY09 visando a detecção dos genótipos de HPV de alto e baixo risco oncogênico.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Papilomavírus Humano**

#### **2.1.1 Fatores Históricos**

Por volta de 1907, Ciuffo fez a observação de um filtrado celular de uma verruga e analisou a progressão de uma possível infecção. A compreensão sobre verrugas cutâneas infecciosas já havia sido relatada em estudos anteriores de Payne (1891) e Jadassohn (1896). Desde o período da Grécia Antiga, as verrugas já eram condições conhecidas, mas somente a partir dos estudos citados houveram buscas para a compreensão de outras características da infecção. Os avanços nas pesquisas demonstraram a primeira associação do “vírus da verruga humana” às verrugas laríngeas, seguindo-se pela publicação, em 1942, por Parsons e Kidd, da doença viral papilomatose oral de coelhos (Syrjänen; Rautava; Syrjänen, 2017).

Os estudos evidenciaram aspectos que, posteriormente, seriam classificados como período de latência viral. Na década de 1940, pesquisadores descreveram a morfologia expressa pelas células citológicas de “células em halo”. Perspectivas frente à compreensão de tais achados, indicaram a presença de coilocitose como evidência de infecção viral, conduzindo a observação de efeitos citopáticos a partir de um vírus na microscopia óptica (Jenson et al., 1982; Kashima et al., 1988; Mckay et al., 2005).

Através das investigações, descobriu-se que os papilomas que acometiam os coelhos, podiam ser transmitidos entre coelhos selvagens e domésticos, e observou-se que o agente desses papilomas era um vírus que, semelhantemente, podia infectar bois, cachorros e o homem, denominando-o de papilomavírus. Evoluções em procedimentos laboratoriais e microscopia eletrônica permitiram a observação das semelhanças entre amostras e, na década de 1950, o Papilomavírus Humano – HPV – foi identificado por Strauss e colaboradores como agente causador das verrugas (Camara et al., 2003; De Oliveira; Pessoa, 2018).

A concepção de que o HPV estaria relacionado com o câncer de colo uterino (CCU) surgiu a partir do virologista e pesquisador Harald zur Hausen, na década de 1980, que obteve seus esforços reconhecidos ganhando o Prêmio Nobel da Medicina, em 2008. A partir da associação com o câncer de colo uterino, estudos clínicos objetivando o desenvolvimento de vacinas profiláticas foram desenvolvidos corroborando como medida de prevenção de verrugas genitais e de lesões precursoras do câncer de colo de útero (Harlan; Berntein; Kessler, 1991; McIntyre, 2005; Hammes; Naud; Matos, 2008).

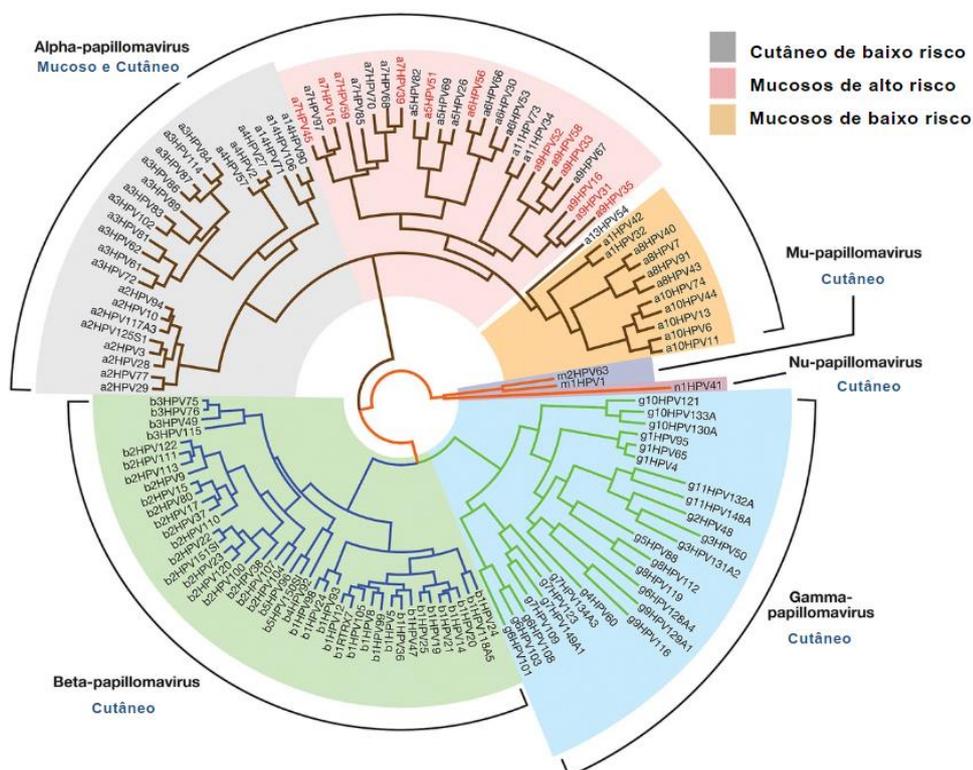
### **2.1.2 Taxonomia do Vírus**

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, do inglês, *International Committee on Taxonomy of Viruses*), o HPV pertence à família *Papillomaviridae*, incluso no grupo de vírus de DNA circular (dsDNA) (Costa, 2019). A família *Papillomaviridae* abrange 16 gêneros englobando um vasto grupamento de espécies hospedeiras, compreendendo peixes, aves, répteis e mamíferos. (Della Fera et al., 2021). Os 16 gêneros são designados por uma letra grega, sendo os principais como *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Deltapapillomavírus*, *Lambdapapillomavírus*, *Etapapillomavírus*, *Thetapapillomavírus* e *Dyoepsilonpapillomavírus* (Figura 1) (Bernard, 2005; Entiauspe et al., 2006; Bernard, 2013).

Proveniente do latim *papila*, que significa o diminutivo de *papula*, projeção, e *oma*, essa era a denominação utilizada pelos médicos da Grécia Antiga para nomear as tumefações. O termo papilomavírus é designado a espécie que ele acomete através de uma nomenclatura binominal, sendo, em inglês, *Human papillomavirus*, *Bovine papillomavirus*, *Cottonnail rabbit papillomavirus*, *Canine papillomavirus*,

*Ovine papillomavirus*, *European elk papillomavirus* e *Deer papillomavirus* (Camara et al., 2003).

**Figura 1** - Diversidade da árvore filogenética do papilomavírus.



Fonte: Adaptado de Doorbar et al., 2018.

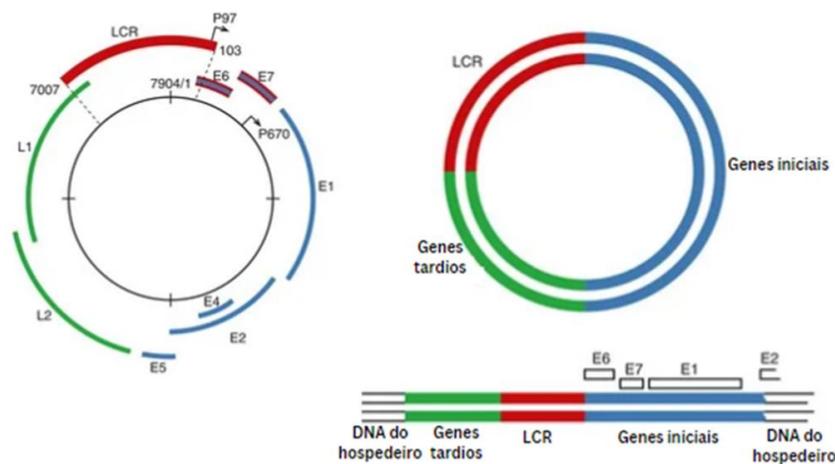
A classificação do HPV é baseada no próprio genoma viral. Esse genoma é categorizado em diferentes tipos e subtipos de acordo com sequências específicas de nucleotídeos presentes no gene L1 dos diferentes HPVs (Camara et al., 2003; Muhr; Eklund; Dillner, 2021). Para que um tipo de HPV seja definido, é necessário que haja uma diferença de, pelo menos, 10% na sequência do gene (de Villiers et al., 2004). Os ramos filogenéticos principais e secundários da árvore são representações dos gêneros e espécies, respectivamente (Van Doorslaer et al., 2018).

### 2.1.3 Genoma do HPV

O HPV caracteriza-se por ser um vírus não envelopado, com 55 nanômetros (nm) de diâmetro, de forma icosaédrica e que possui 72 capsômeros. O genoma do HPV pode ser descrito por meio de uma divisão em três regiões, uma codificante e duas não codificantes (Figura 2). A região não codificante controla a replicação e a

transcrição viral, enquanto que a região codificante codifica as proteínas virais (Della Fera et al., 2021). A partícula viral é então segmentada em três regiões básicas: tardia (L, do inglês, *late*), quadro de leitura aberto (ORF, do inglês, *open reading frame*) composto pelo grupo de proteínas E (E, do inglês, *early*) e longo controle (LCR, do inglês, *log control region*). O vírus se integra ao genoma humano durante o processo de replicação por meio do "rolling circle" (Monteiro et al., 2019; Shi-Yu et al., 2024).

**Figura 2** - Organização típica do genoma do papilomavírus humano.



Fonte: Adaptado de Syrjanen, 2018.

As proteínas E1 e E2 são importantes para o vírus devido a função de replicação do DNA viral. Enquanto que as proteínas L1 e L2 são primordiais para a construção do vírion. Genes acessórios, como E4, E5, E6 e E7, podem estar envolvidos na ação do vírus no hospedeiro, desencadeando processos de modificação gerando um ambiente que favoreça a resposta imune de escape e a replicação do genoma no epitélio em diferenciação. Facilitando assim, a permanência e sobrevivência do vírus no epitélio, em virtude da oportunização da evasão das respostas imunes inatas e da formação de um ambiente conveniente para a replicação do DNA viral (Della Fera et al., 2021; Warowicka et al., 2022).

A capacidade de inserção de fragmentos do DNA viral nas células do hospedeiro se caracteriza com um agravo para o potencial oncogênico do vírus. A inserção desencadeia na célula a desativação de funções primordiais, como a ação de genes supressores de tumor e, em consequência disso, há a transformação celular através das alterações em seu metabolismo, apoptose, regulação da proliferação e estabilidade genética (Melo et al., 2019).

#### 2.1.4 Ciclo de vida do HPV

Microtraumas na pele favorecem a entrada do vírus nas camadas basais do epitélio (Warowicka et al., 2022). E para o desenvolvimento do ciclo de vida viral no hospedeiro, o acesso das partículas virais, composta pelo DNA viral, à lâmina basal necessita de uma relação de interatividade com proteoglicanos de sulfato de heparina da membrana basal. No entanto, fatores externos como hormônios e citocinas também podem influenciar na conclusão ou não do ciclo de vida viral (Doobar et al., 2012).

Somente em células mitoticamente ativas a produção de alguns fatores de replicação e polimerases de DNA do vírus conseguem ser realizados. Nesse sentido, para burlar a maquinaria celular, o ciclo de vida viral apresenta estratégias a partir da codificação de proteínas não estruturais, E1 a E8, que alteram o metabolismo celular normal inibindo a apoptose natural da célula e retardando o processo de distinção do queratócito infectado, tornando-o favorável a replicação (Pinidis et al., 2016; Mac; Moody, 2020).

Os queratócitos basais são utilizados para a internalização da partícula viral e transferência do genoma. Facilitando, assim, a formação de um complexo proteico, L2-DNA, que assegura a entrada dos genomas virais no núcleo (Marusic et al., 2012; Schelhaas et al., 2012). O gene L2 é exposto devido a uma exposição do mesmo pelo capsídeo viral, então ele sofre um processo de clivagem, no qual, o sítio de ligação irá se unir à superfície dos queratócitos. Garantindo uma exposição mais acessível do receptor celular em L1 e, assim, através do gene L1, o vírus consegue se ligar ao receptor celular, facilitando sua entrada na célula, posteriormente, a proteína L1 será submetida à digestão nos lisossomos após ser retida no endossomo (Pinidis et al., 2016).

O genoma é amplificado e há a continuação do elemento extracromossômico, o epissoma viral, em poucos números de cópias. As proteínas de replicação viral começam então a realizar a regulação da transcrição, em específico a proteína E2, que oferece vários sítios de ligação à região LCR viral em associação com o gene E1 para a replicação do DNA (Doobar et al., 2012). A proteína E4 promove a indução de recombinações do citoesqueleto. Além disso, os potentes oncogenes E6 e E7 são expressos de forma descontrolada em conformidade com a amplificação

do número de cópias se estendendo a milhares de réplicas por célula, devido a replicação do DNA viral (Korzeniewski et al., 2011; Stanley, 2012).

O gene E6, apresentado nos HPVs de alto risco oncogênico, tem como função realizar a ubiquitinação da proteína p53, importante para o reparo de danos ao DNA celular. Enquanto o gene E7, também expresso pelos HPVs de alto risco oncogênico, substitui pontos de verificação do ciclo celular, em particular G1/S (Gadducci; Guerrieri; Greco, 2013; Ramshankar; Krishnamurthy, 2013). A associação desses acontecimentos viabiliza a replicação do DNA viral e suprime a verificação do ciclo celular favorecendo o descontrole da célula infectada acarretando em um crescimento desordenado e, como consequência, o desenvolvimento do câncer (Pinidis et al., 2016).

## **2.2 Fisiopatologia da infecção por Papilomavírus Humano**

O vírus possui uma afinidade pelo trato anogenital e a regressão, progressão e persistência da infecção viral estão atreladas aos mecanismos imunogênicos, genéticos, comportamento sexual e estilo de vida dos pacientes (Calumby et al., 2020; Cavalcante et al., 2021).

A atuação viral no hospedeiro pode se dar de duas formas distintas, sendo ela episossomal e integrada ao DNA do hospedeiro. Na forma episossomal, se caracteriza como um mecanismo de produção de cópias virais, enquanto na forma integrada ao DNA do hospedeiro, observa-se, em combinação com outros cofatores, o estabelecimento do processo de oncogênese. Microfissuras no epitélio são preponderantes para a penetração do HPV no epitélio, possibilitando o alcance de células das camadas profundas, infectando-as. A propagação para células vizinhas e permanência latente por um período de tempo indeterminado contribuem para o estabelecimento do vírus na maturação e diferenciação das sucessivas camadas epiteliais. Posteriormente, os anticorpos serão capazes de inativar o HPV havendo o bloqueio do processo inflamatório celular epitelial pelo vírus (Martins; Fridman; Magno, 2021).

A invasão celular e a progressão para câncer sucedem a infecção pelo HPV e é seguida pela persistência do vírus no epitélio. Na maior parte dos casos, a infecção é assintomática e, em mais de 90% dos casos, há a eliminação de forma espontânea pelo corpo, visto que, estimativas apontam que a infecção pode ser

cessada no período entre 6 e 24 meses em 75% das mulheres que enfrentaram a exposição ao vírus (Meneses, 2021).

### **2.2.1 Epidemiologia do Contágio**

A infecção pelo HPV é um fator crucial para os casos de câncer de colo de útero, visto que é responsável por 70% dos casos no mundo. No Brasil, o câncer de colo de útero é a quarta maior causa de morte na população feminina e, dentre os tipos de câncer, o terceiro mais frequente (Cruz et al., 2019). A prevalência soma-se a fatores como o não uso de preservativos e conhecimento inapropriado sobre saúde sexual (Carvalho et al., 2021).

No Brasil, há uma variabilidade de número de casos entre as regiões, sendo a região nordeste acima do índice nacional, expressando para cada 100 mil mulheres uma taxa de 17,96%. Enquanto que a média nacional exprime a alta incidência de 17 casos por 100 mil mulheres (Zerlotti et al., 2018). A nível mundial, países em desenvolvimento exibem números mais altos de mortalidade em decorrência do câncer. À medida que países com desenvolvimento mais acelerado apresentam o declínio da mortalidade, esse aspecto se segue em países que historicamente implementaram o rastreio dos casos de câncer com maior severidade. Nestes países, como Colômbia, México e Chile, houve a redução das taxas de mortalidade. Em contrapartida, taxas mínimas já são observadas no Canadá, Japão, Estados Unidos e países da Europa (Meneses, 2021).

O acometimento pelo HPV é um fator desencadeador importante para todos os casos e tipos de câncer atrelados a ele, significando dentre eles um percentual de 50% de câncer de pênis, 2,2% de câncer de cavidade oral, 78% de câncer de vagina, 88% de câncer anal, 2,4% de câncer de laringe, 24,9% de câncer vulvar e 30,8% de câncer orofaríngeo. Estimativas em relação à quantidade dos novos casos de câncer de colo de útero demonstram números elevados de cerca de 435.000 novos casos até 2030. O HPV 16 é o responsável por 55 a 60% dos casos de todas as categorias de câncer de cervical, enquanto os adenocarcinomas são ocasionados em maior proporção pelo HPV 18, em percentuais de 10 a 15% (Calumby et al., 2020).

O câncer é uma das principais causas de morte antes dos 70 anos de idade. Caracteriza-se como o principal problema de saúde pública no mundo, sendo um

dos principais empecilhos para o aumento da expectativa de vida mundial. Para o triênio de 2023 a 2025 estima-se, no Brasil, 704 mil novos casos de câncer e, então, nota-se o aumento rápido do impacto causado devido à incidência e mortalidade. Dentre as mulheres, o câncer de mama consta com 2,3 milhões (24,5%) de novos casos, se classificando como o mais incidente, seguido dos cânceres de cólon e reto, com 865 mil (9,4%); pulmão, com 771 mil (8,4%) e colo do útero, com 604 mil (6,5%) (INCA, 2022). Devido a contínua quantidade alarmante de casos de câncer, os métodos de diagnósticos e prognósticos precisam de forma urgente ser reavaliados tendo em vista o quantitativo do aumento da mortalidade (Vatankhahan et al., 2024).

### **2.3 Formas de Prevenção**

A Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), estabelece algumas classificações para as prevenções necessárias visando o controle da infecção por HPV, sendo elas as prevenções primária (imunização), secundária (rastreamento e tratamento de lesões), terciária (tratamento e diagnóstico) e cuidados paliativos. Aspectos como educação sexual, utilização de preservativos sexuais, acompanhamento de pacientes imunossuprimidos, tratamento de lesões precursoras e adesão completa ao esquema vacinal são aliados que impactam diretamente proporcionando a prevenção de processos cancerígenos ocasionados pelo HPV (Cavalcante et al., 2021).

A estratégia da OMS para erradicar o câncer de colo de útero inclui três pilares adicionais para combater o HPV, com objetivos ambiciosos a serem alcançados até 2030: i) imunização de 90% das meninas até os 15 anos, ii) realização de uma triagem cervical de alto rendimento em 70% das mulheres entre 35 e 45 anos, e iii) tratamento de 90% dos casos identificados de câncer de colo de útero. Para atingir os objetivos estabelecidos, a vacinação é crucial. As vacinas contra o HPV são seguras e extremamente eficazes, diminuindo lesões graves e câncer cervical em até 97% das mulheres jovens imunizadas entre 12 e 13 anos (World Health Organization, 2020; Vorsters et al., 2022).

### 2.3.1 Vacinas e Adesão Vacinal

Para contribuir com a imunização, adolescentes e pré-adolescentes são vacinados devido a melhor resposta do sistema imunológico às vacinas e também pela não iniciação a atividade sexual, logo, ainda não obtiveram exposição ao vírus. Os meninos também são englobados no plano vacinal do Ministério da Saúde, na faixa etária de 11 a 14 anos de idade, objetivando ofertar a proteção para doenças relacionadas ao HPV. A vacinação no Brasil teve início em março de 2014 primeiramente em meninas de 11 a 13 anos através da iniciativa do Programa Nacional de Imunizações (PNI) havendo o intervalo de 180 dias entre as duas doses da vacina (Oliveira et al., 2021; Ferreira et al., 2022).

O método utilizado no desenvolvimento de vacinas se baseia na produção de anticorpos contra o capsídeo viral devido a inoculação de partículas semelhantes ao capsídeo viral (VLPs, do inglês, *virus like particles*). Através dessa metodologia, as vacinas produzidas por engenharia genética são construídas por meio da codificação de proteínas da região tardia L1 do HPV (Martins; Fridman; Magno, 2021).

O desenvolvimento das vacinas sucedeu-se a partir da tecnologia de DNA recombinante disponibilizadas em três tipos diferentes de acordo com os antígenos na forma VLP que nelas contém: vacina bivalente (GlaxoSmithKline®) que possui antígenos dos tipos HPV 16 e 18; vacina quadrivalente (Merck®) direcionada para os tipos de HPV 6, 11, 16 e 18; e vacina nonavalente (Merck®), desenvolvida a partir da vacina quadrivalente, que abrange os tipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58. Essas vacinas possuem a capacidade de fazer a estimulação da produção de anticorpos contra os tipos particulares de HPV incluídos em suas formulações. Além disso, por se tratarem de vacinas baseadas em partículas semelhantes aos vírus, essas vacinas não são infectantes, pois não possuem DNA em sua constituição (Podgorski et al., 2019; Padilha et al., 2022).

A permissão da vacinação pelos pais, que necessitam de informações acerca da lesividade da infecção por HPV e dos efeitos benéficos da vacinação, é imprescindível para a adesão vacinal, pois, devido à informações equivocadas veiculadas pelos instrumentos midiáticos, campanhas do Ministério da Saúde sofrem influência negativa devido a suposição que os governos retêm conhecimentos acerca desses efeitos colaterais (Oliveira et al., 2021; Souza et al., 2022).

Até o ano de 2019, a implementação em programas nacionais de imunização contra o HPV já havia ocorrido em 124 países e territórios. Os países da América Latina investiram na disponibilização gratuita para o público alvo da vacina quadrivalente. A redução nos números de pessoas infectadas, bem como gastos públicos com diagnósticos e tratamentos está diretamente relacionada com a profilaxia através da vacinação, entretanto, verificou-se a redução de 60% da adesão da segunda dose vacinal dos adolescentes vacinados (Oliveira et al., 2021; Padilha et al., 2022).

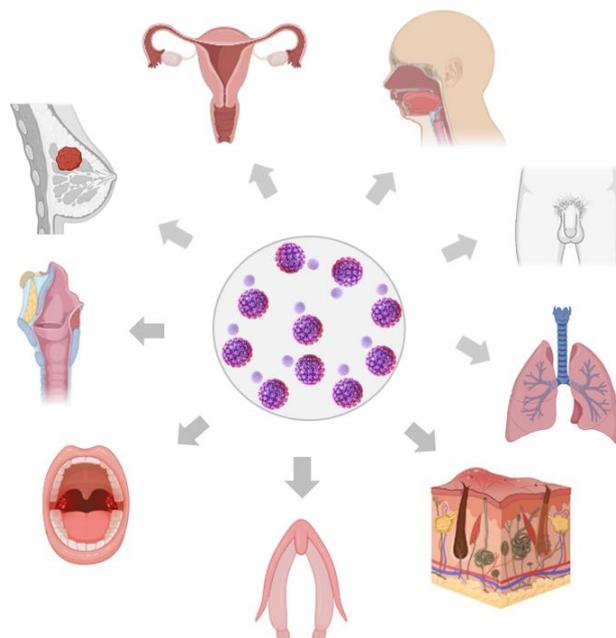
#### **2.4 Carcinogênese mediada por HPV**

O mecanismo natural do processo controlado de divisões celulares permite o crescimento, adaptação e recuperação do organismo. A deturpação desse mecanismo resulta em várias alterações (Llinàs-Arias; Esteller, 2017). De forma geral, o processo de desenvolvimento do câncer deriva de várias etapas, consistindo, principalmente, em alterações genéticas e na obtenção de vantagens para o crescimento, estimulando a conversão progressiva das células normais do organismo em células cancerígenas (Nitin et al., 2019).

A transformação celular maligna se utiliza de genes que estão intrinsecamente comprometidos com a proliferação e o crescimento celular que, em situações de desregulação, contribuem para a transformação da célula. Esses genes são denominados de oncogenes (Knudson, 1971). A infecção pelo HPV é um importante fator para o estabelecimento desses genes em vários tipos de câncer (Choi et al., 2023). Os tipos oncogênicos do HPV são capazes de desencadear alterações celulares e são os principais desencadeadores de cânceres cervical, anal, anogenital, vaginal, peniano e orofaríngeo (Figura 3) (Dykens et al., 2023).

O ciclo de vida do HPV é sustentado pela utilização da maquinaria celular do hospedeiro pelo vírus. De forma inicial, o vírus se estabelece e inicia a fase de manutenção, na qual, os componentes virais podem se manter nas células epiteliais por longos períodos de tempo, como anos e décadas. A integração do DNA viral no hospedeiro facilita a manutenção viral (Cosper et al., 2021).

**Figura 3** - Estruturas em que o HPV pode desencadear processos cancerígenos.

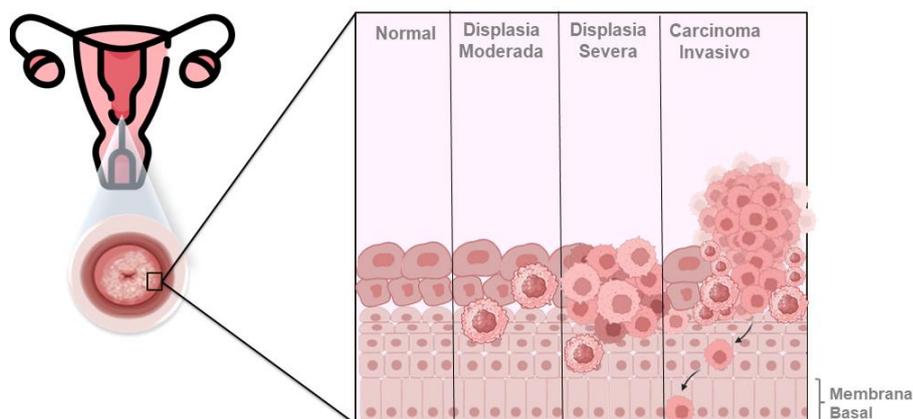


Fonte: Autoria própria, 2024.

A integração do HPV favorece a instabilidade genômica do hospedeiro através da alteração dos níveis de expressões gênicas nos locais da integração viral (Senapati; Senapati; Dwibedi, 2016). Devido a essas alterações, há a interferência em várias vias de sinalização que contribuem para o grande descontrole do ciclo celular do organismo. As mutações genéticas e epigenéticas, podem expressar, por muitas vezes, quadros clínicos assintomáticos (Viana et al., 2020). Como forma de burlar a resposta imunológica, o HPV possui a capacidade de evadir o sistema imune (SI) e fazer a manipulação do microambiente tumoral (TME, do inglês, *tumor microenvironment*) (São Marcos, 2023).

A sucessão de eventos moleculares derivados da infecção pelo HPV ocasionam lesões que são classificadas histologicamente como Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC). Essas lesões serão importantes para a transformação celular, como o processo de carcinogênese, portanto são subclassificadas de acordo com a gravidade da displasia, sendo elas displasia leve (NIC 1), displasia moderada (NIC 2) ou displasia grave para carcinoma in situ (NIC 3) (Figura 4) (Vieira et al., 2022).

**Figura 4** - Esquema da infecção pelo HPV através do tecido cervical.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Cânceres orofaríngeos e anogenitais podem estar relacionados aos HPVs classificados como causadores de Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL), e raramente são encontrados em tumores do colo de útero (Meneses, 2021). Algumas lesões celulares escamosas possuem alterações morfológicas indeterminadas e, por isso, são classificadas em Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) e Células escamosas atípicas não podendo excluir lesão de alto grau (ASC-H), podendo ser classificada como Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL) (Almeida et al., 2021).

#### **2.4.1 Rastreamento do Câncer de Colo Útero**

O rastreamento é um método estratégico utilizado para detectar uma doença em um estágio mais precoce e curável, sendo assim, testes são aplicados em uma população caracterizada como assintomática e em risco (Koshiyama; Matsumura; Konishi, 2017).

O rastreamento do câncer de colo de útero objetiva a diminuição da incidência e da mortalidade através da detecção e prevenção da progressão tumoral. Dois tipos de câncer cervical são considerados mais comuns, o adenocarcinoma e o carcinoma de células escamosas. A importância do rastreamento é devido a detecção da presença de precursores, sendo eles aspectos precoces da doença, mesmo em sua fase inicial. São considerados como precursores lesões LSIL ou NIC1, e, também, células escamosas atípicas exibindo características indeterminadas (Rerucha; Caro; Wheeler, 2018).

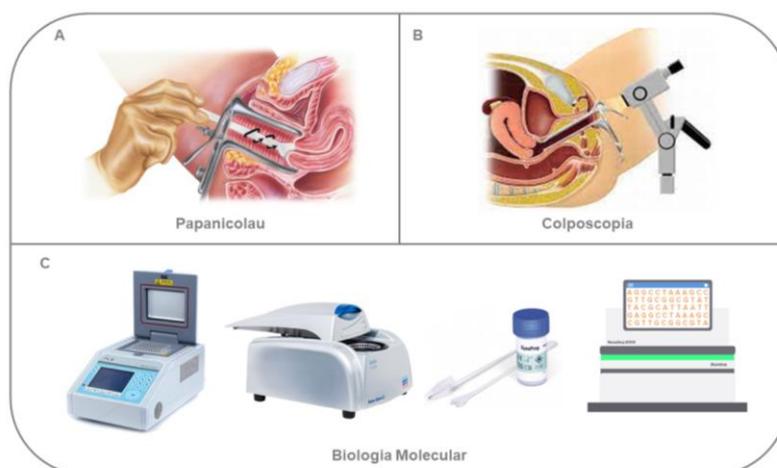
Entidades e organizações médicas recomendam a testagem anual de mulheres sexualmente ativas a partir dos testes de Papanicolau e exame pélvico. A periodicidade e frequência dos testes varia frente a idade, comportamentos sexuais, tabagismo, status socioeconômico e o momento da primeira relação sexual (Zoorob; Cefalu; Sidani, 2001).

Os testes de HPV, isolados ou em associação, e a citologia são metodologias utilizadas no rastreio (Rerucha; Caro; Wheeler, 2018). Atualmente, o teste padrão ouro para o rastreio de câncer de colo uterino é o Papanicolau, fatores como reprodutibilidade, baixo custo e facilidade de execução popularizaram a técnica (Partridge et al., 2024). Apesar disso, a depender dos recursos socioeconômicos da região, testes de HPV utilizando biologia molecular através da amplificação de ácidos nucleicos com reação em cadeia da polimerase e amplificação de sinal também podem ser empregados. Esses testes são utilizados em associação com a citologia em mulheres de 30 a 65 anos (Bedell et al., 2020).

## 2.5 Metodologias Convencionais de Diagnóstico da Infecção pelo HPV

O diagnóstico possui um papel crucial na progressão da infecção pelo HPV, pois é o ponto inicial para o estabelecimento de um protocolo de tratamento assertivo. Para isto, alguns métodos convencionais já são empregados atualmente para o diagnóstico da infecção (Figura 5) (Thakur et al., 2023).

**Figura 5** - Metodologias convencionais de diagnóstico de HPV.



Fonte: Autoria própria, 2024.

### **2.5.1 Papanicolau**

A diferenciação entre células cervicais normais e alteradas foi avaliada em lâminas microscópicas e estudadas pelo Dr. George Nicolas Papanicolau, a partir de estudos iniciais realizados em esfregaços de secreções vaginais de porquinhos-da-índia (Partridge et al., 2024).

De forma tradicional, o papanicolau é a principal forma de exame e rastreio do câncer de colo de útero (Finan et al., 2000). O exame citopatológico Papanicolau, popularmente conhecido como exame preventivo e igualmente denominado por Método Convencional de Esfregaço Cervical (EC) para Coleta Citológica, contribui para o diagnóstico precoce e na diminuição da morbimortalidade que estão atreladas ao câncer de colo de útero. Nesse sentido, a forma de avaliação simples após o esfregaço das células do epitélio cervical, o torna barato, simples e amplamente conhecido. Além disso, é o exame de escolha para o rastreio do câncer de colo uterino (Mitteldorf, 2016; Zerlotti et al., 2018).

A metodologia do Papanicolau foi implantada desde a década de 1960 e, desde então, a utilização do mesmo contribui para diminuição nos números de incidência de câncer cervical no público rastreado (Apgar; Brotzman, 1999; Liang et al., 2021). Consiste na coleta do material cervical a partir de um espécúlo que é introduzido no canal vaginal da paciente, onde o colo do útero e o interior da vagina serão observados e o material será coletado e colocado em lâmina para posterior encaminhamento e análise por especialistas em laboratório de citopatologia (Techakehakij; Feldman, 2008).

Por vezes, desafios técnicos podem dificultar a aplicabilidade do exame de Papanicolau, pois, a análise visual pode ser prejudicada em razão da presença de outros tipos celulares e demais fluidos biológicos, como o sangue. Aspectos como a variabilidade na interpretação do esfregaço citológico apresentam significativas oscilações quanto a sensibilidade e especificidade. Além disso, algumas mulheres podem apresentar quadros de sangramentos leves e cólicas ao se submeterem ao teste de Papanicolau (Felix; Amezcua, 2002; Mitteldorf, 2016; Rerucha; Caro; Wheeler, 2018).

### **2.5.2 Colposcopia**

Quando há um risco iminente da neoplasia intraepitelial cervical 2 (NIC 2) a colposcopia é o teste indicado para o diagnóstico e avaliação da displasia cervical,

vulvar e vaginal. Anteriormente, a idade da paciente, bem como o tipo do HPV, se de alto ou de baixo risco, eram considerados como fatores preponderantes para o encaminhamento para a colposcopia. No entanto, de acordo com a Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical (ASCCP, do inglês, *American Society for Colposcopy and Cervical Pathology*) desde 2020, a tomada de decisão versa sobre a possibilidade de 4% ou mais de neoplasia intraepitelial cervical 3 (NIC 3) ou pior independente do histórico da paciente (Burness; Schroeder; Warren, 2020).

A colposcopia é caracterizada por uma análise detalhada do colo uterino através de um colposcópio que dispõe de um complexo de lentes que permitem a observação de uma região do colo do útero denominada de zona de transformação (Pfeffer; Cross, 2021). Para a operação e manejo técnico, se faz necessário profissionais com preparação clínica e treinamento específico, chamados de colposcopistas (Khan et al., 2017). Dor, infecção, falha no resultado do teste em detrimento de amostra inadequada e sangramento podem ser aspectos danosos causados nos testes de diagnóstico com colposcopia ou curetagem endocervical (Rerucha; Caro; Wheeler, 2018).

