



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

MATHEUS ROBERTO DA SILVA NEVES

**PLATAFORMA GENOSENSORA
IMPEDIMÉTRICA BASEADA EM FILME
DE POLITIOFENO PARA A DETECÇÃO
E DIFERENCIAÇÃO DE SUBTIPOS DO
HPV**

Recife
2022

MATHEUS ROBERTO DA SILVA NEVES

**PLATAFORMA GENOSENSORIA
IMPEDIMÉTRICA BASEADA EM FILME
DE POLITIOFENO PARA A DETECÇÃO
E DIFERENCIAÇÃO DE SUBTIPOS DE HPV**

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

Orientador: Profa. Maria Danielly Lima de Oliveira

Coorientador(a): Prof. César Augusto Souza de Andrade

Coorientador(a): Raiza Pereira Santos de Lucena

Recife
2022

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

Neves, Matheus .

Plataforma genossensora impedimétrica baseada em filme de politiofeno para a detecção e diferenciação de subtipos do HPV / Matheus Neves. - Recife, 2022.

52 folhas : il., tab.

Orientador(a): Maria Oliveira

Cooorientador(a): César Andrade

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2022.

1. genossensores. 2. Eletroquímica. 3. Papilomavírus Humano. 4. Impedância. 5. Microscopia de força atômica. I. Oliveira, Maria . (Orientação). II. Andrade, César . (Cooorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

MATHEUS ROBERTO DA SILVA NEVES

**PLATAFORMA GENOSENSORIA
IMPEDIMÉTRICA BASEADA EM FILME
DE POLITIOFENO PARA A DETECÇÃO
E DIFERENCIAÇÃO DE SUBTIPOS DE
HPV**

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

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr Maria Danielly Lima de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Bioquímica

MSc. Raiza Pereira Santos de Lucena
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Bioquímica

MSc. Léony Soares de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Bioquímica

Dedico este trabalho primeiramente à minha mãe, e às pessoas queridas que estiveram sempre ao meu lado durante este projeto.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos à minha orientadora, Professora Maria Danielly Lima de Oliveira, pela oportunidade e direcionamento para desenvolver e concluir esse projeto. Agradeço a Mestre Raiza Pereira Santos de Lucena por ter me acolhido e me auxiliado sempre durante esta trajetória. Agradeço à pró-reitoria de pesquisa e inovação e à agência de fomentos do conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico. Agradeço à coordenação e à secretaria do curso de Biomedicina pela boa administração do curso. Agradeço também ao departamento de Bioquímica e aos técnicos e funcionários presentes que permitiram o bom funcionamento do laboratório. Aos meus colegas de laboratório que contribuíram por meio do apoio e ensinamentos. Aos meus colegas de classe que me acompanharam nessa jornada e que pude compartilhar conhecimentos. Gostaria de agradecer também ao apoio e carinho da minha família e amigos, sem eles eu não teria chegado onde estou agora.

“Não há tal coisa como a perfeição. Este mundo não é perfeito e, por isso, ele é lindo.”

Fullmetal Alchemist

NEVES, Matheus Roberto da Silva. **Plataforma Genossensora Impedimétrica baseada em Filme de Politiofeno para a Detecção e Diferenciação de Subtipos do HPV**. 2022. 52 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

RESUMO

O Papiloma Vírus Humano (HPV) causa uma infecção sexualmente transmissível de alta prevalência no mundo, causando diversas lesões como a verruga comum e a verruga genital. O diagnóstico do HPV é baseado nos achados clínicos somado aos resultados laboratoriais, onde o principal teste laboratorial utilizado é o PCR. Mesmo sendo o padrão ouro na triagem do HPV, o PCR exige um alto custo e mão de obra especializada, além de um alto intervalo de tempo para aquisição do resultado. Desta forma, se faz necessário o desenvolvimento de métodos analíticos com potencial inovador que possibilitem o rápido diagnóstico com baixo limite de detecção, tais como os biossensores. No presente trabalho, foi desenvolvido um genossensor baseado em poli (ácido tiofeno3-acético) (PTAA) para a biodetecção de diferentes subtipos de HPV em amostras de cDNA de pacientes infectados com alto e baixo risco de desenvolvimento de câncer no colo do útero. O eletrodo de trabalho de ouro foi modificado através da polimerização do PTAA funcionalizado com grupos carboxílicos, após essa etapa, foi adsorvido duas sondas distintas para a detecção do HPV, a sonda p53 e a sonda MY11 com ativação por EDC/NHS. A capacidade sensora do biossensor foi avaliada por análises distintas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica para cada uma das sondas utilizadas, frente a amostras séricas contendo diferentes concentrações de HPV e do controle negativo. Em adição, foi realizada a caracterização topográfica das superfícies modificadas por meio da Microscopia de Força Atômica (AFM). A redução nas correntes de picos catódicas (ipc) e anódicas (ipa) foram observados à medida que o genossensor foi exposto às amostras contendo diferentes concentrações de HPV. O genossensor apresentou uma excelente capacidade sensorial, detectando baixas concentrações de HPV e distinguindo do controle negativo. As análises impedimétricas revelaram um aumento na resistência a transferência de carga (R_{ct}) diretamente proporcional ao processo de bioreconhecimento via hibridização a partir da interação do biorreceptor com a amostra de HPV com subtipos para baixo e alto risco oncogênico. Em adição, as imagens de AFM revelaram uma rugosidade heterogênea da superfície, característico do processo de interação molecular. Os resultados indicaram uma boa sensibilidade, especificidade e biocompatibilidade do genossensor, e a potencial utilização do PTAA como filme para a imobilização da sonda de estudo para HPV.

Palavras-chave: Biossensor. Papilomavírus. Eletroquímica. PTAA. Microscopia de força atômica.

NEVES, Matheus Roberto da Silva. **Polythiophene Film-Based Impedimetric Genosensor Platform for the Detection and Differentiation of HPV Subtypes.** 2022. 52 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Cidade, 2022.

ABSTRACT

The Human Papilloma Virus (HPV) causes a highly prevalent sexually transmitted infection worldwide, causing various lesions such as common warts and genital warts. The diagnosis of HPV is based on clinical findings added to laboratory results, where the main laboratory test used is PCR. Even though it is the gold standard in HPV screening, PCR has a high cost and specialized labor, in addition to a long time interval for acquiring the result. Thus, it is necessary to develop analytical methods with innovative potential that allow rapid diagnosis with a low detection limit, such as biosensors. In the present work, a genosensor based on poly (thiophene-3-acetic acid) (PTAA) was developed for the biodetection of different HPV subtypes in cDNA samples from infected patients with high and low risk of developing cervical cancer. The gold working electrode was modified through the polymerization of PTAA functionalized with carboxylic groups, after this step, two distinct probes were adsorbed for the detection of HPV, the p53 probe and the MY11 probe with activation by EDC/NHS. The sensor capacity of the biosystem was evaluated by different analyzes of cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy for each of the probes used, against the serum sample containing different concentrations of HPV and the negative control. In addition, the topographic characterization of the modified surfaces was performed using Atomic Force Microscopy (AFM). The reduction in cathodic (ipc) and anodic (ipa) peak currents was observed as the genosensor was exposed to samples containing different concentrations of HPV. The genosensor showed excellent sensory capacity, detecting low concentrations of HPV and distinguishing it from the negative control. Impedimetric analyzes revealed an increase in resistance to charge transfer (R_{ct}) directly proportional to the biorecognition process via hybridization from the interaction of the bioreceptor with an HPV sample with subtypes for low and high oncogenic risk. In addition, the AFM images revealed a heterogeneous surface roughness, characteristic of the molecular interaction process. The results indicated good sensitivity, specificity and biocompatibility of the genosensor, and a potential use of PTAA as a film for the immobilization of the HPV study probe.

Keywords: Biosensor. Papilomavirus. Electrochemistry. PTAA. Atomic force microscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Estrutura esquemática ampliada do vírus papiloma: externa e interna..	15
Figura 02 - Distribuição espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2023, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna do colo do útero).....	18
Figura 03 - Esquema representativo dos componentes de um biossensor.....	20
Figura 04 – Esquema representativo dos tipos de receptores para construção de biossensores.....	21
Figura 05 - Ilustração da estrutura química do tiofeno e politiofeno.....	24
Figura 06 – Esquema representativo de uma célula eletroquímica.....	25
Figura 07 – Esquema ilustrativo da voltametria cíclica.....	26
Figura 08 – Desenho esquemático da EIE.....	27
Figura 09 - Diagrama do modo de operação do AFM de modo não-contato.....	28
Figura 10 – Representação esquemática de montagem do genossensor.....	31
Figura 11 – Avaliação topográfica das etapas de montagem do sistema sensor e do bioreconhecimento: a- Filme de PTAA; b- PTAA-sonda MY11; c- PTAA-sonda MY11HPV18; d-PTAA-sonda MY11-HPV16; e- PTAA-sonda MY11-HPV6; f- PTAA-sonda MY11-HPV11.....	34
Figura 12 – Gráfico voltamétrico do processo de polimerização do PTAA.....	35
Figura 13 – Análises de VC e EIE do processo de hibridização da sonda p53 e amostra de cDNA do HPV.....	36
Figura 14 - Variação da resistência de transferência de carga relativa ($\Delta R_{CT}\%$) em função dos subtipos de HPV.....	38
Figura 15 - ΔR_{CT} do sistema genossensor PTAA-sondap53 das análises de diluição seriada de amostra de cDNA do HPV 33 nas concentrações de 1aM, 100aM, 100fM, 50pM e 100pM.....	39
Figura 16 – Avaliação topográfica das etapas de montagem do sistema sensor e do bioreconhecimento: a- Filme de PTAA; b- PTAA-sonda MY11; c- PTAA-sonda MY11-HPV18; d- PTAA-sonda MY11-HPV16; e- PTAA-sonda MY11-HPV6; f- PTAA-sonda MY11-HPV11.....	40
Figura 17 – Gráfico voltamétrico (11A) é gráfico de Nyquist (11B) do sistema genossensor PTAA-sonda das análises de diluição seriada de amostra de cDNA do HPV 6 nas concentrações de 1ag, 100ag, 100fg, 50pg e 100pg.....	42

Figura 18 – Gráfico de Nyquist do sistema genossensor PTAA-sonda das análises de diluição seriada em triplicata de amostra de cDNA do HPV 33 nas concentrações de 1ag, 100ag, 100fg, 50pg e 100pg.....	43
Figura 19 – Gráfico de calibração para os subtipos de HPV 16 (9a) e 33 (9b). As barras de erros são correspondentes ao desvio padrão realizado em triplicata.....	44
Figura 20 – ΔRCT obtido do sistema genossensor PTAA-sondaMY11 frente às amostras na concentração de 100 pg/mL-1 do controle negativo (<i>Candida albicans</i>), HPV16, MIX HPV 33 e HPV 33.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Montagem e bioatividade do sistema PTAA-Sonda frente aos analitos. Os valores dos elementos do circuito equivalente obtidos a partir dos resultados de impedância ajustados. Os resultados de desvio padrão foram obtidos de análises em triplicate.....46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	PAPILOMAVÍRUS HUMANO.....	15
2.1.1	Subdivisões do Papiloma Vírus Humano	16
2.1.2	Epidemiologia Atualizada do HPV.....	17
2.1.3	Métodos de Diagnóstico Atuais Para o HPV	18
2.2	NOVAS ESTRATÉGIAS DE DIAGNÓSTICO DE HPV POR BIOSENSORES.....	19
2.2.1	Classificação dos Biossensores.....	20
2.2.1.1	Imunossensor	22
2.2.1.2	Aptassensores	22
2.2.1.3	Genossensores.....	22
2.3	MATERIAIS PARA A COMPOSIÇÃO DO BIOSENSOR.....	Erro! Indicador não definido.
2.3.1	Polímeros Intrinsecamente condutores	23
2.3.2	Politiofeno	23
2.4	TÉCNICAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DO BIOSENSOR ELETROQUÍMICO.....	24
2.4.1	Voltametria cíclica	25
2.4.2	Espectroscopia de impedância eletroquímica	26
2.4.3	Microscopia de força atômica (AFM).....	28
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	OBJETIVO GERAL.....	29
3.1.1	Objetivos Específicos	29
4	METODOLOGIA	30
4.1	MATERIAIS	30
4.2	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO NANODISPOSITIVO.....	30
4.3	ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO PTAA.....	30
4.4	IMOBILIZAÇÃO E BIOATIVIDADE DAS SONDAS AMINADAS.....	31
4.5	DADOS ANALÍTICOS.....	31
4.6	CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA DO GENOSENSOR.....	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	DADOS ANALÍTICOS OBTIDOS POR MEIO DA SONDA P53.....	Erro! Indicador não definido.
5.1.1	Análises Topográficas Do Sistema Sensor PTAA-Sonda(p53)-HPV.....	33

5.1.2	Caracterização Do Processo De Polimerização.....	34
5.1.3	Caracterização do processo de montagem e biorreconhecimento do genossensor.....	35
5.1.4	Testagem De Múltiplas Análises De Diferentes Subtipos de HPV.....	36
5.1.5	Testagem De Concentrações Distintas Do Analito De Interesse.....	38
5.2	DADOS ANALÍTICOS OBTIDOS POR MEIO DA Sonda MY11	39
5.2.1	Análises Topográficas Do Sistema Sensor PTAA-Sonda(MY11)-HPV.....	39
5.2.2	Testagem Da Sensibilidade Da Sonda MY11 Frente ao HPV 6.....	40
5.2.3	Testagem De Concentrações Distintas Em Triplicata Dos Subtipos 16 e 33.....	42
5.2.4	Estudo Da Especificidade E Seletividade Do PTAA-sonda(MY11)-HPV.....	44
6	CONCLUSÃO	47
7	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

O câncer de colo de útero, também conhecido como cancro uterino, se refere a uma condição patológica neoplásica causada principalmente pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) (Kai et al., 2019; Magalhães et al., 2021). Pois os subtipos de alto risco do HPV são responsáveis pelo processo neoplásico maligno, principalmente em células escamosas das regiões da cérvix uterina e/ou endométrio, tendo em vista que aproximadamente 100% dos casos de câncer cervical em todo o mundo são positivos para DNA oncogênico do HPV (Kai et al., 2019; Magalhães et al., 2021).

