



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

ALEXANDRE HENRIQUE LIMA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO IMPEDIMÉTRICO NANOESTRUTURADO
PARA IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA PAPILOMAVÍRUS
HUMANO (HPV)**

RECIFE

2023

ALEXANDRE HENRIQUE LIMA DOS SANTOS

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: Cesar Augusto Souza de Andrade
Co-orientador: Alberto Galdino da Silva Junior

RECIFE

2023

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

Santos, Alexandre henrique lima dos.

Desenvolvimento de dispositivo impedimétrico nanoestruturado para
identificação de biomarcadores para Papilomavírus humano (HPV) / Alexandre
henrique lima dos Santos. - Recife, 22023.

55 p. : il., tab.

Orientador(a): Cesar Augusto Souza de Andrade

Coorientador(a): Alberto Galdino da Silva Junior

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 22023.

Inclui referências, apêndices.

1. Papilomavírus humano. 2. biossensor. 3. nanopartículas. 4. eletroquímica.
I. Andrade, Cesar Augusto Souza de . (Orientação). II. Junior, Alberto Galdino
da Silva . (Coorientação). III. Título.

500 CDD (22.ed.)

ALEXANDRE HENRIQUE LIMA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO IMPEDIMÉTRICO
NANOESTRUTURADO PARA IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (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: 26/ 04/2023

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr Cesar Augusto Souza de Andrade
UFPE/ Bioquímica

Prof. Dr. Karem Loraine Macena Santos
UFPE/ Bioquímica

Esp. Amanda Moreira Gonçalves de Aguiar
Instituição/ Departamento

Dedico este trabalho a todos que acreditaram em mim ao longo dessa jornada. Que nós possamos mudar o mundo juntos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Professor César, que tornou esse trabalho possível e que sempre deixou o ambiente divertido com seu senso de humor. Também gostaria de agradecer a Prof. Maria Danielly por me receber no laboratório e sempre ser simpática com todos. Agradeço ao meu co-orientador Alberto que sempre esteve disponível para tirar minhas dúvidas e dividir sua experiência sobre o laboratório. Também gostaria de agradecer ao departamento de Bioquímica, aos técnicos vinculados, a FIOCRUZ, ao LPCM e a CAPES que tornaram possível essa pesquisa. Agradeço também a minha amiga Brenda que me ajudou em várias etapas do projeto e sempre esteve disponível para me ajudar.

Gostaria de agradecer a todos os colegas do laboratório de BIONANO que sempre estiveram disponíveis para tirar dúvidas e ajudar com os experimentos, e agradecer aos meus colegas que me acompanharam pela jornada da graduação.

Gostaria de fazer um agradecimento aos meus familiares que sempre me apoiaram e deram todo o apoio possível e impossível para que esse sonho pudesse se tornar realidade. Também gostaria de agradecer ao meu grande amigo Carlos, por topar as saídas mais duvidosas e as ideias mais loucas. Por fim, gostaria de agradecer a Leticia, minha namorada, por seu companheirismo e apoio nesse momento tão importante da minha vida, sem você eu não conseguiria.

..

**“Sonhos determinam o que você quer.
Ação determina o que você conquista.”
Aldo Novak**

SANTOS, Alexandre Henrique Lima. **Desenvolvimento de dispositivo impedimétrico nanoestruturado para identificação de biomarcadores para papilomavírus humano (HPV)**. 2023. 55. Trabalho de Conclusão de Curso Graduação em Biomedicina – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