### **2.5.3 Biologia Molecular**

Técnicas moleculares são empregadas na atualidade para diagnóstico do HPV. Algumas destinadas a fins de avanços em pesquisas e ensaios e, outras, utilizadas em laboratórios de referência especializados, devido ao alto custo de obtenção e manutenção. PCR (Reação em cadeia da polimerase), hibridização do DNA, imunoistoquímica, ensaios de captura híbrida, sequenciamento de nova geração, RT-PCR e ensaios de genotipagem de alta resolução (HRM) são alguns exemplos das técnicas moleculares aplicadas (Gupta; Kumar, Das, 2018).

- **Hibridização do DNA:** Os ensaios de hibridização baseiam-se no fenômeno de complementaridade e utilizam moléculas de sondas específicas para reconhecer e detectar sequências-alvo complementares com elevada precisão. A técnica de hibridização de ácidos nucleicos representa o método mais sensível disponível para a identificação de HPV em amostras clínicas e se destaca como uma abordagem capaz de discriminar os tipos específicos de HPV. Existem numerosos formatos alternativos para os testes de hibridização. A maioria emprega suportes sólidos,

como filtros ou lâminas de vidro, para garantir estabilidade durante o procedimento (Gutiérrez et al., 2009).

- **Reação em cadeia da polimerase (PCR):** É um método amplamente utilizado que possibilita a cópia exponencial de um segmento específico de DNA em um intervalo de tempo relativamente curto. Seus cinco elementos fundamentais incluem: o DNA molde, ou seja, o segmento de DNA fita dupla que será duplicado; os trifosfatos desoxinucleotídeos (dNTPs), os componentes básicos do trifosfato de timina (TTP), DNA trifosfato de adenina (ATP), trifosfato de citosina (CTP) e trifosfato de guanina (GTP); a enzima polimerase, a Taq DNA polimerase une os nucleotídeos; sequências de DNA que complementam o DNA alvo, isto é, primers de oligonucleotídeos; pH e solução tampão de força iônica propícios (Waters; Shapter, 2014; Williams; Kostiuk; Biron, 2022).

Primers específicos concebidos para amplificar apenas um genótipo do HPV podem ser empregados. Como a região L1 representa a parte do genoma mais preservada, há um consenso geral e diversos conjuntos de primers de PCR são direcionados para essa área. Também é possível utilizar a PCR em tempo real. Os primers de PCR específicos do tipo podem ser conjugados com sondas fluorescentes para detecção em tempo real, apesar de tecnicamente ser complicado combinar vários primers particulares do tipo numa reação (Molijn et al., 2005).

- **Hibridização *in situ*:** É uma técnica que identifica sequências de nucleotídeos através da ligação complementar de uma sonda de nucleotídeos (cDNA, cRNA ou oligonucleotídeo sintético) a uma sequência específica de RNA ou DNA em células, segmentos de tecido ou um tecido completo. Vários métodos podem identificar e visualizar os híbridos formados entre a sonda marcada e sequências alvo específicas. A preparação de amostras de tecido através do tratamento com proteases permite o acesso ao ácido nucleico desejado, otimizando a eficácia da hibridização e minimizando a coloração de fundo não específica. O processo de identificação do HPV nas células acontece nos núcleos das células infectadas (Jensen, 2014).

- **Imuno-histoquímica (IHC) para p16INK4a:** A (p16), isto é, proteína supressora de tumor envolvida na inibição da progressão do ciclo celular é frequentemente empregada como um marcador alternativo para a detecção de genótipos de alto risco em tecidos, tornando-se o padrão clínico para exames de

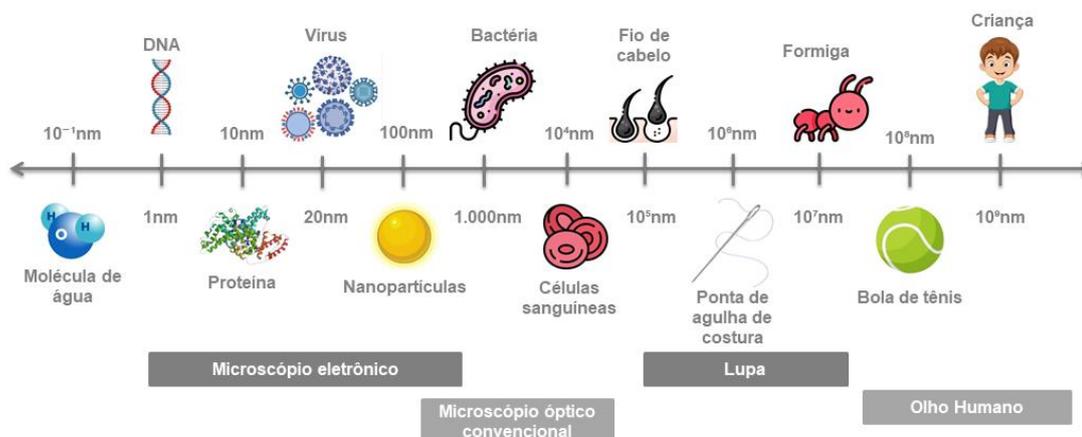
HPV. O teste se fundamenta na interação de anticorpos com antígenos particulares em amostras de tecido. Pode ser observado através de uma reação histoquímica de cromógeno ou por fluorocromos perceptíveis, seja através de microscopia convencional ou fluorescência. Normalmente, a IHC é feita em cortes de tecido e identifica componentes específicos do tecido através da captura de antígenos-alvo, com anticorpos específicos etiquetados com rótulos apropriados que se fixam nos tecidos. A reação é observada através do uso de fluorocromo (absorve ou emite luz) ou cromógenos (geram cores distintas) (Thomas; Primeaux, 2012; Rahimi, 2020).

- **Captura híbrida:** É uma análise de hibridização de ácido nucleico em formato de microtitulação com amplificação de sinal, realizada em amostras cervicais obtidas através do dispositivo de coleta de DNA ou do amostrador cervical HC (vassoura cervical). Após o tratamento, o espécime é liberado e desnaturado, e uma combinação de sondas de RNA multigênicas específicas para 13 HPV de alto risco é incorporada. Se estiver presente, ele se liga às sondas, resultando em híbridos de DNA-RNA que são capturados nos buracos de uma placa de microtitulação revestidos com anticorpos monoclonais específicos para híbridos de DNA-RNA (Burd, 2016).

## 2.6 Nanotecnologia e dispositivos inovadores para diagnóstico clínico

A exploração das numerosas vantagens da miniaturização são perspectivas introduzidas no conceito de nanotecnologia, apresentado pelo físico e ganhador do prêmio Nobel Richard Feynman, em 1965 (Pramanik et al., 2020). Biologia, química, medicina e ciências dos materiais são alguns dos campos de aplicação da nanotecnologia que consiste na utilização de elementos na nanoescala, 1-100 nm. (Figura 6), e os avanços nos estudos da complexidade dos nanomateriais permitiu diferentes funcionalidades e combinações em análises bioanalíticas (Kecili; Buyuktiryaki; Hussain, 2019).

**Figura 6 - Escala nanométrica.**



Fonte: Autoria própria, 2024.

A associação de nanopartículas a procedimentos na área da saúde data do século passado inicialmente através de medicamentos, como o *Adagen*, utilizado para o combate à doenças imunodeficientes. Em torno da década de 1990, estudos com mecanismos semelhantes foram realizados encapsulando drogas em lipossomas e atrelando nanopartículas a outras aplicações. Desde então, o avanço científico-tecnológico oportunizou diferentes estratégias de utilização das nanopartículas na terapia e no diagnóstico, por meio de nanocarreadores para fármacos, terapia fototérmica e fotodinâmica, biossensores e diagnóstico por imagem (Jeevanandam et al., 2018).

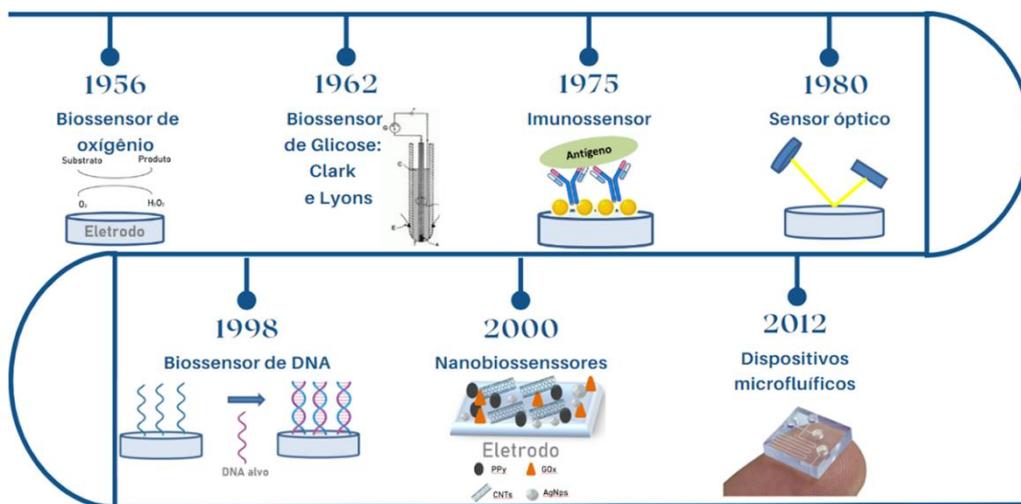
O desenvolvimento e pesquisa de tecnologias emergentes na nanoescala foram revolucionários para as ciências biomédicas na investigação de nanoestruturas programáveis, ofertando o aprimoramento da eficácia terapêutica, flexibilização de superfícies, direcionamento de fármacos, biodisponibilidade e baixa toxicidade. Englobando múltiplas finalidades como a entrega de drogas, a produção de vacinas, a engenharia de tecidos e implantes, o diagnóstico e detecção de analitos alvo, a produção de sensores e a teranóstica (El-Sayed; Kamel, 2020; Singh; Kaur, 2023).

### **2.6.1 Biossensores**

Em 1956, um bioquímico americano chamado Leland Charles Clark Jr. criou o primeiro biossensor com o intuito de detectar a porcentagem de O<sub>2</sub> no sangue (Malik et al., 2023). Tendo em vista essa possibilidade, em 1962, através da utilização da catálise da oxidação da glicose pela enzima glicose oxidase (GOx), um biossensor

para medição de glicose no sangue foi desenvolvido e, dessa forma, outras pesquisas começaram a ser elaboradas utilizando outros materiais, diferentes configurações para o sistema sensor e analitos alvo distintos (Figura 7) (Leca-Bueno et al., 2020).

**Figura 7** – Principais avanços no desenvolvimento de biossensores ao longo dos anos.



Fonte: Adaptado de Malik et al., 2023.

Posteriormente, o estudo sobre o desenvolvimento e a aplicação dos biossensores foi aprimorado, tornando possível o desenvolvimento de sensores para detecção das variações de temperatura e sensores ópticos, respectivamente, em 1974 e 1980. O emprego de enzimas auxiliares e co-reagentes aperfeiçoou a eficiência analítica dos sistemas de sensoriamento e, a partir da terceira geração de biossensores, os biorreceptores foram considerados elementos cruciais para a produção de sensores altamente sensíveis (Singh et al., 2021; Zafar et al., 2022).

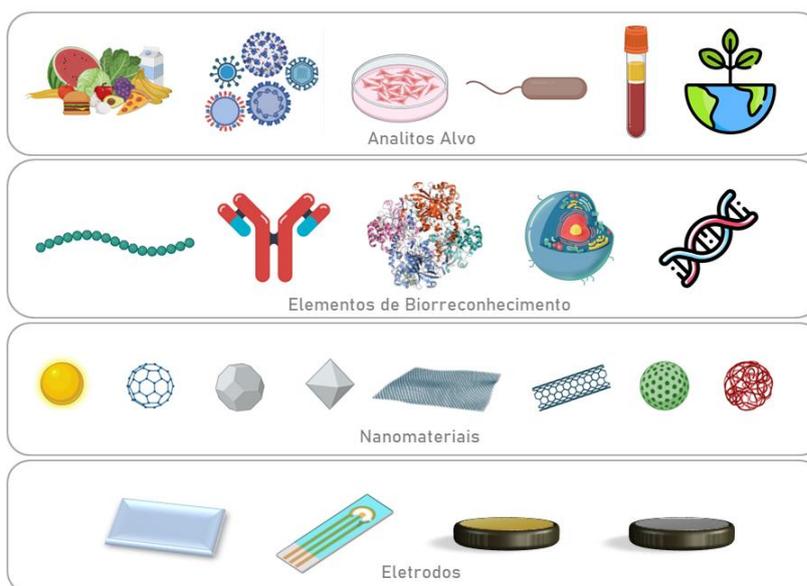
A partir dessas criações, designs inovadores a partir de nano arquiteturas começaram a ser projetados para permitir a detecção de biomoléculas de forma altamente sensível, permeando na interdisciplinaridade das ciências dos materiais, bioquímica, engenharia, biologia molecular, imunologia, medicina clínica e química (Li et al., 2023; Zeng et al., 2024).

Utilizados como ferramentas portáteis, os biossensores são extensamente utilizados como dispositivos de monitoramento no local de atendimento devido ao fornecimento automático do sinal detectável gerado na presença da interação

biomolecular com o analito, evidenciando a velocidade no processamento da resposta analítica (Haleem et al., 2021).

Os biossensores possuem alguns componentes e requisitos básicos necessários para a detecção do analito alvo (Figura 8) (Tabela 1). A interação na superfície do sensor é avaliada através de um transdutor que gera sinais diretamente proporcionais à concentração do analito presente (Hashem et al., 2021). O fator de biorrecepção, através de um elemento de bioreconhecimento, é realizado através da interação com o analito específico, como um aptâmero, anticorpo, lectinas, enzimas e polímeros com impressão molecular. A amplificação dos sinais gerados são processados por meio de sistemas eletrônicos viabilizando o reconhecimento de baixas concentrações (Takaloo; Zand, 2021).

**Figura 8** - Principais componentes de um biossensor.



Fonte: Autoria própria, 2024.

**Tabela 1** - Requisitos necessários para o desenvolvimento de um biossensor altamente eficaz.

Estabilidade	Extensão da susceptibilidade a alterações ambientais, tanto dentro quanto fora do aparelho dos biossensores.
Tempo de resposta	Monitoramento em tempo real da análise e rapidez no resultado do teste.

Sensibilidade	Correlação entre a força do sinal que é transposto e a mudança na concentração dos bioanalitos.
Seletividade	Capacidade de identificar uma molécula específica do analito alvo em amostras complexas que contenham possíveis analitos/contaminantes distintos ou quase idênticos.
Linearidade	A exatidão da resposta fornecida para um conjunto específico de medições em contraste com diferentes concentrações de um analito, a detecção da concentração do substrato aumenta linearmente com o aumento das concentrações.
Reprodutibilidade	Capacidade do biossensor em gerar resultados consistentes emitindo o mesmo sinal de resposta ao mesmo analito em diversos ensaios.

Fonte: Naresh; Lee, 2021; Chada et al., 2022; Das et al., 2023; Malik et al., 2023.

Em conjunto, essas características do biossensor aumentam sua confiabilidade e o aperfeiçoamento da superfície do eletrodo se deve a estratégias como modificações de bons materiais condutores para o aumento da área de superfície do eletrodo e desencadear reações redox para ampliar a magnitude dos resultados analíticos do eletrodo (Das et al., 2023).

### **2.6.1.2 Aplicações dos Biossensores em Diagnósticos**

A aplicabilidade dos biossensores na área médica é ampliada para vários tipos diferentes de analitos, bem como anticorpos, enzimas, receptores celulares, tecidos, ácidos nucleicos, microorganismos e até mesmo organelas. Além disso, após a pandemia da COVID-19 houve uma crescente busca da comunidade pela miniaturização e dispositivos de saúde de fácil utilização e que permitissem a utilização domiciliar. O refinamento dos procedimentos em diagnósticos, o monitoramento em saúde, substratos múltiplos e a praticidade nos resultados começaram a ser ainda mais explorados (Huang et al., 2017; Haleem et al., 2021).

As operações laboratoriais e miniaturizadas são integradas em apenas um chip, revolucionando a tecnologia *Lab-on-chip* (LOC) impulsionando a inovação e o desenvolvimento de dispositivos sensores. Sistemas tecnológicos que aplicam a associação de dispositivos e propriedades físicas, como eletricidade, luz e magnetismo, atreladas com os nanomateriais, promovem a alta amplificação de sinal resultando em perspectivas esperançosas para os sistemas LOC (Li et al., 2023).

A monitorização do câncer realizada por biossensores indica aspectos significativos em relação ao crescimento tumoral e prognóstico para o tratamento adequado. Considerando-se que tratamentos bem-sucedidos e aumento nas taxas de sobrevivência são consequências de doenças detectadas em estágios iniciais (Brazaca et al., 2021).

O emprego de métodos de diagnósticos tradicionais, em sua maioria, demanda de horas de análise, além de recorrentes transferências para laboratórios de maior porte em equipamentos e instrumentação. No entanto, a atuação dos biossensores na transformação de reações biológicas entre o biorreceptor e o analito em sinais legíveis melhoram o diagnóstico e ocasionam a rápida identificação de variados patógenos diminuindo a propagação de determinadas doenças (Wu et al., 2023). Esses sinais legíveis observados podem ser registrados através do elemento de transdução, permitindo, portanto, a análise e quantificação do processo de biorreconhecimento (Zhang et al., 2023). Os sistemas de sensoriamento possuem algumas alternativas para o mecanismo de transdução, são os principais tipos:

- **Piezoelétricos:**

O estresse mecânico em que um determinado material é submetido e a capacidade dele de gerar a produção de voltagem integram um fenômeno físico denominado de efeito piezoelétrico. A metodologia de forma oposta também é possível, uma voltagem aplicada possui a capacidade de resultar uma tensão mecânica (Pohanka, 2018).

Em sensores e biossensores, as oscilações mecânicas provenientes da voltagem em adição com as características do analito resultam na variação na frequência de acordo com a massa (Zhang et al., 2011). Esses dispositivos sensores são fundamentados em um cristal de quartzo com a capacidade de sensibilidade à massa. É realizado um revestimento do cristal a partir de um material biológico,

expressando alta seletividade e sensibilidade para a molécula de estudo, além da simplicidade na execução (Babacan et al., 2000; Marrazza, 2014).

- **Ópticos:**

Nos biossensores ópticos a quantidade de analito presente é proporcional ao sinal que é gerado. As variadas interações entre os componentes do reconhecimento e o alvo desencadeiam variações que acontecem na emissão de luz. Para estudos de bioensaios, técnicas como ressonância plasmônica de superfície (SPR) e espalhamento Raman de superfície aprimorada (SERS) são executadas para avaliar a capacidade de detecção dos biossensores ópticos e ratificar características como baixo ruído de fundo, alta intensidade de sinal e fácil detecção (Das et al., 2023).

Não se limitam apenas a ressonância plasmônica de superfície, mas também na utilização de fibras ópticas, interferômetros, cristais fotônicos e outros. A multiplexação e miniaturização de ensaios atribuem características vantajosas em associação com a precisão, admirável repetibilidade e baixo consumo de energia (Sharma et al., 2021). O sensoriamento óptico possui aplicações diversas desde a inspeção alimentícia até monitoramento de produtos químicos, detecção de patógenos, testagem de medicamentos e detecção de hormônios (Kumar et al., 2023).

- **Termométricos:**

Transdutores térmicos, como termistores e termopilhas, são utilizados como mecanismo de medição diferencial da temperatura enquanto um reator enzimático imobilizado vai possibilitar a medição da catálise enzimática e há a proporcionalidade do sinal térmico e a concentração do substrato em análise (Xie; Danielsson, 2007).

Particularidades fundamentais em reações biológicas como a evolução e a absorção do calor são aspectos explorados pelos sensores termométricos nos fluidos circulantes após as reações, através da medição de mudanças na temperatura. Os termômetros, de uso amplamente difundido, são exemplo da aplicabilidade indispensável desses dispositivos sensores (Ramanathan; Danielsson, 2001).

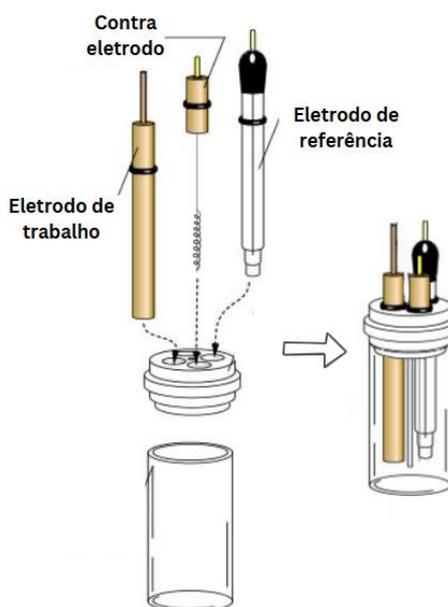
## 2.6.2 Eletroquímicos

Abordagens diferentes de transferência de sinal foram estudadas após o desenvolvimento do primeiro biossensor eletroquímico de glicose (Zeng et al., 2024). A união de técnicas eletrônicas e componentes biológicos constituem os biossensores eletroquímicos derivando em uma vasta gama de aplicações frente a diferentes áreas das ciências, desde o diagnóstico de doenças ao monitoramento ambiental e segurança alimentar (Das et al., 2023).

Nesses dispositivos analíticos, uma variabilidade de biomoléculas, como enzimas, sondas de DNA e anticorpos, podem ser utilizadas e imobilizadas na superfície do transdutor eletroquímico. O transdutor fará a tradução da resposta para um sinal mensurável (Vatankhahan et al., 2024).

Alterações nos potenciais eletroquímicos resultam em respostas analíticas que possibilitam a medição da corrente entre os eletrodos da célula eletroquímica (Figura 9). Técnicas como Voltametria Cíclica e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica são empregadas, nas quais o monitoramento da corrente é realizado conforme a variação do potencial e a obtenção do espectro de impedância através da variação da corrente em uma faixa de frequência para determinação de aspectos capacitivos e resistivos do sistema (Hosseini et al., 2022).

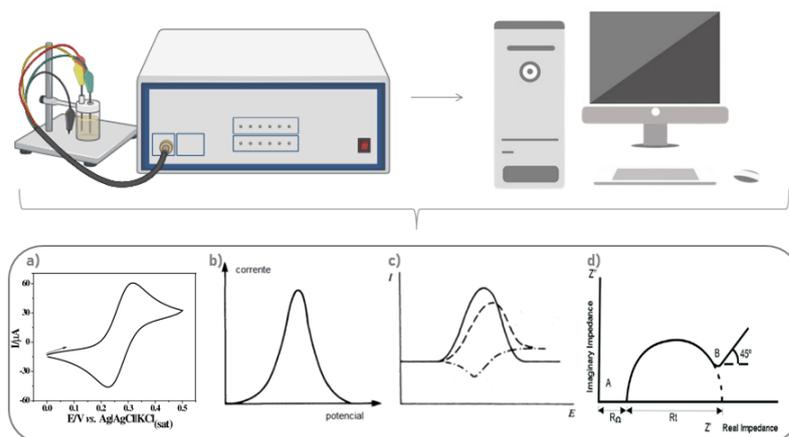
**Figura 9** - Representação ilustrativa de célula eletroquímica com sistema de três eletrodos: eletrodo de referência, eletrodo de trabalho e contra eletrodo.



Fonte: adaptado de <https://www.als-japan.com/1022.html>.

As reações são medidas através de respostas eletroquímicas de impedância, potência e corrente. A linearidade das respostas ao analito é mantida de acordo com a concentração do analito e a resposta do sensor frente aos processos de caracterização (Figura 10) (Haleem et al., 2021). O aumento da quantidade de sítios reativos ocasiona em uma corrente aumentada como resposta a um analito alvo. A menor concentração do analito alvo é um determinante quantitativo para o limite de detecção (LOD) (Das et al., 2023).

**Figura 10** - Representação de componentes de um sistema eletroquímico e as principais técnicas de caracterização empregadas, consistindo em voltametria cíclica (a), voltametria de pulso diferencial (b), voltametria de onda quadrada (c) e espectroscopia de impedância eletroquímica.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Os principais biossensores eletroquímicos estudados são:

- **Potenciométricos:**

Em amplas faixas de concentração diferentes, através da potenciometria, é possível determinar vários íons. O sinal gerado por biossensores potenciométricos é um potencial. Para a realização de ensaios potenciométricos, são necessários um eletrodo de referência que fornecerá um potencial constante a uma determinada temperatura e, também, um eletrodo de trabalho no qual o potencial se altera de acordo com a concentração do analito. Descritos pela primeira vez em 1906, os sensores potenciométricos podem ser aplicados em diversos segmentos, como análises clínicas laboratoriais e monitoramento ambiental (Koncki, 2007; Özbek et al., 2022).

- **Amperométricos:**

Em sistemas amperométricos o potencial do eletrodo de trabalho é controlado em um valor estabelecido levando-se em consideração o eletrodo de referência, comumente de prata/cloreto de prata, e o monitoramento da corrente é realizado em função do tempo. A taxa de transferência de elétrons é a medida direta da força motriz derivada do potencial aplicado que impulsiona a transferência de elétrons (Mongra; Kaur; Bansal, 2012).

Reações de oxidação e redução podem ocorrer no eletrodo de trabalho através de um potencial positivo e negativo, respectivamente. Após a imobilização do biorreceptor, a corrente gerada será um reflexo do tipo de interação ocorrida entre o biorreceptor e o analito alvo (Baracu; Gugoasa, 2021). A superfície na qual as reações eletroquímicas ocorrem são imprescindíveis para a sensibilidade do sensor, nesse sentido, a inserção de materiais nanoestruturados se faz oportuna também para aumentar a área superficial, melhorar o limite de detecção, linearidade, repetibilidade e tempo de resposta (Helm; Jalukse; Leito, 2010).

- **Condutimétricos:**

A condutância elétrica ou resistência da solução são aspectos analisados e medidos em biossensores eletroquímicos. A resistividade geral da solução ou a condutividade sofrem flutuações devido a geração de íons ou elétrons ocorridas nas reações eletroquímicas. Então, há a análise da quantificação dessas variações. Essas mudanças podem ser medidas por meio de biossensores condutimétricos que apresentam baixo custo de produção e estrutura simples (Bakri et al., 2024).

- **Impedimétricos:**

Uma das abordagens eletroquímicas mais empregadas é a determinação de características capacitivas e resistivas das substâncias analisadas através da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), obtendo-se um espectro após a perturbação do sistema eletroquímico ocasionada pela variação da corrente em uma ampla faixa de frequência (Samad Hosseini et al., 2022).

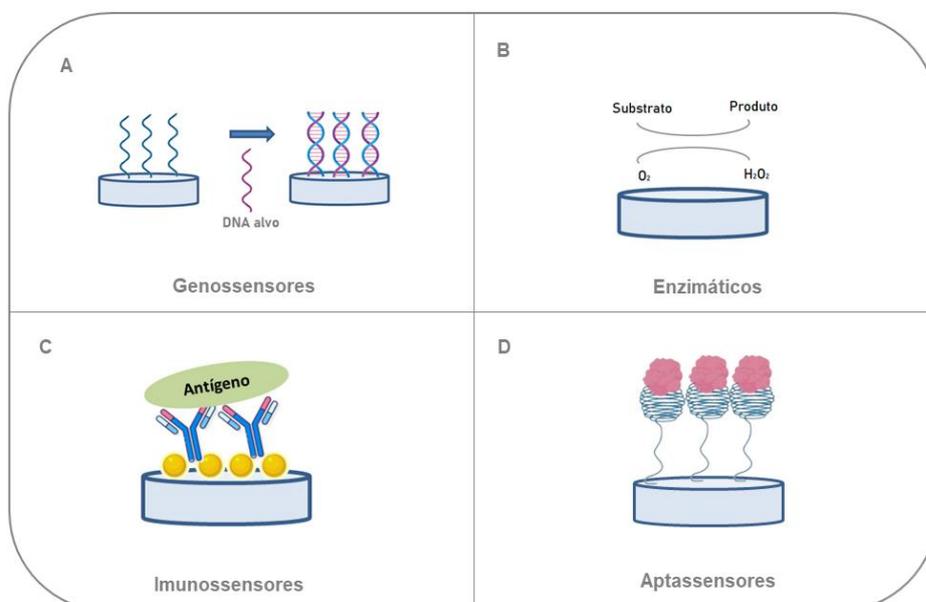
Sendo assim, compreende-se que na análise impedimétrica um circuito faz a medição da resistência ao fluxo de uma corrente elétrica. As informações sobre as interações e processos de biorreconhecimento são obtidos medindo a impedância. A variação da resistência à transferência de carga presentes nas reações são diretamente proporcionais à concentração do analito estudado, bem como, a

complexidade da superfície de funcionalização do eletrodo podendo ser avaliadas de maneira gráfica através dos gráficos de Nyquist e Bode (Dzulkurnain et al., 2021; Antiochia, 2022).

### 2.6.3 Classificação dos Biossensores Eletroquímicos de acordo com o mecanismo de biorrecepção

Os biorreceptores são estruturas biológicas presentes nos biossensores que interagem com o alvo a ser detectado, e essa interação produz um sinal eletroquímico mensurável. Podem incluir moléculas de distintas categorias como ácidos nucleicos, enzimas, anticorpos, lectinas, peptídeos e aptâmeros, classificando, assim, os biossensores de acordo com o mecanismo de biorrecepção (Figura 11) (Mital et al., 2017).

**Figura 11** - Classificação dos principais biossensores eletroquímicos de acordo com o biorreceptor.

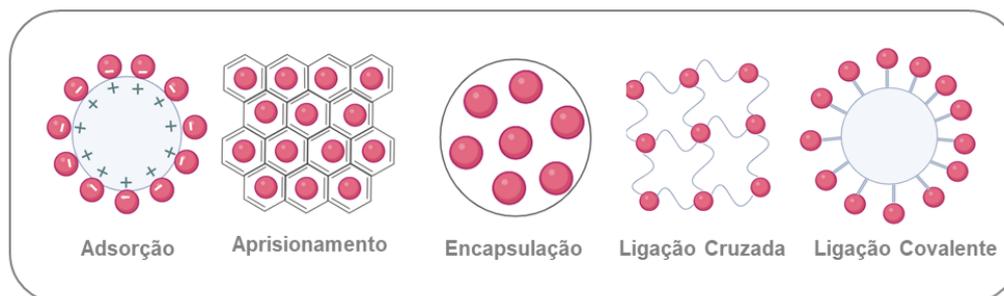


Fonte: Autoria própria, 2024.

Para a efetividade e estabilidade da imobilização dos biorreceptores, os eventos de imobilização são caracterizados pela fixação das biomoléculas na interface de estudo. As propriedades das moléculas fixadas devem ser estudadas para um bom processo de imobilização que pode sofrer influências devido a condições químicas, como pH e temperatura, e a orientação e posição dos receptores (Salva et al., 2021).

Comumente as técnicas de imobilização mais utilizadas (Figura 12) são a encapsulação, a ligação cruzada, o aprisionamento, a adsorção e a ligação covalente. A metodologia empregada afeta diretamente aspectos importantes para o sistema de biossensoriamento, como vida útil, tempo de resposta, estabilidade, sensibilidade, bioatividade e a precisão do biossensor (Asal et al., 2019).

**Figura 12** - Métodos de imobilização de biomoléculas.



Fonte: Autoria própria, 2024.

- **Adsorção:** Consiste na interação eletrostática entre o biorreceptor e o eletrodo modificado, de forma que haja interação entre cargas positivas e negativas causando o processo de atração. Alterações do pH podem desencadear processos de dessorção devido às alterações das cargas elétricas do sistema. Além disso, demais possibilidades como ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals podem ser observadas na imobilização por adsorção. A praticidade desse método está relacionada a não modificação da biomolécula utilizada (Ahuja et al., 2007; Rahman et al., 2015; Smutok; Katz, 2022).
- **Aprisionamento:** Hidrogéis e matrizes poliméricas são amplamente aplicadas para o método de aprisionamento para imobilizar biomoléculas. A metodologia é irreversível e costuma-se haver uma boa preservação da biomolécula utilizada (Karrat, Amine, 2020). Para o processo de imobilização, duas etapas são necessárias: a incorporação da biomolécula à matriz e o processo de, no caso de matrizes poliméricas, a eletropolimerização da solução monomérica (Nguyen; Kim, 2017).
- **Encapsulação:** Método de imobilização, também denominado de ligação por afinidade, que necessita de interações não covalentes que precisam da modificação da superfície interagindo com afinidade com a biomolécula. A estreptavidina-biotina é um dos modelos muito utilizados em protótipos de sistemas sensores. A ligação de

afinidade promove uma orientação configurada da imobilização da biomolécula, alta seletividade e sensibilidade (Rashid; Yusof, 2017).

- **Ligação cruzada:** A formação da ligação cruzada é realizada através de reticulações intermoleculares entre as biomoléculas por ligações covalentes se classificando como um método irreversível (Nguyen; Kim, 2017). Agentes de reticulação podem ser utilizados de acordo com as propriedades físico-químicas. No geral, essa estratégia de imobilização de biomoléculas apresenta baixos custos e alta especificidade (Fritea et al., 2018).

- **Ligação covalente:** É um método de imobilização de natureza irreversível dada a característica de estabilidade das ligações formadas por meios de grupos funcionais, dessa forma, garante fortes processos de quimissorção entre a biomolécula receptora e a superfície. No entanto, reagentes específicos com capacidade de quebrar tais ligações. Agentes de acoplamento são empregados para melhorar o processo das reações, como Nhidroxissuccinimida (NHS), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e glutaraldeído (Liebana; Drago, 2016; Fraas; Franzreb, 2017; Rasheed; Sandhyarani, 2017).

Em um sistema de biossensoriamento eletroquímico, observa-se o fenômeno de transferência de elétrons ou íons após o biorreconhecimento específico viabilizado pelos biorreceptores imobilizados na superfície dos eletrodos. A captura do analito desejado, por meio de biorreceptores com elevada seletividade, reduz a possibilidade de falsos negativos ou falsos positivos durante a aplicação do teste (Wang; Zhou; Wang, 2024). Os biossensores eletroquímicos baseados no mecanismo de biorreconhecimento podem ser classificados em:

- **Aptassensores:** Proteínas, pequenas moléculas orgânicas, como aminoácidos e vitaminas, e íons inorgânicos, como  $Hg^{2+}$  e  $Pb^{2+}$ , são exemplos de moléculas alvo nos quais os aptâmeros têm alta afinidade. Os aptâmeros podem ser caracterizados como ácidos nucleicos pequenos de fita simples, sendo eles de DNA ou RNA (Villalonga et al., 2022).

A alta afinidade oferecida pelos aptâmeros viabilizou um processo de dobra para estruturas tridimensionais permitindo uma firme fixação específica a seus alvos, além disso, possuem tamanhos menores que proteínas e anticorpos e atributos particulares como estabilidade de temperatura, baixa toxicidade, síntese barata e

facilidade de transporte. A diversidade de funcionalidade a partir de diferentes grupos funcionais, como amina, biotina e tiol, colabora para a versatilidade dos aptâmeros (Negahdary, 2020).

Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX) é um tipo de metodologia aplicável para a geração de aptâmeros de forma rápida, econômica e reproduzível através de procedimentos *in vitro*. Esses aspectos associados às vantagens físico-químicas e miniaturização, caracterizam os aptâmeros como moléculas que viabilizam a construção de biossensores fáceis de miniaturizar e promovendo limites de detecção em escala micromolar e femtomolar (Van Den Kieboom et al., 2015).

- **Enzimáticos:** Diversos protocolos experimentais podem ser utilizados a partir do biorreconhecimento de biossensores fundamentados em enzimas. Para o um eficiente desempenho dos biossensores enzimáticos e manutenção da sua estabilidade operacional, alta sensibilidade e seletividade, a imobilização adequada é primordial. A imobilização enzimática na plataforma sensora pode ser realizada de variadas formas como aprisionamento, reticulação ou afinidade, covalência e adsorção (Sassolas et al., 2012).

De custo reduzido e fácil operação, os biossensores enzimáticos são classificados em 3 gerações, baseada em oxigênio, mediador e eletroquímica direta (Zhao; Xu; Chen, 2017). Eles são comercialmente famosos e grandemente estudados e as interações enzima-substratos possuem alta especificidade e as enzimas oferecem a possibilidade de biocatálise, tornando-os atrativos (Nguyen et al., 2019; Bucur et al., 2021).

Dois metodologias são aplicadas no que se refere ao reconhecimento pelas enzimas, sendo elas a detecção de substrato e a inibição enzimática. Ou seja, a detecção do sinal eletroquímico pode ser baseada na conversão do substrato pela enzima inserida no sensor ou através da redução da atividade enzimática pelo analito alvo, nesse caso, a medição é realizada a partir da comparação entre a atividade enzimática na ausência e na presença dos possíveis inibidores (Asal et al., 2018).

- **Imunossensores:** As conhecidas interações que se baseiam em composições bioquímicas dos clássicos modelos antígeno-anticorpo (Ab-Ag) favorecem o desenvolvimento estratégico para o diagnóstico clínico de ensaios de

imunossensores fundamentados na alteração de sinal após a formação específica e complexa do reconhecimento de um anticorpo e o seu respectivo antígeno específico (Chen et al., 2017).

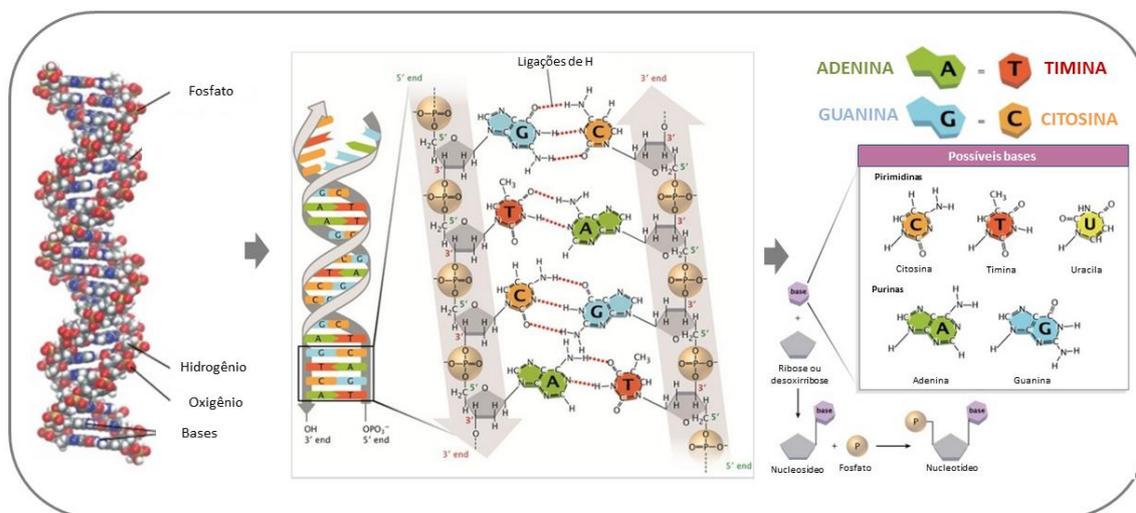
Imunossensores podem se apresentar através de duas configurações diferentes, sendo através do modelo de sanduíche direto, indireto e competitivo (Takaloo; Zand, 2021). No que tange a interpretação de resultados, quando observa-se a diminuição do sinal frente ao aumento de concentração do analito, este imunossensor é do tipo competitivo, no qual o analito não marcado irá competir com o antígeno marcado do teste. Nos ensaios indiretos, há a combinação de um marcador detectável com o antígeno ou anticorpo em foco, no entanto, em ensaios diretos, a formação do complexo induzirá as alterações que serão medidas (Uliana et al., 2014; Mollarasouli; Kurbanoglu; Ozkan, 2019).

### **2.6.3.1 Genossensores**

Em virtude da importância biológica do DNA para os seres vivos, graças a portabilidade das informações genéticas, ele torna-se um alicerce para novas construções e ferramentas tecnológicas em biossensores eletroquímicos apoiados em DNA. Metodologias eletroanalíticas de genossensores são atribuídas por miniaturização, baixas quantidades de volumes de amostras, simplicidade, resposta rápida e alta sensibilidade (Hai et al., 2020).

Comumente, os biossensores de DNA são construídos fundamentados na imobilização de oligonucleotídeos para se unirem à sequência de DNA complementar, ou seja, hibridização da fita simples ao DNA (ssDNA) complementar alvo, através da estruturação baseada no emparelhamento das bases na dupla hélice (Figura 13). O sinal elétrico mensurável é resultado da conversão dessa reação de hibridização pelo transdutor. Diversos eletrodos de trabalho baseados em diferentes materiais, como carbono vítreo, ouro, pasta de carbono e mercúrio podem ser aplicados para o desenvolvimento de genossensores (Das et al., 2023).

**Figura 13** - Dupla-fita de DNA, o emparelhamento das bases, a representação da regra de Chargaff e estrutura química dos nucleotídeos.



Fonte: Adaptado de Pray, 2008.

Em genossensores eletroquímicos há a formação de um duplex híbrido a partir da sequência de sonda de oligonucleotídeos imobilizada e o DNA alvo, sendo a interação detectada a partir da alteração dos sinais das correntes eletroquímicas. A minimização de eventos indesejáveis de adsorção não específica contribuem para a alta sensibilidade e seletividade que vão ser correspondentes a eficiência da hibridização. A eletropolimerização e a automontagem de monocamadas funcionalizadas são algumas metodologias aplicadas no desenvolvimento de biossensores de DNA para a imobilização da sonda. A complementariedade dos ácidos nucleicos, durante o evento de biorreconhecimento, resulta em uma resposta eletroquímica que é monitorada mediante a utilização dos potenciais aplicados (Wang et al., 2012).

Para a eficiente imobilização do DNA na interface do substrato sólido, algumas estratégias de imobilização do DNA são traçadas (Figura 14):

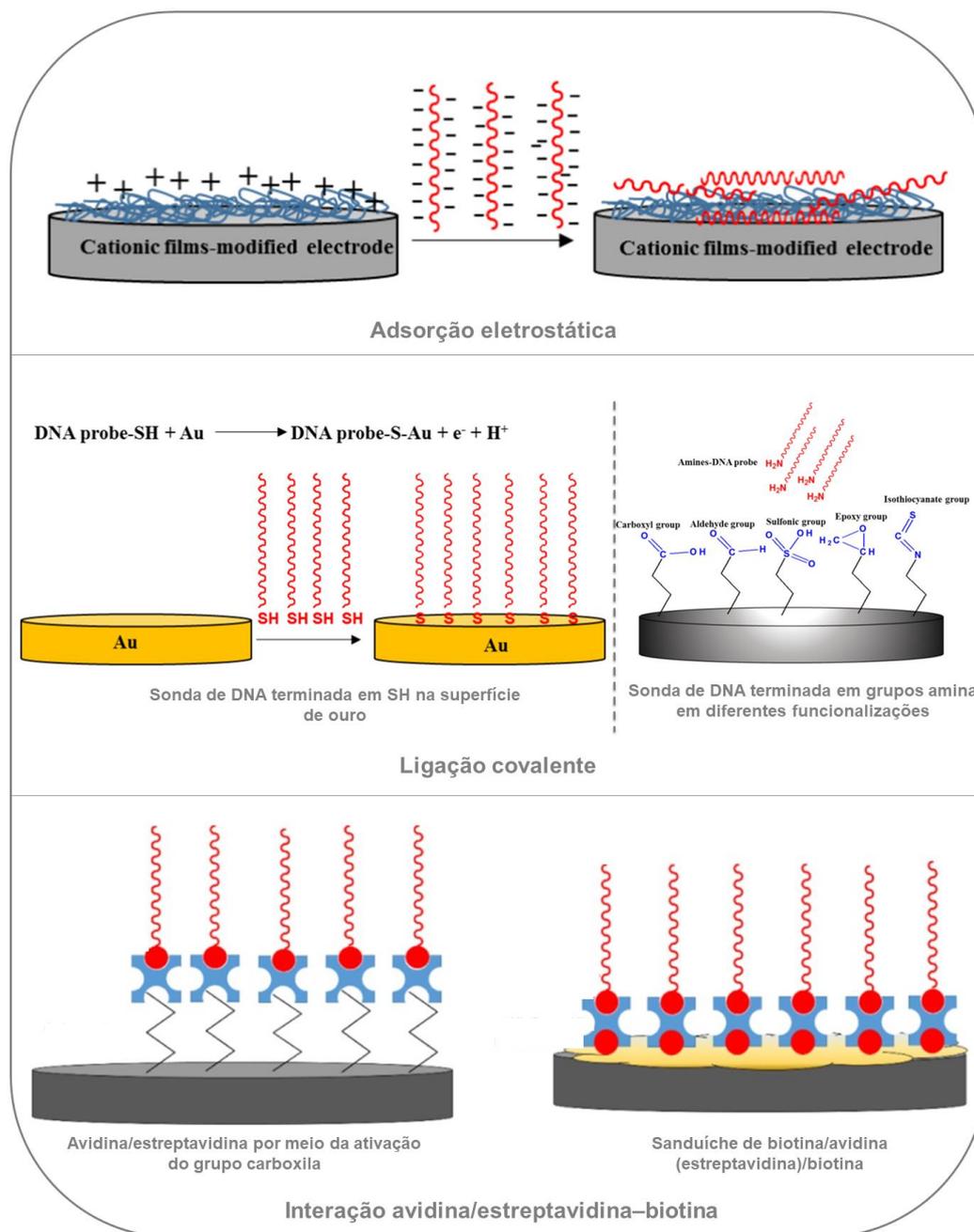
- **Interação eletrostática:** A adsorção da biomolécula na interface ocorre devido a interações estáticas entre a interface e a fita de DNA. Trata-se do método mais básico para fixar sondas de DNA na superfície do eletrodo de trabalho, que não necessita de nenhum produto químico ou alteração das sondas de DNA. As sondas de DNA se fixam na superfície do eletrodo de trabalho através da adsorção entre um

grupo fosfato da fita de DNA com carga negativa e os eletrodos que foram modificados por filmes com carga positiva (Ahuja et al., 2007; Rashid; Yusof, 2017).

- **Ligação covalente:** Comumente, a sonda de DNA sintetizada apresenta grupamentos tiois (S-H) ou aminas (NH<sub>2</sub>) na extremidade de 3' ou 5' para se conectar covalentemente à superfície do metal ou a grupos funcionais específicos presentes na superfície do eletrodo modificado. Dessa forma, estabelecem um forte vínculo covalente, devido à forte capacidade de ligação, e uma estabilidade excepcional para prevenir que as sondas de DNA sejam desorvidas durante as reações de biorreconhecimento. O agente de acoplamento de ativação mais comumente utilizado é o 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), que possui a função de melhorar a interação dos grupos funcionais a partir da ativação desses grupamentos químicos. Frequentemente, a quimissorção e a fixação covalente são empregadas para a imobilização covalente da sonda de DNA, pois, podem prevenir interações e ligações não específicas (Nimse et al., 2014; Thapa; Liu; Wang, 2022).

- **Interação avidina/estreptavidina-biotina:** A biotina é uma molécula de tamanho reduzido que possui uma alta afinidade pelos pontos de ligação da avidina ou estreptavidina, possibilitando a criação de um complexo potente com a avidina. Este é um procedimento de duas fases, em que a superfície sólida é primeiramente biotinizada com um agente reticulador, seguida pela fase de incorporação de estreptavidina. Ademais, a avidina e a estreptavidina são proteínas tetraméricas que compartilham quatro pontos de ligação com a biotina. A sua utilização para imobilização de sondas de DNA pode ser realizada na extremidade de 3' ou 5' da sequência de sondas de DNA, ligando-a à molécula de biotina e, em seguida, inserindo-a no eletrodo modificado com avidina/estreptavidina. Trata-se de uma metodologia para fixar sondas de DNA de forma não covalente na superfície do eletrodo. A conexão entre a avidina/estreptavidina e a molécula de biotina é extremamente estável, resistindo a condições extremas de temperatura, solventes orgânicos, detergentes desnaturantes e pH (Khan et al., 2021; Meng; O'hare; Ladame, 2023).

Figura 14 - Mecanismos de imobilização da sonda de DNA.



Fonte: Adaptado de Rashid; Yusof, 2017.

## 2.7 Materiais Utilizados na Construção de Biossensores Eletroquímicos

Nanomateriais são recursos em potencial para melhoria da qualidade de vida por meio de tecnologias (Steppek et al., 2022). Propriedades de afinidade e/ou catalíticas podem ser exibidas no delineamento de sensores bioanalíticos que utilizam a associação de polímeros condutores com bio nanomateriais. Impasses em soluções norteadoras e em desafios bioanalíticos direcionam a evolução da

nanotecnologia de forma célere com foco em novos materiais para a resolução de tais problemas (Ramanavicius, 2006).

Abordagens de baixo para cima, (do inglês, *top-down*), e de cima para baixo, (do inglês, *bottom-up*), são empregadas para o preparo dos componentes nanométricos utilizadas em tecnologias de biosensoriamento através de técnicas de fiação, pirólise, síntese hidrotérmica, deposição química de vapor (CVD), sol-gel e biossíntese, são etapas procedimentais amplamente utilizadas em sistemas do tipo bottom-up. Enquanto procedimentos classificados como bottom-up, utilizam métodos diversificados como ablação a laser, pulverização catódica, litografia, decomposição térmica, entre outros. A complexidade dessas metodologias é empregada para a síntese de nanopartículas e nanomateriais (Malik et al., 2023).

### **2.7.1 Polímeros Condutores**

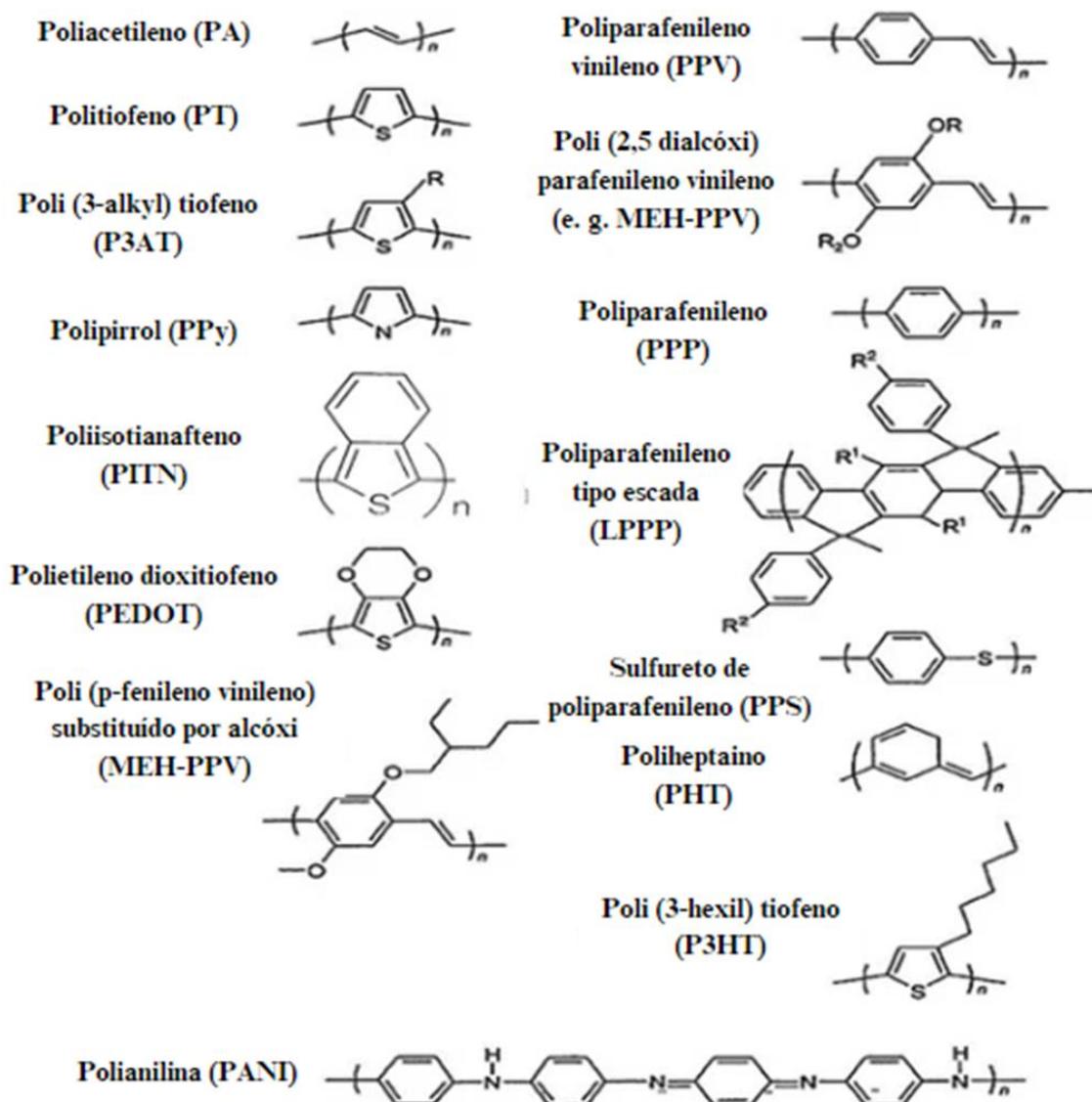
Estudos pioneiros datados de 1977 difundiram o conhecimento e aplicação dos polímeros condutores a partir do aumento da condutividade no estudo de Shirakawa e colaboradores (Shirakawa et al., 1977).

Polímeros condutores são utilizados em uma variedade de aplicações devido a combinação de características dos polímeros orgânicos, como flexibilidade e resistência, e a propriedades eletrônicas e ópticas. Poliacetino, polipirrol (PPy), politiofeno (PTh), polifenileno, polycarbazol e polianilina (PANI) são alguns dos polímeros mais empregados em consequência da facilidade em processos oxidativos e redutores em detrimento da presença de elétrons livres em suas estruturas e, também, por apresentarem ligações simples ( $\sigma$ ) e duplas ( $\pi$ ) (Figura 15) (Lakard, 2020).

Afinidade eletrônica, imobilização estável de biomoléculas, baixo potencial de ionização e alta condutividade são algumas das características expressas pelos polímeros condutores que os tornam tão versáteis para a utilização no desenvolvimento e desempenho dos biossensores. Biomoléculas em plataformas sensoras interagem com os polímeros condutores e, estes vão conferir imobilização em sua superfície havendo possibilidade de operar metodologias como aprisionamento físico, reticulação, adsorção e ligação covalente. A alta resposta de sinal pode ser fundamentada na minimização da resistência da interface entre os

eletrólitos, caracterizada pela alta condutividade dos polímeros condutores (Luong et al., 2020).

**Figura 15** - Estrutura química de alguns polímeros condutores utilizados em processos eletroquímicos.



Fonte: Adaptado de Abhishek et al., 2023.

Filmes finos são formados na superfície do eletrodo gerados pela polimerização eletroquímica dos monômeros condutores. A polimerização eletroquímica é geralmente realizada por voltametria cíclica, visto que, a solução contendo o monômero é submetida a um potencial anódico e, então, há a oxidação do monômero e a formação do cátion radical que reagirá com outros monômeros

ocasionando na concepção de produtos oligoméricos e, posteriormente, na deposição do polímero (Paramo; Ibanez, 2011; Luong et al., 2020).

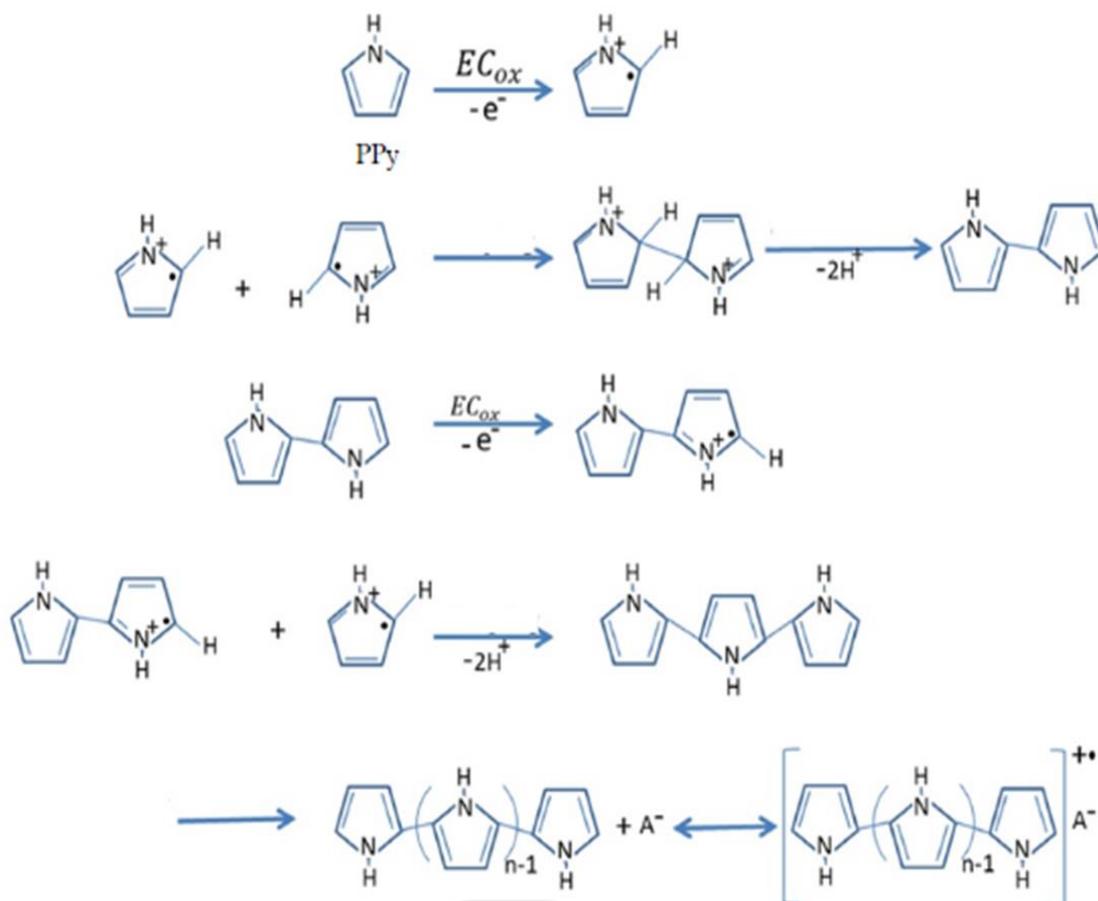
#### **2.7.1.1 Pirrol**

A primeira síntese do polipirrol ocorreu em 1912 e, convencionalmente, devido às fortes interações entre as duas cadeias, torna-se insolúvel em solventes comuns (Oh; Agrawal, 2002). A possibilidade de ser gerado eletroquimicamente e ser depositado em superfícies condutoras configuram ao polipirrol a viabilidade de aplicação na nanotecnologia e, mais especificamente, na resolução de problemáticas a partir de sistemas bioanalíticos. Tais aplicações versam sobre as múltiplas propriedades deste polímero condutor que incluem capacidade de troca iônica, atividade catalítica, atividade redox e formação de nanofios condutivos à temperatura ambiente (Ramanavicius; Ramanaviciene; Malinauskas, 2006).

Na eletropolimerização a aplicação manipulável do potencial torna-se um mecanismo de controle para a espessura e a morfologia das camadas a serem depositadas sobre os eletrodos na célula eletroquímica. O aprisionamento e/ou dopagem de pequenas moléculas orgânicas, como DNA e proteínas, e biomateriais podem ser favorecidos na síntese do polipirrol em solução eletrolítica de pH neutro, nesse sentido, a nanoestruturação desse polímero promove designs atrativos para a construção de biossensores eletroquímicos (Pokrop et al., 2004). Justificando-se, também, pela capacidade de interação com variados centros condutores inorgânicos e orgânicos, como diferentes metais e materiais (Abolghasemi; Babakhanian, 2017; Shan et al., 2017).

A eletropolimerização do PPy é realizada pela voltametria cíclica, expressando várias vantagens desde ao baixo custo e facilidade à rápida detecção, proporcionando varreduras repetíveis e obtenção dos picos de oxidação. Os filmes de PPy são depositados no eletrodo através da produção de um cátion radical que é derivado da primeira reação onde ocorre a transferência de elétrons e, por conseguinte, o cátion se dimeriza através de acoplamento e elimina dois prótons. E, então, reações semelhantes se sucedem para formar um trímero, tetrâmero e, assim, sucessivamente (Figura 16) (Chahma; Carruthers, 2021).

**Figura 16** - Mecanismo de Eletropolimerização do PPy.

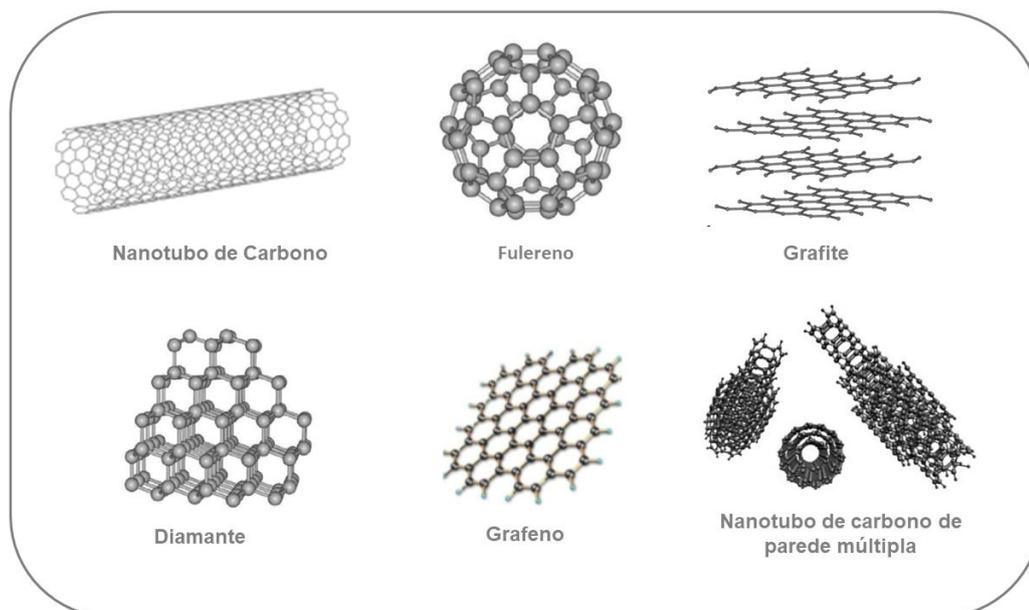


Fonte: Adaptado de Choudhary; Ansari; Purty, 2020.

### 2.7.2 Alótropos de Carbono

O carbono caracteriza-se como um elemento com diversas estruturas alotrópicas e é um dos elementos mais abundantes que se tem conhecimento. Possui múltiplas estruturas em conformações unidimensionais (1D), bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D). O desenvolvimento de novas aplicações e estruturas envolvendo as três mais recentes formas alotrópicas do carbono, ou seja, fulerenos, nanotubos de carbono e grafeno, e das demais possibilidades de formas desses alótropos, como nanofibras gráficas, pontos quânticos de carbono, pontos quânticos de grafeno (GQDs), óxido de grafeno (GO), óxido de grafeno reduzido (rGO) e nanofitas de carbono (CNFs) (Figura 17), continuam com relevante impacto na comunidade científica (Rauti et al., 2019; Chen et al., 2020).

**Figura 17** - Formas dos diferentes alótropos do carbono.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Para todos os grupos da biodiversidade, o carbono é indispensável. Nessa perspectiva, os avanços e a evolução da vida humana desfrutam da otimização da ciência e da tecnologia de novos materiais convencionalmente em diversos âmbitos. Propriedades aplicáveis desses nanocarbonos foram e são explorados em todas as áreas das ciências de materiais, incluindo dispositivos biomédicos e eletrônica devido a propriedades como efeito de tamanho a nível quântico, variada química de superfície e resistência à tração (Yang, 2022; Hayat et al., 2023; Narang et al., 2023).

A localização do carbono na tabela periódica confere características significativas e únicas. Na configuração atômica, o carbono apresenta quatro elétrons na camada de valência possibilitando a formação da diversidade de alótropos ou complexos de diferentes configurações devido à viabilidade do envolvimento do carbono em hibridizações  $sp$ ,  $sp^2$  e  $sp^3$ . Neste sentido, ligações triplas podem ser hibridizadas em grafeno na conformação  $sp$  (Chan et al., 2020).

A precisão atômica na estrutura e o tamanho nanométrico dos novos "nanocarbonos" configuram uma nova perspectiva frente aos clássicos alótropos de carbono já conhecidos, como o diamante e o grafite. Propriedades aplicáveis desses nanocarbonos foram e são exploradas em todas as áreas das ciências de materiais, incluindo dispositivos biomédicos (Stepek et al., 2022).

Os diferentes campos industriais demonstram elevada demanda na busca de materiais à base de carbono (Yang, 2022). Propriedades estáveis de emissão de fluorescência, fácil funcionalização através de moléculas bioativas, estabilidade e elevada condutividade, aplicabilidades diversificadas em supercapacitores, armazenamento de energia e tratamento de águas residuais são exemplos dos avanços na pesquisa e no entendimento sobre os alótropos de carbono (Sharma et al., 2024).

Na elaboração de sensores eficazes, a fácil customização de materiais se torna um tipo de instrumentação popular de vários elementos alótropos do carbono. A alta condutividade elétrica, biocompatibilidade e robustez aprimorada os tornam bastante promissores (Yang et al., 2024). A funcionalização dos nanomateriais amplia a área superficial para a subsequente imobilização de biorreceptores. Dentre os alótropos de carbono, a funcionalização pode ocorrer de variadas formas como a utilização de biopolímeros, nanopartículas de óxido metálico e polímeros orgânicos (Das et al., 2023).

## **2.8 Grafeno**

As descobertas que anteciparam o isolamento do grafeno em uma única folha de grafite, em 2004, datam de 1985 com a descoberta do fulereno C<sub>60</sub> esférico e, em 1991, dos nanotubos de carbono cilíndricos (CNTs). A caracterização e isolamento do grafeno, realizados por Geim e Novoselov, são considerados, no âmbito das ciências de materiais, o avanço mais revolucionário do século 21 (Steppek et al., 2022).

Devido a monocamada plana disposta através da compactação de átomos de carbono formando estruturas 2D firmes, o grafeno demonstra aspectos eletrônicos simples se comparados a outros materiais: semicondutor e disponibilidade de elétrons (Novoselov et al., 2004; Geim; Novoselov, 2007). Por ser caracterizado em estudos anteriores como um material instável e meramente acadêmico, não existia de forma livre e autônoma, pois acreditava-se que sem uma base 3D esses materiais 2D não existiriam. Em 2004, as observações experimentais validaram a descoberta do grafeno e de demais cristais atômicos 2D, como nitreto de boro de camada única (Novoselov et al., 2005).

As propriedades térmicas, eletrônicas e mecânicas são atribuídas ao grafeno e, por isso, a ampla gama de áreas favoráveis para o uso do grafeno. O grafeno apresenta propriedades óticas, eletrônicas e mecânicas bastante atrativas. Notavelmente, a alta mobilidade de elétrons à temperatura ambiente e sensibilidade ao efeito de campo transformaram o grafeno em um elemento explorado em diversos protótipos eletrônicos. Nas aplicações óticas, a utilização do grafeno resulta em filmes finos transparentes que acarretam a diminuição linear da espessura destes filmes (Novoselov et al., 2004; Soldano; Mahmood; Dujardin, 2010).

A combinação de tais características atribuem ao grafeno aplicabilidades vastas, inclusive nos sistemas de sensoriamento para a detecção de diversos analitos, devido a estabilidade química e mecânica, filmes de boa condutividade e transparência ótica, viabilizando assim o desenvolvimento de eletrodos flexíveis transparentes processáveis (Wang et al., 2008). A robustez mecânica do grafeno compreende propriedades preservadas pela hibridização  $sp^2$  abrindo possibilidades de exploração para a transdução do sinal de detecção além da facilidade de produção se comparado a outros elementos gráfiticos, como o os nanotubos (Wehling et al., 2008).

Além disso, atributos eletroquímicos, como a alta mobilidade do portador de carga e alta aderência a superfícies, configuram o grafeno como um agente interessante para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos (Yang et al., 2024). A complexidade do processo de integração de sistemas sensores versa sobre a sensibilidade molecular atrelada à acessibilidade da superfície interfacial até a eficiência do processo de transdução de sinal. Os processos de funcionalização para interações específicas em sensores são possíveis com a utilização do grafeno fornecendo complexos quimicamente estáveis (Soldano; Mahmood; Dujardin, 2010).

O grafeno é um material bidimensional (2D) e possui uma vida quântica útil limitada em detrimento da dependência da lacuna de banda. Em contrapartida, materiais derivados dele, como os pontos quânticos de grafeno (GQDs, do inglês, *graphene quantum dots*), são 0D e possuem responsividade à luz visível atrelado de longa vida quântica e lacuna de banda ajustável (Aguilera-Sigalat; Bradshaw, 2016).

Para a formação dos GQDs, é necessária a transformação do grafeno 2D em 0D, ocasionado após a diminuição horizontal do seu tamanho para nanômetros (2-

10 nm) e, posteriormente, a sua espessura se descasca para 1-2 nm formando os pontos quânticos de grafeno. Os GQDs são beneficiados de características do grafeno e dos pontos quânticos e, por isso, possuem ótimas atividades fotoluminescentes, bons espectros de absorção ultravioleta-visível (UV-Vis) e fluorescência estável (Cheng et al., 2022).