Os métodos de diagnóstico atuais para o câncer de colo de útero versam sobre avaliação citológica ou inspeção visual. A princípio, é realizada uma anamnese com exames citológicos dirigidos principalmente aos fatores de risco e aos sinais e sintomas relacionados ao câncer, como o teste de Papanicolau. Em seguida, são realizados exames moleculares, que geralmente apresentam custo elevado e demanda de tempo para liberação dos resultados. Desta forma, estes métodos ou apresentam baixa especificidade ou são laboriosos e caros. Em relação ao desenvolvimento de métodos de diagnósticos inovadores, a biotecnologia oferece excelentes oportunidades para a concepção de biossensores ultra-sensíveis e bioensaios (Zhang *et al.*, 2008).

Na concepção de novos métodos de diagnóstico, os biossensores ganham destaque. Eles são dispositivos que utilizam um material de origem biológica acoplado a um transdutor sendo capaz de gerar um sinal mensurável. Neste grupo, o desenvolvimento de um genossensor impedimétrico para detecção do HPV conta com a capacidade de identificar o material genético do vírus de forma mais prática a partir de uma análise de impedância eletroquímica. Eles consistem em plataformas que servem de transdutor base para fixação da sonda genética, que irá interagir com o DNA complementar encontrado na amostra, possibilitando um rápido diagnóstico (Taha et al., 2020).

Polímeros condutores, como o poli (ácido tiofeno 3-acético), vêm sendo aplicados no desenvolvimento de biossensores, diante de suas propriedades, como estabilidade química, boa condutividade elétrica e biocompatibilidade (Nair et al.,

2019). Estes polímeros apresentam características estruturais químicas que favorecem as modificações covalentes essenciais para o desenvolvimento de dispositivos sensores. (Li et al, 2007; Wang et al., 2014).

Os métodos eletroanalíticos complementares, como a voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), são utilizados no desenvolvimento dos biossensores nanoestruturados para a obtenção de propriedades elétricas mensuráveis de biomoléculas. Além dessas técnicas, através da microscopia de força atômica (AFM) é possível obter imagens da superfície do eletrodo a cada camada adsorvida, visando sua caracterização estrutural e topográfica (Ferreira et al, 2006). Neste trabalho, há o destaque para os genossensores, que são úteis na avaliação de fragmentos de DNA oncogênico do HPV. Desse modo, a alta sensibilidade e o baixo custo dos biossensores torna possível realizar um diagnóstico preciso dos estágios primários da infecção (Mahmood et al., 2020).

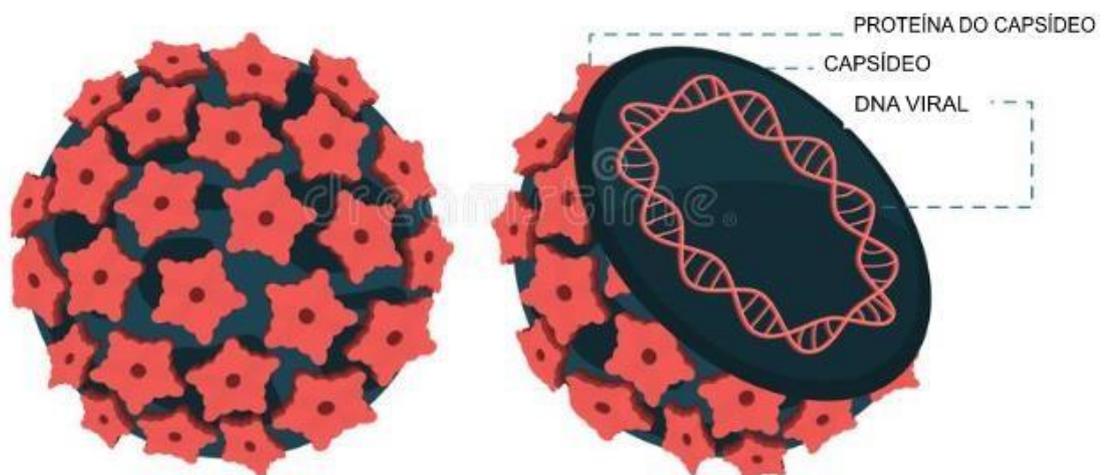
Assim, a associação da nanomateriais e técnicas eletroquímicas de análises são essenciais para o desenvolvimento de novos sistemas sensores. Neste trabalho, foi desenvolvido um biodispositivo com filmes de poli (ácido tiofeno 3-acético) e sondas *MY11* e *p53*. Tendo como objetivo detectar e identificar, respectivamente, amostras de plasmídeos e cDNA de HPV de maneira rápida, simples e precisa, garantindo o diagnóstico precoce desta doença.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PAPILOMAVÍRUS HUMANO

O Papiloma Vírus Humano (HPV) é um vírus com mais de 400 tipos distintos já registrados, com cerca de 200 tipos com capacidade de infectar o ser humano. O HPV pertence à família Papillomaviridae, possui um comprimento de aproximadamente 55 nm de diâmetro e apresenta uma cápsula proteica que contém seu DNA circular de dupla hélice (Figura 1). Seu genoma é dividido nas regiões distal (L), proximal (E) e a não codificante (NCR). A região L é responsável por codificar e sintetizar as proteínas da estrutura do vírus por meio dos genes L1, L2, enquanto que a região E está envolvida na replicação viral e controle de transcrição por meio dos genes E1 e E2. Os principais genes responsáveis pela atividade oncogênica do vírus são os E5, E6 e E7 (Magalhães et al., 2021). E apesar de não apresentar atividade codificante, a região NCR apresenta a maioria dos elementos reguladores responsáveis pela replicação do DNA viral (Araldi et al., 2017).

Figura 01 - Estrutura esquemática ampliada do vírus papiloma: externa e interna.



Fonte: Thumbs dreamstime, Adaptado. (acessado em: novembro de 2021).

Cerca de 1% das lesões provocadas pelos subtipos de HPV de alto risco levam ao desenvolvimento de tumores invasivos (Da Silva et al., 2020). Grande parte dos sistemas imunológicos da população é capaz de eliminar o vírus e evitar a infecção naturalmente, todavia, quando a infecção persiste por uma falha do sistema imunológico, o vírus se torna capaz de se infectar e se proliferar no organismo do hospedeiro (Sendagorda et al., 2019). Desse modo, o HPV provoca falhas no crescimento celular, o que leva ao desenvolvimento de lesões e do possível crescimento tumoral (Szymonowicz et al., 2020). A infecção do vírus no ser humano é caracterizada clinicamente por lesões visíveis na pele ou mucosas, como também podem estar presentes subclínicamente devido a uma infecção adquirida na infância.

A transmissão do HPV ocorre através do contato físico, comumente por meio do ato sexual devido à entrada do vírus por meio das microlesões formadas durante o ato, como também pode ser transmitido pelo compartilhamento de utensílios contaminados e entre mãe e filho durante o parto (Araldi et al., 2018). Atualmente, ainda não existe um tratamento definitivo para o HPV, desse modo, o meio de prevenção mais eficaz contra essa infecção é a vacinação. (Soheili et al., 2021).

2.1.1 Subdivisões do Papiloma Vírus Humano

O HPV é subdividido em diferentes grupos de baixo e alto risco de acordo com sua virulência e atividade oncogênica. Essa divisão ocorreu ao longo da evolução do papilomavírus, no qual mutações polimórficas ocasionaram diferentes variações nas regiões proximais e distais do gene do HPV, levando a diferentes características filogenéticas do vírus, o que proporcionou diferenças em sua virulência (Chan et al., 2019). O grupo de baixo risco corresponde aos subtipos de HPV 6, 11, 53, 66, 70, 73 e 82. Enquanto que, o grupo de alto risco corresponde aos subtipos 16, 18, 31, 33, 35, 51, 52, 56, 58, 59 e 68. Os subtipos de alto risco são responsáveis pelo processo neoplásico maligno da região anogenital, com o envolvimento de praticamente 100% dos casos de câncer de células escamosas do colo do útero, de 85% dos tumores anais e de 50% dos tumores penianos e vulvares (Magalhães et al., 2021).

Ademais, entre os subtipos de alto risco existentes do vírus, os subtipos 16 e 18 são os que apresentam a maior capacidade oncogênica, devido a maior atividade oncogênica de suas proteínas E5, E6 e E7. A proteína E5 atua na evasão imune do

vírus e também aumentando o pH endossomal por meio da interação com a prótonATPase vacuolar, impedindo a degradação do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGF), o que propicia o aumento dos estímulos de crescimentos ocasionados por esse hormônio. Além disso, a oncoproteína E6 tem a capacidade de aumentar o crescimento celular tumoral principalmente por meio da redução dos níveis da proteína supressora de tumor p53 através de sua regulação negativa e degradação por ubiquitinação. Outrossim, a proteína E6 também induz a elevação na atividade do gene transcriptase reversa da telomerase humana por meio do aumento de sua expressão gênica, e, desse modo, em conjunto a outras alterações genéticas, causam a imortalização das células tumorais. E a oncoproteína E7 atua em conjunto com a E6 provocando mutações e instabilidade genômica, além da sua capacidade inibitória da proteína supressora de tumor pRb, resultando no aumento da atividade do fator de crescimento E2F (Araldi et al., 2018; Gupta et al., 2018).

2.1.2 Epidemiologia Atualizada do HPV

O papilomavírus humano é responsável pela infecção sexualmente transmissível mais comum no mundo, ficando acima de infecções por herpes e vírus da imunodeficiência humana (Wendland et al., 2020), com a estimativa global de risco de infecção pelo HPV é de 15% a 25% para cada novo parceiro sexual (Carvalho et al., 2021). O câncer cervical causado pela infecção dos subtipos de alto risco do vírus também possui um alto impacto no mundo, com uma estimativa média anual de 230.000 mortes, principalmente em países em desenvolvimento (Manini et al., 2018). Ademais, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2020, mais de 500 mil mulheres foram diagnosticadas com esse câncer de colo de útero e aproximadamente 342 mil vieram ao óbito.

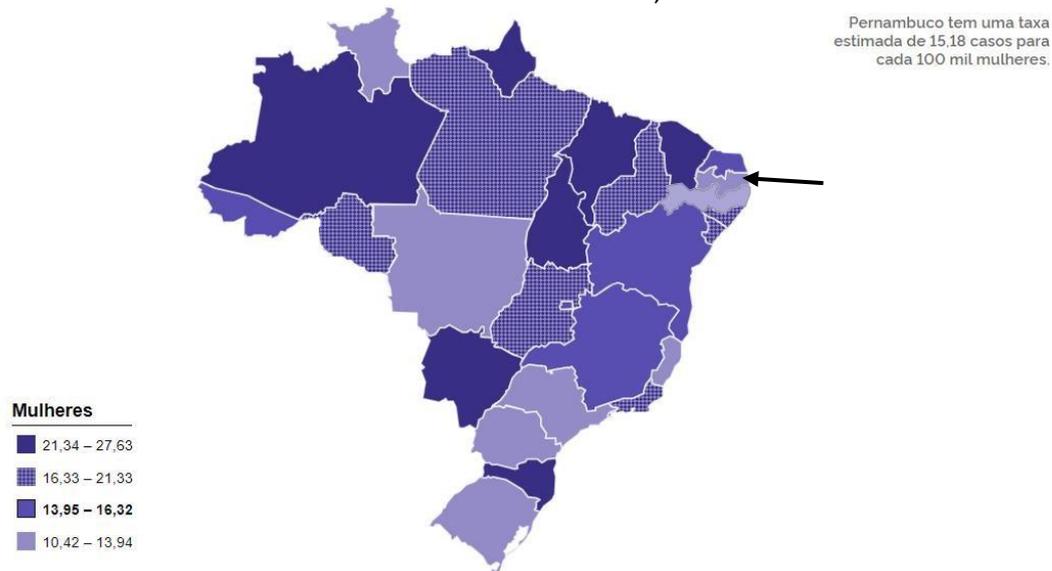
No Brasil, o HPV apresenta uma taxa de infecção variável em relação ao sítio de infecção, devido ao tamanho e diversidade socioeconômica do país, com uma maior prevalência de 36.21% na região peniana e com taxas de 25.68% na região anal, 25.41% na região cervical e 11.43% na região oral (Colpani et al., 2020).

Ademais, de acordo com Instituto Nacional do Câncer (Inca), no Brasil, esse tipo de câncer possui também um impacto significativo para a saúde pública, pois apresenta a taxa de mortalidade ajustada pela população mundial de 4,60 óbitos/100

mil mulheres, em 2020. Na região nordeste, o câncer de colo de útero apresenta um impacto ainda maior, com taxa de mortalidade de 5,58/100 mil mulheres, ocupando o terceiro lugar no Brasil em relação ao número de mulheres mortas por câncer de colo de útero (INCA, 2020).