O câncer de colo uterino cervical pode ser causado através da infecção persistente do Papilomavírus Humano (HPV). Excluindo os tumores de pele não melanoma, é considerado o terceiro mais comum entre as mulheres no Brasil. Essa patologia costuma ser silencioso e evoluir de forma lenta, apresentando apenas sintomatologia em estágios avançados da doença, sendo este, um fator determinante para a busca de alternativas diagnósticas inovadoras que possam identificar a doença de maneira rápida, específica e resultar em um bom prognóstico quando confirmado. Nesse contexto, biossensores eletroquímicos se destacam por serem biodispositivos utilizados no diagnóstico de múltiplas doenças, apresentando características como elevada sensibilidade, seletividade e baixo custo, além de permitir a sua miniaturização quando associados a nanomateriais. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma plataforma biossensora eletroquímica nanoestruturada formada por monocamadas automontadas de 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS), nanopartículas de ouro funcionalizadas e a sonda aminada p53 para a identificação do cDNA de HPV em amostras clínicas de pacientes com baixa carga viral. Para isso, foi utilizado na análise da interação biomolecular a técnica de impedância eletroquímica (EIE), que é capaz de caracterizar cada camada de bioreconhecimento adsorvido na superfície do eletrodo, por meio de variações na taxa de transferência de elétrons. Através do estudo foi observado a eficiente adsorção das monocamadas automontadas (MPTS), das nanopartículas de ouro (AuNPs) e da sonda aminada p53 na superfície do eletrodo. Esses resultados foram confirmados por meio da taxa de transferência de elétrons e das variações da resposta de EIE, logo após a adsorção de cada camada. Portanto, o sensor desenvolvido (MPTS-AuNPs-p53) foi capaz de detectar diferentes tipos de HPV (33,31,18 e 6), sendo mais sensível na detecção do HPV 18 de alto risco, com diferentes concentrações testadas e limite mínimo de detecção de 1 fg/ μ L. Desta maneira foi possível determinar que a plataforma teve uma boa reprodutibilidade, alta seletividade e especificidade quando submetida a análises de biomoléculas comuns (glicose, ácido cítrico). Logo, o estudo demonstra como o biossensor desenvolvido caracteriza-se como uma promissora ferramenta voltada para o diagnóstico do HPV, já que se mostrou responsivo a amostras de HPV de diferentes tipos com detecção de baixas concentrações e seletividade em relação a biomoléculas comuns, podendo no futuro servir de apoio às técnicas consideradas “padrão ouro” como o RT-qPCR e o exame citopatológico.

Palavras-chave: Papilomavírus humano; biossensor; nanopartículas; eletroquímica.

SANTOS, ALEXANDRE. **Development of a impedimetric nanostructures device for identification of biomarkers for human papillomavirus (HPV)**. 2023. 55. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Cervical cancer can be caused by persistent Human Papillomavirus (HPV) infection. Excluding non-melanoma skin tumors, it is considered the third most common cancer among women in Brazil. This type of pathology is usually silent and evolves slowly, presenting some symptoms in advanced stages of the disease, which is a determining factor for the search for innovative diagnostic alternatives that can identify the disease quickly, specifically and result in a good prognosis when confirmed. In this context, electrochemical biosensors stand out for being biodevices used in the diagnosis of multiple diseases, with characteristics such as high sensitivity, selectivity and low cost, in addition to allowing their miniaturization when associated with nanomaterials. The present work aimed to develop a nanostructured electrochemical biosensor platform formed by self-assembled monolayers of 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTS), functionalized gold nanoparticles and the p53 aminated probe for the identification of HPV cDNA in clinical samples. For this, the technique of electrochemical impedance (EIS) was used in the analysis of the biomolecular interaction, which is capable of characterizing each layer of biorecognition adsorbed on the surface of the electrode, through variations in the rate of electron transfer. Through the study, the efficient adsorption of self-assembled monolayers (MPTS), gold nanoparticles (AuNPs) and the p53 aminated probe on the electrode surface was observed. These results were confirmed by means of the electron transfer rate and the variations of the EIE response, right after the adsorption of each layer. Therefore, the developed sensor (MPTS-AuNPs-p53) was able to detect different types of HPV (33,31,18 and 6), being more sensitive in the detection of high-risk HPV 18, with different concentrations tested and a minimum limit of detection of 1 fg/ μ L. In this way, it was possible to determine that the platform had good reproducibility, high selectivity and specificity when subjected to analyzes of common biomolecules (glucose, citric acid). Therefore, the study demonstrates how the developed biosensor is characterized as a promising tool for the diagnosis of HPV, since it proved to be responsive to HPV samples of different types with detection of low concentrations and selectivity in relation to common biomolecules. In the future, it can support techniques considered the “gold standard” such as RT-qPCR and cytopathological examination.