### **2.8.1 Pontos Quânticos de Grafeno**

De forma geral, os pontos quânticos são materiais excepcionalmente muito pequenos feitos por materiais semicondutores e que, ao receberem energia, são capazes de emitir luz brilhante e intensa. Os pontos quânticos possuem uma grande área superficial, tornando-os interessantes para aplicação na detecção e diagnóstico de doenças. Podem ser formadas a partir de diferentes materiais, como ouro, carbono e materiais semicondutores, e são eficientemente fixadas a superfícies devido a fácil interação com moléculas viabilizando diversas aplicações biomédicas (Karami et al., 2024).

Diferentes alótropos de carbono podem expressar pontos quânticos a depender dos processos de síntese utilizados, derivando desses processos os pontos quânticos de grafeno, pontos quânticos de carbono, pontos de polímero carbonizado e nanopontos de carbono (Pourmadadi et al., 2023). O uso dos pontos quânticos está fortemente associado com o desenvolvimento e fabricação de dispositivos ópticos devido a emissão de luz intensa e brilhante ao receberem energia (Karami et al., 2024).

Os pontos quânticos de grafeno apresentam propriedades e aplicações diversas na biotecnologia versando sobre bioimagem e biossensoriamento, sistemas de entrega de medicamentos, fototerapia, terapia fotodinâmica, captação e armazenamento de energia, fotocatalise e engenharia de tecidos (Kumar et al., 2022). Uma das características mais atrativas dos GQDs é que são compostos de carbono e, portanto, facilmente acessíveis, apresentando baixa toxicidade, alta solubilidade em diversos solventes e a possibilidade de incorporar grupos funcionais em suas bordas. Essas características os tornam muito mais atraentes para diversas aplicações quando comparados aos semicondutores inorgânicos QDs (Bacon; Bradley; Nann, 2014).

O caráter dos GQDs é definido pelo seu arranjo de elétrons, influenciada por diversos fatores, como a funcionalização química, a conformação física, as dimensões laterais e as concentrações de defeitos. Os GQDs, além de possuírem características eletrônicas, também exibem fotoluminescência e, nesse caso, as concentrações de dopantes, dimensões físicas e grupos funcionais de superfície são projetados para exibir fotoluminescência com uma faixa de emissão que inclui o infravermelho próximo, exibindo colorações como vermelho, laranja, verde, azul e violeta intenso (Choi, 2017; Chung; Revia; Zhang, 2021).

O transporte eletrônico nos pontos quânticos de grafeno é realizado em todas as três dimensões espaciais, apresentando formato hexagonal e um tamanho na faixa abaixo de 20 nm de diâmetro, demonstrando camadas atômicas e dimensões dentro da nanoescala, o configurando como um material 0D. As suas principais propriedades luminescentes e de condutividade elétrica se devem às modificações na distribuição eletrônica tornando-o um material de banda proibida, ou seja, um material que se encontra em uma faixa de energia entre a banda de valência e a banda de condução. Dessa forma, essas modificações podem ser ajustadas de acordo com a estrutura e o tamanho dos GQDs (Geim; Novoselov, 2007; Choudhary et al., 2015; Tian et al., 2018).

Os GQDs são anisotrópicos e apresentam um aspecto parecido com um tecido, similar ao grafeno. Os GQDs possuem características morfológicas similares às dos pontos de carbono e do grafeno. A dimensão do vértice dos GQDs é bastante reduzida quando comparada à sua borda. Esta estrutura possibilita a expressão de grupos funcionais na superfície externa por meio da formação das folhas de grafeno, únicas ou múltiplas, proporcionando assim, diversos locais para a funcionalização química (Tabish et al., 2022).

Ademais, a biocompatibilidade também é uma característica fundamental dos GQDs para a utilização em biossensores in vivo. Apesar de vários nanomateriais à base de carbono terem sido identificados como tóxicos devido à agregação, os GQDs apresentam uma solubilidade melhorada em meios aquosos, o que os torna um substituto ecológico para nanopartículas de metal. Uma forma eficaz de avaliar a biocompatibilidade de GQDs é executar um teste de citotoxicidade, que avalia a toxicidade desses compostos para células cultivadas. Vários estudos comprovaram que os GQDs não são citotóxicos, variando a citotoxicidade conforme as suas

alterações de superfície (Lee et al., 2020; Nesakumar; Srinivasan; Alwarappan, 2022).

Espectroscopia UV-vis, Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS), espectroscopia de Raman, difração de raio-X (DRX), HRTEM (microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução, do inglês, *High-resolution transmission electron microscopy*) e a espectroscopia FTIR são técnicas empregadas para pesquisar e caracterizar os pontos quânticos de grafeno (Karami et al., 2024).

### **2.8.1.2 Pontos quânticos de grafeno aplicados em biossensores eletroquímicos**

Objetivando a detecção de DNA barata e precisa, plataformas de metodologias eletroquímicas baseadas em pontos quânticos de grafeno são amplamente aplicados em estudos com ácidos nucleicos aperfeiçoando a imobilização de sequências de sondas de fita simples de DNA (ssDNA) (Chen et al., 2017).

A notável performance dos sensores que empregam materiais baseados em GQDs é principalmente devido à sua elevada relação superfície-volume, além de seus diversos pontos de detecção de moléculas. O contato com o analito de interesse pode ocorrer nos locais de borda, através dos grupos funcionalizados, ou através da interação  $\pi$ - $\pi$ . Ademais, a modulação da transferência de carga dos GQDs pode ser ajustada conforme a aplicação desejada. Normalmente, a eliminação dos grupos funcionais resulta em GQDs com uma característica de hibridização  $sp^2$  mais acentuada, o que conseqüentemente reduz a resistência elétrica (Facure et al., 2020).

A preferência pelo uso de GQDs na eletroquímica também se deve à sua facilidade de fabricação e à possibilidade de serem dopados ou modificados para usos específicos de detecção. Essas propriedades possibilitam que nanomateriais que utilizam GQDs apresentem limites de detecção reduzidos e sensibilidades elevadas. Frequentemente, podem ser combinados com outros materiais para criar nanocompósitos baseados em GQDs, visando a criação de efeitos sinérgicos para simplificar reações catalíticas com analitos de interesse (Asadi et al., 2019).

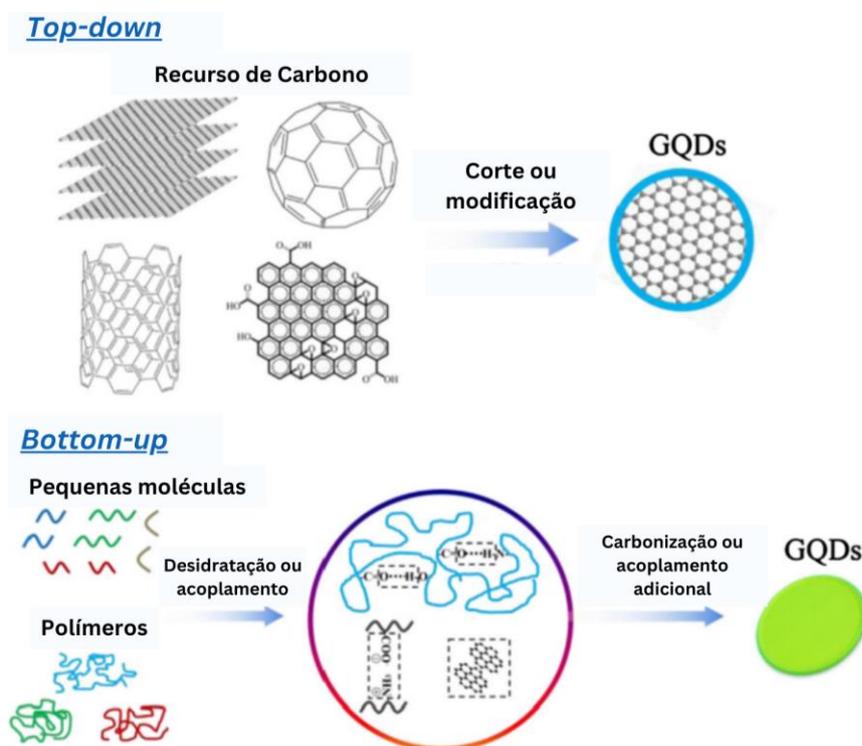
A preservação dos grupos funcionais pode favorecer a interação com os analitos, um requisito crucial para as aplicações de sensoriamento. Neste sentido,

há um aumento na transferência de carga ao utilizar GQDs em aplicações eletroquímicas, mesmo quando funcionalizadas. Essa conduta pode ser compreendida através das ilhas de carbono sp<sup>2</sup> que persistem nos GQDs funcionalizados, facilitando a transferência de carga (Xie et al., 2016).

### 2.8.1.3 Principais métodos de síntese dos pontos quânticos de grafeno

Os GQDs estão sendo produzidos através de técnicas físicas e químicas. A classificação de abordagens de síntese de GQDs pode ser feita de cima para baixo (*top-down*) ou de baixo para cima (*bottom-up*) (Figura 18). Na metodologia de baixo para cima, os GQDs, em sua maioria, são produzidos especialmente através da pirólise ou carbonização de precursores orgânicos menores, abertura de gaiolas de fulereno e técnicas de molde. Por outro lado, os GQDs na metodologia de cima para baixo são, por muitas vezes, obtidos através do dimensionamento de grandes quantidades de carbono grafítico (Kumar et al., 2022).

**Figura 18** - Abordagens *top-down* e *bottom-up* para a síntese dos GQDs.



Fonte: Adaptado de Kumar et al., 2020.

- **Método de cima para baixo (*top-down*)**

**Esfoliação:** O material é imerso em um eletrólito e um potencial é aplicado levando a clivagem de ligações  $sp^2$  e posteriormente a redução eletroquímica por um potencial apropriado (Tan et al., 2015).

**Hidrotermal:** Nanopartículas de carbono são fragmentadas a partir do uso de agentes oxidantes fortes, como  $HNO_3$  e  $H_2SO_4$ . O uso de diferentes temperaturas hidrotérmicas ocasiona variação no tamanho das partículas de GQDs (Xie; Lai; Huq, 2017).

**Clivagem oxidativa:** Ligações C-C são "cortadas" por agentes de oxidação fortes dos materiais precursores, como grafeno e nanotubos (Kumar et al., 2022).

- **Método de baixo para cima (*bottom-up*)**

**Pirólise:** Processo de "quebra" de moléculas orgânicas ou polímeros na ausência de oxigênio em alta temperatura (Sengupta et al., 2023).

**Abertura de gaiola do fulereno:** Formação de folhas a partir da abertura da estrutura do fulereno devido ao rompimento de ligação covalente entre átomos de carbono utilizando o rutênio como agente catalisador (Nesakumar; Srinivasan; Alwarappan, 2022).

**Síntese verde:** Utilização de biomassa/extrato vegetal para a formação dos GQDs empregando solventes ecológicos não tóxicos, degradação de compostos ricos em carbono por bactérias e fungos e condições controladas de aquecimento (Sengupta et al., 2023).

## 2.9 Técnicas de Caracterização Analítica de Eletrodos Modificados

Os avanços tecnológicos proporcionaram a incorporação de técnicas eletroquímicas baseadas no fluxo de cargas e alterações no que se refere à resistência eletrolítica, concentração de íons e adsorção de espécies eletroativas. As técnicas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE), voltametria cíclica (VC), voltametria de onda quadrada e a voltametria de pulso diferencial (DPV) são metodologias eletroquímicas para a eletroanálise da detecção de biomarcadores de importância biomédica, com destaque para o câncer. (Das et al., 2023).

A multidisciplinariedade utilizada na construção de dispositivos sensores permite a consolidação de técnicas a nível micro e nanoscópicas com sistemas correlacionados em mecanismos biológicos, eletrônicos, químicos e mecânicos. Modificações químicas e estruturais são acrescentadas para melhoria da eficiência do

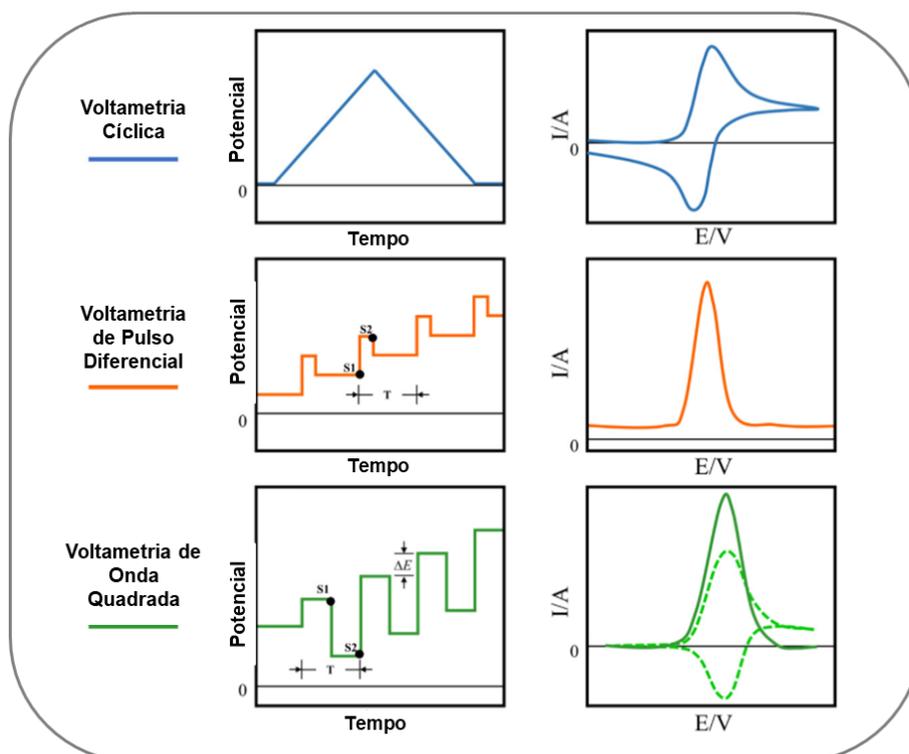
dispositivo e aprimoramento da região condutora ou semicondutora (Khare et al., 2022).

### 2.9.1 Voltametria

O processo de quantificação da detecção eletroquímica de moléculas biologicamente importantes pode ser realizado através das técnicas voltamétricas. Nas quais um potencial é aplicado ao eletrodo de trabalho tornando possível a medição da corrente obtida após o processo de oxidação ou redução do analito analisado eletroquimicamente. Os picos obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito estudado (Labib; Sargent; Kelley, 2016).

Por meio das técnicas de voltametria é possível analisar alvos em uma ampla faixa de potencial com seletividade e alta sensibilidade (Dhanjai et al., 2018). Os biossensores agraciados com a utilização das técnicas voltamétricas são chamados de biossensores voltamétricos e podem ser caracterizados pelos diferentes tipos de voltametria, como voltametria de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada e voltametria cíclica (Figura 19). A aplicabilidade dos métodos voltamétricos pode ser feita para detectar múltiplas amostras em diferentes potenciais (Singh et al., 2021).

**Figura 19** - A forma de aplicação do potencial e o voltamograma obtido por voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada.



Fonte: Adaptado de Liu et al., 2022.

- **Voltametria de Pulso Diferencial:** As técnicas de pulso diferencial se baseiam na aplicação de “degraus de potencial”, ou seja, pulsos que são de amplitude fixa, observando-se uma “rampa” de potencial crescente. A medição da corrente é feita antes da aplicação do pulso e outra ao final do pulso, onde a primeira é subtraída da segunda. A mensuração do sinal eletroquímico da técnica é realizada após o término da corrente capacitiva e do componente faradaico. Para análise dos dados obtidos, é possível fazer a extração da corrente e potencial de pico, como altura e largura (Pacheco et al., 2013).
- **Voltametria Onda Quadrada:** Uma onda quadrada simétrica com uma determinada amplitude é sobreposta a uma rampa de potencial em formato de escada (*staircase*), que é empregada ao eletrodo de trabalho. A corrente é exibida duas vezes, uma no término do pulso direto, onde a direção do pulso coincide com a direção da varredura, e outra no término do pulso reverso (que acontece no meio do degrau da onda *staircase*), onde a direção do pulso é oposta à direção da varredura. A expressão gráfica da técnica, o voltamograma, é plotado de acordo com a diferença obtida entre essas duas correntes versus o potencial aplicado a rampa (Souza; Machado; Avaca, 2003; Liu et al., 2022).

### 2.9.1.1 Voltametria Cíclica

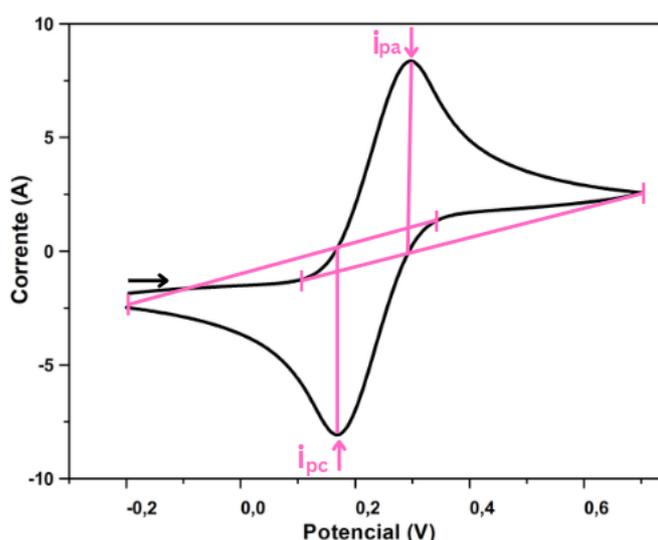
Metodologias de adsorção, cinética de reações heterogêneas de transferências de elétrons e a termodinâmica dos processos de oxidação e redução, ou seja, processos redox, podem ser facilmente analisados através da técnica de voltametria cíclica (Pacheco et al., 2013).

A Voltametria cíclica (VC), faz parte da classe de transdução amperométrica, apresenta um gráfico geralmente em formato de "pato" (Figura 20), obtido pela alteração do potencial e a medição da corrente resultante. Os pontos mais altos e baixos do "pato" correspondem às correntes de pico anódicas e catódicas, respectivamente, em um sistema eletroquímico composto por três eletrodos imersos em uma solução eletrolítica. Complementarmente, o voltamograma cíclico é construído ao medir a corrente entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo em

relação ao potencial, que é promovido pelo eletrodo de referência e é medido entre o mesmo e o eletrodo de trabalho (Elgrishi et al., 2018).

O formato característico do voltamograma cíclico, como é chamado o gráfico resultante da voltametria cíclica, é devido ao potencial de varredura que é aplicado da forma de uma onda triangular ao eletrodo de trabalho. O fluxo do potencial no eletrodo de trabalho promove contínuos eventos de oxidação e diminuição de espécies eletroativas na solução. Entendendo-se, portanto, oxidação como a perda de elétrons e redução como o processo de ganho de elétrons. Conforme o potencial aplicado no eletrodo de trabalho se alinha com o potencial de equilíbrio das espécies na solução, a corrente responsiva cresce progressivamente e as espécies oxidadas/reduzidas na superfície do eletrodo diminuem de maneira gradual. Após a estabilização dos movimentos de transferência de carga e difusão, um pico de oxidação/redução surge. Ao examinar a configuração dos picos no voltamograma, é possível obter dados sobre o processo de reação, tais como a reversibilidade da reação, potencial redox, velocidade de reação e concentração do analito analisado (Liu et al., 2022; Amaral et al., 2023).

**Figura 20** - Exemplo de um voltamograma cíclico clássico obtido a partir de análises eletroquímicas.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Com base nesses aspectos, fica evidente que o potencial tem um impacto direto no estado de oxirredução das espécies eletroativas próximas à superfície do eletrodo. Conforme o potencial aumenta, a oxidação das espécies é facilitada. Por

outro lado, em potenciais mais negativos, o eletrodo se transforma numa fonte de elétrons, contribuindo para a diminuição das espécies químicas. Portanto, ao realizar uma varredura de potencial em direção positiva, utiliza-se o termo varredura anódica. Uma varredura de potencial em sentido contrário é conhecida como varredura catódica (Elgrishi et al., 2018). De acordo com essa concepção, é evidenciada a equação a seguir (Equação 1), na qual O representa a forma oxidada da espécie eletroativa, R a sua versão reduzida e  $ne^-$  representa a quantidade de elétrons envolvidos no processo de oxirredução.



O impulso para o acontecimento da reação eletroquímica é a diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho utilizado e o de referência. Para a produção da corrente elétrica é necessário que no início, o potencial seja varrido de forma linear ao longo do tempo, dando origem a uma substância química que sofre oxidação ou redução quando o potencial alcança um valor suficientemente negativo ou positivo na superfície do eletrodo de trabalho. Durante a análise de potencial, é possível quantificar a quantidade de substâncias químicas que estão em um processo redox em um determinado intervalo de tempo. Seguindo a direção da seta de cor preta na Figura 20, é observável o sentido da corrente para potenciais mais positivos, anódicos. No ponto mais alto do gráfico, pode-se extrair o pico de corrente anódica ( $I_{pa}$ ) que corresponde ao processo oxidativo que aumenta até atingir um ponto de saturação, reduzindo, assim, o transporte de massa no eletrodo de trabalho. Esse processo deriva na diminuição da corrente anódica durante a varredura, portanto, um ponto de transição é alcançado tornando a percepção da varredura em sentido inverso, seguindo uma orientação em sentido aos potenciais negativos, e, havendo a redução eletroquímica na superfície do eletrodo de trabalho resultando na corrente de pico catódica ( $I_{pc}$ ) em seu ponto mais baixo. Sendo assim, a varredura de potencial do eletrodo é invertida e realizada na direção contrária e, assim, segue até atingir o potencial inicial (Elgrishi et al., 2018; Espinoza et al., 2019; Sandford et al., 2019).

Alguns fatores principais podem afetar a intensidade da corrente, bem como dados específicos sobre o analito, podem ser obtidos através de alterações nas

respostas voltamétricas. O potencial ( $E$ ) é o parâmetro a ser determinado, enquanto a corrente resultante ( $i$ ) é o parâmetro medido. Portanto, essas reações fornecem elétrons suficientes para o movimento de deslocamento da corrente elétrica. Contudo, vários elementos podem modificar a intensidade deste fluxo de carga, como o uso ou a produção de espécies eletroquímicas e a existência de cargas negativas. Diferentes elementos, como partículas e nanoestruturas, podem se aderir no eletrodo de trabalho, afetando, portanto, a condutividade do sistema (Grieshaber et al., 2008; Semenova et al., 2018; Parmin et al., 2019).

### **2.9.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica**

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) tem sido extensivamente empregada em diversos segmentos biotecnológicos. Desde o seu desenvolvimento, que data entre 1880 e 1900, a técnica de EIE passou por processos de aprimoramento, desde a incrementação aos sistemas eletroquímicos com Warburg, em 1899, até o desenvolvimento do circuito equivalente de Randle, em 1947, primordial para a análise dos espectros característicos a impedância da transferência de carga (Khare et al., 2022).

A EIE fornece amplas informações sobre um sistema eletroquímico real. Fatores físicos, elétricos e eletroquímicos, como capacitância da dupla camada elétrica na interface e o eletrólito, a cinética de uma reação de transferência de carga, reações e fenômenos de adsorção e dessorção, fenômenos de transferência de massa, resistência do eletrólito e a condutividade do sistema, podem ser avaliadas através da aplicação da EIE (Lazanas; Prodromidis, 2023).

Esta metodologia baseia-se no emprego de um estímulo elétrico a um conjunto de eletrodos posicionados em uma célula eletroquímica e na análise da reação gerada após esse estímulo elétrico. Normalmente, este estímulo aplicado é um potencial contínuo de pequena amplitude na forma senoidal. Ao aplicar um potencial de baixo valor, o sistema experimentará uma perturbação mínima, possibilitando a análise de eventos próximos ao estado de equilíbrio. Na mesma célula eletroquímica, um sinal variado em diferentes frequências é sobreposto. Como resultado, há a produção de uma corrente alternada de característica senoidal. A impedância do sistema é determinada através do monitoramento das

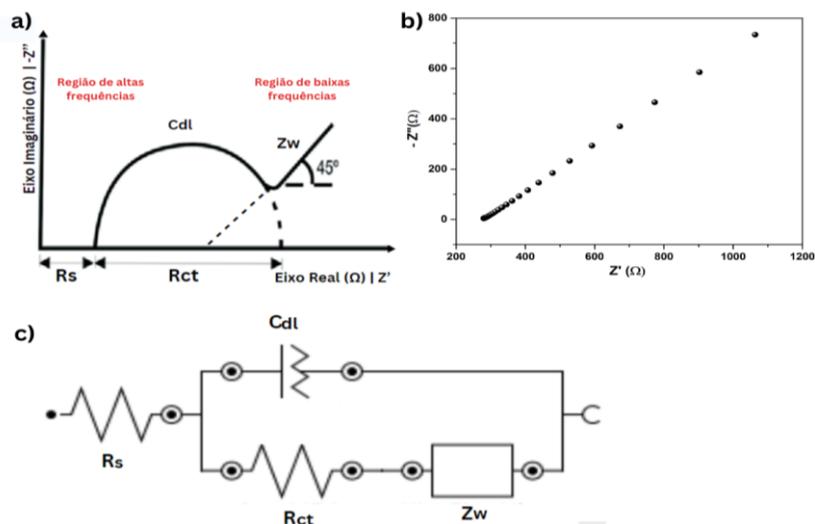
relações entre o potencial aplicado e a corrente gerada (Muñoz; Montes; Baeza, 2017).

A lei de Ohm (Equação 2) é utilizada para as medições de impedância, onde a avaliação é feita com a mudança de fase ocasionada da relação entre a tensão e a corrente aplicada. Em mensurações eletroquímicas, em uma célula eletroquímica um potencial de Corrente Alternada (CA) é aplicado e mede-se a corrente e a resistência por meio do circuito. Fenômenos de redução/oxidação ocorrem na solução eletrolítica e a determinação impedimétrica pode ser medida em variações de frequência (f) em uma faixa fixa ou em apenas uma frequência (Khare et al., 2022).

$$R = \frac{E}{I} \quad \text{Equação 2}$$

A capacidade de um elemento do circuito resistir ao fluxo de uma corrente elétrica é o conceito atribuído a resistência elétrica, na qual compreende-se que a resistência é a razão entre a voltagem e a corrente, observados na equação 2. Números complexos formados pelos valores da impedância correspondem à resistência, ou seja, a parte real ( $Z'$ ), e à capacitância do circuito elétrico, ou seja, a parte imaginária ( $-Z''$ ), que, graficamente, são representados no diagrama de Nyquist, que corresponde aos resultados obtidos por meio de circuito elétrico, denominado de circuito equivalente (Figura 21) (Sacco, 2017).

**Figura 21** - Representação geral do gráfico Nyquist (a), gráfico impedimétrico de sistema com resistência zero (b) e circuito equivalente de Randles (c).



Fonte: Autoria própria.

O espectro de impedância relacionado aos números complexos do sistema impedimétrico pode ser adquirido seguindo o esquema matemático das equações 3 e 4. Compreendendo-se, portanto, que os elementos presentes possuem significância analítica elucidada na Tabela 2.

$$Z' = R_s + \frac{R_{ct}}{1 + \omega^2 C_{dl}^2 R_{ct}^2} \quad \text{Equação 3}$$

$$-Z'' = \frac{\omega C_{dl} R_{ct}^2}{1 + \omega^2 C_{dl}^2 R_{ct}^2} \quad \text{Equação 4}$$

**Tabela 2 – Elementos comumente encontrados no circuito elétrico e a respectiva interpretação física.**

Elemento	Sigla	Símbolo	Significado físico
Resistor	R		Pode simbolizar a resistência da solução eletrolítica ( $R_s$ ) e a resistência de transferência de carga ( $R_{ct}$ ). $R_s$ : Vinculado a concentração iônica, a natureza dos íons e a área do eletrodo. $R_{ct}$ : A taxa de transferência de elétrons é inversamente proporcional ao $R_{ct}$ . É o critério mais comumente usado para avaliar a interação do biossensor com o analito de interesse. Ligada às alterações na superfície do transdutor que afetam a condução de elétrons na interface eletrodo/solução.
Capacitor	C		Relacionado a dupla camada elétrica. Pode ser usado para representar o acúmulo/depleção, ou seja, a distribuição de carga ocorrendo através na interface solução eletrolítica/eletrodo.
Elemento de fase constante	CPE		Utilizado para capacitâncias não ideais, que podem surgir devido à não uniformidade e porosidade dos materiais e interfaces eletroquímicas. A interface é vista como uma camada compacta de heterogeneidade.

Warburg	W		Utilizado para resistências que ocorrem devido à transferência de massa (difusão), que é mais proeminente em baixas frequências.
Indutor	L		Representa contribuições de impedância associadas a fios enrolados/conexões elétricas em altas frequências e processos de degradação em baixas frequências.

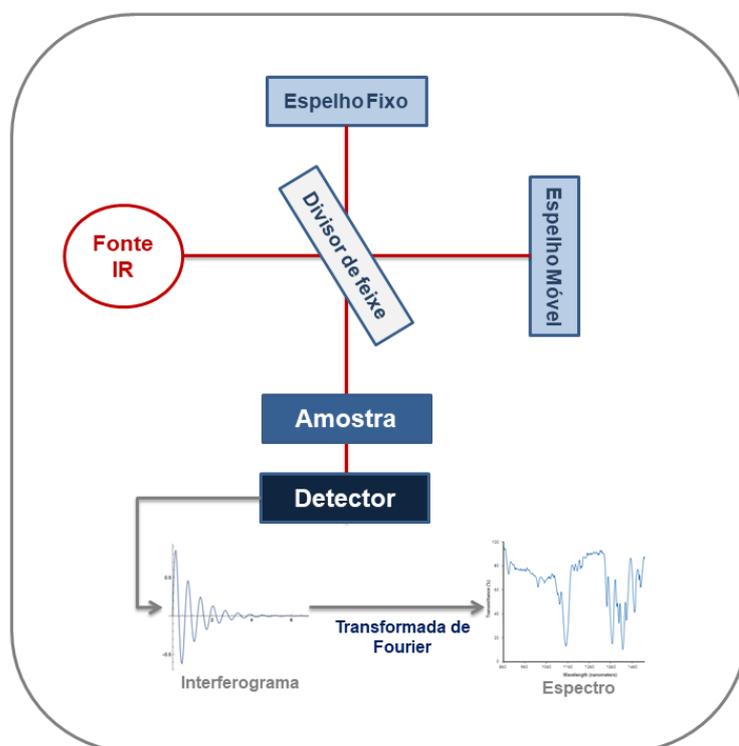
Fonte: Adaptado de Vadhva et al., 2021.

### 2.9.3 Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier - FTIR

A coleta de informações acerca das moléculas em aspectos de emissão, reflexão e absorção é possível através da técnica de luz infravermelha. Para análise de interações moleculares e grupos funcionais, a Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR) é aplicada sanando limitações da espectroscopia de fotoelétrons de raios X, por exemplo, pois, permite de forma altamente eficaz a análise da composição da diversidade dos constituintes químicos presentes (Saji et al., 2024).

Para a possibilidade de aplicação da técnica, o maquinário necessário é dotado de uma fonte, um interferômetro, um detector, um compartimento para amostra, um conversor analógico-digital e um amplificador (Figura 22). Então, o sinal é obtido, amplificado, processado e transformado em um sinal viável para o detector e, assim, submetida a transformação de Fourier (Stuart, 2004).

**Figura 22** - Representação esquemática do mecanismo de funcionamento da espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Na metodologia convencional de espectroscopia no infravermelho (IR) há o fornecimento de informações importantes sobre as ligações químicas e grupos funcionais constituintes do composto estudado obtendo picos que representam os modos vibracionais das moléculas analisadas, sendo assim, a molécula poderá ser identificada através de suas características específicas. Em relação a técnica de FTIR, o emprego de dois feixes IR é convertido em um interferograma que fará o registro das modificações dos comprimentos dos feixes (Upadhyay; Jaiswal; Jha, 2016).

Portanto, um divisor de feixes é imprescindível para a produção do interferograma, pois, é responsável pela divisão da luz em dois feixes fazendo assim com que o interferômetro colete a luz, que é combinada por ser obtida em duas fontes distintas. A ferramenta matemática, denominada de transformada de Fourier, é responsável pela conversão do interferograma resultante em um espectro que é plotado da intensidade em relação à frequência (Svensson; Kourtji; Macgregor, 2002; Heberger, 2008; He et al., 2023).

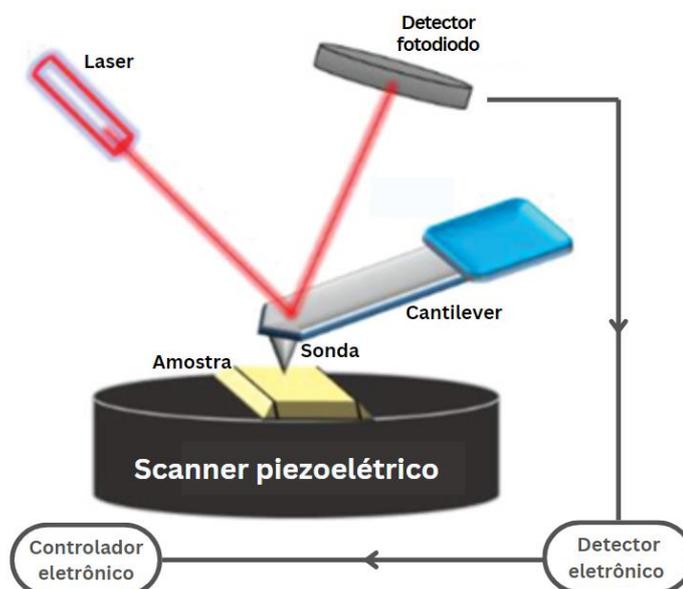
#### 2.9.4 Microscopia de Força Atômica - AFM

A técnica de microscopia de força atômica (AFM, do inglês, *atomic force microscopy*) foi criada em 1986 para a obtenção de imagens em resolução atômica de superfícies sólidas. O mecanismo básico de funcionamento do AFM é baseado no monitoramento das forças atuantes entre a superfície da amostra e a ponta do AFM. A ponta é vinculada à extremidade disponível de uma sonda microcantilever, um sensor de deflexão do cantilever, um posicionador piezoelétrico e um sistema de *feedback* elétrico que interliga o nanoposicionador ao sensor de deflexão (Figura 23) (Muller et al., 2021).