Em Pernambuco, o carcinoma de colo uterino também possui valores expressivos, estando em quarto lugar no Nordeste na incidência de novos casos para o ano de 2022, com uma estimativa de novos casos de 730/100 mil mulheres (INCA, 2019). Ademais, o estudo epidemiológico de Cavalcanti (2022) também confirma esses dados em Pernambuco e suas Macrorregiões, demonstrando altas taxas de mortalidade de 2.989 óbitos em mulheres no período entre 2010 e 2019.

Figura 02 - Distribuição espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2023, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna do colo do útero).



Fonte: INCA, 2022.

2.1.3 Métodos de Diagnóstico Atuais Para o HPV

A forma de diagnóstico atual da infecção pelo HPV é realizada prioritariamente por meio da anamnese e do exame clínico do paciente nos casos da presença de condiloma (verrugas anogenitais). Após isso, para os casos de pacientes do sexo feminino em que se tenha suspeita do desenvolvimento do tumor cervical, é necessário que seja realizado também o exame citológico por meio da análise de alterações de esfregaços cervicais, denominado teste de Papanicolau,

para avaliar os fatores de risco relacionados ao câncer. Todavia, devido às limitações por ser apenas um teste morfológico, tem-se a necessidade de realizar exames moleculares para a confirmação do subtipo do HPV para o diagnóstico, e desse modo, direcionar o analista para o diagnóstico correto (Carvalho et al., 2021).

Entre esses exames, destacam-se a captura híbrida, uma técnica simples, rápida e de baixo custo, todavia, é incapaz de distinguir o DNA especificamente os tipos virais de alto risco, além de não ser capaz de detectar de forma adequada a presença do HPV no início da infecção. E a reação da polimerase em cadeia (PCR), sendo o padrão ouro para o diagnóstico do HPV, tem elevada sensibilidade e especificidade na identificação do DNA do HPV. A técnica de PCR é baseada inicialmente na extração do material genético, adicionando logo após uma mistura contendo desoxirribonucleotídeos trifosfatos, os primers, DNA polimerase e tampão. Toda essa mistura é colocada em um termociclador, onde ocorrem as etapas de desnaturação, anelamento e extensão, para que o resultado seja analisado através de uma eletroforese em gel de agarose ou de poliacrilamida. Todavia, apresenta custo elevado devido aos equipamentos sofisticados e mão de obra especializada para evitar possíveis erros técnicos e analíticos. (Fonseca et al., 2016).

2.2 NOVAS ESTRATÉGIAS DE DIAGNÓSTICO DE HPV POR BIOCENSORES

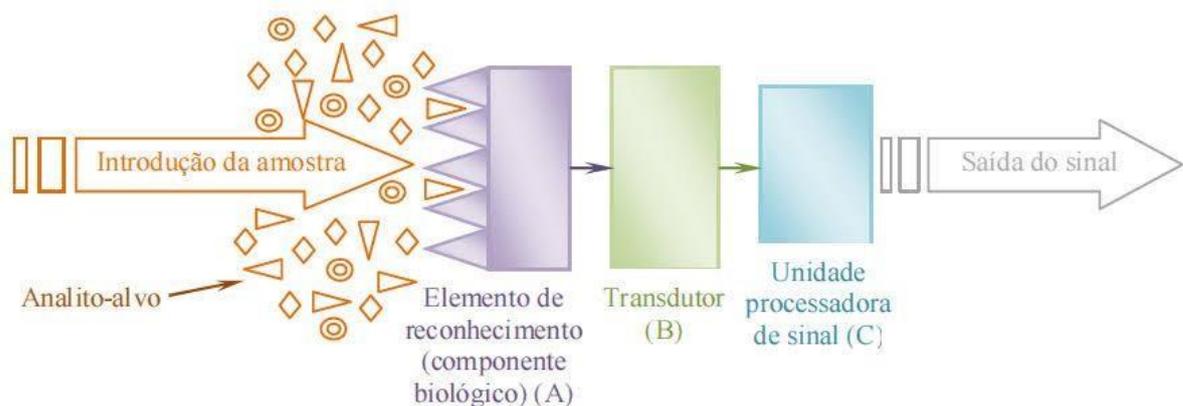
Os métodos de diagnóstico atuais para o diagnóstico específico do HPV demandam tempo de análise e custo elevado. A partir disso, torna-se perceptível a necessidade do desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico para o papilomavírus. Nesse sentido, os biossensores nanoestruturados são uma alternativa promissora para desempenhar esse papel, pois os biossensores direcionados para o HPV detectam fragmentos de DNA oncogênico do vírus e os genes supressores de tumor alvo desse vírus, desse modo, garantindo uma alta sensibilidade e especificidade ao método, que em conjunto ao seu baixo custo, torna possível realizar um diagnóstico preciso dos estágios primários da infecção, e, dessa forma, contribuindo para o tratamento mais eficiente do paciente (Avelino et al., 2020; Mahmood et al., 2020).

De modo geral, os biossensores são dispositivos capazes de obter propriedades elétricas mensuráveis de biomoléculas de interesse clínico por meio de mudanças bioquímicas e fisiológicas, o que garante alta sensibilidade e

especificidade ao método. Ademais, o biossensor é um método de análise difundido na pesquisa atualmente, devido a sua variedade de uso, incluindo pesquisas recentes do seu uso para a detecção do coronavírus, como possível forma de diagnóstico da Síndrome Respiratória Aguda Grave por coronavírus (SARS-CoV) (Taha et al., 2020).

Os biossensores são dispositivos de ampla utilidade devido a sua rapidez, praticidade e ao seu baixo custo, incluindo também seu potencial de detectar simultaneamente diferentes biomoléculas em uma única análise (Jayanthi et al., 2017; Fan et al., 2020). Esses sensores nanoestruturados são compostos basicamente por um biorreceptor responsável reconhecer e ligar-se especificamente ao analito; uma superfície capaz de receber o sinal gerado pela interação dos componentes funcionalizados em sua estrutura com o analito; um transdutor que tem a função de converter a reação bioquímica em um sinal mensurável; e uma parte eletrônica ou um software responsável por preparar o sinal recebido (Figura 03), amplificando para um formato digital que será interpretado pelo analista (Taha et al., 2020).

Figura 03 - Esquema representativo dos componentes de um biossensor.



Fonte: Calil et al. 2014.

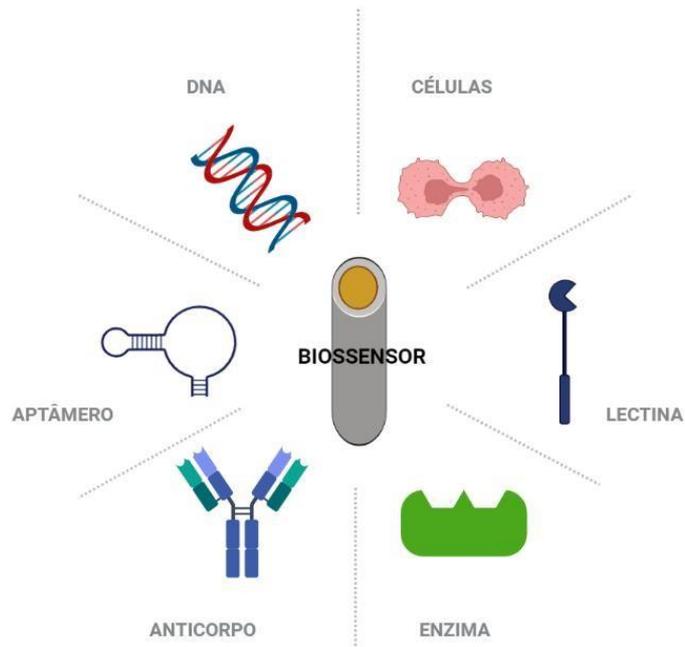
2.2.1 Classificação dos Biossensores

Os biossensores podem ser subdivididos pelo transdutor, que realiza sua função de converter o sinal bioquímico em um sinal mensurável tal como alterações de carga e/ou massa, luz, calor e entre outras mudanças detectadas pelo sensor de

forma diretamente proporcional à quantidade de interações entre o analito e o bioreceptor.

Os transdutores podem ser classificados, de forma geral, de acordo com sua forma de conversão, como em óptico, piezoelétrico, calorimétrico e eletroquímico (Calil et al., 2021). Outrossim, entre esses tipos de transdutores, os eletroquímicos são os que mais se destacam, devido ao seu custo-benefício e a maior susceptibilidade em miniaturizar a estrutura do biossensor (Blair et al., 2019; Mahmoodi et al., 2020). Os Biossensores também são divididos de acordo com o bioreceptor específico para as diversas possibilidades de analitos que podem ser detectadas, demonstrados na Figura 04.

Figura 04 - Esquema representativo dos tipos de receptores para construção de biossensores.



Fonte: Próprio autor (2022).

Essa característica permite que seu uso se adeque ao tipo de resposta desejada pelo analista, o que traz a essa tecnologia grande interesse científico e do mercado industrial (Bhalla et al., 2016). Desse modo, serão descritos os tipos de biossensores de acordo com as possíveis biomoléculas utilizadas como biorreceptores:

2.2.1.1 Imunossensor

É atribuída essa classificação ao biossensor que utiliza os anticorpos como biomolécula, no qual a forma de detecção se encontra na formação de um imunocomplexo entre o biorreceptor e o analito, que nesse caso é o antígeno alvo. (Liu, D. *et al.*, 2020). Ademais, esse tipo de reconhecimento específico antígenoanticorpo garante uma excelente sensibilidade e especificidade ao método, que em conjunto a sua praticidade causada pela ausência da necessidade de purificar a amostra e da grande variedade de anticorpos disponíveis, o torna uma excelente ferramenta de pesquisa e diagnóstico (Evtugyn *et al.*, 2018).

2.2.1.2 Aptassensores

Outrossim, os aptassensores utilizam os aptâmeros como biorreceptor, que são compostos de fitas curtas de nucleotídeos de DNA produzidos sinteticamente, porém ao contrário da sonda utilizada nos genossensores, os aptâmeros têm sua estrutura semelhante anticorpos, com a capacidade de identificar e interagir com diversos tipos de proteínas. Os aptâmeros apresentam vantagem na detecção de múltiplos alvos em relação aos métodos que utilizam os anticorpos tradicionais, pois não apresentam a reação cruzada que pode ocorrer entre esses anticorpos, o que permite o uso dessas biomoléculas para o desenvolvimento de biossensores multiplexados (Calil et al., 2021; Fan et al., 2020).

2.2.1.3 Genossensores

Os genossensores apresentam uma elevada sensibilidade e especificidade devido à base de sua detecção basear-se na ligação por complementaridade entre a sonda primer utilizada em relação ao fragmento de DNA/RNA de interesse, processo

esse conhecido como hibridização (Chauhan *et al.*, 2016). Esse tipo de estudo é de grande utilidade na saúde para a pesquisa do material genético de vírus, bactérias e outros organismos infecciosos, como também se tem grande utilidade para a pesquisa do DNA oncogênico de células neoplásicas ou de mutações no material genético de modo geral (Civit *et al.*, 2012; Butterworth *et al.*, 2019; Mahmoodi *et al.*, 2020).

2.3 MATERIAIS PARA A COMPOSIÇÃO DO BIOSENSOR

O desenvolvimento de plataformas biossensoras necessita de polímeros ou nanomateriais que auxiliem a imobilização de biomoléculas da superfície do eletrodo de trabalho e na captação de sinal elétrico. Desse modo, é imprescindível a escolha e manuseio adequado da plataforma e de sua funcionalização ideal para garantir uma interação estável e eficiente entre essas moléculas (Ganji, 2009).

2.3.1 Polímeros Intrinsecamente condutores

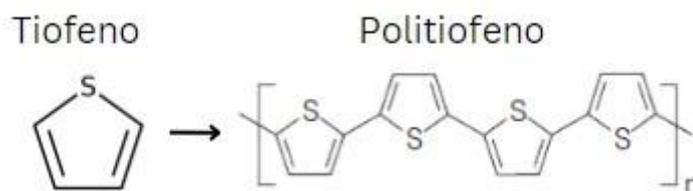
Os polímeros condutores, tal como polianilina, politiofeno e polipirrol, têm sido amplamente empregados como matrizes de imobilização em pesquisas de biossensores devido às suas excelentes características intrínsecas, como alta, facilidade de seu manuseio e boa estabilidade térmica e química (Wen *et al.*, 2012; Aydin *et al.*, 2020). Ademais, outra característica importante desses nanomateriais é a capacidade de imobilizar grupos funcionais como ácido carboxílico, amino, epóxi e tiol aos grupos laterais de polímeros condutores, o que permite conjugar o filme do polímero com as demais estruturas do biossensor por meio de ligações fortes, e, dessa forma, sendo de grande utilidade como um microambiente adequado para biomoléculas e alta superfície condutora para transferência de elétrons (Aydin *et al.*, 2020).

2.3.2 Politiofeno

Além de suas características intrínsecas de um polímero condutor, o politiofeno apresenta baixo custo e uma versatilidade estrutural que proporcionam o seu uso em distintos campos, como na bioeletrônica e biotecnologia (Aydin *et al.*,

2020). Ademais, o politiofeno também é um dos principais polímeros que tem sido utilizado como no campo de biossensor para imobilizar biomarcadores de modo geral, como enzimas e fragmentos de DNA (Le Floch et al., 2005; Nandini et al., 2014). Portanto, o filme eletrodepositado de politiofeno (Figura 05) apresenta propriedades físico-químicas essenciais para o desenvolvimento de genossensores. (Wen et al., 2012; Voccia et al., 2017; Aydın et al., 2020).

Figura 05 - Ilustração da estrutura química do tiofeno e politiofeno.