Key words: 1. human papillomavirus; biosensors; nanoparticles; electrochemistry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Esquemática do genoma do HPV demonstrando o arranjo das proteínas precoces (E), os genes do capsídeo (L1 E L2) e a região de logo controle (LCR). 17
- Figura 2** – Progressão do câncer do colo de útero 19
- Figura 3** – A) Exame colposcópico evidenciando epitélio branco denso papilar com circunvoluções, B) Exame colposcópico também evidenciando epitélio branco denso papilar. 21
- Figura 4** – Demonstração da colheita tríplice das amostras cervicovaginais. 22
- Figura 5** – Coleta das amostras citológicas da ectocérvice e da endocérvice. a) sendo a rotação da espátula de Ayre para a coleta de material da ectocérvice. b) colheita da mucosa endocervical com a escovinha. c) modelo de confecção e distribuição das amostras na lâmina citológica 22
- Figura 6** – A) Lâmina de exame de Papanicolau com achados normais B) Achados de lesões de nível 3. 23
- Figura 7** – Componentes possíveis em biossensores. 25
- Figura 8** – A) Gráfico representativo no diagrama de Nyquist. B) Circuito equivalente de Randles. 31
- Figura 9** – Ilustração da plataforma biossensora com MPTS- AuNPs-Sonda p53-cDNA de HPV. 36
- Figura 10** – Mudança no do espectro de absorção após funcionalização com Cys. 36
- Figura 11** – Mudança no espectro de absorção após funcionalização com Cys. 37
- Figura 12** – Diagrama de Nyquist referente à caracterização eletroquímica da plataforma biossensora. 38
- Figura 13** – Análise de sensibilidade do biossensor frente a amostra de HPV 33 40
- Figura 14** – Espectroscopia de impedância com análise de concentração do HPV 18. 41
- Figura 15** – Resposta impedimétrica do HPV6 em concentrações de 1fg/μL, 50 fg/μL, 500 fg/μL e 1 pg/μL 43
- Figura 16** – a) Resposta eletroquímica do controle negativo com glicose b) resposta eletroquímica do controle com ácido nítrico 44
- Figura 17** – Resposta impedimétrica do HPV 6 em concentrações de 1fg/μL, 50 fg/μL, 500 fg/μL e 1 pg/μL. 45
- Figura 18** – A) Resposta eletroquímica do controle negativo com glicose B) resposta eletroquímica do controle com ácido nítrico.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos mais comuns de HPV em lesões de pele e mucosa genital	16
Tabela 2 – Resultados citopatológicos e condutas clínicas para o rastreamento do câncer do colo uterino	19
Tabela 3 – Resultados eletroquímicos da plataforma com testes de HPV 18. Todos realizados em triplicata	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HPV	Papilomavírus humano
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
EDC	N-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida
NHS	N-hidroxissuccinimida
mL	Mililitro
pg	Picrograma
fg	Fentograma
ICTV	The International Committee on Taxonomy of Viruses
RCT	Resistência à transferência de cargas
RT- qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
VLP	Virus-like particle
PCR	Reação em cadeia da polimerase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Papilomavírus Humano.....	16
2.1.2 Rastreamento do HPV.....	18
2.2 Exames na detecção de HPV.....	20
2.2.1 Exames de colposcopia e teste de papanicolau.....	20
2.2.3 Ensaio de captura híbrida.....	24
2.3 Biossensores Para a Detecção do HPV.....	24
2.3.1 Tipos de Biossensores.....	25
2.3.2 Biossensores de acordo com seus bioreceptores.....	26
2.3.2.1 Genossensor.....	26
2.3.2.2 Microbiológicos.....	26
2.3.2.3 Imunossensor.....	27
2.3.2.4 Enzimático.....	27
2.3.3 De Acordo Com a Natureza do Evento de Bioreconhecimento Com o Analito Alvo.....	28
2.3.4 De Acordo com o Transdutor.....	28
2.3.4.1 Biossensor eletroquímico.....	28
2.3.4.2 Biossensores ópticos e piezoelétricos.....	29
2.3.4.4 Biossensores Térmicos.....	29
2.4 Detecção eletroquímica.....	29
2.5 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).....	30
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
4. METODOLOGIA.....	32
4.1 Materiais.....	32
4.2 Síntese e modificação química das nanopartículas de ouro pela L-cisteína (cys).....	33
4.3 Preparo da plataforma biossensora e leitura de amostras.....	34
4.4 Medidas eletroquímicas.....	35
4.5 Simulação do circuito equivalente de Randles nas análises de EIE.....	35
4.6 Medidas de espectrofotometria de UV-VIS.....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1 Medidas de absorção UV-VIS.....	36
5.2 Caracterização Eletroquímica da plataforma biossensora.....	37
5.3 Análise da sensibilidade do biossensor.....	39
5.4 Resultados da espectroscopia de impedância em relação a bioatividade da	