Várias propriedades físicas, mecânicas e químicas podem ser caracterizadas a partir das técnicas de microscopia. A AFM se tornou uma alternativa microscópica frente ao microscópio de varredura por tunelamento (STM, do inglês, *scanning tunneling microscope*), pois, este necessita do monitoramento durante o funcionamento das alterações na corrente do túnel de amostras condutoras e semicondutoras. Nesse sentido, a microscopia de força atômica é uma maneira alternativa de investigação em escala nanométrica e em tempo real da morfologia tridimensional em amostras de superfícies condutoras ou não. O processo superficial em amostras sólidas, e também líquidas, podem ser estudadas pela AFM, justificando, assim, a aplicabilidade em diversos cenários científicos, desde as ciências agrônômicas e ambientais, até as ciências de materiais e biológicas (Liu et al., 2023).

O funcionamento da técnica ocorre devido ao acompanhamento da deflexão normal e torcional do cantilever, enquanto um laser é focado na extremidade do cantilever e refletido para o quadrante de fotodiodo sensível à posição. Nesse sentido, a deflexão do cantilever será proporcional à força, entendendo-se, portanto, que a deflexão do cantilever é a medida que denota o atrito maior ou em quais regiões têm bordas na amostra, especialmente no modo contato (Ando, 2012).

**Figura 23** - Representação ilustrativa do processo de funcionamento de um microscópio de força atômica.



Fonte: Adaptado de Shin et al., 2015.

Em contrapartida ao microscópio óptico, em que a luz usada para a iluminação será a resolução do comprimento de onda, em torno de 250 e 420 nm, no caso da AFM, a resolução proporcionada é muito maior no momento da varredura, variando entre 2 a 5 nm (Joshua et al., 2023). Nessa perspectiva, as interfaces de polímeros e outros materiais podem ser caracterizadas em seu estado nativo gerando mapas de propriedades dos materiais estudados. A força de interação no que se refere à distância ponta-superfície são registradas pelo AFM, gerando, assim, imagens topográficas do material analisado (Garcia, 2020). A altura é controlada e torna possível a manutenção da força estável entre a ponta e a amostra. A deflexão do cantilever versus sua posição na amostra podem ser observadas a partir da plotagem da imagem topográfica (Butt; Cappella; Kappl, 2005).

A resolução na direção z para sondas, normalmente utilizadas para obter imagens de amostras biológicas, é de cerca de 1 Å, enquanto que a resolução lateral, mais especificamente, x e y, é de cerca de 1 nm, sendo baseada na geometria da sonda e pelas forças de interação, da interação sonda-amostra (Heath et al., 2021).

A geometria do ápice da ponta piramidal determina a resolução de uma imagem. O sensor funciona de duas maneiras, ou seja, no modo de contato e no modo sem contato ou dinâmico. O modo de contato, é caracterizado pelo contato

direto com as superfícies da amostra, enquanto que no modo sem contato ou dinâmico, há a oscilação da ponta para a interação com a superfície da amostra. A medição do perfil da superfície de contato ocorre através do cantilever, mediante o deslocamento da ponta em relação à rugosidade da amostra, é possível se obter um padrão de superfície da amostra. O cantilever se curva devido às forças repulsivas que atuam entre as superfícies da amostra e a ponta, conforme a ponta do AFM mapeia a superfície da amostra (Nguyen-Tri et al., 2020).

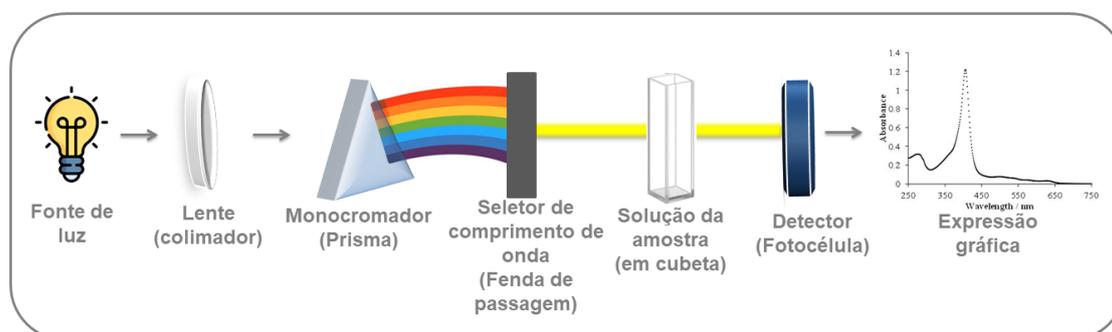
### **2.9.5 Espectroscopia UV Visível - UV/Vis**

A técnica de espectrofotometria de absorção ultravioleta e visível (UV-Vis) se baseia na redução da medição da radiação eletromagnética através de um material absorvente. Esta radiação abrange uma faixa espectral entre 190 e 800 nm, diferenciando-se em termos de faixas de energia e tipo de excitação de outras áreas relacionadas. Esta suavização é consequência da reflexão, dispersão, absorção ou interferências. Contudo, é possível realizar medições precisas da atenuação ao registrar apenas a absorbância. Dentro de certos limites, a absorbância é diretamente relacionada à concentração do analito a ser analisado e à distância que a luz percorre ao atravessar a amostra no decorrer da irradiação (Passos; Saraiva, 2019).

A quantidade de luz que é absorvida ou transmitida será medida através da espectroscopia UV-vis em diferentes comprimentos de onda nas faixas caracterizadas como visível (Vis) e luz ultravioleta (UV). O procedimento se baseia em um feixe de luz que ilumina a amostra e a análise da medição da quantidade de luz que atravessa por ela. No processo experimental, análises qualitativas e quantitativas podem ser feitas, ou seja, determinação da presença e da quantidade de determinadas substâncias, respectivamente (Ostergaard, 2016).

Após a absorção de luz pela amostra, a luz restante é gravada de acordo com o comprimento de onda por meio de um detector (Figura 24), denominada de luz transmitida. O espectro de absorção da amostra será então produzido pelo detector. O fornecimento de informações acerca das interações moleculares devido ao monitoramento de reações químicas, avaliação de aspectos e propriedades ópticas e caracterização dos materiais empregados no estudo podem ser atribuídas a espectroscopia UV-vis (Picollo; Aceto; Vitorino, 2019; Yurdakal et al., 2019).

**Figura 24** - Representação esquemática do mecanismo de funcionamento da espectroscopia de UV Visível - UV/Vis.



Fonte: Autoria própria, 2024.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Construir eletrodos biossensíveis baseados em PPY e QGDs para o diagnóstico diferencial de HPV.

#### 3.2. Específicos

- Obter filme de PPY sobre superfície de eletrodo de ouro através de eletrossíntese;
- Sintetizar quantum dots de grafeno através da técnica da pirólise do ácido cítrico;
- Estudar as propriedades eletroquímicas e interfaciais do filme de PPY adsorvido sobre o ouro e avaliar a influência da imobilização covalente dos QGDs;
- Imobilizar quimicamente segmentos de DNA (sondas de bioreconhecimento) sobre a plataforma nanoestruturada PPY/QGDs;
- Verificar a viabilidade de construção de eletrodos biossensíveis baseados em sonda de DNA degenerada MY09 (sondas capazes de reconhecer todos os tipos de HPV);
- Avaliar a capacidade de reconhecimento específico de eletrodos biossensíveis construídos a partir de sondas de DNA degeneradas frente à plasmídeos recombinantes contendo específico de eletrodos biossensíveis construídos a partir do gene L1 de diferentes tipos de HPV (HPV 16, 18, 31 e 58);
- Avaliar a capacidade de reconhecimento da sonda de DNA desenvolvida para detectar famílias de HPV através do uso de plasmídeos recombinantes;

- Avaliar a seletividade dos eletrodos biossensíveis frente à plasmídeos contendo segmentos de DNA não complementar;
- Determinar o limite de detecção dos eletrodos biossensíveis e realizar o ensaio de biodetecção em amostras clínicas de pacientes infectados com HPV (amostras de cDNA);
- Determinar as correntes de pico anódicas (ipa) e catódicas (ipc) dos voltamogramas cíclicos para cada etapa de montagem dos eletrodos biossensíveis e após o processo de biodetecção;
- Realizar simulação teórica dos resultados experimentais obtidos a partir de espectroscopia de impedância eletroquímica;
- Avaliar a reprodutibilidade, repetitividade de sinal e estudar a ação de moléculas interferentes sobre a resposta eletroquímica;
- Realizar análise morfológica e topográfica dos filmes biológicos PPY/QGDs/sonda e PPY/QGDs/sonda/HPV através de AFM;

#### 4. ARTIGO

### **NANOSTRUCTURED GENOSENSOR PLATFORM BASED ON POLYPYRROLE FILM AND GRAPHENE QUANTUM DOTS FOR THE DETECTION OF HIGH- RISK HPV**

Artigo submetido ao periódico: **Journal of Pharmaceutical and Biomedical  
Analysis**



Fator de impacto: 3.1

**NANOSTRUCTURED GENOSENSOR PLATFORM BASED ON POLYPYRROLE  
FILM AND GRAPHENE QUANTUM DOTS FOR THE DETECTION OF HIGH-  
RISK HPV**

Luiza G. T. Santos <sup>a,b</sup>, Alberto G. Silva-Junior <sup>a,b</sup>, Maurília P. Costa <sup>a,b</sup>, Norma L. C. L. Silva <sup>c</sup>,  
Cesar A. S. Andrade <sup>a,b</sup>, Maria D.L. Oliveira <sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901  
Recife, PE, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de  
Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

<sup>c</sup> Departamento de Virologia-Instituto Aggeu Magalhaes-Fiocruz, 50670-420 Recife, PE, Brazil.

\*To whom correspondence should be addressed.

M. D. L. Oliveira, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

Phone: +55-81-2126.8450

E-mail: [maria.dloliveira@ufpe.br](mailto:maria.dloliveira@ufpe.br)

## ABSTRACT

Human Papillomavirus (HPV) is a globally prevalent infection, contributing to both benign and malignant diseases. While low-risk HPV type cause warts, high-risk strains are linked to cervical cancer and other malignancies. The most prevalent HPVs, HPV 16 and 18, are accountable for over 70% of cervical cancer cases globally. The virus poses a significant public health burden, particularly in low-resource settings. Electrochemical genosensor stands out as a promising tool for detecting and screening HPV and other cancer related viruses. For this reason, we developed an electrochemical genosensor for the detection of high-risk HPV. A nanostructured electropolymerized polypyrrole (PPy) film and graphene quantum dots (GQD) was designed for the immobilization of the HPV MY09 probe. The sensing platform was characterized by using cyclic voltammetry (CV) and atomic force microscopy (AFM), evaluating biological samples of cDNA from infected patients. Topographical analysis revealed increased peaks and roughness regarding the hybridization process between the sensing platform and patient samples. Electrochemically, the proposed biosensor exhibited sensitive response over recombinant plasmid and cDNA samples, revealing a LOD of 0.62  $\text{pg.mL}^{-1}$  and 0.85  $\text{pg.mL}^{-1}$  for plasmidial and cDNA samples, respectively. Moreover, the genosensor presented excellent selectivity over negative patient samples and interfering molecules. Therefore, our results highlight the ability of the PPy-GQD-MY09<sub>probe</sub>-BSA genosensor platform to detect different HPV genotypes, displaying higher affinity over HPV 16 and 18. The developed sensor strategy stands out as a promising tool for HPV diagnosis and follow-up treatment.

*Keywords: Genosensor; cyclic voltammetry; quantum dots; polypyrrole; Human Papillomavirus.*

## **1. Introduction**

Human papillomavirus (HPV) is a widespread viral infection that affects epithelial tissues, including the skin and mucous membranes. Despite secondary prevention through screening methods, cervical cancer remains one of the world's leading causes of cancer-related morbidity and death among women. It is the fourth most prevalent type of cancer and the fourth most common cause of deaths due to cancer among women, responsible for over 600.000 new cases and 342.000 deaths worldwide in 2020 [1]. In Brazil, cervical cancer ranks third in terms of cases and fourth in terms of female fatal outcomes, according to the National Cancer Institute (INCA). When age-adjusted to the World Standard Population, the country's cervical cancer mortality rate in 2020 was 4.6 deaths per 100.000 women [2].

According to the International Agency for Research on Cancer (IARC), HPV presents over 200 known types and is categorized into low-risk and high-risk groups based on their association with cancer development. Long-term infection with one of the high-risk HPV genotypes (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68) are the primary cause of nearly all cervical malignancies globally [3]. High-risk HPVs possess oncogenic potential by integrating their DNA into the host genome and disrupting cell cycle regulation. Low-risk HPV genotypes (6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73, and 81) are primarily linked to benign conditions like genital warts and recurrent respiratory papillomatosis [4]. The prevalence of HPV emphasizes the significance of broad vaccination and routine screening, even in the presence of preventive measures. Campaigns for public health highlight how crucial early detection is to control the disease [5].

Molecular and cytological methods are used in HPV diagnosis to identify the virus and any related cellular abnormalities. The Papanicolaou (Pap) smear is the most widely used technique for detecting precancerous alterations in cervical cells, nevertheless, regular follow-up tests are necessary since pap smears are less sensitive [6]. HPV DNA testing identifies

certain HPV types and detects viral genetic material. It is frequently carried out using PCR-based techniques. However, particularly in areas with limited resources, their cost and complexity limit them from being widely used [7]. An alternate method for highly sensitively identifying high-risk HPV strains is hybrid capture (HC2) technology, but it is not genotype specific and may result in false positives [8]. When biopsies are obtained to confirm a diagnosis or evaluate the course of a disease, histopathological analysis is used. For HPV screening and treatment, cytology and molecular testing together continue to be the gold standard [9].

Electrochemical biosensors are cutting-edge analytical tools that use easily measured electrical signals to identify biological molecules. High sensitivity, specificity, quick response time, and affordability are some of the features that make these devices suitable for clinical settings [10]. Viral DNA, RNA, or proteins can be precisely targeted by using certain probes such as aptamers, oligonucleotides, or antibodies. These biosensors help detect viral indicators in virus diagnostics, even at low concentrations, enabling early infection identification and monitoring [11]. Their portability and point-of-care testing capabilities further increase their use, particularly in areas with limited resources. Since their performance has been further enhanced by recent advancements in nanomaterials and microfabrication, electrochemical biosensors have potential as a diagnostic tool for viruses such as HIV, SARS-CoV-2, and HPV [12,13].

An effective electrochemical method for examining redox features and electron transfer mechanisms in biosensors is cyclic voltammetry (CV). Through the application of a cyclic potential sweep to an electrochemical system, CV produces a current response that offers comprehensive insights into the interactions between the analyte and electrode surface [14]. Its high sensitivity makes it possible to detect even the smallest biochemical changes, which makes it perfect for tracking the immobilization of biomolecules, examining the kinetics of

reactions, and identifying target analytes. CV is frequently used in biosensors to assess the functionalization of electrode surfaces and the binding of the probes to target molecules [15].

Conducting polymers and nanoparticles are examples of nanomaterials that have transformed electrochemical biosensors by improving their stability, sensitivity, and specificity. Effective platforms for biomolecule immobilization and signal transduction are created by conducting polymers, such as polypyrrole, which offer superior electrical conductivity and biocompatibility [16]. Quantum dots and other nanoparticles have special optical and electrical characteristics that allow for lower detection limits and improved signal amplification [17]. These materials enhance the sensors' surface area, which enhances analyte interaction and detection performance. Furthermore, their adaptability enables the development of multiplexed biosensors, which can identify several targets at once [18].

This study presents the development of an advanced electrochemical biosensor incorporating polypyrrole (PPy) and graphene quantum dots (GQDs), offering a promising platform for the detection and differentiation of HPV genotypes. The biosensor leverages the superior conductivity of PPy and the high surface area of GQDs, which are functionalized with carboxyl groups to immobilize the degenerate MY09 probe (5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3'). This probe enables the identification of multiple HPV genotypes with high specificity. The functionalization of the modified electrodes was characterized using Fourier-transform infrared (FTIR) and UV-vis spectroscopy. Surface morphology analysis was performed using atomic force microscopy (AFM), while cyclic voltammetry (CV) validated the assembly process and demonstrated the biosensor's capability to detect HPV. The effectiveness of the biosensor was evaluated using complementary DNA (cDNA) samples from patients with low-risk and high-risk HPV infections as well as recombinant plasmids expressing the viral capsid L1 gene.

## 2. Experimental

### 2.1 Materials

Pyrrole (98%), bovine serum albumin (BSA) ( $\geq 98\%$ ), 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) were obtained from Sigma Aldrich Co. (St Louis, USA). Potassium ferricyanide ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ), potassium ferrocyanide ( $K_4[Fe(CN)_6]$ ), monobasic sodium phosphate ( $NaH_2PO_4$ ), dibasic sodium phosphate ( $Na_2HPO_4$ ), sodium hydroxide and citric acid were purchased from VETEC (Brazil). DNA probe was purchased from Invitrogen (USA). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore-Synergy, Billerica, USA). All chemicals and solvents were of analytical grade and used as received.

### 2.2. DNA probe and biological samples

A DNA MY09 probe (5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3') with an amino-terminal modification was employed in detection assays. This probe is a degenerate oligonucleotide designed to target the conserved region of the HPV L1 gene. Recombinant plasmids were created by subcloning the L1 gene sequences from various HPV types (16, 18, 31, and 58) into a PTA vector. The subcloning of the L1 gene was verified by sequencing the recombinant plasmids using primers specific to the plasmid backbone.

For clinical samples, total RNA was extracted from cervical cells using Trizol reagent. The extracted RNA was reverse transcribed into cDNA specific for HPV types 16, 18, 31, and 58 using a random primer. PCR followed by agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining was conducted to validate the samples. PCR characterization determined whether samples were positive or negative for HPV (Table S1). The study was approved by the local ethics committee (CAAE 23698513.0.0000.5190). Samples were serially diluted in 10 mM phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and stored at  $-10^\circ C$  until further analysis.

### *2.3. Graphene quantum dots (GQD) synthesis*

GQD were synthesized according to the methodology of Sahub et al., 2022 [19], with minor modification. Briefly, the synthesis was carried out with the pyrolysis of citric acid, achieved by heating 2 g of citric acid in an oven at 200°C for 20 minutes, resulting in a thick, dark-orange liquid. Subsequently, 100 mL of a 1% NaOH solution was added to the system under stirring to ensure complete dissolution. The final solution was then adjusted to a pH of 4.0. Water soluble GQD were stored at  $\pm 4^{\circ}\text{C}$  until use.

### *2.4. Biosensor platform assembly process*

Initially, the gold electrode ( $\varphi = 2$  mm) was carefully polished using alumina paste ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), sonicated in MilliQ ultrapure water and then thoroughly rinsed with deionized water. CV and EIS were used to access the cleaning process, and after the electrodes revealed a clean pattern, they were subjected to PPy polymerization through CV.

After that, the electrodes were immersed in a solution containing 1 M HCl and 30 mM pyrrole monomer homogenized under magnetic stirring and ultrasonic bath. Six cycles of polymerization were used in a potential range of -0.4 V to 1.4 V at a scan rate of  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . A thin black film was formed. Subsequently, 2  $\mu\text{L}$  of GQD was dropped cast onto the PPy layer and then, coupling agents EDC NHS (0.4 M and 0.1 M, respectively) were used to activate and improve the immobilization of the MY09 DNA probe (2  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{M}$ ), adsorbed on the functionalized electrode for 15 min. 0,01% BSA was added to block nonspecific free active sites. Fig. 1 shows the stepwise assembly process of the biosensor.

### *2.5. Biorecognition and sensor specificity*

Biorecognition assays were performed using recombinant plasmid samples containing the HPV L1 gene (HPV types 16, 18, 31, and 58) at concentrations ranging from 1 to 75  $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , as well as cDNA samples from cervical cells positive for HPV. Specificity evaluations were conducted with non-complementary DNA sequences and cDNA from patient samples with the genomes of *Candida albicans*, hepatitis C virus (HCV), *Escherichia coli*, and *Schistosoma mansoni*.

Before conducting electrochemical assays, recombinant plasmid samples were heated at 90°C. Hybridization was achieved by applying 2  $\mu\text{L}$  of each sample onto the functionalized electrode and incubating for 5 minutes. Following sample adsorption, the electrode was thoroughly washed with ultrapure deionized water to eliminate unbound molecules. The same protocol was applied for the detection of cDNA. Subsequently, the sensor platform underwent electrochemical analysis using CV.

#### 2.6. Electrochemical characterization

Electrochemical analyses were conducted using a potentiostat/galvanostat Autolab PGSTAT 128N (Metrohm, Netherlands) operated through NOVA 1.11 software. Measurements were carried out in a three-electrode setup immersed in a solution of 10 mM  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (1:1, v/v) prepared in PBS at pH 7.4. The reference electrode was a silver/silver chloride (Ag/AgCl) electrode saturated with 3 M KCl, the counter electrode was a platinum wire, and the working electrode was a bare gold electrode. Voltammograms were recorded over a potential range from -0.2 V to 0.7 V with a scan rate of 50  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . All experiments were conducted in triplicate at room temperature ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ) within a Faraday cage to minimize external interference.

#### 2.7. Optical and topographical measurements

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy was performed using an Agilent Cary 630 FTIR spectrometer (Agilent Technologies, Rowville, Australia) equipped with a diamond attenuated total reflectance (ATR) accessory. Spectra were recorded over the 650–4000  $\text{cm}^{-1}$  range with a resolution of 2  $\text{cm}^{-1}$  under room temperature conditions and 50% relative humidity. UV-vis absorption analysis was conducted using a K37-UV-vis Kasvi spectrophotometer within the 200–600 nm wavelength range, employing quartz cuvettes with an optical path length of 1.0 cm.

Surface topography of the sensor platform and its interaction with the target analyte was analyzed using an SPM-9700 atomic force microscope (Shimadzu, Japan) operating in non-contact mode. Silicon probe cantilevers (Nanoworld, Japan) with a spring constant of 42  $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$  and resonance frequency of 300 kHz were used for the measurements. Imaging was performed at room temperature with a line-scan rate of 1 Hz, covering a  $5 \times 5 \mu\text{m}$  scanning area, and achieving a lateral resolution of  $512 \times 512$  pixels. The acquired images were processed using Gwyddion software for final analysis.

### **3. Results and discussion**

#### *3.1. Topographical characterization*

3D AFM images of the biosensor manufacturing process and its interaction with recombinant plasmid and cDNA samples are shown in Fig. 2. In addition, parameters such as average roughness (Ra) and root mean square roughness (RMS) were used to access detailed roughness information. In Fig. 2a, a well-distributed cauliflower-like shape layer of PPy is observed, revealing topographic peak of 21 nm and roughness values of  $\text{RMS} = 31.19 \text{ nm}$  and  $\text{Ra} = 28.02 \text{ nm}$ . The obtained shape is characterized by solvent molecule incorporation and polymeric mesh swelling [20]. As shown in Fig. 2b, surface heterogeneity is observed after the adsorption of GQD, attributed to the formation of aggregate groupings of the

nanoparticles [21], reaching a maximum height of 28 nm, which resulted in the increase in Ra = 37.45 nm and RMS = 42.30 nm. The results revealed the improvement in surface area, and thus, allowed the extensive immobilization of the MY09 probe and BSA, as seen in Fig. 2c. Height and morphology presented a noticeable change, with an average height of 41 nm (Ra and RMS values, 87.1 nm and 121.3 nm, respectively).

After being exposed to a clinical sample of HPV 18 cDNA (Fig. 2d), an increase in maximum height was observed (63 nm), showing a heterogeneous morphology and increased roughness (RMS = 145.2 nm and Ra = 108 nm). AFM image revealed rounded areas, resulting from the hybridization with complementary DNA target. When using non-complementary DNA molecules for selectivity testing, Fig. 2e demonstrates that the roughness and heterogeneity of the sensor platform are not significantly affected. The hybridization test with HCV cDNA samples showed a maximum peak height of 39 nm (RMS = 125.1 nm and Ra = 92.3 nm). Thus, the genosensor's capacity to identify specific viral genetic material is presumed, where the capacity to identify HPV samples is linked to the rise in height values, highlighting the successful hybridization with MY09 [22].

### 3.2. ATR-FTIR and UV-vis analyses

FTIR analysis was used to determine the relationship between the gold electrode, PPy layer, and GQD nanoparticles, as shown in Fig. S1. While the carbonyl group (C=O) stretching vibration is linked to the strong band at  $1738\text{ cm}^{-1}$ , the aliphatic C-H stretching vibration produced the absorption peak at  $2104\text{ cm}^{-1}$  [23]. Stretching bonds of the pyrrole rings are responsible for bands that fall between  $1555\text{ cm}^{-1}$  and  $1458\text{ cm}^{-1}$  in the spectrum [24]. Furthermore, C = N stretching vibrations ( $1394\text{ cm}^{-1}$ ), = C-H plane vibrations ( $1221\text{ cm}^{-1}$ ), and bending vibrations of the aromatic ring are detected between  $950$  and  $795\text{ cm}^{-1}$  [25,26]. GQDs showed C-H stretching at  $2941\text{ cm}^{-1}$ , C=O stretching (C(O)-OH) at  $1725.18\text{ cm}^{-1}$  [27],

and C-OH stretching at and  $1176\text{ cm}^{-1}$  [28], which suggested that the carboxyl and hydroxyl groups were vibrating and functionalizing onto crystalline GQDs.

The UV-vis spectrum of GQDs (Fig. S2) revealed absorption bands at  $\lambda = 300\text{--}350\text{ nm}$  and  $\lambda = 400\text{--}450\text{ nm}$ , corresponding to the  $n\rightarrow\pi^*$  transitions of C=O groups and surface molecular centers, as well as an absorption edge attributed to the ( $n\rightarrow\pi^*$ ) transitions of non-bonding electrons from adatoms, respectively [29,30].

### *3.3. Electrochemical investigation of the biosensing platform*

CV provides comprehensive insights into surface changes and redox activity, presenting a valuable approach for assembling and analyzing biosensor devices. CV tracks variations in the anodic ( $i_{PA}$ ) and cathodic ( $i_{PC}$ ) current peaks during the assembly process. These peaks show electron transfer events and the effective immobilization of functional groups, nanoparticles or biomolecules [31]. The efficiency of a particular probe's binding or the formation of bioconjugates on the electrode surface can be indicated by changes in peak potential or current intensity.

Fig. S3 presents the electropolymerization process of the PPy film fabricated onto the gold electrode, carried out using a CV razing potential of  $-0.2\text{ V}$  to  $+1.0\text{ V}$ . As a result, the polymerization of pyrrole was found to start at  $+0.7\text{ V}$ , leading to a homogeneous thin black porous film [32]. The film thickness and the increase in polymer conductivity during six voltammetric cycles are correlated. Furthermore, compared to other doping ions, HCl was shown to be a great choice for electropolymerizing conducting polymers like PPy, exhibiting the highest capacitance and current density [33].

The peak current values obtained were determined over the sequential fabrication of the genosensor, as shown in Fig. 3 and in Table S2. The redox behavior of the cleaned Au bare electrode exhibited an  $I_{PA}$  value of  $77.86 \pm 1.63\ \mu\text{A}$ . Afterward, CV was used in the PPy

electropolymerization, leading to an improved conducting surface and thus, electron transfer kinetics, revealing an amperometric response of  $94.95 \pm 1.34 \mu\text{A}$ . Substantial conductivity, strong electronic affinity, and a  $\sigma$ - $\pi$  conjugate system that promotes charge mobility throughout the molecule structure make PPy a good choice for electrochemical biosensor manufacture. Additionally, we accessed the electrode's electroactive area using the Randles-Sevcik equation [34]:

$$I_p = K \cdot n^{3/2} A D^{1/2} \nu^{1/2} C$$

where  $n$  is the number of electrons transmitted ( $=1$ ),  $\nu$  is the scan rate in  $\text{V/s}$  ( $0.100 \text{ V s}^{-1}$ ),  $C$  is the probe molecule in the bulk solution ( $10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$ ),  $A$  is the electrode surface area in  $\text{cm}^2$ ,  $D$  is the diffusion coefficient in  $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$  ( $7.20 \times 10^{-6} \text{ cm}^2$ ), and  $K$  is the constant ( $2.69 \times 10^5$ ). As a result, the PPy-modified gold electrode's surface area was  $0.0745 \text{ cm}^2$ .

GQD was adsorbed onto the PPy electropolymerized layer surface to enhance the probe's immobilization and response signal. As a result, a decrease in anodic and cathodic currents ( $I_{\text{PA}} = 85.93 \pm 3.10 \mu\text{A}$ ) was obtained. In sequence, after activation of free carboxyl groups using EDC NHS coupling agents, single-stranded MY09 probe modified with 5'-amino group was immobilized onto the PPy-GQD layer. Consequently, redox peaks revealed a further decrease ( $I_{\text{PA}} = 66.10 \pm 4.79 \mu\text{A}$ ). The phosphate groups in the nucleotide structure and the electroactive anions in solution are repelled by one another, which blocks the charge flow [35]. BSA was then used to block free-active areas and avoid interference with unwanted molecules. Additionally, it stabilizes immobilized biomolecules, preserving their activity and offering proper analytical performance [36]. Voltammetric response showed a slight decrease in peak currents ( $I_{\text{PA}} = 63.92 \pm 2.20 \mu\text{A}$ ). After assembling, the platform was kept at  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  to perform stability tests. Over the course of a week, the nanostructured platform remains stable. For a day after the MY09 probe was attached, the genosensor remained stable. Due to its inability to regenerate with the same degree of response, we consider the electrode to be a

single-use electrode.

#### *3.4. Bioanalytical performance of the biosensor*

The analytical features of the PPy-GQD-MY09<sub>probe</sub>-BSA biosensor were initially accessed using recombinant plasmids from high and low-risk HPV, with concentrations ranging from 1 to 75 pg.μL<sup>-1</sup>. As a result, a proportional decrease in voltammetric response was observed following the increase in the concentration of the target plasmids (Fig. S4). The capture of the HPV gene on the surface of the sensor platform is responsible for the drop in both peak currents. A negative global charge is present in the double-stranded DNA (dsDNA) molecules that are generated on the sensor layer resulted from hybridization. This feature hinders electrons from moving from the transducer to the electroactive species [37].

After voltammetric analysis in the recognition of plasmid samples, the percentage of the anodic current variation's relative deviation ( $\Delta I$ ) was utilized to determine the degree of HPV genome recognition [38]:

$$\Delta\% = \frac{(I_b - I_a)}{I_b} \times 100$$

where  $I_a$  is the peak current following hybridization with the complementary HPV oligonucleotide sequence, and  $I_b$  is the anodic peak for the PPy-GQD-MY09<sub>probe</sub>-BSA sensing layer. Table S3 shows the relationship between the target analyte and  $\Delta I$  values as the concentration increases.

#### *3.5. Clinical samples evaluation and selectivity tests*

The genosensor voltammetric response was also analyzed against HPV cDNA samples, resulting in different peak current values between HPV families, as observed in Fig. 4. Variation in the  $\Delta I$  values were observed after exposure of the genosensor to HPV 16, 18, 31 and 58 samples. The amperometric anodic shift of the sensor ( $\Delta I$ ) also presented a gradual

increase in  $\Delta I$  values as the concentration of the analyte rises (Table 1).

When assessing the sensitivity and analytical performance of electrochemical biosensors, the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) are crucial variables. The LOQ specifies the lowest concentration that can be quantitatively measured with reasonable accuracy and precision, whereas the LOD denotes the lowest analyte concentration that can be consistently separated from the background signal [39]. A lower LOD improves detection capabilities, increasing the sensor's efficacy for analyte identification at the trace level. LOD and LOQ were evaluated following the calculations  $3.3\sigma/s$  and  $10\sigma/s$ , where  $\sigma$  represents the intercept's standard deviation, while  $s$  is the slope or degree of curve inclination [40]. The proposed genosensor showed a lower plasmidial and cDNA LOD and LOQ of  $0.62 \text{ pg.mL}^{-1}/2.85 \text{ pg.mL}^{-1}$  and  $0.85 \text{ pg.mL}^{-1}/2.85 \text{ pg.mL}^{-1}$  for HPV 31 and HPV 18, respectively, highlighting the ability of the sensor in detect specific oligonucleotides at minimal analyte concentration. LOD and LOQ for all studied HPV genotypes is shown in Table S4. Moreover, Table 2 summarizes electrochemical biosensors for HPV detection, pointing out the sensitivity of the PPY-GQD-MY09<sub>probe</sub>-BSA sensor platform.

The anodic shift observed in a genosensor for HPV detection serves as a key electrochemical indicator of successful hybridization between the target DNA and the immobilized probe. This shift occurs due to changes in the electrode surface charge and electron transfer kinetics upon DNA binding, leading to an increase in oxidation potential. In clinical samples, the anodic shift enhances signal differentiation, allowing for sensitive and specific HPV detection. The magnitude of the shift correlates with target concentration, enabling quantitative analysis of viral load [41]. The genosensor was exposed to suspensions of different cervical smear samples from HPV patients to validate the sensor system (Fig. S5, Table S5). These samples were molecularly classified based on the virus subtype and previously confirmed. The anodic peak currents were then measured using voltammetric

analysis and compared to negative samples (Fig. 5a). For the positive samples, the results show a significant amperometric response. Additionally, a 3D graph (Fig. 5b) can be accessed by utilizing variables like half-peak potential ( $E_{1/2}$ ), peak height, and peak area. Positive samples, which include HPV 16 and 58, are immediately recognized, while negative samples were located near the bottom.

We conducted electrochemical tests under the same circumstances as those previously reported for HPV plasmid and cDNA detection in order to examine the specificity and selectivity of the sensor platform. We tested the extent to which the sensor interacted with cDNA samples of *Candida albicans*, *E. coli*, *S. mansoni*, and the hepatitis C virus (Fig. 5c). Furthermore, we conducted electrochemical studies of the PPy-GQD-MY09probe-BSA against interfering elements such glucose, ascorbic acid, and glycine (Fig. 5d). After exposing the genosensor to these samples, changes in the anodic peak values were observed; consequently, voltammetric shifts show that non-complementary DNA sequences were physically adsorbed. It is noteworthy that the biosensor's current values when exposed to negative samples are much lower than those that are produced when using specific complementary DNA sequences. According to the IARC, the HPV samples examined in this study belong to the alphapapillomavirus genus. While HPV 18 is a member of alphapapillomavirus 7, HPV 16, 31, and 58 belong to the same evolutionary branch (alphapapillomavirus 9). Based on the electrochemical patterns that each type of HPV presented in this study, it was shown that, if they show genetic similarities among themselves, those that belong to the same evolutionary branch display a similar electrochemical response pattern.