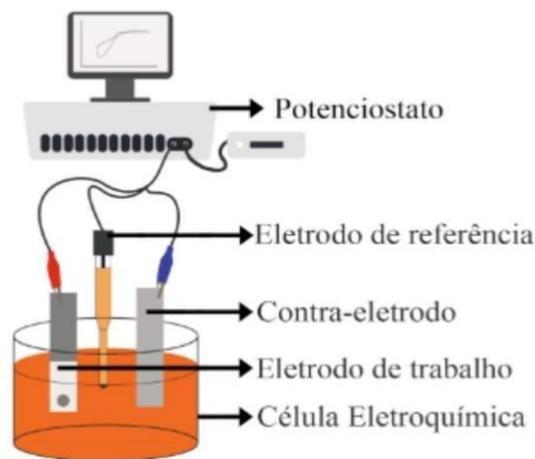
Fonte: Próprio autor (2022).

2.4 TÉCNICAS PARA CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO

Para o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico, é necessário o uso de técnicas que executam a avaliação da montagem da nanoestrutura neste, como também o uso de métodos que validem os resultados por meio da comparação dos resultados experimentais obtidos com os teóricos esperados. Entre as técnicas utilizadas para a realização dos experimentos, os métodos eletroanalíticos de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) são os mais amplamente utilizados, devido a sua ampla gama de utilidades e dados experimentais obtidos por meio dessas técnicas. (Stupin et al., 2021).

Vale ressaltar que o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico é feito por meio do uso de uma célula eletroquímica, assim como demonstrada na figura 06. Nesse sentido, a célula eletroquímica é composta basicamente pelo eletrodo de trabalho, onde é montado o biossensor; pelo eletrodo de referência que é responsável por gerar uma diferença de potencial em conjunto ao eletrodo de trabalho; e pelo eletrodo auxiliar, que tem como função receber a corrente gerada em conjunto ao eletrodo de trabalho, e, desse modo, evitando que ocorram interferências na corrente constante do eletrodo de referência (Pacheco et al., 2013).

Figura 06 - Esquema representativo de uma célula eletroquímica.



Fonte: Holzmann, 2020

2.4.1 Voltametria cíclica

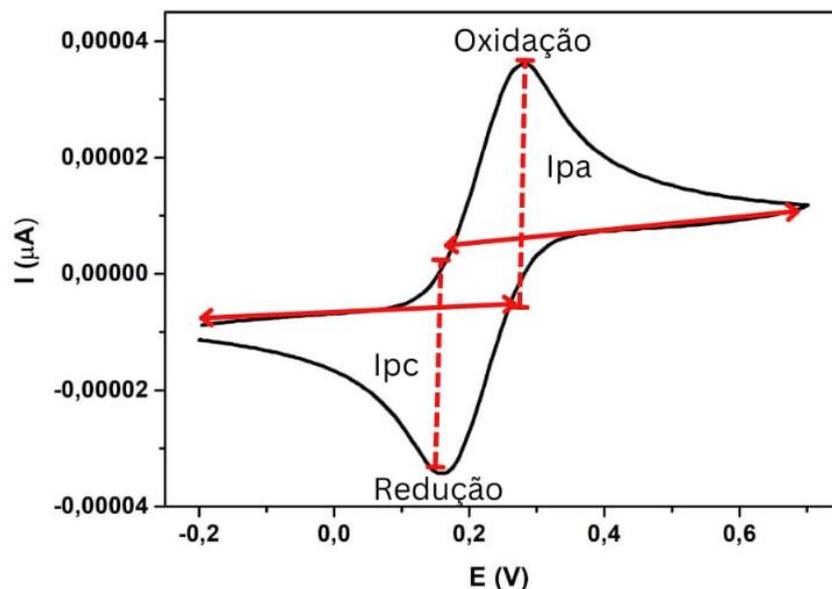
A voltametria cíclica é um método analítico comumente utilizado para a caracterização de experimentos eletroquímicos. O princípio de funcionamento dessa técnica baseia-se na aplicação de uma diferença de potencial (ddp), gerando uma reação eletroquímica reversível entre a superfície do biossensor e a solução eletrolítica, que se inicia através da redução do composto (sonda redox) por meio da aplicação de um potencial para regiões mais positivas (anódica), gerando um pico de corrente proporcional à concentração desse composto.

Após esta etapa ter atingido seu pico máximo, no qual nenhuma reação de oxidação ocorra, o potencial então é aplicado no sentido inverso da reação inicial, em que os produtos gerados do processo de oxidação inicial serão reduzidos,

gerando um pico catódico inverso e simétrico ao anódico, formando o gráfico de voltametria cíclica (Figura 7). (Grieshaber *et al.*, 2008).

Ademais, o gráfico voltamétrico gerado apresenta configurações diferentes de acordo com o tipo de material e solução eletroanalítica utilizada, o que garante respostas únicas e específicas de cada analito estudado, tornando essa técnica muito útil para a pesquisa da termodinâmica das reações químicas oriundas da transferência de massa e de carga entre o analito e a superfície do eletrodo (Pacheco *et al.*, 2013; Magar *et al.*, 2021).

Figura 07 - Esquema representativo de um voltamograma, destacando pontos de oxidação e redução formados durante a passagem da corrente.



Fonte: Próprio autor (2022).

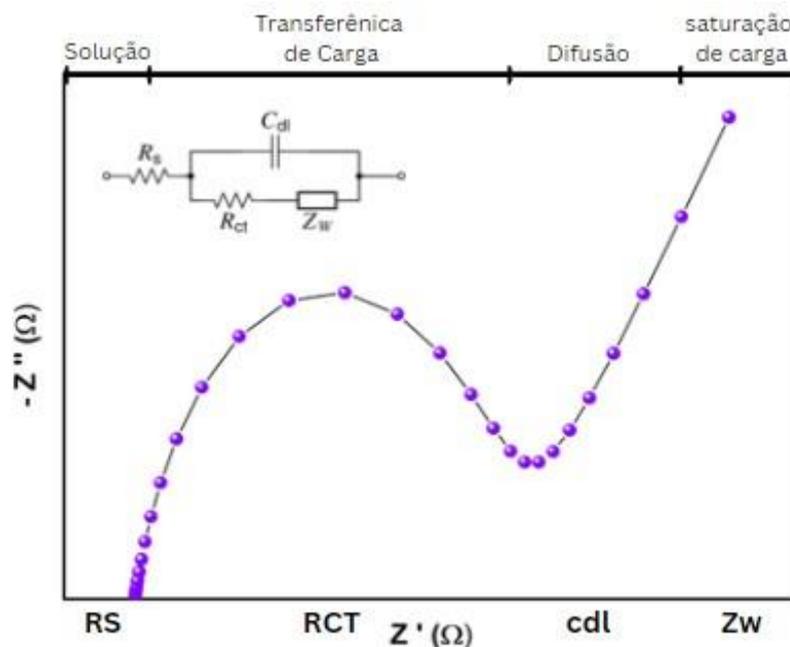
2.4.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A técnica de EIE é um dos métodos eletroanalíticos mais importantes devido a algumas vantagens em relação aos outros testes. Entre essas vantagens, podemos citar a sua forma de análise, que se baseia no princípio de aplicar uma onda de potencial alternada de pequena amplitude através de uma ampla faixa de

frequência, captando as ondas resultantes da passagem de corrente elétrica, que são visualizadas por meio desse bloqueio parcial da transferência de carga ocasionado pela presença do biossensor e das moléculas de interesse (Ribeiro et al., 2015; Aydin et al., 2020; Stupin et al., 2021).

Esses resultados experimentais obtidos são visualizados por meio do gráfico de Nyquist (Figura 8), que é caracterizado pelo eixo X, que representa a parte real da impedância, e o eixo Y representando a parte imaginária/teórica. Outrossim, o gráfico de Nyquist também é um fator determinante para o estudo comparativo com um circuito equivalente, que é ajustado de acordo com o tipo de gráfico obtido, que pode variar de acordo com a composição da superfície do eletrodo de trabalho e da reação eletroquímica obtida (Magar et al., 2021).

Figura 08 - Circuito equivalente do tipo Randles (inserido) e sua resposta idealizada na EIE. As descrições dos componentes estão no texto.



Fonte: Próprio autor, 2022.

Entre os circuitos equivalentes desenvolvidos, o circuito equivalente de Randles é um dos comumente utilizados para o estudo de biossensores nanoestruturados, devido aos valores do circuito apresentar resultados teóricos semelhantes aos obtidos experimentalmente, permitindo a confirmação teórica de forma prática e confiável (Carvalho, De et al., 2006; Ribeiro et al., 2015; Stupin et al., 2021).

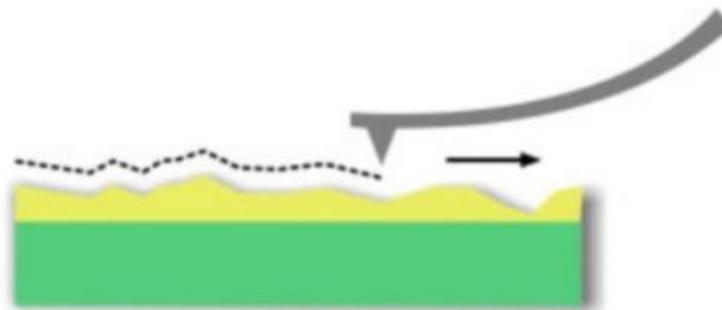
O circuito de Randles é caracterizado pelos seguintes componentes: resistência da solução (R_s), capacitância de dupla camada na superfície do eletrodo (C_{dl}), resistência à transferência de carga (R_{CT}) e impedância de Warburg (Z_W), que ocorre devido ao processo de difusão entre o eletrodo e o eletrólito (Ribeiro et al., 2015; Teixeira et al., 2014; Magar et al., 2021).

2.4.3 Microscopia de força atômica (AFM)

O AFM é uma técnica com diversas aplicações que pode ser utilizada para realizar as análises topográficas da superfície e do processo de montagem e bioreconhecimento do biossensor. E para o estudo da superfície do eletrodo, é comumente utilizado o AFM de modo não-contato, no intuito de se ter nenhuma perturbação ou arraste do nanomaterial presente no biossensor (Figura 9). Essas imagens tridimensionais em alta resolução são obtidas através do mapeamento da superfície do biossensor.

Esse processo é feito comumente em uma superfície que mimetiza um biossensor e seu biorreconhecimento por meio de uma sonda composta de uma ponteira piramidal fina que interage com a superfície a nível atômico, processo esse denominado de deflexão, que acarreta em diferentes variações topográficas na medida em que interage com estruturas e materiais distintos. Outrossim, essa ponteira é conectada a um cantilever que é responsável por receber e traduzir as informações produzidas (Ferreira et al., 2006).

Figura 9 - Diagrama do modo de operação do AFM de modo não-contato.



Fonte: Liu SY, 2010.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um nanodispositivo genossensor baseado em filmes finos de poli (ácido tiofeno-3-acético)(PTAA) para a detecção de papilomavírus humano.

3.1.1 Objetivos Específicos

- Realizar a eletrodeposição de filmes de poli (ácido tiofeno 3-acético) sobre a superfície de eletrodo de ouro;
- Confeccionar e avaliar as características elétricas de filmes nanoestruturados formados por poli (ácido tiofeno 3-acético) sobre superfície de eletrodo de ouro;
- Estudo voltamétrico e impedimétrico de filme fino composto por PTAA;
- Obtenção dos diagramas de Nyquist com diferentes concentrações da sonda de HPV sobre o filme de PTAA através de espectroscopia de impedância eletroquímica;
- Avaliar a termodinâmica de interação PTAA-sonda;
- Determinar o circuito equivalente para os sistemas analisados por meio da avaliação do comportamento interfacial da capacitância da dupla camada elétrica, resistência de transferência de carga e resistência de Warburg;
- Avaliação morfológica através de microscopia de força atômica;
- Avaliar a performance do genossensor frente a amostras contendo diversas concentrações de papiloma vírus humano (HPV), através de voltametria cíclica e impedância eletroquímica.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

O ácido 3-tiofeno acético (TAA), 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) foram adquiridos da SigmaAldrich. As demais soluções, como Tampão PBS, ferrocianeto de potássio ($K_4 [Fe (CN) 6]$) e ferricianeto de potássio ($K_3 [Fe(CN)_6]$), as sondas MY11 e p53, as amostras de plasmídeos e cDNA de HPV, foram preparadas com água ultrapura (Milli-Q). Para o processo de montagem da plataforma genossensora, foi utilizado poli (ácido tiofeno-3-acético) como superfície para adesão da sonda de estudo.

4.2 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO NANODISPOSITIVO

A análise eletroquímica foi realizada através de um potenciostato/galvanostato PGSTAT 302N, utilizando uma célula eletroquímica composta por 3 eletrodos, sendo um contra eletrodo de platina, um eletrodo de referência Ag/AgCl e um eletrodo de trabalho de disco de ouro. Como sonda redox, foi utilizado uma solução de 20 mL de $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ (1:1). As análises de voltametria cíclica (VC) foram realizadas a um potencial de varredura fixo de -0,2 a 0,7 V. A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foi obtida numa faixa de frequência entre 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV.