plataforma.....	40
5.5 Controle negativo com glicose e ácido cítrico, moléculas comuns.....	45
5.6 Reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade da plataforma biossensora... 46	
6. CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino tem um histórico muito bem conhecido e já estudado, tendo como causa principal a infecção pelo papilomavírus humano (HPV). Atualmente já foram descobertos mais de 200 tipos diferentes de HPV (AVELINO et al., 2022), que muitas vezes estão associados com o aparecimento de lesões benignas como verrugas e papilomas (HPV 1, HPV 2, HPV 3 e HPV 4), e outras vezes lesões malignas como as lesões de colo de útero. Os tipos de HPV com mais chances de virarem lesões oncogênicas de colo de útero são o HPV16 (53%), HPV 18 (15%), HPV45 (9%), HPV 31 (6%), HPV 33 (3%) (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020).

Desta forma, a infecção por HPV pode acontecer por contato de pele ou mucosa de material infectado, porém, o meio mais comum de infecção é o sexual. É necessária uma infecção persistente por um tipo oncogênico do HPV combinado com outros fatores (idade, tabagismo, imunidade, genética) para que se comece as mudanças celulares no colo do útero. Na maioria das mulheres, de 12 a 24 meses após a infecção, o próprio sistema imunológico do indivíduo consegue eliminar a infecção, mas, o risco de desenvolvimento para uma neoplasia é de 30% quando não ocorre tratamento das lesões precursoras (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020).

A existência de uma forte relação entre a infecção por papilomavírus humano (HPV) e a carcinogênese cervical destaca a importância do seu diagnóstico precoce. A colposcopia em combinação com o teste de Papanicolau tem sido o método clínico mais usado para determinar a presença ou ausência de lesões no epitélio cervical causadas pelo HPV. A confirmação do diagnóstico pode ser feita por avaliação histopatológica do tecido através de biópsia (CONTROLE INTEGRAL DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO GUIA DE PRÁTICAS ESSENCIAIS, 2014)

. Embora amplamente empregadas, estas técnicas possuem baixa acurácia, os resultados não são suficientemente preditivos, a reprodutibilidade não é satisfatória e a correlação entre alterações visuais no tecido e a severidade da doença é pouco significativa. Diante destas limitações, novos métodos para a detecção do HPV têm sido desenvolvidos, como ensaios sorológicos e detecção do genoma viral. Entretanto, os testes sorológicos podem não quantificar as imunoglobulinas anti-HPV em condições clínicas com baixas cargas virais e a cultura de células para a detecção de espécimes de HPV exibe baixa acurácia. Como

diagnóstico molecular, destacam-se ensaios de captura híbrida e ensaios de amplificação de ácidos nucleicos, como a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) (AVELINO et al., 2022).

Os ensaios de captura híbrida tornaram-se o padrão ouro e são extensivamente utilizados em testes clínicos. Contudo, ensaios de captura híbrida não permitem a identificação de genótipos específicos do HPV, identificando apenas os grupos de alto e baixo risco oncogênico. Além disso, estes ensaios possuem sensibilidade menor que a técnica PCR e resultados positivos podem ser obtidos a partir da hibridização com tipos de HPV não incluídos no teste (BORDIGONI et al., 2021). Dessa forma, a pesquisa biomédica associada à nanotecnologia tem atraído atenção do campo diagnóstico com o uso de biossensores eletroquímicos, dispositivos de diagnóstico de analitos de interesse clínico caracterizados pela sua elevada sensibilidade, especificidade e baixo custo. A aplicação da nanotecnologia na estratégia diagnóstica permite a miniaturização e portabilidade do biodispositivo (PUROHIT et al., 2020), favorecendo a acessibilidade em locais de difícil acesso com uma análise rápida e simples de diferentes amostras clínicas. Em adição, biossensores são capazes de detectar bioanalitos de forma qualitativa e quantitativa, podendo determinar a carga de determinada doença ou se determinado tratamento clínico está sendo efetivo (AVELINO, et al., 2022).