#### **4. Conclusion**

In this study, we proposed the development of an electrochemical genosensor based on

electropolymerized PPy film, GQD, and the MY09 probe, which revealed high sensitivity and selectivity for detecting high-risk HPV. MY09 probe effectively hybridized with target sequences, confirming its reliability in identifying oncogenic HPV. The integration of quantum dots such as GQD enhanced the electron transfer rate, improving the sensor's performance. Bioactivity study was performed using recombinant plasmids and cDNA from infected patients. Topographical analysis using AFM confirmed the successful assembly of the nanostructured biosensor, revealing uniform surface morphology and successful interaction with HPV oligonucleotides. Using a calibration curve ranging from 1 pg.mL<sup>-1</sup> to 75 pg.mL<sup>-1</sup>, the PPy-GQD-MY09<sub>probe</sub>-BSA platform was assessed against prominent high-risk HPV genotypes (HPV 16, 18, 31, and 58) using cyclic voltammetry. The sensor exhibited strong binding affinity with both plasmidial and cDNA samples from infected patients. The genosensor revealed significant sensitivity, with a LOD of 0.62 pg.mL<sup>-1</sup> and 0.85 pg.mL<sup>-1</sup> for plasmidial and cDNA samples, respectively, and selectivity over negative samples and interfering molecules. Moreover, 5 minutes was sufficient to obtain the electrochemical results, highlighting the fast analysis of genosensor sensing platforms in a label-free strategy. Hence, we point out the PPy-GQD-MY09<sub>probe</sub>-BSA biosensor as a promising tool for the diagnosis and follow-up treatment of high-risk HPV.

### **Acknowledgments**

The authors are grateful for the support from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grant number 304678/2021-0 and 304680/2021-4), Foundation for the Support of Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) (grant numbers APQ-0425- 2.01/22 and APQ-0384-2.01/19) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) (grant number 88881.878936/2023-01 – CAPES/COFECUB).

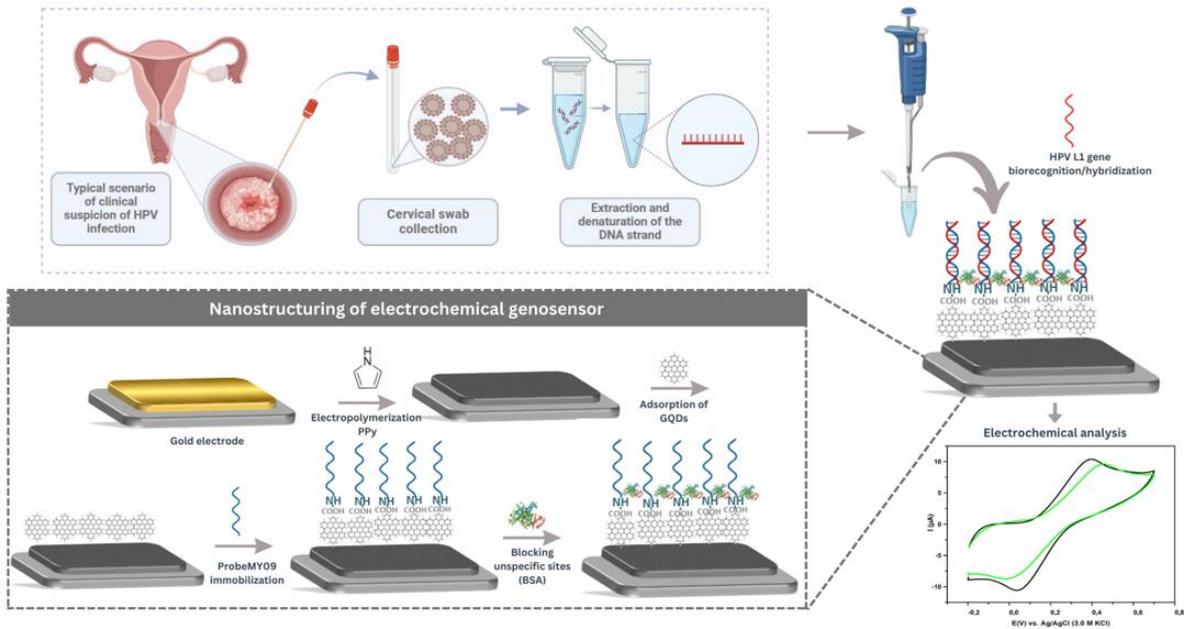
## Table Caption

**Table 1.** Analytical performance of biosensors for detecting HPV compared to PPy-GQD-MY09probe-BSA genosensor

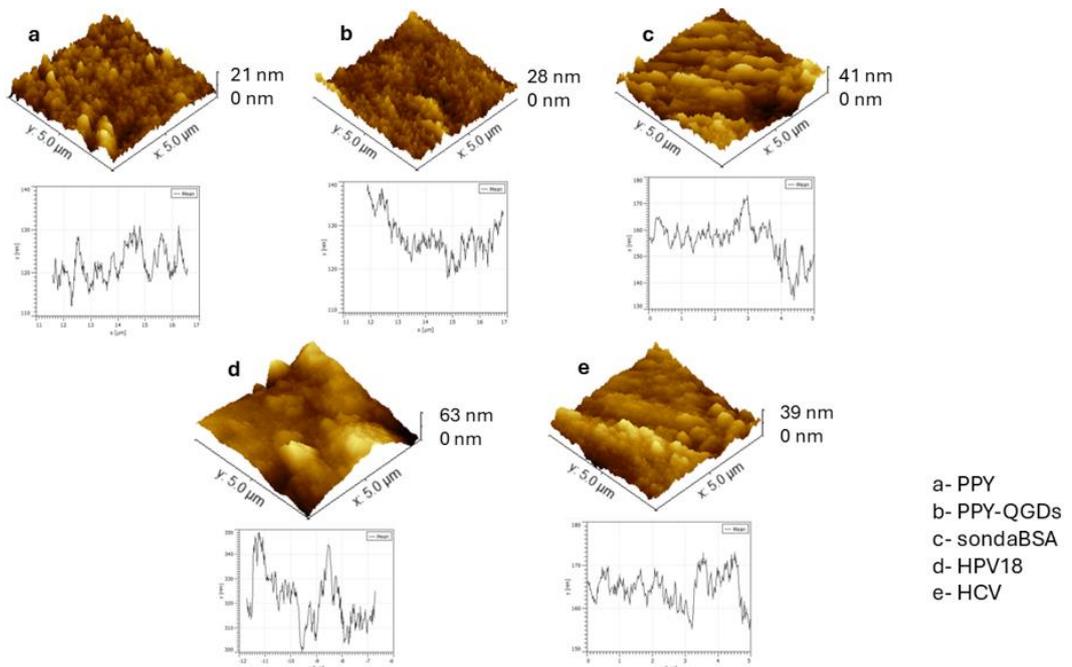
Sensor platform	Target Analyte	Technique	LOD	Test Time	Reference
Gold electrode/PPy/AuNPs/Cys/Probe/BSA	HPV 6 HPV 16 HPV 18 HPV 45 HPV 53 HPV 54 HPV 58 (L1 gene)	CV and EIS	0.37	15 min	[42]
Gold electrode/AuNp/PANI/Probe	HPV 11 HPV 16	CV and EIS	2.742 $\mu$ L	15 min	[43]
Gold electrode/Cys/HPV 16 Probe	HPV 16	DPV		10 min	[44]
ITO/GONRs/Ag@AuNPs/PDNA	HPV 16	CV and EIS	100aM	-	[45]
Carbon electrodes/Cys/GQDsLOC	HPV 6 HPV 11 HPV 16 HPV 18	DPV and CV	20 fM	20 min	[46]
Gold electrode/Ag@AuNPs-GO/SPA/Antibody/BSA	HPV 16 (L1 gene)	DPV, CV and EIS	0,002ng/mL <sup>-1</sup>	-	[47]
SPCEE/GO/cssDNA	HPV 16	CV, EIS	0,48 $\mu$ M	10 min	[48]
GHOXE/PAMAM/sgRNAt/dCas9	HPV 11	CV, EIS	17,75pM	5 min	[49]
Gold electrode/PPy/QGDs//MY09/BSA		CV	0.62 pg. $\mu$ L <sup>-1</sup>	5 min	This Work.

**Figure Caption**

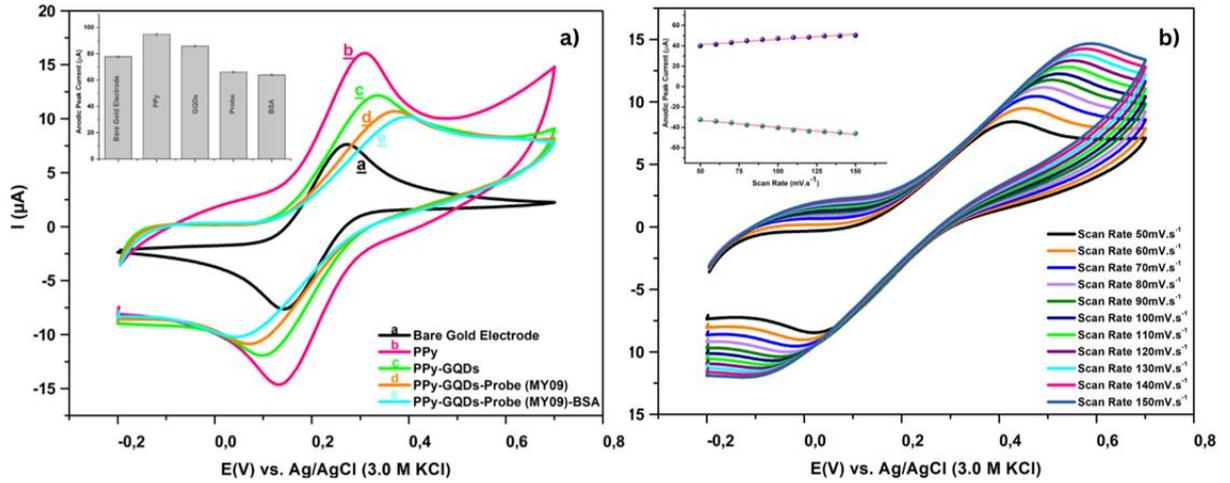
**Fig. 1.** Schematic representation of the nanostructuring process and validation of the electrochemical genosensor platform.



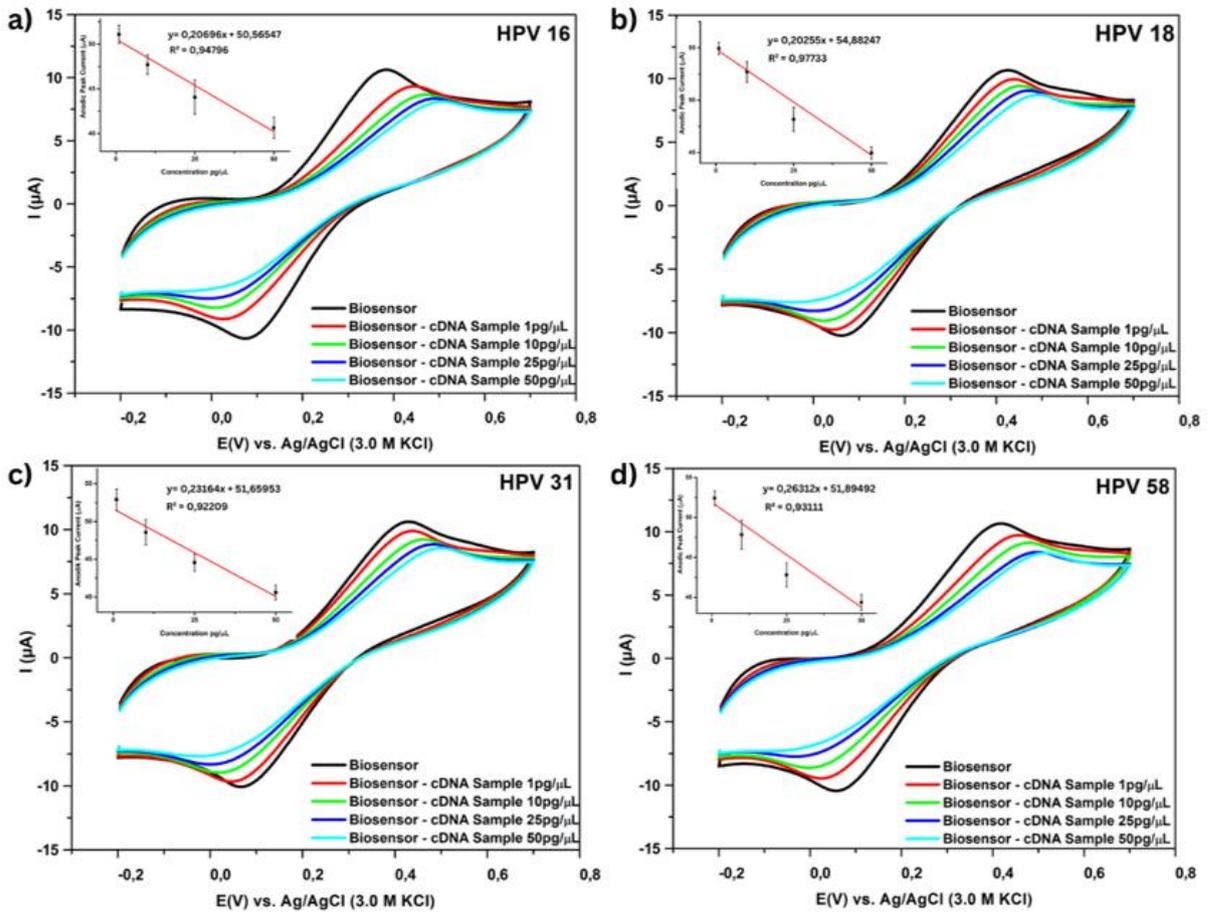
**Fig. 2.** AFM 3D images of the biosensor assembling steps: PPy (a), PPy-QGDs (b), PPy-QGDs-ProbeMY09-BSA (c), PPy-QGDs-ProbeMY09-BSA-HPV18 (d), and PPy-QGDs-ProbeMY09-BSA-HCV (e).



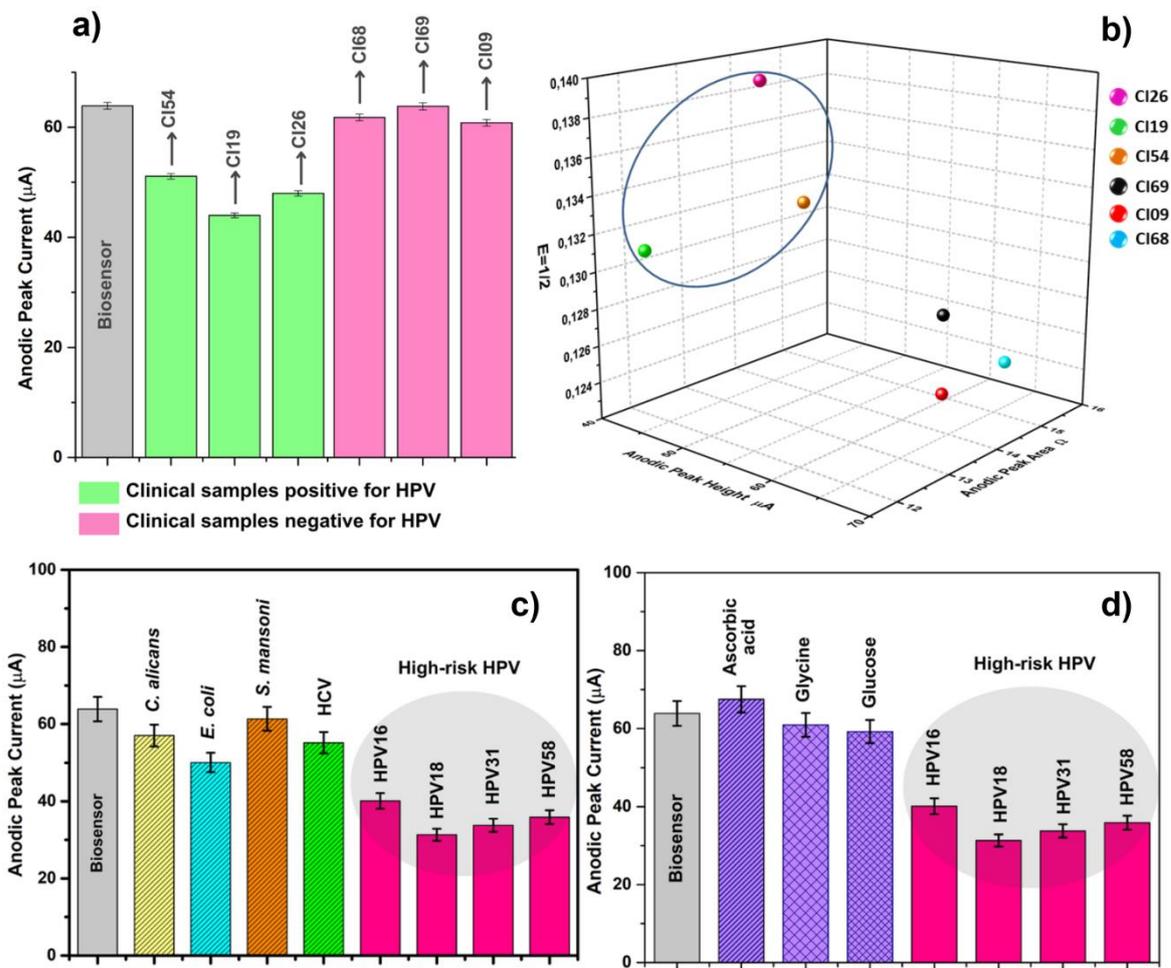
**Fig. 3.** Cyclic voltammograms of each biosensor assembly step (a) and the variation of the biosensor scan rates from 50 to 150 mV/s (b). Inset: Histogram of anodic peak currents (a) and the linear relationship between anodic and cathodic peak currents at different scan rates (b).



**Fig. 4.** Cyclic voltammograms obtained from the biosensor biorecognition process with high-risk oncogenic HPV cDNA samples: HPV16 (a), HPV18 (b), HPV31 (c), and HPV58. Inset: biosensor calibration curve with mean standard deviation values from triplicate test analysis.



**Fig. 5.** Anodic peak currents of cervical smear samples from negative and positive patients (a) and three-dimensional graph (b) of CV mathematical variables obtained from the PPy-GQD-MY09<sub>probe</sub>-BSA sensor platform. Peak current variation for the selectivity study with non-complementary oligonucleotide sequence (c) and interfering molecules (d). Every methodological procedure was carried out three times.



## References

- [1] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, CA. Cancer J. Clin. 71 (2021) 209–249. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

- [2] M.S. Melo, S.V.M.A. Lima, A.D. dos Santos, C.J.N. Ribeiro, P. de A.B. Júnior, T.K.S. Silva, L.T. de Resende, F. Corrêa, A. Migowski, M. Schiffman, A.C. Rodriguez, A. Ribeiro, T. Raiol, Temporal trends, spatial and spatiotemporal clusters of cervical cancer mortality in Brazil from 2000 to 2021, *Sci. Rep.* 14 (2024) 24436. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-75378-1>.
- [3] R.B. Perkins, N. Wentzensen, R.S. Guido, M. Schiffman, Cervical Cancer Screening: A Review, *JAMA* 330 (2023) 547–558. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.13174>.
- [4] D. Bhat, The “Why and How” of Cervical Cancers and Genital HPV Infection., *Cytojournal* 19 (2022) 22. [https://doi.org/10.25259/CMAS\\_03\\_03\\_2021](https://doi.org/10.25259/CMAS_03_03_2021).
- [5] C.R. Pereira da Veiga, E. Semprebon, J.L. da Silva, V. Lins Ferreira, C. Pereira da Veiga, Facebook HPV vaccine campaign: insights from Brazil, *Hum. Vaccin. Immunother.* 16 (2020) 1824–1834. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1698244>.
- [6] F. Chen, L. Hsu Lin, I. Hindi, W. Sun, N. Shafizadeh, O. Szeto, T.C. Brandler, A. Simsir, HPV Cotesting of Unsatisfactory Papanicolaou Tests: Implications for Follow-up Intervals, *Am. J. Clin. Pathol.* 160 (2023) 137–143. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqad026>.
- [7] J. Williams, M. Kostiuk, V.L. Biron, Molecular Detection Methods in HPV-Related Cancers, *Front. Oncol.* 12 (2022). <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2022.864820>.
- [8] A. Koussouri, A. Baraquin, M. Desmarets, K. Diallo, L. Puget, Q. Lepiller, J.-L. Prétet, Comparison of high-risk HPV detection by the AmpFire® HPV Screening 16/18/HR technique (Atila Biosystems) and the hybrid capture 2 test (Qiagen), *Mol. Biol. Rep.* 51 (2024) 52. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08939-8>.
- [9] A.C. Chrysostomou, L.G. Kostrikis, Methodologies of Primary HPV Testing Currently Applied for Cervical Cancer Screening, *Life* 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/life10110290>.

- [10] Y. Hui, Z. Huang, M.E.E. Alahi, A. Nag, S. Feng, S.C. Mukhopadhyay, Recent Advancements in Electrochemical Biosensors for Monitoring the Water Quality, *Biosensors* 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/bios12070551>.
- [11] B. Mikaeeli Kangarshahi, S.M. Naghib, N. Rabiee, DNA/RNA-based electrochemical nanobiosensors for early detection of cancers, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 61 (2024) 473–495. <https://doi.org/10.1080/10408363.2024.2321202>.
- [12] A. Curulli, Functional Nanomaterials Enhancing Electrochemical Biosensors as Smart Tools for Detecting Infectious Viral Diseases, *Molecules* 28 (2023). <https://doi.org/10.3390/molecules28093777>.
- [13] G. Maduraiveeran, M. Sasidharan, V. Ganesan, Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications, *Biosens. Bioelectron.* 103 (2018) 113–129. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.12.031>.
- [14] H.-W. Wang, C. Bringans, A.J.R. Hickey, J.A. Windsor, P.A. Kilmartin, A.R.J. Phillips, Cyclic Voltammetry in Biological Samples: A Systematic Review of Methods and Techniques Applicable to Clinical Settings, *Signals* 2 (2021) 138–158. <https://doi.org/10.3390/signals2010012>.
- [15] D. Semenova, A. Zubov, Y.E. Silina, L. Micheli, M. Koch, A.C. Fernandes, K. V Gernaey, Mechanistic modeling of cyclic voltammetry: A helpful tool for understanding biosensor principles and supporting design optimization, *Sensors Actuators B Chem.* 259 (2018) 945–955. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.088>.
- [16] T. Acar, K. Nur Çimen, E. Özalp, Ö. İlca, E. Ahlatcıoğlu Özerol, Recent Advances in Biosensors Based on Conducting Polymers for Biomedical Applications, *ChemistrySelect* 8 (2023) e202300819. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/slct.202300819>.
- [17] S. Chung, R.A. Revia, M. Zhang, Graphene Quantum Dots and Their Applications in Bioimaging, Biosensing, and Therapy, *Adv. Mater.* 33 (2021) 1904362.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adma.201904362>.

[18] P. Wilczewska, J. Breczko, D.M. Bobrowska, M. Wysocka-Żołopa, J. Goclon, A. Basa, K. Winkler, Enhancement of polypyrrole electrochemical performance with graphene quantum dots in polypyrrole nanoparticle/graphene quantum dot composites, *J. Electroanal. Chem.* 923 (2022) 116767. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2022.116767>.

[19] C. Sahub, T. Tuntulani, T. Nhujak, B. Tomapatnanaget, Effective biosensor based on graphene quantum dots via enzymatic reaction for directly photoluminescence detection of organophosphate pesticide, *Sensors Actuators B Chem.* 258 (2018) 88–97.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.072>.

[20] K.Y.P.S. Avelino, A.G. Silva-junior, M.G.R. Pitta, A. Errachid, M.D.L. Oliveira, A.S. Andrade, Nanoimmunosensor for the electrochemical detection of oncostatin M receptor and monoclonal autoantibodies in systemic sclerosis, *Talanta* 256 (2023) 1–9.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124285>.

[21] F. Faridbod, A.L. Sanati, Graphene Quantum Dots in Electrochemical Sensors/Biosensors, *Curr. Anal. Chem.* 15 (2019) 103–123.

<https://doi.org/https://doi.org/10.2174/1573411014666180319145506>.

[22] S. Lin, C.-H. Hong, B.-C. Sheu, L.-X. Wu, W.-C. Huang, W.-C. Huang, C.-Y. Guo, Dynamic response of HPV16/anti-HPV16 pairs with unbinding events studied by atomic force microscopy, *Biochem. Biophys. Reports* 6 (2016) 203–208.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.04.008>.

[23] R.P.S. Lucena, A.G. Silva-Junior, L.H.V. Gil, M.T. Cordeiro, C.A.S. Andrade, M.D.L. Oliveira, Application of concanavalin A as a new diagnostic strategy for SARS-COV-2 spike protein, *Biochem. Eng. J.* 201 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.109116>.

[24] Y. Fu, A. Manthiram, Core-shell structured sulfur-polypyrrole composite cathodes for lithium-sulfur batteries, *RSC Adv.* 2 (2012) 5927–5929. <https://doi.org/10.1039/c2ra20393f>.

- [25] A. Pasha, S. Khasim, A.A.A. Darwish, T.A. Hamdalla, S.A. Al-Ghamdi, High Performance Organic Coatings of Polypyrrole Embedded with Manganese Iron Oxide Nanoparticles for Corrosion Protection of Conductive Copper Surface, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* 32 (2022) 499–512. <https://doi.org/10.1007/s10904-021-02130-x>.
- [26] R. Turczyn, K. Krukiewicz, A. Katunin, J. Sroka, P. Sul, Fabrication and application of electrically conducting composites for electromagnetic interference shielding of remotely piloted aircraft systems, *Compos. Struct.* 232 (2020) 111498. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compstruct.2019.111498>.
- [27] J.P. Naik, P. Sutradhar, M. Saha, Molecular scale rapid synthesis of graphene quantum dots (GQDs), *J. Nanostructure Chem.* 7 (2017) 85–89. <https://doi.org/10.1007/s40097-017-0222-9>.
- [28] P. Pimpang, R. Sumang, S. Chooapun, Effect of concentration of citric acid on size and optical properties of fluorescence graphene quantum dots prepared by tuning carbonization degree, *Chiang Mai J. Sci.* 45 (2018) 2005–2014.
- [29] T.-F. Yeh, W.-L. Huang, C.-J. Chung, I.-T. Chiang, L.-C. Chen, H.-Y. Chang, W.-C. Su, C. Cheng, S.-J. Chen, H. Teng, Elucidating Quantum Confinement in Graphene Oxide Dots Based On Excitation-Wavelength-Independent Photoluminescence, *J. Phys. Chem. Lett.* 7 (2016) 2087–2092. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.6b00752>.
- [30] F. Liu, M.-H. Jang, H.D. Ha, J.-H. Kim, Y.-H. Cho, T.S. Seo, Facile synthetic method for pristine graphene quantum dots and graphene oxide quantum dots: origin of blue and green luminescence, *Adv. Mater.* 25 (2013) 3657–3662. <https://doi.org/10.1002/adma.201300233>.
- [31] A.G. da Silva-Junio, I.A.M. Frias, R.G. Lima-Neto, L. Migliolo, P.S. e Silva, M.D.L. Oliveira, C.A.S. Andrade, Electrochemical Biosensor Based on Temporin-Pta Peptide for Detection of Microorganisms, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2022) 114788.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114788>.

[32] K.Y.P.S. Avelino, G.S. dos Santos, I.A.M. Frías, A.G. Silva-Junior, M.C. Pereira, M.G.R. Pitta, B.C. de Araújo, A. Errachid, M.D.L. Oliveira, C.A.S. Andrade, Nanostructured sensor platform based on organic polymer conjugated to metallic nanoparticle for the impedimetric detection of SARS-CoV-2 at various stages of viral infection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 206 (2021) 114392. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114392>.

[33] M. Zhang, A. Nautiyal, H. Du, J. Li, Z. Liu, X. Zhang, R. Wang, Polypyrrole film based flexible supercapacitor: mechanistic insight into influence of acid dopants on electrochemical performance, *Electrochim. Acta* 357 (2020) 136877. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136877>.

[34] R. Ekici, B. Bozdoğan, E.B. Denkbaş, Development of Electrochemical Biosensor Platforms for Determination of Environmental Viral Structures, *Appl. Sci.* 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/app122412971>.

[35] H.-B. Xu, R.-F. Ye, S.-Y. Yang, R. Li, X. Yang, Electrochemical DNA nano-biosensor for the detection of genotoxins in water samples, *Chinese Chem. Lett.* 25 (2014) 29–34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2013.10.011>.

[36] S. Gundagatti, S. Srivastava, An optimization of blocking agents for designing reliable electrochemical biosensors for ovarian cancer, *Mater. Today Proc.* (2023). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.04.460>.

[37] C. Srisomwat, P. Teengam, N. Chuaypen, P. Tangkijvanich, T. Vilaivan, O. Chailapakul, Pop-up paper electrochemical device for label-free hepatitis B virus DNA detection, *Sensors Actuators B Chem.* 316 (2020) 128077. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128077>.

[38] H.B. Dantas, A.G. Silva-Junior, N.L.C.L. Silva, A. Errachid, M.D.L. Oliveira, C.A.S. Andrade, Genosensor based on polypyrrole and dendrimer-coated gold nanoparticles for

human papillomavirus detection, *Biochem. Eng. J.* 213 (2025) 109551.

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2024.109551>.

[39] Á. Lavín, J.D. Vicente, M. Holgado, M.F. Laguna, R. Casquel, B. Santamaría, M. V Maigler, A.L. Hernández, Y. Ramírez, On the Determination of Uncertainty and Limit of Detection in Label-Free Biosensors, *Sensors* 18 (2018). <https://doi.org/10.3390/s18072038>.

[40] H. Moulahoum, F. Ghorbanizamani, The LOD paradox: When lower isn't always better in biosensor research and development, *Biosens. Bioelectron.* 264 (2024) 116670. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2024.116670>.

[41] R.P.S. Lucena, I.A.M. Frías, N. Lucena-Silva, C.A.S. Andrade, M.D.L. Oliveira, Impedimetric genosensor based on graphene nanoribbons for detection and identification of oncogenic types of human papillomavirus, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 96 (2021) 1496–1503. <https://doi.org/10.1002/jctb.6726>.

[42] K.Y.P.S. Avelino, L.S. Oliveira, H.P. de Oliveira, N. Lucena-Silva, C.A.S. Andrade, M.D.L. Oliveira, Impedimetric sensing platform for human papillomavirus and p53 tumor suppressor gene in cervical samples, *J. Sci. Adv. Mater. Devices* 7 (2022) 100411. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2021.100411>.

[43] K.Y.P.S. Avelino, L.S. Oliveira, N. Lucena-Silva, C.P. de Melo, C.A.S. Andrade, M.D.L. Oliveira, Metal-polymer hybrid nanomaterial for impedimetric detection of human papillomavirus in cervical specimens, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 185 (2020) 113249. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113249>.

[44] D.S. Campos-Ferreira, G.A. Nascimento, E.V.M. Souza, M.A. Souto-Maior, M.S. Arruda, D.M.L. Zanforlin, M.H.F. Ekert, D. Brunaska, J.L. Lima-Filho, Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16 detection in real samples, *Anal. Chim. Acta* 804 (2013) 258–263. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.10.038>.

[45] S. Pareek, U. Jain, M. Bharadwaj, K. Saxena, S. Roy, N. Chauhan, An ultrasensitive

electrochemical DNA biosensor for monitoring Human papillomavirus-16 (HPV-16) using graphene oxide/Ag/Au nano-biohybrids, *Anal. Biochem.* 663 (2023) 115015.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.115015>.

[46] L.S. Oliveira, S. Goel, K. Amreen, N. Lucena-Silva, M.D.L. Oliveira, C.A.S.

Andrade, Microfluid biosensor for detection of hpv in patient scraping samples: Determining E6 and E7 oncogenes, *Bioelectrochemistry* 160 (2024) 108795.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2024.108795>.

[47] A. Wang, Y. Zhou, Y. Chen, J. Zhou, X. You, H. Liu, Y. Liu, P. Ding, Y. Qi, C.

Liang, X. Zhu, Y. Zhang, E. Liu, G. Zhang, Electrochemical immunosensor for ultrasensitive detection of human papillomaviruse type 16 L1 protein based on Ag@AuNPs-GO/SPA, *Anal. Biochem.* 660 (2023) 114953. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114953>.

[48] M.S.L. Meneses, M.B.P. Toralles, C.M.C. Mendes, Evolução da técnica de PCR: sua contribuição no diagnóstico da infecção por HPV, *Rev. Ciências Médicas e Biológicas* 18 (2019) 361–366. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v18i3.34480>.

[49] M.U. Mumcu, H.D. Ertuğrul Uygun, Z.O. Uygun, Human Papilloma Virus-11 DNA Detection by Graphene-PAMAM Modified Impedimetric CRISPR-dCas9 Biosensor, *Electroanalysis* 34 (2022) 830–834. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elan.202100536>.

**Material Suplmentar – ARTIGO 1: NANOSTRUCTURED GENOSENSOR PLATFORM BASED ON POLYPYRROLE FILM AND GRAPHENE QUANTUM DOTS FOR THE DETECTION OF HIGH-RISK HPV**

**NANOSTRUCTURED GENOSENSOR PLATFORM BASED ON POLYPYRROLE FILM AND GRAPHENE QUANTUM DOTS FOR THE DETECTION OF HIGH-RISK HPV**

Luiza G. T. Santos <sup>a,b</sup>, Alberto G. Silva-Junior <sup>a,b</sup>, Maurília P. Costa <sup>a,b</sup>, Norma L. C. L. Silva <sup>c</sup>,  
Cesar A. S. Andrade <sup>a,b</sup>, Maria D.L. Oliveira <sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

<sup>c</sup> Departamento de Virologia-Instituto Aggeu Magalhaes-Fiocruz, 50670-420 Recife, PE, Brazil.

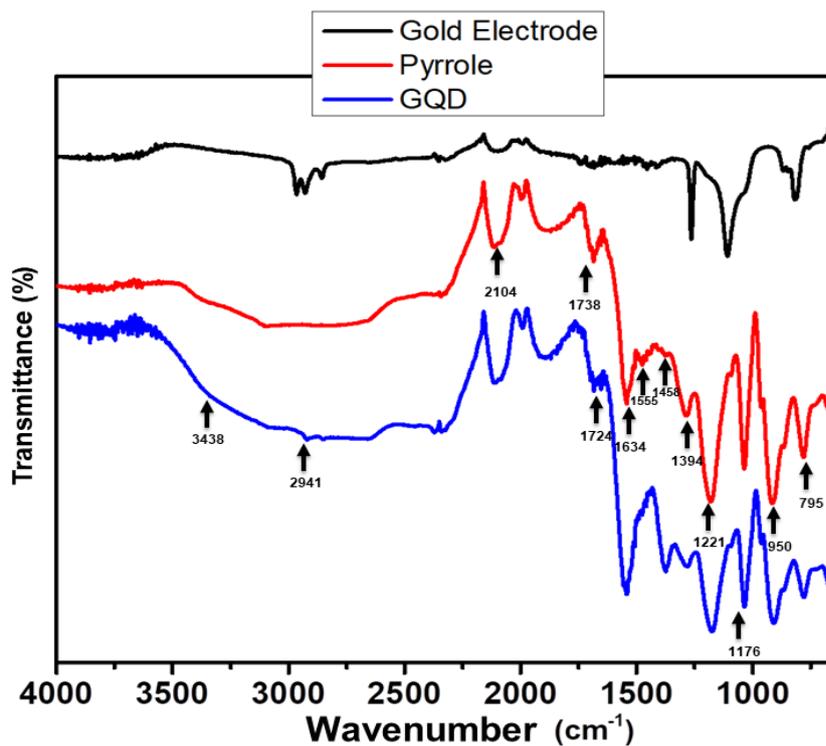
\*To whom correspondence should be addressed.