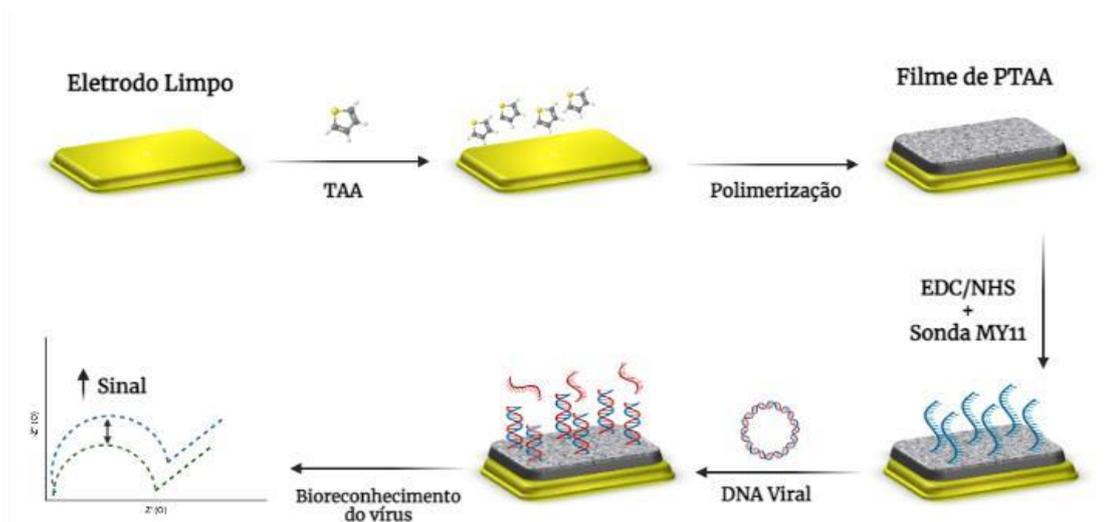
4.3 EletropOLIMERIZAÇÃO DO PTAA

Assim como demonstrado no esquema do processo de montagem do genossensor (Figura 10). Inicialmente, foi preparado 20 mL de uma solução 0,1 M de ácido 3-tiofeno acético (TAA) em HCl (0,1 M), para realização do processo de polimerização do monômero TAA em um filme poli (ácido tiofeno-3-acético) (PTAA).

A síntese foi realizada na célula eletroquímica composta por três eletrodos convencionais imersos em uma solução de TAA (0,5 M) dissolvida em 20 mL de HCl (0,1 M). O filme de PTAA foi preparado por polimerização potenciostática pela

técnica de voltametria cíclica (VC) na superfície do eletrodo de ouro, posicionado paralelamente ao eletrodo de referência e ao contra-eletrodo em uma faixa de potencial de -0,2 a +1,5 V com uma velocidade de varredura de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Figura 10 - Representação esquemática de montagem do genossensor.



Fonte:

Próprio autor.

4.4 IMOBILIZAÇÃO E BIOATIVIDADE DA SONDAS Aminadas

Após o processo de polimerização do PTAA, foram aplicados $4\mu\text{L}$ da solução de EDC/NHS (1:1) sobre a camada de PTAA presente na superfície do eletrodo para ativar os seus grupos carboxílicos por um período de incubação de 10 minutos. Em seguida, foi gotejado $2\mu\text{L}$ da solução da sonda aminada sobre o eletrodo modificado que é ativado pelo EDC/NHS, que permaneceu incubado por 30 minutos para que ocorra a imobilização covalente da sonda. Foram feitas as análises das amostras de cDNA utilizando dois biorreceptores distintos, a sonda aminada p53 e a sonda aminada MY11. Após ocorrido as ligações da sonda com o PTAA, o sistema genossensor foi avaliado frente às amostras de cDNA de diferentes subtipos de HPV, por um período de incubação de 30 minutos.

4.5 DADOS ANALÍTICOS

Os gráficos de impedância eletroquímica (diagramas de Nyquist) foram obtidos pelo software NOVA 1.11, e foram submetidos à análise de dados através do programa EQUIVCRT (Andrade et al., 2011). Os dados experimentais foram analisados por meio do circuito de Randles e pelo estudo comparativo do ΔRCT , que foram feitos por meio do software origin 7.0 para confecção dos gráficos e obtenção de dados matemáticos referentes às etapas de montagem a bioatividade do genossensor.

4.6 CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA DO GENOSENSOR

O equipamento utilizado para realizar as medições topográficas foi o Microscópio de força atômica 9700 (Shimadzu, Japão). As imagens de AFM foram adquiridas através de um cantilever de silício revestido de alumínio com uma frequência de ressonância de 75 kHz e uma constante de força de 3 N.m⁻¹ (Multi 75AL, NCHR) em um modo sem contato. A resolução lateral foi definida para 512 × 512 pixels em uma área de digitalização de 5 × 5 μm. Além disso, as imagens foram processadas e analisadas usando o software Gwyddion.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DADOS ANALÍTICOS OBTIDOS POR MEIO DA SONDA P53

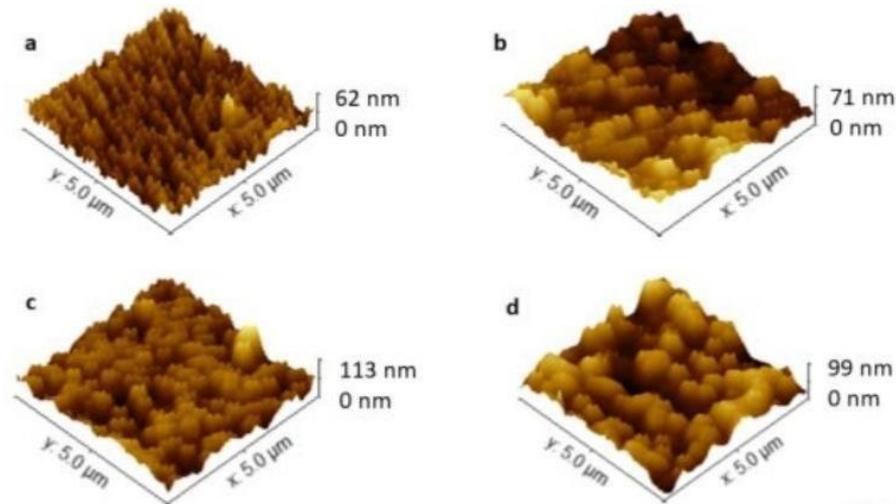
5.1.1 Análises Topográficas Do Sistema Sensor PTAA-Sonda(p53)-HPV.

Para a confirmação da aderência dos componentes do biodispositivo e do seu biorreconhecimento, foram feitas análises topográficas das modificações de uma superfície que mimetiza um eletrodo de trabalho ao longo do desenvolvimento do genossensor, que foram realizadas por meio do AFM (Fig. 11). Para isso, o sistema sensor PTAA-Sonda(p53)-HPV foi exposto frente a subtipos de HPV de alto e baixo risco oncogênico, para avaliar as alterações da altura máxima e da rugosidade de cada etapa.

Após o processo de polimerização, é possível visualizar que houve a formação e eletrodeposição do filme do politiofeno, já que houve um aumento da altura média de 62 nm entre a superfície e o PTAA formado. A superfície contendo a sonda p53 revelou uma altura média de 71 nm e com rugosidade de característica heterogênea. Destaca-se que as superfícies contendo as amostras de cDNA para HPV 18 e 11 revelaram um aumento da altura média e rugosidade média distintas com alturas de 113 nm e 99 nm respectivamente (Fig. 11c e Fig. 11d).

Por meio dessa diferença na morfologia e altura da superfície do eletrodo, é possível perceber que o genossensor foi capaz de detectar e distinguir diferentes subtipos de HPV de acordo com sua virulência, já que houve uma maior interação com o subtipo de HPV 18 considerado de alto risco, assim como outros estudos que demonstraram a presença do biorreconhecimento do analito da superfície de trabalho do biossensor. (Vitoretto A. et al., 2014; Avelino et al., 2020).

Figura 11 - Avaliação topográfica das etapas de montagem do sistema sensor e do bioreconhecimento: a- Filme de PTAA; b- PTAA-sonda(p53)8; c- PTAA-sonda-HPV18 e cPTAA-sonda-HPV11.



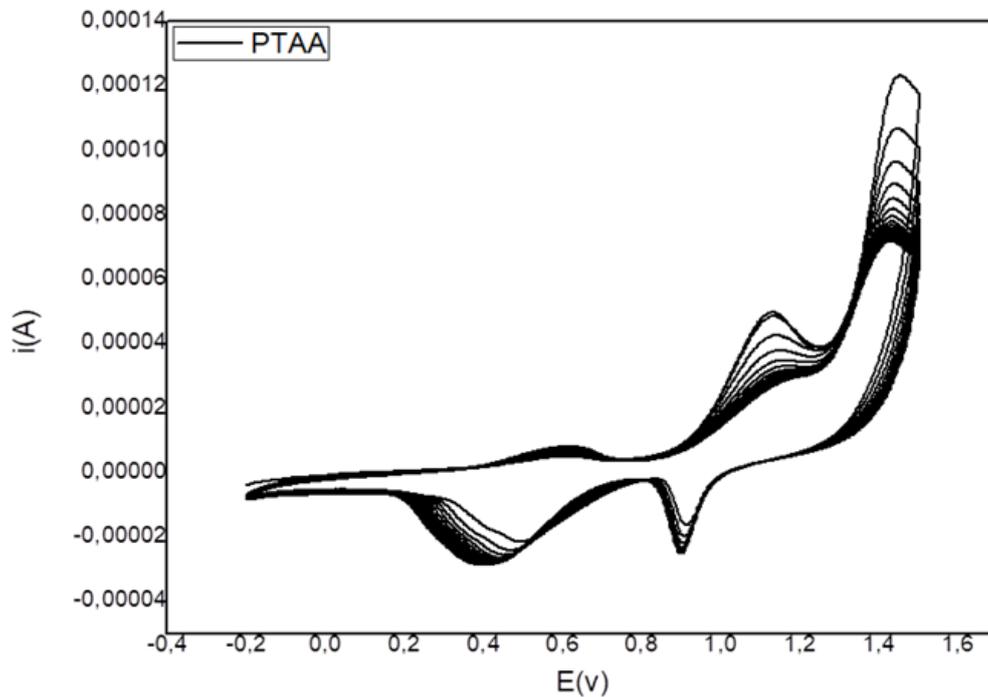
Fonte: Próprio autor.

5.1.2 Caracterização Do Processo De Polimerização

O polímero do politiofeno foi obtido com sucesso através do processo de eletropolimerização desse composto sobre a superfície do disco de ouro do eletrodo de trabalho. Esse experimento foi realizado através de 20 ciclos do VC, no qual é possível visualizar que a formação progressiva das camadas do filme do polímero provocou uma redução progressiva das correntes de pico catódicas e anódicas. Desse modo, essa alteração da resposta amperimétrica após o seu processo de eletrodeposição denota a sua formação e aderência sobre a superfície do eletrodo de trabalho (Voccia et al 2017).

Ademais, foi possível observar que também houve a formação de picos adicionais na região catódica devido à presença de grupos carboxílicos presentes na estrutura do politiofeno, o que demonstra a obtenção de um voltamograma (Figura 12) característico do processo de óxido-redução do PTAA (Aydın et al., 2020).

Figura 12 - Gráfico voltamétrico do processo de polimerização do PTAA.



Fonte: Próprio autor.

5.1.3 Caracterização do processo de montagem e biorreconhecimento do genossensor

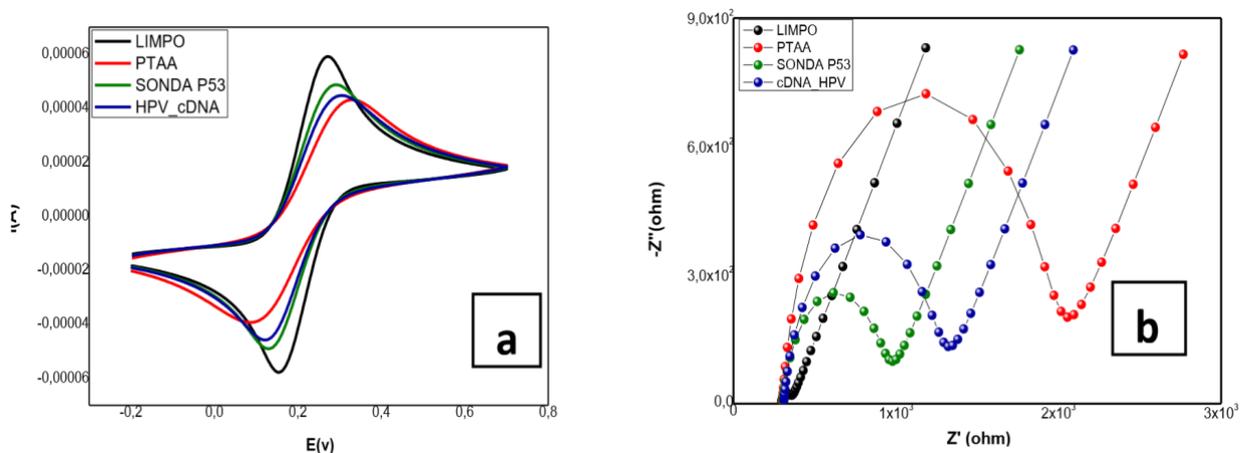
Os resultados obtidos das etapas de montagem do sistema sensor e a capacidade de bioreconhecimento do sistema sensor PTAA-sonda(p53)-HPV estão destacadas por meio da caracterização feita através das alterações dos picos anódicos e catódicos dos voltamogramas presentes na Figura 13a, e através das alterações da resistência a transferência de carga visualizadas pelos gráficos de Nyquist, obtidos das análises de impedância eletroquímica presentes na Figura 13b.

Nota-se que o processo de polimerização do PTAA feito por VC provocou um grande aumento da resistência a transferência de carga (Fig. 13b), o que se deve ao aumento da carga negativa ocasionado pela presença dos grupos carboxílicos em sua estrutura. Outrossim, é possível visualizar que após a imobilização da sonda aminada p53 nos grupos carboxílicos do polímero, teve um aumento da transferência de elétrons entre o eletrodo de trabalho e a sonda redox, refletido pelo aumento da corrente de picos anódicos e catódicos do voltamograma (Fig. 13a) e na diminuição do diâmetro do semicírculo ocorrido no gráfico de Nyquist (Fig. 13b). Em

seguida, o sistema sensor PTAA-sonda(p53)-HPV, quando exposto à amostra de cDNA do HPV na concentração de 100 pg/mL^{-1} , mostrou-se responsivo pelo aumento da RCT.