Biossensores são constituídos basicamente pelo biorreceptor, designado especificamente para a identificação de um analito (anticorpos, enzimas, proteínas oligonucleotídeos, fragmentos de DNA/RNA, etc.) e um transdutor eletroquímico (impedimétrico, amperométrico, condutimétrico) responsável por converter o evento da interação analito-biorreceptor em um sinal elétrico mensurável, sendo diretamente proporcional à concentração do analito presente na amostra (AVELINO, et al., 2022). Destarte, o presente estudo possui como principal objetivo o desenvolvimento e análise de um biossensor eletroquímico voltado para a identificação de cDNA de HPV. A plataforma biossensora é composta por monocamadas automontadas de 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS), nanopartículas de ouro (AuNPs) e a sonda aminada p53 (5'-amina-TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA-3'). A relevância do projeto é determinada pela alta demanda demonstrada pelo Sistema Único de Saúde e sociedade por um diagnóstico rápido, de baixo custo, efetivo e de fácil acesso para o papilomavírus humano.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Papilomavírus Humano

Os Papilomavírus humanos possuem tropismo pelo epitélio escamoso da pele e da mucosa, além disso, os diferentes tipos de HPV que infectam uma mesma espécie podem apresentar tendência a se instalarem em diferentes regiões do organismo como, mãos, pés, axilas, mucosas genitais, anais ou orais. Entretanto, o tipo de lesão que irá ou não se desenvolver depende diretamente do tipo viral, já que os tipos 1, 2 e 4 estão diretamente ligados com o aparecimento de verrugas em pés e mãos. Já os HPV 6 e 11 são responsáveis pelo aparecimento de verrugas genitais, e os tipos 16 e 18 são encontrados em carcinomas escamosos do colo do útero junto com outros tipos de baixo ou alto risco carcinogênico (TABELA 1) (OLIVEIRA, M. L. da S. *et al.*, 2021; MIYASAKI; JUNIOR, 2021).

Tipos de lesões	Tipos mais comuns de HPV
Benignas da pele	1, 2, 3, 4 e 10
Benignas da mucosa anogenital	6, 11, 40, 42, 43, 55, 53, 56, 66, 68
Malignas da mucosa anogenital	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58

Tabela 1. Tipos mais comuns de HPV em lesões benignas e malignas de pele e mucosa genital, autoria do próprio autor com referências retiradas de OLIVEIRA, M. L. da S. *et al.*, 2021; MIYASAKI; JUNIOR, 2021.

Segundo o comitê internacional de taxonomia viral (The International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV), o Papilomavírus Humano está atualmente classificado na família Papillomaviridae, esses vírus possuem genoma composto por uma dupla hélice de DNA circular, com aproximadamente 8 mil pares de bases e

capsídeo icosaédrico com um diâmetro de 50 a 60 nm, não sendo revestido por envelope lipídico (ROSA et al., 2009). Apesar do seu pequeno genoma, sua biologia molecular é bastante complexa (Fig. 1). Seus genes são divididos em região reguladora (LCR – *long control region*) que contém o material genético responsável pela replicação viral e grande parte dos promotores de transcrição. Existem duas regiões codificadoras, a sequência precoce (E – early) que codifica as proteínas para a construção do capsídeo viral (L1 e L2), sendo responsáveis pelas etapas finais da replicação do vírus, e a tardia (L – late) que faz parte da codificação e replicação do material genético do vírus e da transformação celular (E1, E2, E6 e E7). Em resumo, teremos 4 principais oncogenes (E1, E2, E6 e E7), duas proteínas reguladoras (E1 e E2) e duas proteínas estruturais (L1 e L2) (ROSA et al., 2009).