M. D. L. Oliveira, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

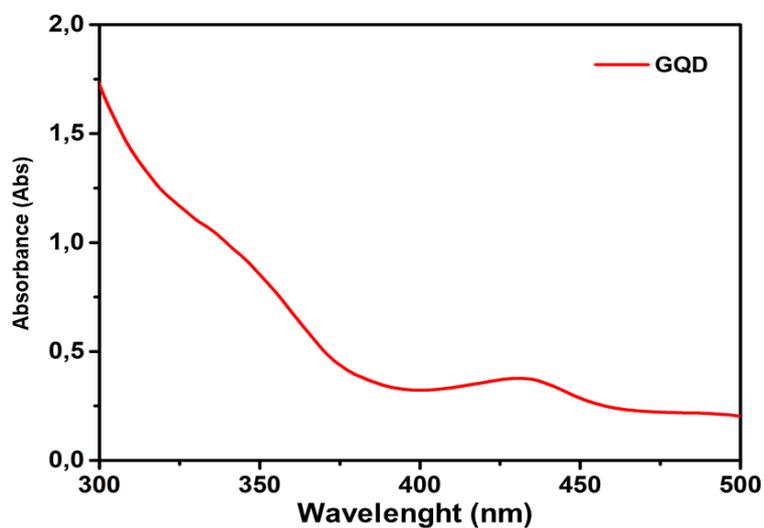
Phone: +55-81-2126.8450

E-mail: [maria.dloliveira@ufpe.br](mailto:maria.dloliveira@ufpe.br)

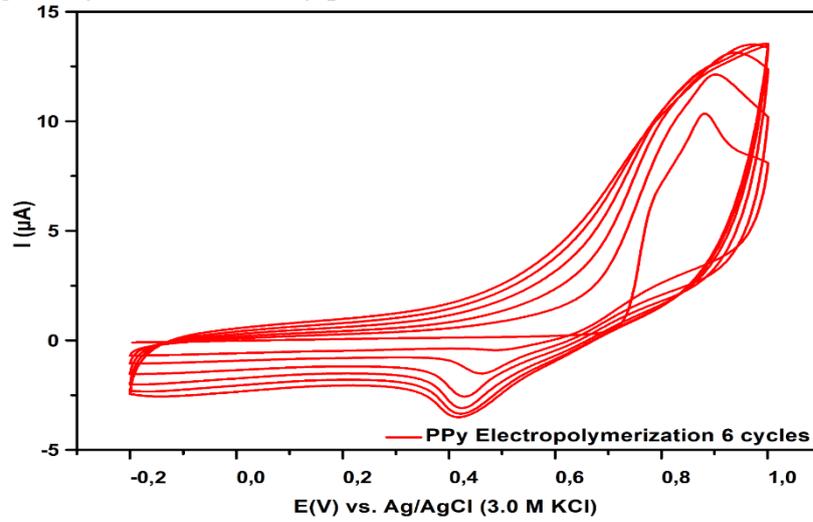
**Fig. S1.** ATR-FTIR spectra of the gold electrode after the electropolymerization process and pyrrole functionalization with GQDs.



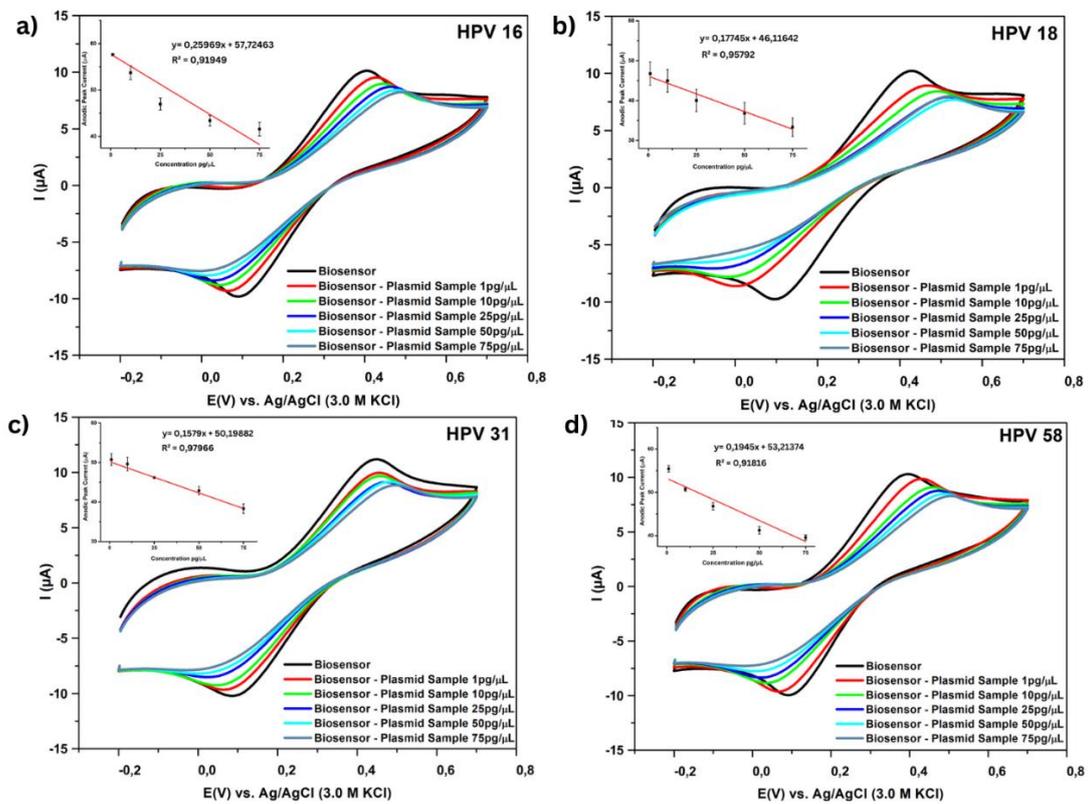
**Fig. S2.** UV-vis analysis of GQDs.



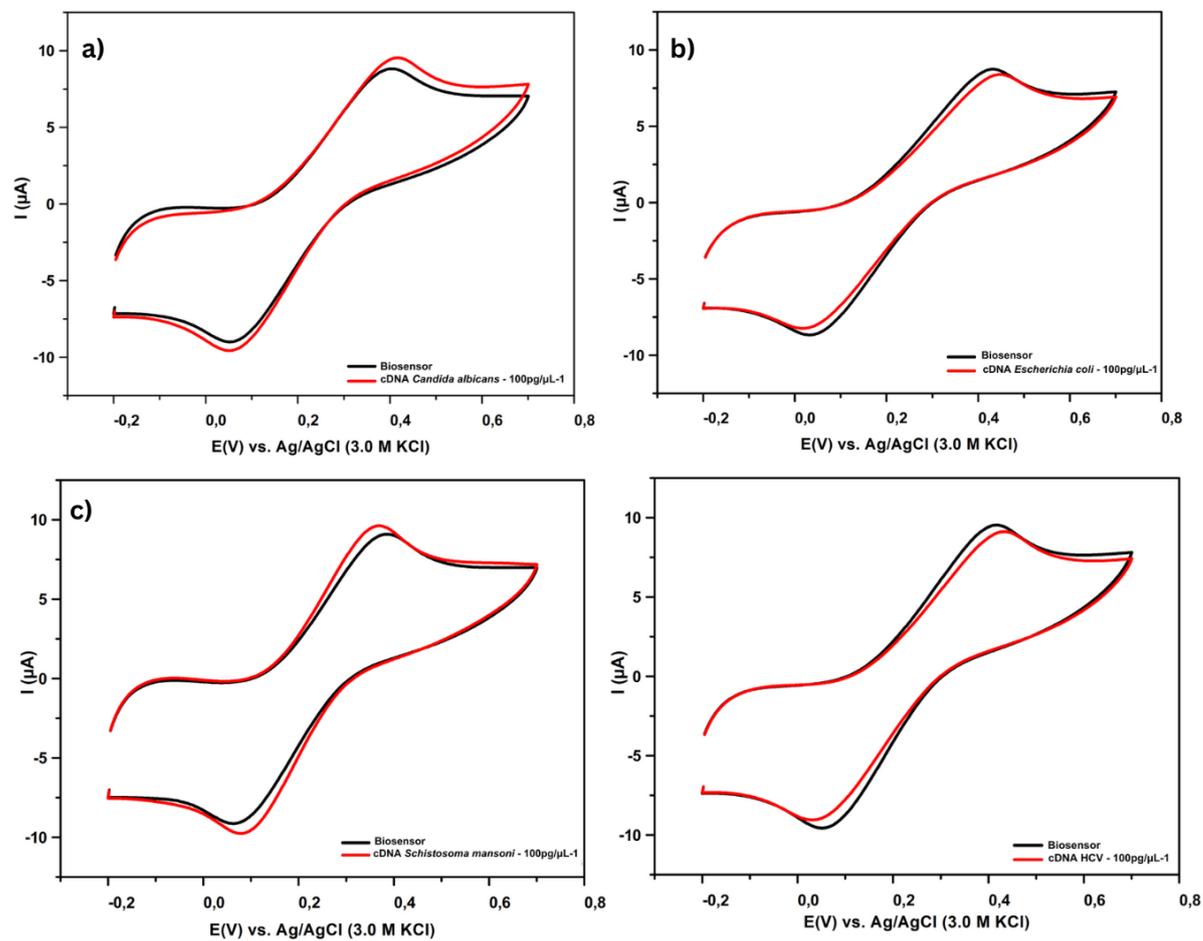
**Fig. S3.** Electropolymerization of the pyrrole monomer in 6 cycles at the gold electrode interface using the cyclic voltammetry process.



**Fig. S4.** Voltammetric characterization of the biosensor exposed to recombinant plasmids containing the L1 gene of high-risk oncogenic HPVs: 16 (a), 18 (b), 31 (c), 58 (d). Inset: biosensor calibration curve with mean standard deviation values from triplicate test analysis.



**Fig. S5.** Cyclic voltammograms corresponding to negative control tests with cDNA from specimens of clinical importance to validate the specificity of the biosensor. *Candida albicans* (a), *Escherichia coli* (b), *Schistosoma mansoni* (c), and hepatitis C virus (d).



**Table S1.** Sequences of nitrogenous bases of the L1 gene for different HPV genotypes.

<b>Family</b>	<b>Type of HPV</b>	<b>Access number</b>
F16	HPV 16	FJ006723.1
	HPV 31	HQ537668.1
	HPV 58	EU918765.1
F18	HPV 18	GQ180791.1

**Table S2.** Values obtained from the extraction of the anodic and cathodic peaks of the cyclic voltammogram at each stage of PPy-GQD-MY09<sub>probe</sub>-BSA genosensor assembling process.

<b>Modified Electrode</b>	<b>IpA(<math>\mu</math>A)</b>	<b>IpC(<math>\mu</math>A)</b>
<b>Au</b>	7786 $\pm$ 1.63	68.57 $\pm$ 1.06
<b>Au-PPy</b>	94.95 $\pm$ 1.34	105.33 $\pm$ 1.31
<b>Au-PPy-GQDs</b>	85.93 $\pm$ 3.10	87.50 $\pm$ 1.51
<b>Au-PPy-GQDs-Probe</b>	66.10 $\pm$ 4.79	70.20 $\pm$ 2.74
<b>Au-PPy-GQDs-Probe-BSA</b>	63.92 $\pm$ 2.20	65.53 $\pm$ 1.06

**Table S3.** Amperometric shift of the anodic and cathodic peaks of the biosensor after exposure to recombinant plasmids. The experimental values described correspond to the mean values  $\pm$  their respective standard deviations.

<b>Modified Electrode</b>	<b>Plasmid Sample (pg <math>\mu</math>L<sup>-1</sup>)</b>	<b>IpA(<math>\mu</math>A)</b>	<b>IpC(<math>\mu</math>A)</b>	<b><math>\Delta</math>IpA%</b>
<b>Biosensor</b>	-	63.92 $\pm$ 2.20		
<b>HPV 16</b>	1pg/ $\mu$ L	57.63 $\pm$ 0.25	59.37 $\pm$ 1.64	9.84 $\pm$ 0.48
	10pg/ $\mu$ L	53.73 $\pm$ 1.47	53.03 $\pm$ 0.91	15.94 $\pm$ 1.22
	25pg/ $\mu$ L	46.97 $\pm$ 1.29	46.63 $\pm$ 1.06	26.51 $\pm$ 0.70
	50pg/ $\mu$ L	43.40 $\pm$ 1.15	41.03 $\pm$ 1.27	32.10 $\pm$ 0.93
	75pg/ $\mu$ L	41.57 $\pm$ 1.45	36.57 $\pm$ 1.10	34.96 $\pm$ 0.38
<b>HPV 18</b>	1pg/ $\mu$ L	47.77 $\pm$ 1,30	45.70 $\pm$ 1.39	25.26 $\pm$ 0.64
	10pg/ $\mu$ L	44.97 $\pm$ 0,87	37.53 $\pm$ 1,36	29.64 $\pm$ 0.78
	25pg/ $\mu$ L	37.70 $\pm$ 0.98	28.80 $\pm$ 1.48	41.02 $\pm$ 0.38
	50pg/ $\mu$ L	34.80 $\pm$ 1.20	23.83 $\pm$ 0.64	45.55 $\pm$ 0.84
	75pg/ $\mu$ L	33.33 $\pm$ 0.92	17.40 $\pm$ 0.36	47.85 $\pm$ 0.11
<b>HPV 31</b>	1pg/ $\mu$ L	53.74 $\pm$ 3.52	57.47 $\pm$ 0.58	15.92 $\pm$ 1.52
	10pg/ $\mu$ L	49.62 $\pm$ 1.71	52.60 $\pm$ 1.00	22.37 $\pm$ 1.35
	25pg/ $\mu$ L	43.18 $\pm$ 0.24	43.50 $\pm$ 1.00	32.44 $\pm$ 0.83
	50pg/ $\mu$ L	40.90 $\pm$ 2.06	38.50 $\pm$ 0.10	36.01 $\pm$ 0.70

	75pg/ $\mu$ L	36.33 $\pm$ 2.23	33.83 $\pm$ 0.15	43.16 $\pm$ 1.22
	1pg/ $\mu$ L	55.43 $\pm$ 0.75	63.23 $\pm$ 1.59	13.28 $\pm$ 1.15
	10pg/ $\mu$ L	50.73 $\pm$ 0.50	52.83 $\pm$ 1.29	20.63 $\pm$ 1.01
<b>HPV 58</b>	25pg/ $\mu$ L	46.80 $\pm$ 0.85	46.87 $\pm$ 1.31	26.78 $\pm$ 0.49
	50pg/ $\mu$ L	41.23 $\pm$ 0.90	39.57 $\pm$ 1.54	35.49 $\pm$ 0.90
	75pg/ $\mu$ L	39.57 $\pm$ 0.58	33.27 $\pm$ 0.78	38.09 $\pm$ 0.62

**Table S4.** LOD and LOQ for all HPV genotypes in the study.

	<b>Plasmids</b>	<b>LOD</b> (pg.mL <sup>-1</sup> )	<b>LOQ</b> (pg.mL <sup>-1</sup> )
	<b>HPV 16</b>	0.75	2.52
	<b>HPV 18</b>	1.43	4.79
	<b>HPV 31</b>	0.62	2.08
	<b>HPV 58</b>	1.94	6.47
	<b>cDNA</b>		
	<b>HPV 16</b>	1.07	3.57
	<b>HPV 18</b>	0.85	2.85
	<b>HPV 31</b>	1.70	5.69
	<b>HPV 58</b>	1.44	4.80

**Table S5.** Characteristics of the blinded cervical smear samples used in the analytical study.

---

<b>Code</b>	<b>Sample</b>	<b>HPV genotype</b>	<b>Classification</b>
<b>CI54</b>	Positive	16	High risk
<b>CI19</b>	Positive	58	High risk
<b>CI26</b>	Positive	16	High risk
<b>CI68</b>	Negative	-	-
<b>CI69</b>	Negative	-	-
<b>CI09</b>	Negative	-	-

---

## 5. CONCLUSÕES

No presente trabalho foi desenvolvido um sistema biossensor nanotecnológico eletroquímico para a detecção de diferentes genótipos do papilomavírus humano (HPV) que possui alta significância clínica devido a possibilidade da evolução de quadros cancerígenos, onde uma sonda de oligonucleotídeos de fita simples foi utilizadas como elemento de biorreconhecimento. A sonda MY09 foi imobilizada em um substrato sólido de ouro de um eletrodo de trabalho contendo camadas do polímero condutor pirrol e o ponto quânticos de grafeno que foram imprescindíveis para a condução da corrente elétrica na interface eletrodo-solução.

O sistema sensor foi considerado apto para os testes com as amostras do analito alvo, genótipos de alto e baixo risco oncogênico, após as etapas de caracterização que evidenciaram o revestimento do eletrodo pelos elementos constituintes da plataforma sensora por meio das técnicas voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica.

Além disso, as análises de AFM proporcionaram análise topográfica do sistema evidenciando a rugosidade e o aspecto de interação entre cada camada do sensor. As ferramentas de FTIR e UV-Vis foram empregadas para investigação da interação dos grupamentos químicos presentes na superfície da interface.

A associação entre esses materiais proporcionou a síntese de um material híbrido com propriedades físico-químicas aprimoradas, compatibilidade biológica e fácil biofuncionalização. Através do processo de quimisorção, a camada automontada de PPy/GQDs foi obtida sobre a superfície transdutora com simplicidade e elevada reprodutibilidade. A utilização do polímero condutor possibilitou o aumento da área de trabalho do eletrodo viabilizando a interação com os grupos carboxílicos dos pontos quânticos de grafeno formando um complexo estável para a adsorção das sequências de DNA.

O sistema foi considerado apropriado para os testes de testes de bioatividade, validando-se que o biossensor proposto teve a capacidade de detectar diferentes genótipos de HPV (HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 45 e 58) em plasmídeos recombinantes e espécimes cervicais (amostras de cDNA) com alta sensibilidade e estabilidade nas concentrações de 1pg/ $\mu$ L a 75pg/ $\mu$ L através da identificação do gene altamente conservado do capsídeo viral, o gene L1. Foi observado pelas

análises quantitativas e gráficas padrões diferenciados de resposta para os diferentes tipos de HPV, podendo-se, portanto, inferir a perspectiva de um diagnóstico diferencial.

Em relação aos métodos convencionais, os genossensores eletroquímicos podem ser vistos como uma opção inovadora para identificar genótipos de HPV. Possuem uma produção fácil e respostas ágeis para identificar os genótipos do HPV, de apenas 5 minutos, possibilitando um diagnóstico antecipado e prevenindo a progressão do processo cancerígeno nas estruturas anogenitais.

Por meio desses resultados promissores apresentados pelos protótipos sensores, é possível observar a eficácia da utilização de biossensores eletroquímicos baseados em DNA para a detecção de espécimes virais prevalentes. A partir de então, a perspectiva visa a miniaturização, flexibilidade e avanços nanotecnológicos assegurando a diferenciação entre HPV de alto risco e baixo risco oncogênico nos mais diversos tipos de amostras.

## 6. REFERÊNCIAS

ABERGEL, D. S. L. et al. Properties of graphene: a theoretical perspective. **Advances in physics**, v. 59, n. 4, p. 261–482, 2010. <https://doi.org/10.1080/00018732.2010.487978>.

ABHISHEK, N. et al. Metal-conducting polymer hybrid composites: A promising platform for electrochemical sensing. **Inorganic chemistry communications**, n. 111334, p. 111334, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2023.111334>.

ABOLGHASEMI, M.-M.; BABAKHANI, A. Uma nova plataforma de detecção eletroquímica baseada em Pt/PPy/Eosina-Y para a determinação de cádmio. **New journal of chemistry**, v. 41, n. 19, p. 11335–11341, 2017.

AGUILERA-SIGALAT, Jordi; BRADSHAW, Darren. Synthesis and applications of metal-organic framework–quantum dot (QD@ MOF) composites. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 307, p. 267-291, 2016.

AHUJA, T. et al. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials**, v. 28, n. 5, p. 791–805, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.046>.

AHUJA, T. et al. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials**, v. 28, n. 5, p. 791-805, 2017.

AKGÖNÜLLÜ, S.; DENIZLI, A. Recent advances in optical biosensing approaches for biomarkers detection. **Biosensors & bioelectronics**: X, v. 12, n. 100269, p. 100269, 2022. ISSN 2590-1370, <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100269>.

ALMEIDA, Carmen Mariana Carneiro et al. Principais fatores de risco associados ao desenvolvimento do câncer de colo do útero, com ênfase para o Papilomavírus humano (HPV): um estudo de revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e19810111634-e19810111634, 2021.

AMARAL, Eduardo Matheus Ferreira et al. Sensores Eletroquímicos e Biossensores: Seus Princípios Básicos de Funcionamento e Algumas Aplicações: Princípios básicos sobre sensores eletroquímicos e biossensores. **Revista Virtual de Química**, v. 15, n. 3, 2023.

ANDO, T. High-speed atomic force microscopy coming of age. **Nanotechnology** , v. 23, n. 6, p. 062001, 2012. doi: 10.1088/0957-4484/23/6/062001. PMID: 22248867.

ANTIOCHIA, R. Electrochemical biosensors for SARS-CoV-2 detection: Voltametric or impedimetric transduction? **Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)**, v. 147, n. 108190, p. 108190, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108190>.

APGAR, Barbara S.; BROTZMAN, Gregory. HPV testing in the evaluation of the minimally abnormal Papanicolaou smear. **American Family Physician**, v. 59, n. 10, p. 2794-2800, 1999.

ASADI, Ebadollah et al. A review of clinical applications of graphene quantum dot-based composites. **Journal of Composites and Compounds**, v. 1, n. 1, p. 31-40, 2019.

ASAL, M. et al. Recent developments in enzyme, DNA and immuno-based biosensors. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 18, n. 6, p. 1924, 2018. <https://doi.org/10.3390/s18061924>.

ASAL, M. et al. An overview of biomolecules, immobilization methods and support materials of biosensors. **Sensor review**, v. 39, n. 3, p. 377–386, 2019.

BABACAN, S. et al. Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application. **Biosensors & bioelectronics**, v. 15, n. 11–12, p. 615–621, 2000. ISSN 0956-5663, [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(00\)00115-9](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(00)00115-9).

BACON, M.; BRADLEY, S. J.; NANN, T. Graphene quantum dots. **Particle & particle systems characterization: measurement and description of particle properties and behavior in powders and other disperse systems**, v. 31, n. 4, p. 415–428, 2014. doi:10.1002/ppsc.201300252

BAKRI, M. H. et al. Biomedical applications of wearable biosensors. **Next Materials**, n. 100084, p. 100084, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.nxmte.2023.100084>.

BARACU, Angela Mihaela; GUGOASA, Livia Alexandra Dinu. Recent advances in microfabrication, design and applications of amperometric sensors and biosensors. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 168, n. 3, p. 037503, 2021.

BEDELL, Sarah L. et al. Cervical cancer screening: past, present, and future. **Sexual medicine reviews**, v. 8, n. 1, p. 28-37, 2020.,  
<https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2019.09.005>.

BERGANT MARUŠIČ, M. et al. Human papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via sorting nexin 17: HPV L2 and SNX17. *Traffic* (Copenhagen, Denmark), v. 13, n. 3, p. 455–467, 2012.

BERNARD, Hans-Ulrich, The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses, **Journal of Clinical Virology**, Volume 32, Supplement, 2005, Pages 1-6, ISSN 1386-6532,  
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.10.021>.

BERNARD, Hans-Ulrich. Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: an overview and recent developments. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 18, p. 357-361, 2013, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.011>.

BUCUR, B et al. Vasilescu, A. Addressing the Selectivity of Enzyme Biosensors: Solutions and Perspectives. **Sensors 2021**, 21, 3038.  
<https://doi.org/10.3390/s21093038>.

BURD, E. M. Human Papillomavirus laboratory testing: The changing paradigm. **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 2, p. 291–319, 2016.  
<https://doi.org/10.1128/cmr.00013-15>.

BURNESS, Jessica Valls; SCHROEDER, Jillian Marie; WARREN, Johanna B. Cervical colposcopy: indications and risk assessment. **American family physician**, v. 102, n. 1, p. 39-48, 2020.

BUTT, H.-J.; CAPPELLA, B.; KAPPL, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. **Surface science reports**, v. 59, n. 1–6, p. 1–152, 2005.

CALUMBY, R. J. N.; SILVA, R. A. dos S.; SUÁREZ, J. A. G.; LÔBO, T. de L. G. F.; VIEIRA, D. S.; SILVA, K. W. L. da; REIS, M. J. P.; GRILLO, L. A. M. Papiloma Vírus Humano (HPV) e neoplasia cervical: importância da vacinação / Human papillomavirus (HPV) and cervical neoplasia: importance of vaccination. **Brazilian Journal of Health Review**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 1610–1628, 2020. DOI: 10.34119/bjhrv3n2-023.

CAMARA, Geni NN et al. Os papilomavírus humanos–HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 1, n. 1, p. 149-158, 2003.

CAVALCANTE, Rosiane Luz et al. Impacto da pandemia por COVID-19 na imunização da vacina contra o Papilomavírus Humano entre crianças e adolescentes

de 9 a 14 anos na região do Xingu-Pará. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e36310413987-e36310413987, 2021.

CARVALHO, A. M. C. DE .; ARAÚJO, T. M. E. DE .. FACTORS ASSOCIATED WITH ADOLESCENT COMPLIANCE WITH HUMAN PAPILLOMAVIRUS VACCINE: A CROSS-SECTIONAL STUDY. **Texto & Contexto - Enfermagem**, v. 30, p. e20200362, 2021.

CHADHA, U. et al. Recent progress and growth in biosensors technology: A critical review. **Journal of industrial and engineering chemistry**, v. 109, p. 21–51, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2022.02.010>.

CHAHMA, M.; CARRUTHERS, C. Detecção eletroquímica de oligonucleotídeos usando polipirroles. **Sensors and actuators reports** , v. 3, n. 100039, p. 100039, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2021.100039>.

CHEN, Y. et al. Topological carbon materials: A new perspective. **Physics reports**, v. 868, p. 1–32, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.physrep.2020.05.003>.

CHENG, C. et al. Advances in preparation, mechanism and applications of graphene quantum dots/semiconductor composite photocatalysts: A review. **Journal of hazardous materials**, v. 424, n. Pt D, p. 127721, 2022b.

CHOI, Suk-Ho. Unique properties of graphene quantum dots and their applications in photonic/electronic devices. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 50, n. 10, p. 103002, 2017. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aa5244>.

CHOI, S. et al. HPV and cervical cancer: A review of epidemiology and screening uptake in the UK. **Pathogens**, v. 12, n. 2, p. 298, 2023. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020298>.

CHOUDHARY, Raghvendra Pratap et al. Optical properties of few layered graphene quantum dots. **Materials Research Express**, v. 2, n. 9, p. 095024, 2015.

CHOUDHARY, R. B.; ANSARI, S.; PURTY, B. Robust electrochemical performance of polypyrrole (PPy) and polyindole (PI) based hybrid electrode materials for supercapacitor application: A review. **Journal of energy storage**, v. 29, n. 101302, p. 101302, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.est.2020.101302>.

CHUNG, Seokhwan; REVIA, Richard A.; ZHANG, Miqin. Graphene quantum dots and their applications in bioimaging, biosensing, and therapy. **Advanced Materials**, v. 33, n. 22, p. 1904362, 2021. <https://doi.org/10.1002/adma.201904362>.

COSPER, P. F. et al. Biology of HPV mediated carcinogenesis and tumor progression. **Seminars in radiation oncology**, v. 31, n. 4, p. 265–273, 2021. ISSN 1053-4296, <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2021.02.006>.

COSTA, Ana Paula Ferreira et al. Papilomavírus humano: resposta imune e vacinação. 2019.

COSTA, Annielson de Souza. Nível de conhecimento sobre papiloma vírus humano (HPV) e aceitabilidade de sua vacina quadrivalente entre estudantes de medicina. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CRUZ, G. DE C. V. et al.. Construction and validation of an educational technology on human papillomavirus vaccine for adolescents. *Escola Anna Nery*, v. 23, n. 3, p. e20190050, 2019.

DAS, S. et al. Diagnosis of cancer using carbon nanomaterial-based biosensors. **Sensors & diagnostics**, v. 2, n. 2, p. 268–289, 2023. <https://doi.org/10.1039/d2sd00182a>.

DE OLIVEIRA, Adna Candido; PESSOA, Daliana Caldas. HPV e Câncer de Colo Uterino: uma Revisão Bibliográfica. **Revista de Ensino e Cultura**, v. 1, n. 03, p. 87-96, 2018.

DE VILLIERS, Ethel-Michele et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

DELLA FERA, Ashley N. et al. Persistent human papillomavirus infection. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 321, 2021.

DHANJAI et al. Voltammetric sensing of biomolecules at carbon based electrode interfaces: A review. **Trends in analytical chemistry: TRAC**, v. 98, p. 174–189, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.11.010>.

DOORBAR, J et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses, **Vaccine**, Volume 30, Supplement 5, 2012, Pages F55-F70, ISSN 0264-410X, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>.

DOORBAR, John. Host control of human papillomavirus infection and disease. **Best practice & research Clinical obstetrics & gynecology**, v. 47, p. 27-41, 2018.

DYKENS, J. Andrew et al. Gender neutral HPV vaccination programs: Reconsidering policies to expand cancer prevention globally. **Frontiers in Public Health**, v. 11, p. 1067299, 2023. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1067299>.

DZULKURNAIN, N. A. et al. A review on impedimetric and voltammetric analysis based on polypyrrole conducting polymers for electrochemical sensing applications. **Polymers**, v. 13, n. 16, p. 2728, 2021. <https://doi.org/10.3390/polym13162728>.

D'ORAZIO, Paul. Biosensors in clinical chemistry—2011 update. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 19-20, p. 1749-1761, 2011.

ELGRISHI, N. et al. A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. **Journal of chemical education**, v. 95, n. 2, p. 197–206, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>.

ESKIKÖY BAYRAKTEPE, D.; YILDIZ, C.; YAZAN, Z. The development of electrochemical DNA biosensor based on poly-L-methionine and bimetallic AuPt

Nanoparticles coating: Picomolar detection of Imatinib and Erlotinib. **Talanta**, v. 257, n. 124361, p. 124361, 2023.

EL-SAYED, Amr; KAMEL, Mohamed. Advances in nanomedical applications: diagnostic, therapeutic, immunization, and vaccine production. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 16, p. 19200-19213, 2020.

ENTIAUSPE, Ludmila et al. Papilomavírus Humano: uma abordagem atual. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 18, n. 2, p. 51-62, 2006.

ESPINOZA, E. M. et al. Practical Aspects of Cyclic Voltammetry: How to Estimate Reduction Potentials When Irreversibility Prevails. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 166, n. 5, p. H3175–H3187, 2019.

FACURE, Murilo HM et al. A review on graphene quantum dots and their nanocomposites: from laboratory synthesis towards agricultural and environmental applications. **Environmental Science: Nano**, v. 7, n. 12, p. 3710-3734, 2020.

FASBENDER, Stefan et al. The low toxicity of graphene quantum dots is reflected by marginal gene expression changes of primary human hematopoietic stem cells. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 12028, 2019.

FELIX, J. C.; AMEZCUA, C. In vitro adjuncts to the Pap smear. **Obstetrics and gynecology clinics of North America**, v. 29, n. 4, p. 685–699, 2002, ISSN 0889-8545, [https://doi.org/10.1016/S0889-8545\(02\)00044-X](https://doi.org/10.1016/S0889-8545(02)00044-X).

FRAAS, Regina; FRANZREB, Matthias. Reversible covalent enzyme immobilization methods for reuse of carriers. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 35, n. 5, p. 337-348, 2017.

Fritea, L., Tertis, M., Sandulescu, R., & Cristea, C. (2018). Enzymes–Graphene Platforms for Electrochemical Biosensors Design With Biomedical Applications. **Methods in Enzymology**. doi:10.1016/bs.mie.2018.05.010

GADDUCCI, Angiolo; GUERRIEI, Maria Elena; GRECO, Carlo. Biomarcadores teciduais como variáveis prognósticas do câncer cervical. **Oncologia/Hematologia**. 2013; 86 :104–129.

GARCIA-MELO, L. F. et al. Development of the BAT-26 mutation-based electrochemical genosensor for identifying microsatellite instability in relationship to cancer. **Sensing and bio-sensing research**, v. 44, n. 100651, p. 100651, 2024.

GARCIA, R. Nanomechanical mapping of soft materials with the atomic force microscope: methods, theory and applications. **Chemical Society reviews**, v. 49, n. 16, p. 5850–5884, 2020. DOI: 10.1039/D0CS00318B.

Geim, A., Novoselov, K. A ascensão do grafeno. **Nature Mater**, 6 , 183–191 (2007). <https://doi.org/10.1038/nmat1849>.

GEIM, Andre K.; NOVOSELOV, Konstantin S. The rise of graphene. **Nature materials**, v. 6, n. 3, p. 183-191, 2007.

GLEHN, M. DE P. VON . et al.. Human papillomavirus vaccination coverage in Northeast Brazil, 2013-2021: a descriptive study. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 32, n. 2, p. e2022790, 2023.

GRIESHABER, D. et al. Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1400-1458, 2008.

GUPTA, S.; KUMAR, P.; DAS, B. C. HPV: Molecular pathways and targets. **Current problems in cancer**, v. 42, n. 2, p. 161–174, 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.currprobcancer.2018.03.003>.

GUTIÉRREZ et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus in the development of cervical cancer. **Salud publica de Mexico**, v. 51 Suppl 3, p. S479-88, 2009

HAMMES, Luciano Serpa; NAUD, Paulo Sergio Viero; MATOS, Jean Carlos de. Reconhecimento pela descoberta do Papilomavírus Humano (HPV). **Revista HCPA**. Porto Alegre. Vol. 28, n. 3 (2008), p. 202-204, 2008.