Observa-se que os resultados obtidos das análises eletroquímicas de VC e EIE (Fig. 13a e Fig. 13b respectivamente) revelaram que houve interação via processo de hibridização entre a sonda e a amostra de cDNA. O processo de biorreconhecimento da sonda p53 é destacado pela redução dos picos catódico e anódico e consequente aumento do diâmetro do semicírculo do gráfico de Nyquist, indicando a presença dessa amostra de cDNA através desse novo bloqueio da transferência de elétrons.

Figura 13 - Análises de voltametria cíclica (a) e espectroscopia de impedância eletroquímica (b) do processo de hibridização da sonda p53 e amostra de cDNA do HPV.



Fonte: Próprio autor.

5.1.4 Testagem De Múltiplas Análises De Diferentes Subtipos de HPV

Após a obtenção dos resultados do processo de montagem e biorreconhecimento do genossensor, foram feitas análises impedimétricas em que o sistema sensor PTAA-Sonda(p53)-HPV foi exposto frente as amostras de cDNA de pacientes infectados com os subtipos de HPV 6, 11, 16, 31, 33, 45 e 58 para avaliar a especificidade do genossensor frente a presença de diferentes concentrações de

cDNA de acordo com a virulência de cada subtipo frente ao sistema sensor PTAA-sonda(p53)-HPV.

A sonda aminada p53 foi escolhida como biorreceptor, pois as proteínas oncogênicas do Papilomavírus causam danos ao genoma humano com proporções distintas de acordo com o subtipo infectante, e conseqüentemente afetando a proteína supressora de tumor p53 de forma semelhante. Os dados obtidos por meio da variação da resistência a transferência de carga ($\Delta RCT\%$) foram obtidos a partir da equação 01, no qual o RCT (biossensor) se refere ao valor de RCT obtido da plataforma automontada PTAA-Sonda, enquanto que o RCT (biossensor-HPV) corresponde aos valores obtidos do biorreconhecimento dessa plataforma frente às amostras de HPV.

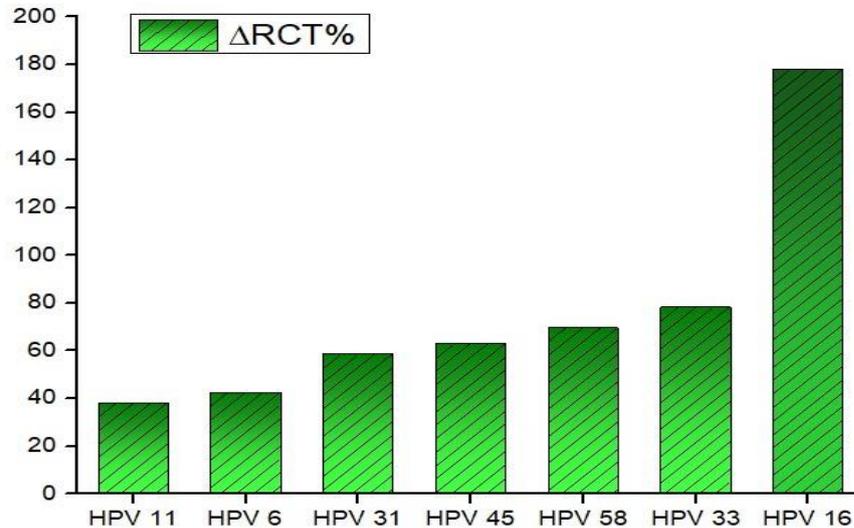
Equação:

01:

$$\Delta Rct (\%) = \frac{Rct (biossensor-HPV) - Rct (biossensor)}{Rct (biossensor)} \times 100$$

Desse modo, os dados obtidos pela variação da resistência a transferência de carga ($\Delta RCT\%$) (Fig. 14) demonstram que a sonda p53 utilizada no genossensor foi capaz de diferenciar os tipos de HPV de acordo com a sua atividade cancerígena relacionada com a presença maior de cDNA, indicando que espécies de alto risco como o HPV 16 apresentaram interação maior com a sonda aminada em comparação com as de baixo risco, assim como foi demonstrado em outros estudos que comprovaram a eficiência da sonda p53 como biorreceptor para os genossensores (Hasanzadeh et al., 2017).

Figura 14 - Variação da resistência de transferência de carga relativa ($\Delta RCT\%$) em função dos subtipos de HPV.

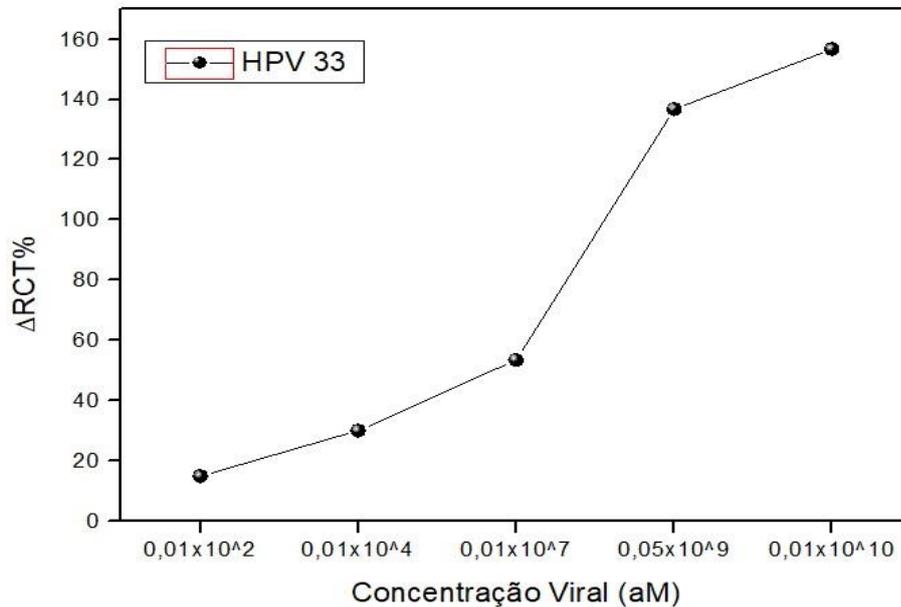


Fonte: Próprio autor.

5.1.5 Testagem De Concentrações Distintas Do Analito De Interesse

Foram realizados experimentos para avaliar a capacidade de bioreconhecimento do sistema sensor PTAAsonda(p53)-HPV foi avaliada frente à diluição seriada de amostra de cDNA do HPV 33 nas concentrações de 1aM, 100aM, 100fM, 50pM e 100pM. Os resultados experimentais de EIE obtidos dessa avaliação foram ajustados frente ao circuito elétrico equivalente de Randles. E os dados obtidos em ΔRCT (Fig. 15) confirmaram que o genossensor foi capaz de detectar diferentes concentrações da amostra de HPV, visto que houve um aumento gradativo da RCT a medida em que concentrações maiores da amostra de cDNA do HPV 33 foi adsorvida na superfície do genossensor (Chaibun et al., 2022).

Figura 15 - ΔRCT do sistema genossensor PTAAsonda(p53)-HPV das análises de diluição seriada de amostra de cDNA do HPV 33 nas concentrações de 1aM, 100aM, 100fM, 50pM e 100pM.



5.1 DADOS ANALÍTICOS Obtidos Por Meio da Sonda MY11

5.2.1 Análises Topográficas Do Sistema Sensor PTAA-Sonda(MY11)-HPV.

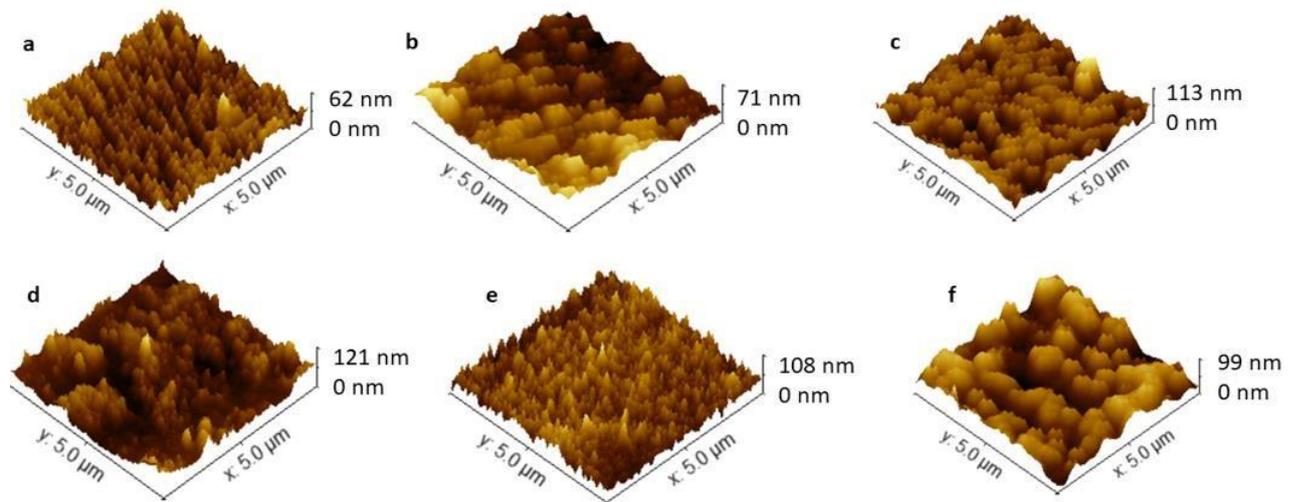
Outrossim, também foram feitas análises topográficas por meio do AFM (Figura 16) para avaliação de mais subtipos de HPV de alto e baixo risco, para avaliar uma faixa maior de detecção do genossensor utilizando a sonda MY11 frente a esses analitos.

A superfície contendo a sonda aminada apresentou uma altura média de 71 nm e com rugosidade de característica heterogênea. É possível visualizar que as amostras dos subtipos de alto risco 18 e 16 apresentaram um aumento da altura e rugosidade média com alturas de 113 nm e 121 nm respectivamente (Fig. 16c e Fig. 16d).

Além disso, as superfícies contendo os subtipos de baixo risco 6 e 11 apresentaram um aumento da altura e rugosidade média de 108 nm e 99 nm (Fig. 16e e Fig. 16f), porém esse aumento foi menor em relação aos subtipos de alto risco. Por meio dessa diferença na morfologia e altura da superfície do eletrodo entre os subtipos de alto e baixo risco analisados, é possível perceber que o genossensor foi capaz de detectar e distinguir diferentes subtipos de HPV de acordo com sua

virulência, já que houve uma maior interação com os subtipos de alto risco em relação aos de baixo risco.

Figura 16 - Avaliação topográfica das etapas de montagem do sistema sensor e do bioreconhecimento: a- Filme de PTAA; b- PTAA-sonda MY11; c- PTAA-sonda MY11-HPV18; d-PTAA-sonda MY11-HPV16; e- PTAA-sonda MY11-HPV6; f- PTAA-sonda MY11-HPV11.



Fonte: Próprio autor.

5.2.2 Testagem Da Sensibilidade Da Sonda MY11 Frente ao HPV 6

Após à obtenção dos dados eletroanalíticos de uma gama de diversos subtipos de HPV para a avaliação de sua especificidade, foram feitas novas análises por meio dos experimentos utilizando a segunda sonda aminada selecionada. Os novos experimentos para o genossensor utilizando a sonda MY11 seguiram o mesmo padrão de montagem da plataforma sensora baseada o politiofeno utilizada para a sonda p53.

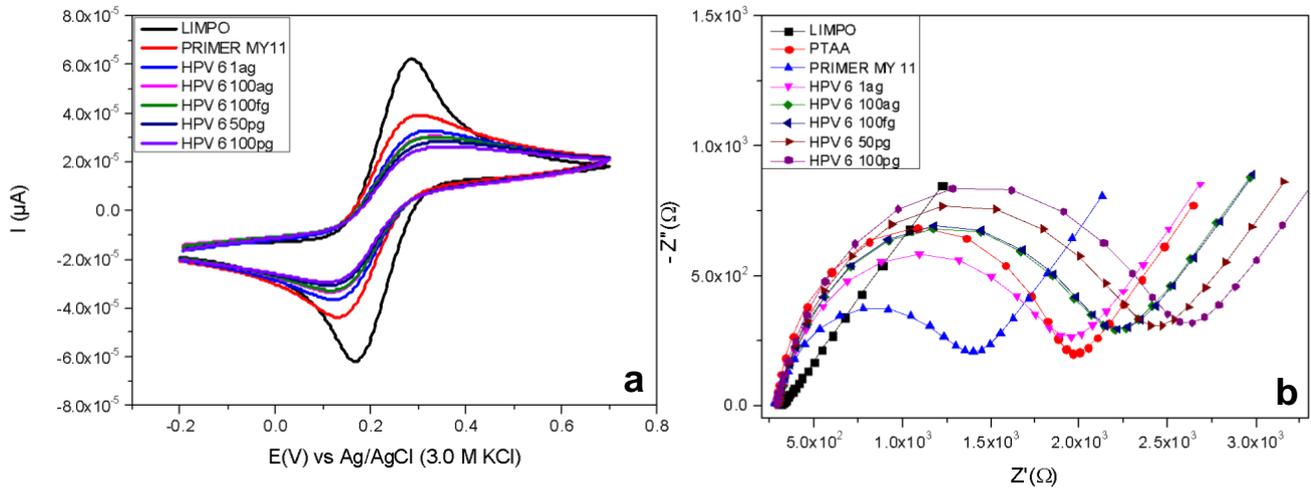
A nova sonda MY11 escolhida é composta de primers degenerados com capacidade de interagir com diferentes sequências de cDNA da região distal (L) do Papilomavírus, o que garante ampla afinidade para a detecção do cDNA viral do Papilomavírus de modo geral, o que torna propício seu uso como um biorreceptor sensível (P. S, V., 2016). Desta forma, foram realizadas análises em diluição seriada

para avaliar a sensibilidade do genossensor por meio de sua capacidade de bioreconhecimento por meio do uso da sonda MY11 frente a diferentes concentrações do subtipo 6, considerado de baixo risco oncogênico.