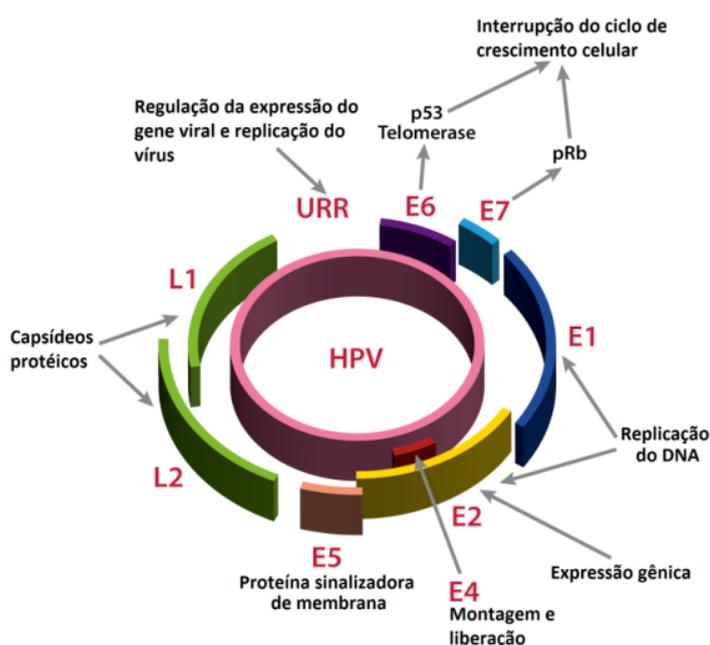


Figura 1. Esquemática do genoma do HPV demonstrando o arranjo das proteínas precoces (E), os genes do capsídeo (L1 e L2) e a região de longo controle (LCR). Retirado de (LUÍS; PAES, 2017).

O HPV possui uma função essencial na etiologia do câncer de colo uterino, seu ciclo de replicação causa multiplicação e mutações celulares, que podem levar a imortalização e malignidade da célula. Esse mecanismo é causado principalmente por dois oncogenes, o E6 e o E7, que produzem proteínas que interferem diretamente no ciclo celular. A proteína P53 é o principal alvo do gene E6, já que

ocorre uma degradação induzida da proteína supressora de tumor (em HPVs de alto risco essa ação da E6 na degradação de p53 é muito mais eficiente) (N. DE LIMA CAMARA *et al.*, 2003). Por conta desse mecanismo, o organismo acaba aumentando a expressão dessa proteína (P53) para que ocorra a normalização de seus níveis (AVELINO *et al.*, 2022).

2.1.2 Rastreamento do HPV

Após a infecção pelo HPV as células cervicais sofrem alterações que podem progredir para um câncer. No entanto, é uma doença de progressão lenta, podendo levar de 10 a 20 anos para que se chegue em estágios avançados das lesões. Atualmente, o principal método usado pelas principais instituições de saúde é o rastreamento, que apenas possibilita a identificação das lesões precursoras, e a partir dos exames, o paciente é indicado para o tratamento, caso haja lesões. Portanto, os métodos atuais de rastreamento são a colposcopia e o exame citopatológico, que devem ser oferecidos para mulheres entre 25 e 64 com vida sexual ativa. Elas fazem parte da população com maior risco de desenvolvimento de lesões malignas (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA)., 2016).

O rastreamento não é indicado para mulheres com menos de 25 anos, já que a maioria das lesões irão regredir espontaneamente de 12 a 24 meses após a infecção, além do impacto psicológico negativo que essas pacientes podem apresentar. Já para mulheres que já passaram dos 65 anos e mantiveram seus exames em dia e obtiveram resultados normais, o risco de desenvolvimento de câncer cervical é bastante reduzido por conta da evolução lenta da doença, dessa forma não existem evidências sobre a efetividade do rastreamento após essa idade (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA)., 2016).

Atualmente, no Brasil, após dois exames normais com intervalo de 1 ano, é recomendado o intervalo de 3 anos para realização do próximo rastreamento. Esse intervalo é recomendado por conta da ausência de evidências da efetividade de exames anuais, já que a doença possui um desenvolvimento lento (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA)., 2016).