HARLAN, LC; BERNTEIN, AB; KESSLER, LG. Cervical câncer screening: who is not screened and why? **Am J Public Health** 1991;81(7):885-90.

HASANZADEH, M.; KARIMZADEH, Y.; SHADJOU, N. MGQDs towards electrochemical sensing. **J. Nanostruct.**, v. 8, p. 21-30, 2018.

HAYAT, A. et al. State, synthesis, perspective applications, and challenges of Graphdiyne and its analogues: A review of recent research. **Advances in colloid and interface science**, v. 319, n. 102969, p. 102969, 2023.  
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102969>.

HE, H.-J. et al. Hyperspectral imaging combined with chemometrics for rapid detection of talcum powder adulterated in wheat flour. **Food control**, v. 144, n. 109378, p. 109378, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109378>.

HEATH, G. R. et al. Localization atomic force microscopy. **Nature**, v. 594, n. 7863, p. 385–390, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03551-x>.

HÉBERGER, K. Chemoinformatics—multivariate mathematical—statistical methods for data evaluation. Em: **Medical Applications of Mass Spectrometry**. [s.l.] Elsevier, 2008. p. 141–169. <https://doi.org/10.1016/B978-044451980-1.50009-4>.

HELM, I.; JALUKSE, L.; LEITO, I. Measurement uncertainty estimation in amperometric sensors: A tutorial review. **Sensors** (Basel, Switzerland), v. 10, n. 5, p. 4430–4455, 2010. <https://doi.org/10.3390/s100504430>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). **Estimativa 2023** : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2022. *E-book* (160 p.). ISBN 978-65-88517-10-9. Disponível em:

<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>. Acesso em: 25 set. 2024.

JEEVANANDAM, J. et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 9, p. 1050–1074, 2018. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>.

JENSEN, E. Technical review: In situ hybridization: AR insights. **Anatomical record (Hoboken, N.J.: 2007)**, v. 297, n. 8, p. 1349–1353, 2014. <https://doi.org/10.1002/ar.22944>.

JENSON, A. B. et al. Frequency and distribution of papillomavirus structural antigens in verrucae, multiple papillomas, and condylomata of the oral cavity. *PubMed*, v. 107, n. 2, p. 212–8, 1 maio 1982.

JinLing Zheng, DanDan Meng, Xing Zheng, Yan Zhang, HongFei Chen, Graphene-based materials: A new tool to fight against breast cancer, **International Journal of Pharmaceutics**, Volume 603, 2021, 120644, ISSN 0378-5173, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120644>.

JOSHUA, A. M.; CHENG, G.; LAU, E. V. Soft matter analysis via atomic force microscopy (AFM): A review. **Applied Surface Science Advances**, v. 17, n. 100448, p. 100448, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2023.100448>.

KARAMI, M. H. et al. Graphene quantum dots: Background, synthesis methods, and applications as nanocarrier in drug delivery and cancer treatment: An updated review. **Inorganic chemistry communications**, v. 161, n. 112032, p. 112032, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2024.112032>.

KARRAT, Abdelhafid; AMINE, Aziz. Recent advances in chitosan-based electrochemical sensors and biosensors. **Arab. J. Chem. Environ. Res**, v. 7, n. 2, p. 66-93, 2020.

KASHIMA, H. et al. Carcinoma ex-papilloma: histologic and virologic studies in whole-organ sections of the larynx. **The Laryngoscope**, v. 98, n. 6, p. 619-624, jun. 1988.

KAUR, B.; KUMAR, S.; KAUSHIK, B. K. Recent advancements in optical biosensors for cancer detection. **Biosensors & bioelectronics**, v. 197, n. 113805, p. 113805, 2022. ISSN 0956-5663, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113805>.

KEÇİLİ, R.; BÜYÜKTIRYAKI, S.; HUSSAIN, C. M. Advancement in bioanalytical science through nanotechnology: Past, present and future. **Trends in analytical chemistry: TRAC**, v. 110, p. 259–276, 2019. ISSN 0165-9936, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.012>.

KHAN, Michelle J. et al. ASCCP colposcopy standards: role of colposcopy, benefits, potential harms, and terminology for colposcopic practice. **Journal of lower genital tract disease**, v. 21, n. 4, p. 223-229, 2017.

KHAN, S. et al. DNAzyme-based biosensors: Immobilization strategies, applications, and future prospective. **ACS nano**, v. 15, n. 9, p. 13943–13969, 2021. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04327>.

KHARE, R. et al. Blueprint for impedance-based electrochemical biosensors as bioengineered tools in the field of nano-diagnostics. **Current research in biotechnology**, v. 4, p. 564–578, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.11.001>.

KHODAKOV, D.; WANG, C.; ZHANG, D. Y. Diagnostics based on nucleic acid sequence variant profiling: PCR, hybridization, and NGS approaches. **Advanced drug delivery reviews**, v. 105, n. Pt A, p. 3–19, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.005>.

KNUDSON, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Process. Academic. National. Science. USA**, vol. 820–823, 1971. doi:10.1073/pnas.68.4.820.

KONCKI, R. Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis. **Analytica chimica acta**, v. 599, n. 1, p. 7–15, 2007, ISSN 0003-2670, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.08.003>.

KORZENIEWSKI, N. et al. Genomic instability and cancer: lessons learned from human papillomaviruses. **Cancer letters**, v. 305, n. 2, p. 113–122, 2011.

KOSHIYAMA, M.; MATSUMURA, N.; KONISHI, I. Subtypes of ovarian cancer and ovarian cancer screening. **Diagnostics** (Basel, Switzerland), v. 7, n. 1, p. 12, 2017. <https://doi.org/10.3390/diagnostics7010012>.

KUMAR, P. et al. Graphene quantum dots: A contemporary perspective on scope, opportunities, and sustainability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 157, n. 111993, p. 111993, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111993>.

KUMAR, Y. R. et al. Graphene quantum dot based materials for sensing, bio-imaging and energy storage applications: a review. **RSC advances**, v. 10, n. 40, p. 23861–23898, 2020. DOI: 10.1039/D0RA03938A.

LABIB, Mahmoud; SARGENT, Edward H.; KELLEY, Shana O. Electrochemical methods for the analysis of clinically relevant biomolecules. **Chemical reviews**, v. 116, n. 16, p. 9001-9090, 2016.

LAKARD, B. Electrochemical biosensors based on conducting polymers: A review. **Applied sciences** (Basel, Switzerland), v. 10, n. 18, p. 6614, 2020. <https://doi.org/10.3390/app10186614>.

LAZANAS, A. C.; PRODROMIDIS, M. I. Electrochemical Impedance Spectroscopy-A tutorial. **ACS measurement science Au**, v. 3, n. 3, p. 162–193, 2023. <https://doi.org/10.1021/acsmesuresciau.2c00070>.

LEE, Na Eun et al. Ultraviolet/blue light emitting high-quality graphene quantum dots and their biocompatibility. **Carbon**, v. 170, p. 213-219, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2020.08.015>.

Leva-Bueno, J., Peyman, SA & Millner, PA Uma revisão sobre imunossensores impedimétricos para detecção de patógenos e biomarcadores. **Med Microbiol Immunol** 209 , 343–362 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00430-020-00668-0>.

LIANG, Linda A. et al. Cervical cancer screening: comparison of conventional Pap smear test, liquid-based cytology, and human papillomavirus testing as stand-alone or cotesting strategies. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 30, n. 3, p. 474-484, 2021.

LIEBANA, Susana; DRAGO, Guido A. Bioconjugation and stabilisation of biomolecules in biosensors. **Essays in biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 59-68, 2016.

LIU, Jingjing et al. Application and progress of chemometrics in voltammetric biosensing. **Biosensors**, v. 12, n. 7, p. 494, 2022. <https://doi.org/10.3390/bios12070494>.

LI, G. et al. Recent advancement in graphene quantum dots based fluorescent sensor: Design, construction and bio-medical applications. **Coordination chemistry reviews**, v. 478, n. 214966, p. 214966, 2023.

LIN, G.; LI, J. Circulating HPV DNA in HPV-associated cancers. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 542, n. 117269, p. 117269, 2023.

LLINÀS-ARIAS, P.; ESTELLER, M. Epigenetic inactivation of tumour suppressor coding and non-coding genes in human cancer: an update. **Open biology**, v. 7, n. 9, p. 170152, 2017. <http://doi.org/10.1098/rsob.170152>.

LUONG, J. H. T. et al. Recent advances of conducting polymers and their composites for electrochemical biosensing applications. **Journal of functional biomaterials**, v. 11, n. 4, p. 71, 2020. <https://doi.org/10.3390/jfb11040071>.

MAC, M.; MOODY, C. A. Epigenetic regulation of the human Papillomavirus life cycle. **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 483, 2020. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060483>.

MALIK, S. et al. Nanomaterials-based biosensor and their applications: A review. **Heliyon**, v. 9, n. 9, p. e19929, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19929>.

MARRAZZA, G. Piezoelectric biosensors for organophosphate and carbamate pesticides: A review. **Biosensors**, v. 4, n. 3, p. 301–317, 2014. . <https://doi.org/10.3390/bios4030301>.

MARTINS, Cecília Maria Roteli; FRIDMAN, Fabíola Zoppas; MAGNO, Valentino. Papilomavírus humano (HPV). PROGRAMA VACINAL PARA MULHERES, p. 31, 2021.

McINTYRE, P. Finding the viral link: the story of Harald zur Hausen. In: **Cancer World**; 2005. P. 32-37.

MCKAY, S. P. et al. Human Papillomavirus (HPV) Transcripts in Malignant Inverted Papilloma are from Integrated HPV DNA. **The Laryngoscope**, v. 115, n. 8, p. 1428–1431, ago. 2005.

MEDINA, M. L.; MEDINA, M. G.; MERINO, L. A. Principales conductas de riesgo sobre Papilomavirus Humano en universitarios argentinos. **Avances en odontostomatología**, v. 34, n. 6, p. 311-319, 2018.

MEIRELES, Leilyane Araújo et al. Atuação do enfermeiro na adesão da imunização do Papilomavírus humano em adolescentes. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 6, p. 17413-17427, 2020.

MELO, Bernardo Augusto de Carvalho et al. Infecção por papilomavírus humano e carcinoma espinocelular oral-Uma revisão sistemática. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 87, p. 346-352, 2021.

MENÊSES, Marta Soraia L.; TORALLES, Maria Betânia P.; MENDES, Carlos Maurício Cardeal. Evolução da técnica de PCR: sua contribuição no diagnóstico da infecção por HPV. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.(Impr.)**, p. 361-366, 2019.

MENÊSES, Marta Soraia Lima. Frequência do papiloma vírus humano em mulheres atendidas no Centro de Oncologia da Bahia (2018/2019). Orientador: Carlos Maurício Cardeal Mendes. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2021.

MENG, X.; O'HARE, D.; LADAME, S. Surface immobilization strategies for the development of electrochemical nucleic acid sensors. **Biosensors & bioelectronics**, v. 237, p. 115440, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115440>.

MITTAL, S. et al. Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies. **Biosensors & bioelectronics**, v. 88, p. 217–231, 2017.

MITTELDORF, C. A. T. S.. Cervical cancer screening: from Pap smear to future strategies. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 52, n. 4, p. 238–245, jul. 2016.

MOLIJN, A. et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 32 Suppl 1, p. S43-51, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.12.004>.

MOLLARASOULI, F.; KURBANOGLU, S.; OZKAN, S. A. The role of electrochemical immunosensors in clinical analysis. **Biosensors**, v. 9, n. 3, p. 86, 2019. <https://doi.org/10.3390/bios9030086>.

MONGRA, A. C.; KAUR, Amandeep; BANSAL, R. K. Review study on electrochemical-based biosensors. **measurements**, v. 2, n. 2, p. 743-749, 2012.

MONTEIRO, Bruna Karoline Santos Melo et al. Papilomavírus humano em região anal: revisão de literatura. 2019.

MÜHR, Laila Sara Arroyo; EKLUND, Carina; DILLNER, Joakim. Misclassifications in human papillomavirus databases. **Virology**, v. 558, p. 57-66, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.03.002>.

MÜLLER, D. J. et al. Atomic force microscopy-based force spectroscopy and multiparametric imaging of biomolecular and cellular systems. **Chemical reviews**, v. 121, n. 19, p. 11701–11725, 2021.

MUÑOZ, J.; MONTES, R.; BAEZA, M. Trends in electrochemical impedance spectroscopy involving nanocomposite transducers: Characterization, architecture surface and bio-sensing. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, p. 201-215, 2017.

NARANG, G. et al. A review on the synthesis, properties, and applications of graphynes. **FlatChem**, v. 40, n. 100517, p. 100517, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.flatc.2023.100517>.

NARESH, V.; LEE, N. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 4, p. 1109, 2021. <https://doi.org/10.3390/s21041109>.

NEGAHDARY, M. Electrochemical aptasensors based on the gold nanostructures. **Talanta**, v. 216, n. 120999, p. 120999, 2020. ISSN 0039-9140, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120999>.

NESAKUMAR, N.; SRINIVASAN, S.; ALWARAPPAN, S. Graphene quantum dots: synthesis, properties, and applications to the development of optical and electrochemical sensors for chemical sensing. **Mikrochimica acta**, v. 189, n. 7, p. 258, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05353-y>.

NGUYEN, Hoang Hiep; KIM, Moonil. An overview of techniques in enzyme immobilization. **Applied Science and Convergence Technology**, v. 26, n. 6, p. 157-163, 2017.

NGUYEN, H. H. et al. Immobilized enzymes in biosensor applications. **Materials**, v. 12, n. 1, p. 121, 2019. <https://doi.org/10.3390/ma12010121>.

NGUYEN-TRI, P. et al. Recent applications of advanced atomic force microscopy in polymer science: A review. **Polymers**, v. 12, n. 5, p. 1142, 2020.

NIMSE, S. B. et al. Immobilization techniques for microarray: challenges and applications. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 12, p. 22208–22229, 2014. <https://doi.org/10.3390/s141222208>

NOVOSELOV, Kostya S. et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. **science**, v. 306, n. 5696, p. 666-669, 2004.

NOVOSELOV, Kostya S. et al. Two-dimensional atomic crystals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 30, p. 10451-10453, 2005.

OH, S.-R.; AGRAWAL, S. K. Control of Position and Grasping Force With Cooperating Arms: A Feedback Linearization Approach. **Dynamic Systems and Control**, 1 jan. 2002.

OLIVEIRA, Ana Katherine da Silveira Gonçalves de et al. Infecção pelo HPV: rastreamento, diagnóstico e conduta nas lesões HPV-induzidas. **Femina**, p. 166-172, 2021.

OLIVEIRA, Paulo Sérgio de et al. Vaccination coverage against human papillomavirus (HPV) and associated factors in female academics from a university in southwestern Goiás, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 55, p. 65, 2021.

OLIVEIRA, Rafael Furlan de; MARTINEZ, Diego Stéfani Teodoro; FAZZIO, Adalberto. A nanotecnologia na saúde: a nanotecnologia e os nanomateriais são elementos centrais para a inovação e solução de problemas na área da saúde. **Ciência e Cultura**, v. 74, n. 4, p. 01-10, 2022. <http://dx.doi.org/10.5935/2317-6660.20220060>.

ØSTERGAARD, J. UV/Vis Spectrophotometry and UV Imaging. **Advances in Delivery Science and Technology**. New York, NY: Springer New York, 2016. p. 3–27. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-4029-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-4029-5_1).

ÖZBEK, O. et al. Potentiometric urea biosensors. **Clinica chimica acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 524, p. 154–163, 2022. ISSN 0009-8981, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.11.011>.

PACHECO, Wagner Felipe et al. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PADILHA, Aline Rafaela Neves et al. Motivos de pais e responsáveis para a não adesão à vacinação contra o Papilomavírus Humano: Revisão de Escopo. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e28211124792-e28211124792, 2022.

PANCERA, Tayuska Ribeiro; DOS SANTOS, Graciete Helena Nascimento. Epidemiologia Molecular da infecção pelo papilomavírus humano (HPV) e câncer cervical no Brasil: Revisão Integrativa. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 5, n. 2, p. 79-83, 2018.

PÁRAMO-GARCÍA, Ulises; IBANEZ, Jorge G.; BATINA, Nikola. Electrochemical modulation of the thickness of polypyrrole films by using different anionic dopants. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 6, n. 11, p. 5172-5188, 2011.

PARMIN, N. A. et al. A Sensitive DNA Biosensor using Screen Printed Gold Electrode Interdigitated Electrode (IDE) Pattern based for Identification of Human

Papillomavirus Type 18 Variants. **Journal of Futuristic Biosciences and Biomedical Engineering**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2019a.

PARTRIDGE, E. E. et al. Cervical cancer screening. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN**, v. 8, n. 12, p. 1358–1386, 2010. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2010.0103>.

PEREIRA-CALDEIRA, Natália Maria Vieira et al. Instrumentos para avaliação da qualidade de vida em indivíduos com papilomavírus humano. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 72, p. 1363-1369, 2019.

PEREIRA-CALDEIRA, N. M. V. et al.. Scale for assessing the quality of life of women with Human Papillomavirus infection. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 74, n. 6, p. e20200698, 2021.

PASSOS, M.L.C.; SARAIVA, M. L.M.F.S. Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. **Measurement: journal of the International Measurement Confederation**, v. 135, p. 896–904, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2018.12.045>.

PINIDIS et al. Human Papilloma Virus' Life Cycle and Carcinogenesis. **PubMed**, v. 11, n. 1, p. 48–54, 1 mar. 2016.

PFIEFFER, M. L.; CROSS, L. Deciphering pap guidelines and determining management in primary care. **Advances in Family Practice Nursing**, v. 3, p. 95–109, 2021. ISBN 9780323811002, <https://doi.org/10.1016/j.yfnp.2021.01.009>.

PICOLLO, M.; ACETO, M.; VITORINO, T. UV-Vis spectroscopy. **Physical Sciences Reviews**, v. 4, n. 4, 2019. <https://doi.org/10.1515/psr-2018-0008>

PODGORSKI, Thaísa et al. Adesão de adolescentes à vacinação contra o Papilomavírus Humano em um município da Região Sul do Brasil. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 9, n. 4, p. 258-263, 2019.

POHANKA, M. Visão geral de biossensores piezoelétricos, imunossensores e sensores de DNA e suas aplicações. **Materiais**. 2018; 11(3):448. <https://doi.org/10.3390/ma11030448>.

POKROP, R. et al. Solution processible sulfosuccinate doped polypyrrole: preparation, spectroscopic and spectroelectrochemical characterization. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 415, n. 1, p. 93-104, 2004. [10.1080/15421400490482934](https://doi.org/10.1080/15421400490482934).

POURMADADI, M. et al. Properties and application of carbon quantum dots (CQDs) in biosensors for disease detection: A comprehensive review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 80, p. 104156, fev. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104156>.

PRAMANIK, P. K. D. et al. Advancing Modern Healthcare With Nanotechnology, Nanobiosensors, and Internet of Nano Things: Taxonomies, Applications, Architecture, and Challenges. **IEEE Access**, v. 8, p. 65230–65266, 2020.

PRAY, Leslie. Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 100, 2008.

QIN, J.; WANG, W.; GAO, L.; YAO, S. Q. Emerging biosensing and transducing techniques for potential applications in point-of-care diagnostics. **Chemical Science**, 13(10), 2857-2876, 2022, DOI: <https://doi.org/10.1039/D1SC06269G>.

RAHIMI, S. HPV-related squamous cell carcinoma of oropharynx: a review. **Journal of clinical pathology**, v. 73, n. 10, p. 624–629, 2020. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2020-206686>.

RAHMAN, M M. et al. Electrochemical DNA hybridization sensors based on conducting polymers. **Sensors**, v. 15, n. 2, p. 3801-3829, 2015.

RAMANATHAN, K.; DANIELSSON, B. Principles and applications of thermal biosensors. **Biosensors & bioelectronics**, v. 16, n. 6, p. 417–423, 2001. ISSN 0956-5663, [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00124-5](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00124-5).

RAMANAČIUS, A.; RAMANAČIENĖ, A.; MALINAUSKAS, A. Electrochemical sensors based on conducting polymer—polypyrrole. **Electrochimica acta**, v. 51, n. 27, p. 6025–6037, 2006.

RAMSHANKAR, Vijayalakshmi; KRISHNAMURTHY, Arvind. Human papilloma virus in head and neck cancers—role and relevance in clinical management. **Indian journal of surgical oncology**, v. 4, p. 59-66, 2013.

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.

RASHID, J. I. A.; YUSOF, N. A. 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. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2017.09.001>.

RAUTI, R. et al. Properties and behavior of carbon nanomaterials when interfacing neuronal cells: How far have we come? **Carbon**, v. 143, p. 430–446, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2018.11.026>.

RERUCHA, Caitlyn M.; CARO, Rebecca J.; WHEELER, Vernon L. Cervical cancer screening. **American family physician**, v. 97, n. 7, p. 441-448, 2018.

SÁ, J. M.; COLOMBO, Tatiana Elias. Infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) em mulheres dos municípios de São José do Rio Preto e Olímpia de janeiro de 2015 até janeiro de 2016. **Journal Health Science Inst**, v. 36, n. 2, p. 99-104, 2018.

SACCO, A. Electrochemical impedance spectroscopy: Fundamentals and application in dye-sensitized solar cells. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 814–829, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.159>.

SAJI, R. et al. Application of FTIR spectroscopy in dairy products: A systematic review. **Food and Humanity**, v. 2, n. 100239, p. 100239, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2024.100239>.

SALVA, M. L. et al. Methods for immobilizing receptors in microfluidic devices: A review. **Micro and Nano Engineering**, v. 11, n. 100085, p. 100085, 2021.

SAMAD HOSSEINI, S. et al. Perspectives and trends in advanced DNA biosensors for the recognition of single nucleotide polymorphisms. **Chemical engineering journal (Lausanne, Switzerland: 1996)**, v. 441, n. 135988, p. 135988, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.135988>.

SANATI, A. et al. A review on recent advancements in electrochemical biosensing using carbonaceous nanomaterials. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 12, 13 nov. 2019. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3854-2>.

SANDFORD, C. et al. A synthetic chemist's guide to electroanalytical tools for studying reaction mechanisms. **Chemical Science**, v. 10, n. 26, p. 6404-6422, 2019.

SÃO MARCOS, Bianca de França. Avaliação do microambiente tumoral pulmonar infectado com o papilomavírus humano. 2023.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 3, p. 489–511, 2012. ISSN 0734-9750, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>.

SCHELLHAS, M et al. Entrada do papilomavírus humano tipo 16 por endocitose dependente de actina, clatrina e lipid raft independente. **PLoS Pathog**, 8 (4) (2012) pág. e1002657.

SEERIG, Mariana Manzoni et al. Eficiência da técnica de PCR e da Captura Híbrida para a detecção do HPV: uma revisão integrativa. **Acta Elit Salutis**, v. 8, n. 2, 2024.

SEMENOVA, D. et al. Mechanistic modeling of cyclic voltammetry: A helpful tool for understanding biosensor principles and supporting design optimization. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 259, p. 945-955, 2018.

SENAPATI, R.; SENAPATI, N. N.; DWIBEDI, B. Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression. **Infectious agents and cancer**, v. 11, n. 1, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13027-016-0107-4>.

SENGUPTA, S. et al. A review on synthesis, toxicity profile and biomedical applications of graphene quantum dots (GQDs). **Inorganica chimica acta**, v. 557, n. 121677, p. 121677, 2023.

SHAN, X. et al. Spontaneous and specific binding of enterohemorrhagic Escherichia coli to overoxidized polypyrrole-coated microspheres. **Chemical communications**, v. 53, n. 27, p. 3890–3893, 1 jan. 2017.

SHARMA, A. et al. Optical biosensors for diagnostics of infectious viral disease: A recent update. **Diagnostics** (Basel, Switzerland), v. 11, n. 11, p. 2083, 2021. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11112083>.

SHARMA, G. Biogenic carbon nanostructured materials for detection of cancer and medical applications: A mini review. **Hybrid Advances**, v. 5, n. 100166, p. 100166, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.hybadv.2024.100166>.

SHIN, H. et al. Component-/structure-dependent elasticity of solid electrolyte interphase layer in Li-ion batteries: Experimental and computational studies. **Journal of power sources**, v. 277, p. 169–179, 2015.

SHIRAKAWA, Hideki et al. Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH)<sub>x</sub>. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 16, p. 578-580, 1977.

SINGH, N. et al. Inflammation and cancer. **Annals of African medicine**, v. 18, n. 3, p. 121, 2019. DOI: 10.4103/aam.aam\_56\_18.

SINGH, A. et al. Recent advances in electrochemical biosensors: Applications, challenges, and future scope. **Biosensors**, v. 11, n. 9, p. 336, 2021. <https://doi.org/10.3390/bios11090336>.

SINGH, A. K. et al. Optical biosensors: a decade in review. **Alexandria Engineering Journal**, v. 67, p. 673–691, 2023. ISSN 1110-0168, <https://doi.org/10.1016/j.aej.2022.12.040>.

SINGH, H.; KAUR, K. Role of nanotechnology in research fields: Medical sciences, military & tribology- A review on recent advancements, grand challenges and perspectives. **Materials today: proceedings**, 2023. ISSN 2214-7853, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.02.061>.

SMUTOK, O.; KATZ, E. Biosensors: Electrochemical devices-general concepts and performance. **Biosensors**, v. 13, n. 1, p. 44, 2022.

SOLDANO, C.; MAHMOOD, A.; DUJARDIN, E. Production, properties and potential of graphene. **Carbon**, v. 48, n. 8, p. 2127–2150, 2010.

SOUZA, Djenaine de; MACHADO, Sergio AS; AVACA, Luis A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química nova**, v. 26, p. 81-89, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100015>.

SOUZA, Z. A. DE . et al.. Importance of vaccination against human papillomavirus in a rural settlement in Terenos, Mato Grosso do Sul. *Revista de Saúde Pública*, v. 57, p. 10, 2023.

STANLEY, Margaret A. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 2, p. 215-222, 2012.

STEPEK, I. A. et al. New paradigms in molecular nanocarbon science. **Tetrahedron**, v. 123, n. 132907, p. 132907, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2022.132907>.

STUART, Barbara H. **Infrared spectroscopy: fundamentals and applications**. John Wiley & Sons, 2004.

SVENSSON, O.; KOURTI, T.; MACGREGOR, J. F. An investigation of orthogonal signal correction algorithms and their characteristics. **Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society**, v. 16, n. 4, p. 176-188, 2002.

SYRJÄNEN, Stina; RAUTAVA, Jaana; SYRJÄNEN, Kari. HPV in head and neck cancer—30 years of history. **HPV infection in head and neck cancer**, p. 3-25, 2017.

SYRJÄNEN, Stina. Oral manifestations of human papillomavirus infections. **European journal of oral sciences**, v. 126, p. 49-66, 2018.

TABISH, T. A. et al. Graphene quantum dots-based electrochemical biosensing platform for early detection of acute myocardial infarction. **Biosensors**, v. 12, n. 2, p. 77, 2022. <https://doi.org/10.3390/bios12020077>.

TAN, X. et al. Electrochemical synthesis of small-sized red fluorescent graphene quantum dots as a bioimaging platform. **Chemical communications (Cambridge, England)**, v. 51, n. 13, p. 2544–2546, 2015. <https://doi.org/10.1039/C4CC09332A>.  
TECHAKEHAKIJ, W.; FELDMAN, R. D. Cost-effectiveness of HPV vaccination compared with Pap smear screening on a national scale: A literature review. **Vaccine**, v. 26, n. 49, p. 6258–6265, 2008. ISSN 0264-410X, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.09.036>.

THAPA, K.; LIU, W.; WANG, R. Nucleic acid-based electrochemical biosensor: Recent advances in probe immobilization and signal amplification strategies. **Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. e1765, 2022. <https://doi.org/10.1002/wnan.1765>.

THAKUR, D. et al. High-performance biosensing systems for diagnostics of sexually transmitted disease – A strategic review. **Process biochemistry (Barking, London, England)**, v. 126, p. 223–237, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.01.009>.

THOMAS, J.; PRIMEAUX, T. Is p16 immunohistochemistry a more cost-effective method for identification of human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma? **Annals of diagnostic pathology**, v. 16, n. 2, p. 91–99, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2011.09.002>.

TIAN, P. et al. Graphene quantum dots from chemistry to applications. **Materials today chemistry**, v. 10, p. 221-258, 2018.

ULIANA, C. V.; RICCARDI, C. S.; YAMANAKA, H. Diagnostic tests for hepatitis C: recent trends in electrochemical immunosensor and genosensor analysis. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 42, p. 15476–15491, 2014. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i42.15476>.

Upadhyay, N., Jaiswal, P. & Jha, S.N. Detection of goat body fat adulteration in pure ghee using ATR-FTIR spectroscopy coupled with chemometric strategy. **J Food Sci Technol**, 53, 3752–3760 (2016). <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2353-2>.

VADHVA, P. et al. Electrochemical impedance spectroscopy for all-solid-state batteries: Theory, methods and future outlook. **ChemElectroChem**, v. 8, n. 11, p. 1930–1947, 2021. <https://doi.org/10.1002/celec.202100108>.

VAN DEN KIEBOOM, C. H. et al. Aptasensors for viral diagnostics. **Trends in analytical chemistry: TRAC**, v. 74, p. 58–67, 2015. ISSN 0165-9936, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.012>.

VAN DOORSLAER, Koenraad et al. ICTV virus taxonomy profile: Papillomaviridae. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 8, p. 989-990, 2018.

VIANA, M. R. P. et al. Molecular detection of HPV and FT-IR spectroscopy analysis in women with normal cervical cytology. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 29, n. 101592, p. 101592, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.101592>.

VILLALONGA, A. et al. Electrochemical aptasensors for clinical diagnosis. A review of the last five years. **Sensors and actuators B, Chemical**, v. 369, n. 132318, p. 132318, 2022. ISSN 0925-4005, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.132318>.

VIEIRA, G. V. et al. Proteases and HPV-induced carcinogenesis. **Cancers**, v. 14, n. 13, p. 3038, 2022. <https://doi.org/10.3390/cancers14133038>.

VORSTERS, A. et al. HPV prevention and control - The way forward. **Preventive medicine**, v. 156, n. 106960, p. 106960, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ypm.2022.106960>.

XIE, Bin; DANIELSSON, Bengt. Thermal biosensor and microbiosensor techniques. **Handbook of biosensors and biochips**, v. 2, p. 1-19, 2007.

XIE, J.-D.; LAI, G.-W.; HUQ, M. M. Hydrothermal route to graphene quantum dots: Effects of precursor and temperature. **Diamond and related materials**, v. 79, p. 112–118, 2017.

XIE, Rongbin et al. Graphene quantum dots as smart probes for biosensing. **Analytical Methods**, v. 8, n. 20, p. 4001-4016, 2016.

WANG, Xuan; ZHI, Linjie; MÜLLEN, Klaus. Transparent, conductive graphene electrodes for dye-sensitized solar cells. **Nano letters**, v. 8, n. 1, p. 323-327, 2008.

Wang, J. Electrochemical biosensing based on noble metal nanoparticles. **Microchim Acta**, 177, 245–270 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00604-011-0758-1>.

- WANG, X.; ZHOU, J.; WANG, H. Bioreceptors as the key components for electrochemical biosensing in medicine. **Cell reports. Physical science**, v. 5, n. 2, p. 101801, 2024.
- Warowicka A, Broniarczyk J, Węglewska M, Kwaśniewski W, Goździcka-Józefiak A. Papel duplo do YY1 no ciclo de vida do HPV e no desenvolvimento do câncer cervical. **Revista Internacional de Ciências Moleculares**. 2022; 23(7):3453. <https://doi.org/10.3390/ijms23073453>.
- Waters, D.L.E., Shapter, F.M. (2014). The Polymerase Chain Reaction (PCR): General Methods. In: Henry, R., Furtado, A. (eds) *Cereal Genomics. Methods in Molecular Biology*, vol 1099. Humana Press, Totowa, NJ. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0_7).
- WEHLING, T. O. et al. Molecular doping of graphene. **Nano letters**, v. 8, n. 1, p. 173-177, 2008.
- WILCZEWSKA, P. et al. Enhancement of polypyrrole electrochemical performance with graphene quantum dots in polypyrrole nanoparticle/graphene quantum dot composites. **Journal of electroanalytical chemistry**, v. 923, n. 116767, p. 116767, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2022.116767>.
- WILLIAMS, J.; KOSTIUK, M.; BIRON, V. L. Molecular detection methods in HPV-related cancers. **Frontiers in oncology**, v. 12, p. 864820, 2022. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.864820>.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem**. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240014107>>. Acesso em: 6 jan. 2025.
- YANG, Kai; FENG, Liangzhu; LIU, Zhuang. Stimuli responsive drug delivery systems based on nano-graphene for cancer therapy. **Advanced drug delivery reviews**, v. 105, p. 228-241, 2016.
- YI, X.-W. et al. T-carbon: Experiments, properties, potential applications and derivatives. **Nano today**, v. 42, n. 101346, p. 101346, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101346>.
- YURDAKAL, S. et al. (Photo)catalyst Characterization Techniques. **Heterogeneous Photocatalysis**. Elsevier, 2019. p. 87–152. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64015-4.00004-3>.
- ZAFAR, Hima et al. Comprehensive review on wearable sweat-glucose sensors for continuous glucose monitoring. **Sensors**, v. 22, n. 2, p. 638, 2022.
- ZERLOTTI, Lais Barbosa et al. Epidemiologia de exames e mortalidade presuntivos à infecção pelo papiloma vírus humano. **RBAC**, v. 50, n. 2, p. 124-9, 2018.

ZHANG, Chunli et al. Thickness-shear vibration of AT-cut quartz plates carrying finite-size particles with rotational degree of freedom and rotatory inertia [Correspondence]. **IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control**, v. 58, n. 3, p. 666-670, 2011.

ZHANG, F.-T. et al. Immobilization-free DNA-based homogeneous electrochemical biosensors. **Trends in analytical chemistry: TRAC**, v. 85, p. 17–32, 2016.

ZHANG, L. et al. Electrochemical biosensors represent promising detection tools in medical field. **Advanced Sensor and Energy Materials**, v. 2, n. 4, p. 100081, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.asems.2023.100081>

ZHAO, W.-W.; XU, J.-J.; CHEN, H.-Y. Photoelectrochemical enzymatic biosensors. **Biosensors & bioelectronics**, v. 92, p. 294–304, 2017. ISSN 0956-5663, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.009>.

ZHOU, Xingyu. Application of different methods for cervical cancer detection. **Transactions on Materials, Biotechnology and Life Sciences**, v. 3, p. 137-142, 2024.

ZOOROB, Roger et al. Cancer screening guidelines. **American family physician**, v. 63, n. 6, p. 1101-1113, 2001. PMID: 11277547.