Os dados obtidos por voltametria cíclica (Fig. 17a) indicaram uma boa resposta da nova sonda utilizada no sistema sensor, pois é possível visualizar bem uma queda gradativa na corrente de pico anódica e catódica, o que reflete uma queda na resposta amperimétrica total do sistema proporcional ao aumento da concentração da amostra (Ramesh et al., 2019).

Foram obtidos também resultados em gráfico de Nyquist, por meio da impedância eletroquímica (Fig. 17b), que foram avaliados pelo circuito de Randles. Os resultados demonstraram que o biorreceptor do genossensor foi capaz de reconhecer o subtipo HPV 6, observa-se que houve um aumento gradativo do diâmetro do semicírculo à medida em que foram analisadas concentrações maiores. Esses resultados estão diretamente relacionados com o incremento na resistência de transferência de carga proporcional ao aumento da concentração das amostras, assim como demonstrado em outros estudos que utilizaram a sonda MY11 para a detecção do genoma viral do Papilomavírus (Avelino et al., 2020).

Figura 17 - Gráfico voltamétrico (17a) é gráfico de Nyquist (17b) do sistema genossensor PTAA-sonda das análises de diluição seriada de amostra de cDNA do HPV 6 nas concentrações de 1ag, 100ag, 100fg, 50pg e 100pg.



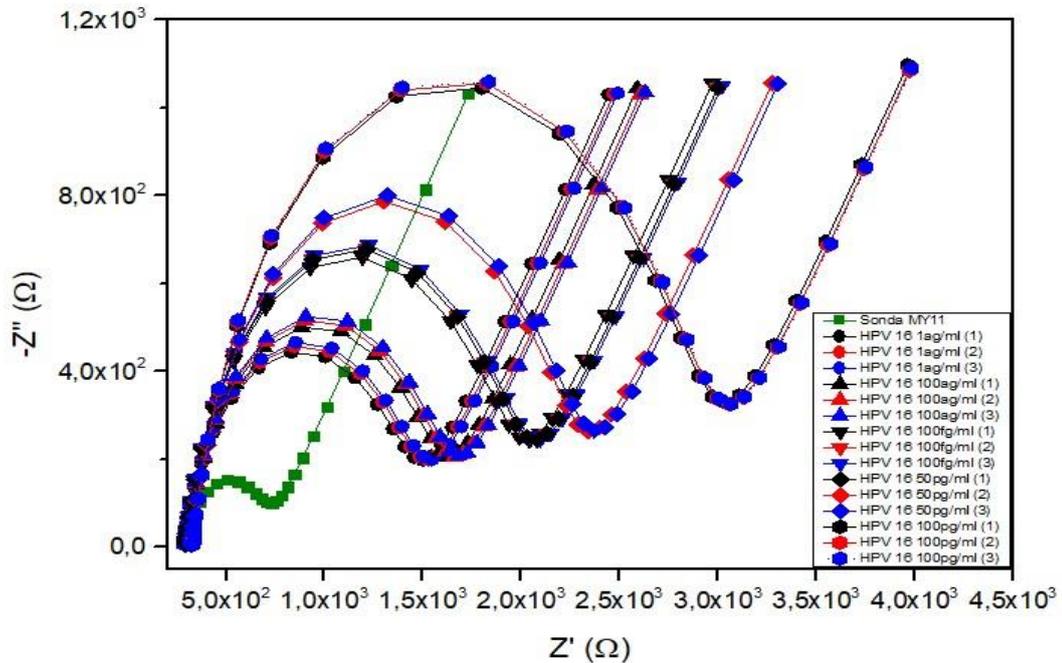
Fonte: Próprio autor.

5.2.3 Testagem De Concentrações Distintas Em Triplicata Dos Subtipos 16 E

33

Ademais, foram feitas as análises dos experimentos de diluição seriada em um amplo espectro de 1 ag/mL a 100 pg/mL em triplicata dos subtipos de HPV 16 e 33. Esses subtipos foram escolhidos devido ao alto índice de infecção no nordeste, especificamente no estado de Pernambuco. O gráfico de Nyquist obtido por EIE do subtipo 33 indica uma boa capacidade detectora do genossensor (Fig. 18), visto que é possível visualizar o aumento no diâmetro dos semicírculos dos gráficos à medida que novas camadas da plataforma nanoestruturada vão sendo adsorvidas e o posterior bioreconhecimento do sensor frente a concentrações gradativamente maiores do vírus (Mahmood et al., 2020; Pareek et al., 2021; Chaibun et al., 2022).

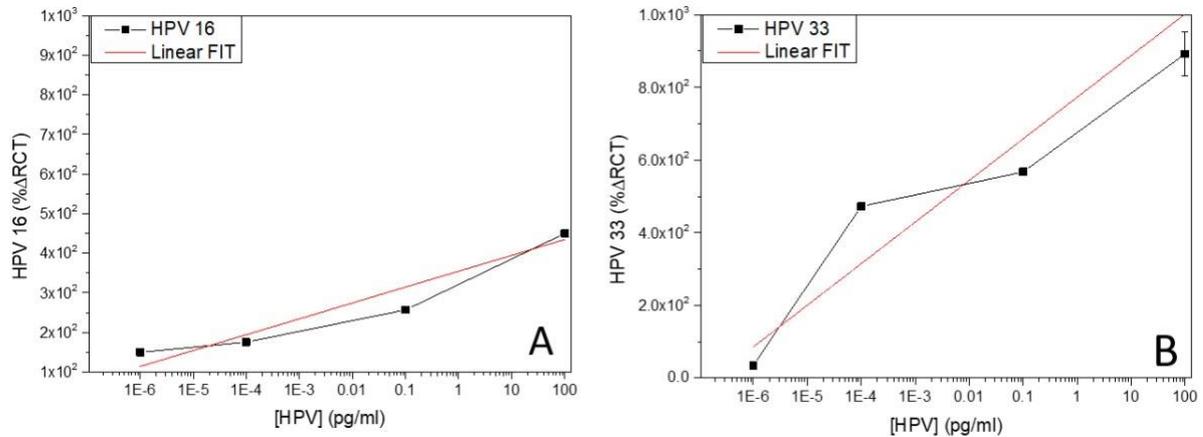
Figura 18 - Gráfico de Nyquist do sistema genossensor PTAA-sonda(MY11)-HPV das análises de diluição seriada em triplicata de amostra de cDNA do HPV 16 nas concentrações de 1ag/mL, 100ag/mL, 100fg/mL, 50pg/mL e 100pg/mL.



Fonte: Próprio autor.

Outrossim, para a avaliação do desempenho do genossensor, também foram realizados experimentos de calibração. As curvas de calibração obtidas do processo de análise das diluições dos HPV 16 (Fig. 19a) e 33 (Fig. 19b) demonstraram uma boa resposta do genossensor, visto que foi obtido uma boa resposta identificada pelo R^2 de 0,92 para o subtipo 16 e de 0,74 para o subtipo 33. Ademais, essas análises foram realizadas em triplicata, que demonstraram que o genossensor, mesmo possuindo uma composição simples de apenas uma camada de nanomaterial, apresentou uma excelente estabilidade, pois as respostas obtidas através do desvio padrão representadas por barras de erro apresentaram apenas um baixo desvio (Rawat et al., 2022).

Figura 19 - Gráfico de calibração para os subtipos de HPV 16 (19a) e HPV 33 (19b). As barras de erros são correspondentes ao desvio padrão realizado em triplicata.



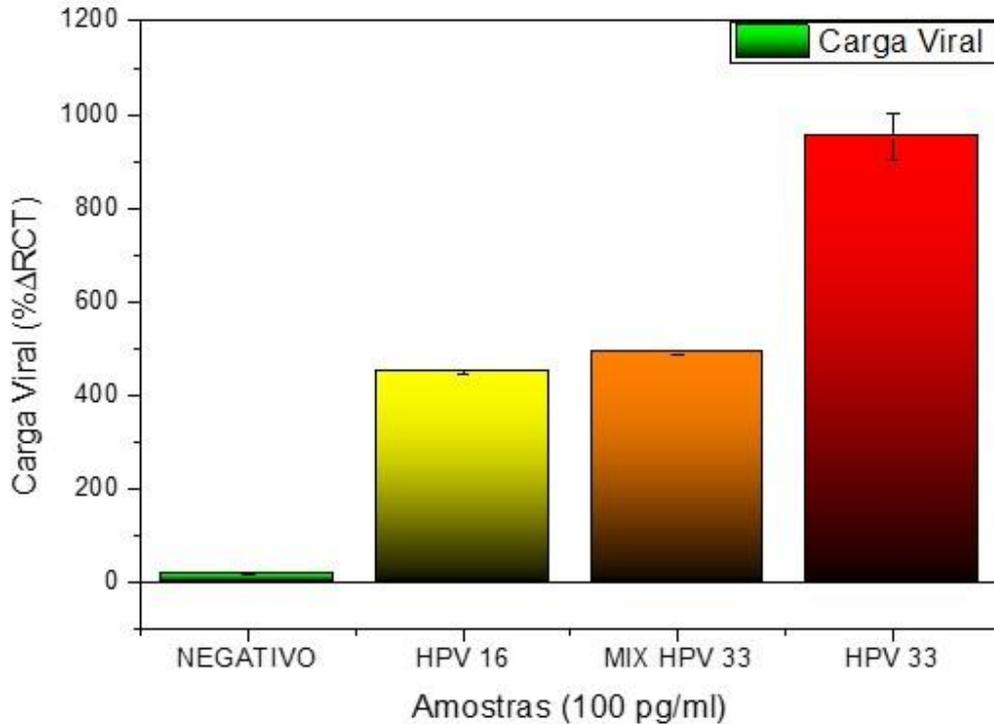
Fonte: Próprio autor.

5.2.4 Estudo Da Especificidade E Seletividade Do PTAA-sonda(MY11)-HPV

Ademais, foram feitos experimentos em triplicata do controle negativo, das amostras de HPV dos subtipos 16 e 33 e da amostra mix do subtipo 33 contendo *Candida albicans* e o vírus da hepatite C na concentração de 100 pg/mL. Os valores de ΔRCT obtidos dessas análises foram inseridos em um gráfico de barras (Fig. 20). O valor baixo do ΔRCT obtido da análise do controle negativo está relacionado diretamente a especificidade do genossensor, já que devido a ausência da amostra de HPV para o genossensor identificar, não houve uma resposta significativa relacionada a detecção desse controle.

Do mesmo modo que a presença dos subtipos de HPV 16 e 33 nas demais amostras analisadas obtiveram respostas em ΔRCT significativamente expressivas, pois a sonda MY11 foi capaz de reconhecer o DNA do vírus, sendo confirmadas pelas respostas obtidas pelo circuito de Randles (Civit et al., 2012; Rawat et al., 2022). Outrossim, a seletividade do genossensor foi confirmada por meio de sua capacidade de detectar a presença do genoma do Papilomavírus na amostra mix contendo também diferentes controles negativos (Chaibun et al., 2022).

Figura 20 - ΔRCT obtido do sistema genossensor PTAA-sonda(MY11)-HPV frente às amostras na concentração de 100 pg.mL^{-1} do controle negativo (*Candida albicans*), HPV16, MIX HPV 33 e HPV 33.



Fonte: Próprio autor.

Para a validação dos dados experimentais obtidos da impedância eletroquímica durante a pesquisa, foram extraídos os elementos elétricos por meio do circuito equivalente de Randles (Tabela 1). Essas variáveis são propícias para anuir os valores de EIE obtidos, pois estão relacionadas às propriedades dielétricas das diferentes etapas de modificação do sistema sensor e o processo de bioreconhecimento (Ramesh et al., 2019).

Tabela 1 - Montagem e bioatividade do sistema PTAA-Sonda(MY11)-HPV frente aos analitos. Os valores dos elementos do circuito equivalente obtidos a partir dos resultados de impedância ajustados. Os resultados de desvio padrão foram obtidos de análises em triplicata com tempo de incubação de 30 minutos.

Eletrodo modificado	CPE(mMho)	N	Rct (kW)	Zw (mMho)
Sonda MY11	5,813±0,727	0,759±0,007	0,467±0,021	989±11
Controle Negativo 100 pg.mL-1	2,173±0,015	0,848±0,001	0,548±0,002	889,67±1,527
MIX HPV 33 100 pg.mL-1	4,670±0,0512	0,796±0,004	2,760±0,017	962±12,12
HPV 16 100 pg.mL-1	1,437±0,04	0,870±0,002	2,567±0,015	825,33±5,033
HPV 33 100 pg/mL-1	1,983±0,246	0,848±0,013	4,920±0,236	533±7,21

Fonte: Próprio autor.