Na TABELA 2 são apresentadas as condutas frente aos resultados obtidos no rastreamento. Já na Fig. 2 é demonstrado um desenho esquemático de como pode ocorrer a progressão da infecção pelo HPV, até a formação de lesões de alto grau e câncer de colo uterino.

DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO		FAIXA ETÁRIA	CONDUTA INICIAL
Células escamosas atípicas de significado indeterminado	Possivelmente não neoplásicas (ASC-US)	< 25 anos	Repetir citologia em 3 anos
		Entre 25 e 29 anos	Repetir a citologia em 12 meses
		≥ 30 anos	Repetir a citologia em 6 meses
	Não se podendo afastar lesão de alto grau (ASC-H)		Encaminhar para colposcopia
Células glandulares atípicas de significado indeterminado (AGC)	Possivelmente não neoplásicas ou não se podendo afastar lesão de alto grau		Encaminhar para colposcopia
Células atípicas de origem indefinida (AOI)	Possivelmente não neoplásicas ou não podendo afastar lesão de alto grau		Encaminhar para colposcopia
Lesão de baixo grau (LSIL)		< 25 anos	Repetir citologia em 3 anos
		≥ 25 anos	Repetir a citologia em 6 meses
Lesão de alto grau (HSIL)			Encaminhar para colposcopia
Lesão intraepitelial de alto grau não podendo excluir microinvasão			Encaminhar para colposcopia
Carcinoma escamoso invasor			Encaminhar para colposcopia
Adenocarcinoma <i>in situ</i> (AIS) ou invasor			Encaminhar para colposcopia

Tabela 2. Resultados citopatológicos e condutas clínicas para o rastreamento do câncer do colo uterino, retirado de (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva., 2016).

Figura 15 - Progressão do câncer do colo do útero

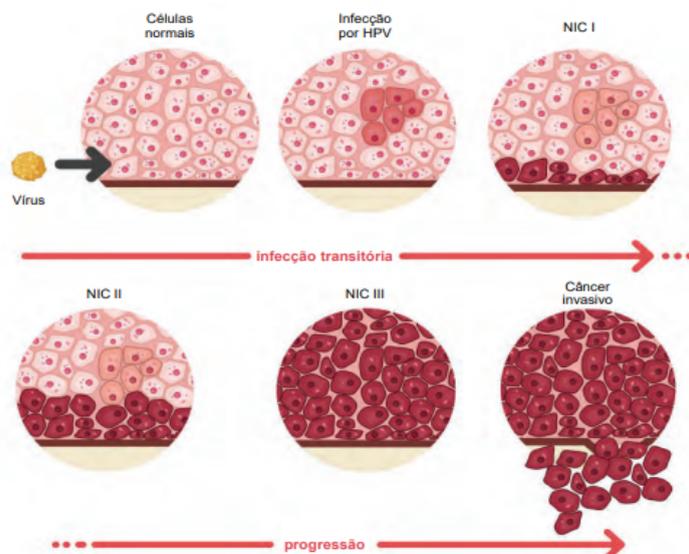


Figura 2. Progressão do câncer do colo de útero, desde seu estágio inicial até lesões de alto grau e câncer invasivo. Retirado de (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), p 44).

2.2 Exames na detecção de HPV

2.2.1 Exames de colposcopia e teste de papanicolau

A colposcopia é um exame com o objetivo de avaliar sistematicamente todo o trato genital inferior, com enfoque em colo do útero, da vagina e da vulva. Esse exame é realizado com um colposcópico, que emite luz intensa e amplia o campo de visão do examinador, permitindo que se analise os vasos sanguíneos das regiões e a camada epitelial dos tecidos. Dessa forma, se faz a distinção entre aspectos coloscópicos normais e anormais encontrados nos pacientes. Em regras gerais, a colposcopia é utilizada em pacientes já positivos no exame de rastreamento, e serve para comprovar o tipo da lesão e o seu grau (CONTROLE INTEGRAL DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO GUIA DE PRÁTICAS ESSENCIAIS., 2016). No exame coloscópico pode ser utilizado ácido acético de 3 a 5% aplicado diretamente sobre o colo uterino, de forma que se acredita que ele atue causando precipitação reversível das proteínas intracelulares e citoqueratinas, que quando condensadas,

levam ao acetobranqueamento (Fig. 3 A,B), ajudando na identificação de lesões no exame, já que células neoplásicas possuem uma maior produção de proteínas (MAIA, RAMON DOS SANTOS., 2022; MUSTAFA et al, 2015).