6 CONCLUSÃO

Foi desenvolvido um genossensor baseado filme eletrodepositado de PTAA. O filme de PTAA apresentou boa capacidade de adsorção das sondas em estudo (p53 e MY11) evidenciado por meio de alterações nos gráficos de voltametria cíclica, pela redução da resistência a transferência de carga evidenciado pelo aumento dos diâmetros dos semicírculos dos gráficos de Nyquist através das análises de impedância eletroquímica, e pelas análises topográficas da superfície do genossensor por meio da microscopia de força atômica.

Em adição, o sistema desenvolvido revelou elevada bioafinidade, sensibilidade, e especificidade para a detecção do vírus de baixo e alto risco oncogênico por meio dos resultados eletroanalíticos obtidos proporcionais a virulência e oncogenicidade de cada subtipo. Ademais, o genossensor foi capaz de detectar os subtipos do papilomavírus e distinguir do controle negativo, mostrando-se específico, uma vez que não foi capaz de biointeragir com as amostras dos controles negativos. Do mesmo modo que o genossensor mostrou-se seletivo por diferenciar eletroquimicamente, e confirmado teoricamente por meio do circuito equivalente de Randles, a amostra de HPV 33 das amostras de controle negativo de *Candida albicans* e do vírus da hepatite C.

Através das imagens de AFM foi possível comprovar as alterações topográficas após cada etapa de modificação da superfície do eletrodo. Desse modo, o desenvolvimento de um genossensor com uma plataforma simples, de baixo custo e eficiente evidencia a viabilidade de se utilizar o PTAA como filme para a imobilização da sonda de estudo e sua possível utilização como genossensor para HPV.

7 REFERÊNCIAS

- ARALDI, R. P. et al. **The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. Biomedicine and Pharmacotherapy** Elsevier Masson SAS, , 1 out. 2018.
- AVELINO, K. Y. P. S. et al. **Metal-polymer hybrid nanomaterial for impedimetric detection of human papillomavirus in cervical specimens.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 185, 5 jun. 2020.
- AYDIN, E. B.; AYDIN, M.; SEZGINTÜRK, M. K. **Construction of succinimide group substituted polythiophene polymer functionalized sensing platform for ultrasensitive detection of KLK 4 cancer biomarker.** Sensors and Actuators, B: Chemical, v. 325, 15 dez. 2020.
- BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. **A review on impedimetric biosensors. Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology** Taylor and Francis Ltd., , 1 jan. 2016.
- Bao, H., Pan, Y., Ping, Y., Sahoo, N. G., Wu, T., Li, L., Li, J., Gan, L. H. **Chitosan functionalized graphene oxide as a nanocarrier for drug and gene delivery.** Small. v. 7, p. 1569–1578, 2011.
- BHALLA, N. et al. **Introduction to biosensors.** Essays in Biochemistry, v. 60, n. 1, p. 1–8, 30 jun. 2016.
- BLAIR, E. O.; CORRIGAN, D. K. **A review of microfabricated electrochemical biosensors for DNA detection. Biosensors and Bioelectronics** Elsevier Ltd, , 1 jun. 2019.
- BUTTERWORTH, A. et al. **SAM composition and electrode roughness affect performance of a DNA biosensor for antibiotic resistance.** Biosensors, v. 9, n. 1, 1 mar. 2019.
- Cavalcanti, A. **Mortalidade por Câncer do Colo de Útero no Estado de Pernambuco.** Atena. Pernambuco. 2022.
- CALIL, S. S.; da SILVA, P. R. Q.; **Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade.** Último acesso em Novembro, 2022.
- Chaibun, T., Thanasapburachot, P., Chatchawal, P., Yin, L., et al. **A Multianalyte Electrochemical Genosensor for the Detection of High-Risk HPV Genotypes in Oral and Cervical Cancers.** Biosensors. Thailand. 2022

CHAN, C. K. et al. **Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination - Review of Current Perspectives.** *Journal of Oncology*. Hindawi Limited, , 2019.

CHAUHAN, R. et al. Recent advances in mycotoxins detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 81, p. 532–545, 15 jul. 2016.

CIVIT, L. et al. Electrochemical genosensor array for the simultaneous detection of multiple high-risk human papillomavirus sequences in clinical samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 715, p. 93–98, 17 fev. 2012.

COLPANI, V. et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 15, n. 2, 2020.

DA SILVA, R. L. et al. Role of HPV 16 variants among cervical carcinoma samples from Northeastern Brazil. **BMC Women's Health**, v. 20, n. 1, 1 ago. 2020.

DE CARVALHO, N. S. et al. **Brazilian protocol for sexually transmitted infections 2020: Human papillomavirus (hvp) infection.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 54, 2021.

DE CARVALHO, L. A.; DE ANDRADE, A. R.; BUENO, P. R. Espectroscopia De Impedância Eletroquímica Aplicada Ao Estudo Das Reações Heterogêneas Em Ânodos Dimensionalmente Estáveis. **Quim. Nova**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 796-804, jul. 2006.

EVTUGYN, G. et al. Affinity Biosensors for Detection of Mycotoxins in Food. Em: **Advances in Food and Nutrition Research**. [s.l.] Academic Press Inc., 2018b. v. 85p. 263–310.

FAN, J. et al. **Disposable multiplexed electrochemical sensors based on electrotriggered selective immobilization of probes for simultaneous detection of DNA and proteins.** *Journal of Materials Chemistry B*, v. 8, n. 33, p. 7501–7510, 7 set. 2020.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 137–142, fev. 2006.

FONSECA, M. et al. **ESTUDO COMPARATIVO DAS TÉCNICAS DE PCR E CAPTURA HÍBRIDA PARA O DIAGNÓSTICO DO HPV: REVISÃO DE LITERATURA.** *Salvador*, v. 4, n. 4, p. 59-65, dez. 2016.

GANJI, M. D. Density functional theory based treatment of amino acids adsorption on single-walled carbon nanotubes. **Diamond and Related Materials**, v. 18, n. 4, p. 662–668, abr. 2009.

GUPTA, S.; KUMAR, P.; DAS, B. C. **HPV: Molecular pathways and targets.** *Current Problems in Cancer* Mosby Inc., , 1 mar. 2018.

Goodman, C. S. **Introduction to health care technology assessment: ten basic steps**. 1999.

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

Hasanzadeh, M., Shadjou, N. **(Nano)-materials and methods of signal enhancement for genosensing of p53 tumor suppressor protein: Novel research overview**. Materials Science and Engineering. Iran. 2017

HOLZMANN, Henrique. **As Engenharias e Seu Papel no Desenvolvimento Autossustentado**. 1 Edição. Ponta Grossa, PR: Atena, 2020.

JAYANTHI, V. S. P. K. S. A.; DAS, A. B.; SAXENA, U. **Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers**. **Biosensors and Bioelectronics** Elsevier Ltd, , 15 maio 2017.

Jönsson, B. **Technology assessment for new oncology drugs**. Clinical Cancer Research. v. 19, p. 6-11, 2013.

Kai, C., Aimagambetova, G., Ukybassova, T., Kongrtay, K., and Azizan, A. **Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination— Review of Current Perspectives**. University School of Medicine, University Medical Center. Astana, kazakhstan. 2019.

Kudoh, A., Sato, S., Itamochi, H., Komatsu, H., Nonaka, M., Sato, S., Chikumi, J., Muneaki, S., Oishi, T., Kigawa, J., Harada, T. **Human papillomavirus type-specific persistence and reappearance after successful conization in patients with cervical intraepithelial neoplasia**. International Journal of Clinical Oncology. v. 1, p. 1-8, 2015.

LE FLOCH, F. et al. **Ferrocene-functionalized cationic polythiophene for the label-free electrochemical detection of DNA**. Advanced Materials, v. 17, n. 10, p. 1251–1254, 13 maio 2005.

LI, Bo et al. **Inkjet printed chemical sensor array based on polythiophene conductive polymers**. Sensors and Actuators B: Chemical, v. 123, n. 2, p. 651-660, 2007.

LIU, S.; WANG, Y. **Application of AFM in microbiology: A review**. Scanning, mar. 2010.

MAGALHÃES, G. M. et al. Update on human papilloma virus - part I: epidemiology, pathogenesis, and clinical spectrum. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 96, n. 1, p. 1–16, 1 jan. 2021.

MAGAR, H. S.; HASSAN, R. Y. A.; MULCHANDANI, A. **Electrochemical impedance spectroscopy (Eis): Principles, construction, and biosensing applications**. SensorsMDPI, , 1 out. 2021.

MAHMOODI, P. et al. **Early-stage cervical cancer diagnosis based on an ultrasensitive electrochemical DNA nanobiosensor for HPV-18 detection in real samples.** Journal of Nanobiotechnology, v. 18, n. 1, 13 jan. 2020.

MANINI, I.; MONTOMOLI, E. Epidemiology and prevention of Human Papillomavirus. **Annali di Igiene Medicina Preventiva e di Comunita**, v. 30, n. 4, p. 28–32, 2018.

Nair, Sarita S.; Mishra, Sujeet K.; Kumar, Devendra. **Recent progress in conductive polymeric materials for biomedical applications.** Polymers for Advanced Technologies, v. 30, n. 12, p. 2932-2953, 2019.

NANDINI, S. et al. **Development of a simple bioelectrode for the electrochemical detection of hydrogen peroxide using Pichia pastoris catalase immobilized on gold nanoparticle nanotubes and polythiophene hybrid.** Analyst, v. 139, n. 22, p. 5800–5812, 15 out. 2014.

National Institute for Health and Clinical Excellence. NICE guidance. NICE guidance research recommendations. Disponível em: <http://www.nice.org.uk/guidance/> Acesso em 08/03/2022.

Nunes, A. A., Martinez, E. Z., Ana, L. W., Pazin-Filho, A., Coelho, E. B., Mello, L. M. **Testes Diagnósticos no contexto da Avaliação de Tecnologias em Saúde: Abordagens, Métodos e Interpretação.** Medicina - Ribeirão Preto (on line). v. 48 (1), p. 08-18, 2015.

PACHECO, W. F. et al. Voltammetry: A brief review about concepts. **Revista Virtual de Química.** Sociedade Brasileira de Química, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 516-537, 12 ago. 2013.

PAREEK, S. et al. **Nitrogen-Doped Carbon Dots for Selective and Rapid Gene Detection of Human Papillomavirus Causing Cervical Cancer.** ACS Omega, v. 6, n. 46, p. 31037–31045, 23 nov. 2021.

Patil, J., Vickery, J. L., Scott, T. B., Mann, S. **Aqueous stabilization and self-assembly of graphene sheets into layered bio-nanocomposites using DNA.** **Advanced Materials.** v. 21, p. 3159–3164, 2009.

P. S V., Patil C., Nagmoti M., et al. **Detection of HPV DNA Using MY09/MY11 and G5/G6 Primer Sets in HIV Positive Patients with Positive Linear Array Genotype Assay Results.** International Journal of Medical Research Professionals. India. 2016.

Ramesh T., Foo K., Haarindraprasad R., Sam A., Solayappan M. **Gold-Hybridized Zinc Oxide Nanorods as Real-Time Low-Cost NanoBiosensors for Detection of virulent DNA signature of HPV-16 in Cervical Carcinoma.** Scientific Reports. Malaysia. 2019.

RAWAT, R. et al. **An Electroanalytical Flexible Biosensor Based on Reduced**

Graphene Oxide-DNA Hybrids for the Early Detection of Human Papillomavirus. *Diagnostics*, v. 12, n. 9, 1 set. 2022.

RIBEIRO, D. V.; SOUZA, C. A. C.; ABRANTES, J. C. C. Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) to monitoring the corrosion of reinforced concrete. *Revista IBRACON de Estruturas e Materiais*, v. 8, n. 4, p. 529–546, ago. 2015.

SAAD CALIL, S.; ROBERTO QUEIROZ DA SILVA, P. **Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade**. [s.l: s.n.].

SENDAGORTA-CUDÓS, E.; BURGOS-CIBRIÁN, J.; RODRÍGUEZ-IGLESIAS, M. Genital infections due to the human papillomavirus. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 37, n. 5, p. 324–334, 1 maio 2019.

SOHEILI, M; KEYVANI, H; SOHEILI, M; NASSERI, S. **Human papilloma virus: A review study of epidemiology, carcinogenesis, diagnostic methods and treatment of all HPV-related cancers**. *Med J Islam Repub Iran*. 2021.

STUPIN, D. D. et al. Bioimpedance Spectroscopy: Basics and Applications. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, v. 7, n. 6, p. 1962–1986, 14 jun. 2021.

SZYMONOWICZ, K. A.; CHEN, J. **Biological and clinical aspects of HPV-related cancers**. *Cancer Biology and Medicine*, v. 1, n. 1, 1 nov. 2020.

TAHA, B. A. et al. **An analysis review of detection coronavirus disease 2019 (Covid-19) based on biosensor application**. *Sensors (Switzerland)* MDPI AG, v. 2, n. 1, 1 nov. 2020.

TEIXEIRA, S. et al. Novel single-wall carbon nanotube screen-printed electrode as an immunosensor for human chorionic gonadotropin. *Electrochimica Acta*, v. 136, p. 323–329, 1 ago. 2014.

Vitoreti A. **Desenvolvimento de um Imunossensor Eletroquímico Para Identificação de Toxinas de Serpentes**. São Paulo. 2014

Wang, Hsing-Ju; CHEN, Chih-Ping; Jeng, Ru-Jong. **Polythiophenes comprising conjugated pendants for polymer solar cells: a review**. *Materials*, v. 7, n. 4, p. 2411-2439, 2014

WENDLAND, E. M. et al. **Prevalence of HPV infection among sexually active adolescents and young adults in Brazil: The POP-Brazil Study**. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

Zhang, X., Ju, H., Wang, J. **Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications**. Imprint Amsterdam; Boston. Academic Press, 2008.