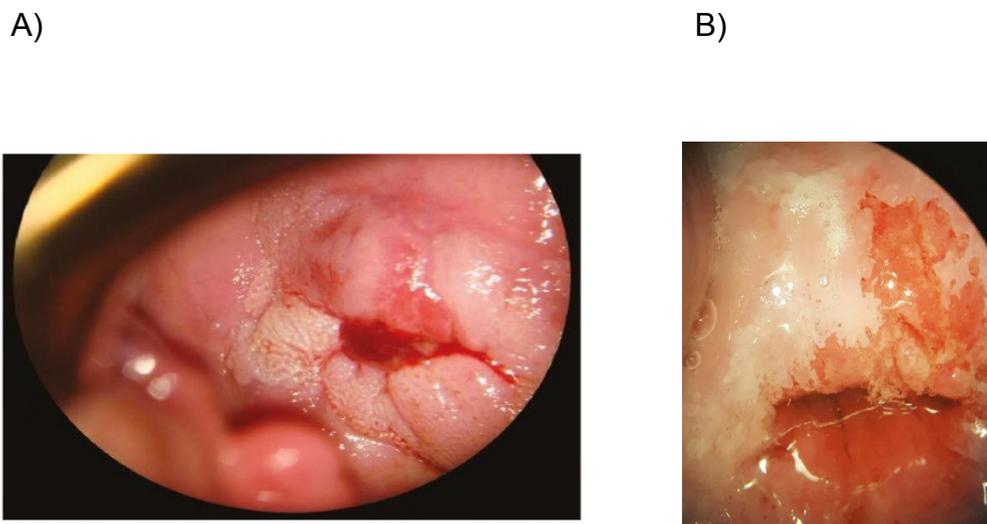


Figura 3. A) Exame colposcópico evidenciando epitélio branco denso papilar com circunvoluções, B) Exame colposcópico também evidenciando epitélio branco denso papilar. Retirado de Doenças do Trato Genital Inferior e Colposcopia: Um enfoque na terapêutica., 2020.

Já o exame de papanicolau (Fig. 4) é atualmente o método mais comum utilizado para a procura de alterações no colo do útero.

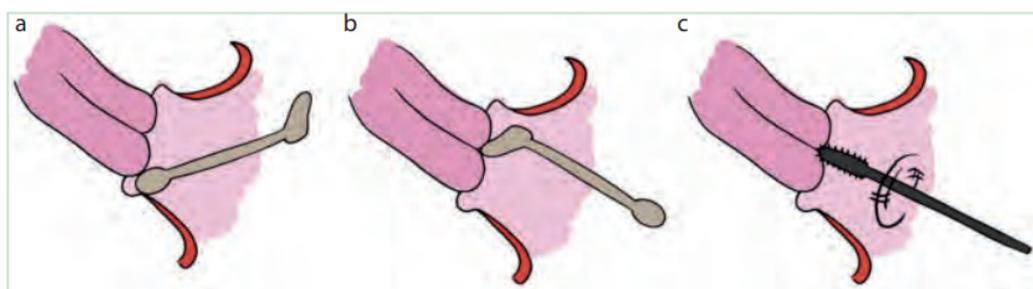


Figura 4. Demonstração da colheita tríplice das amostras cervicovaginais. Retirado de (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

- a- Colheita do fundo de saco posterior da vagina
- b- Colheita da ectocérvice
- c- Colheita da endocérvice

Esse exame consiste em deitar o paciente em posição ginecológica, em seguida a especular é introduzida na vagina para que, após uma movimentação transversal, a vagina fique exposta e só então é usado uma escova cervical para fazer raspagem no endocérvice e coleta do material (Fig 5 a,b).

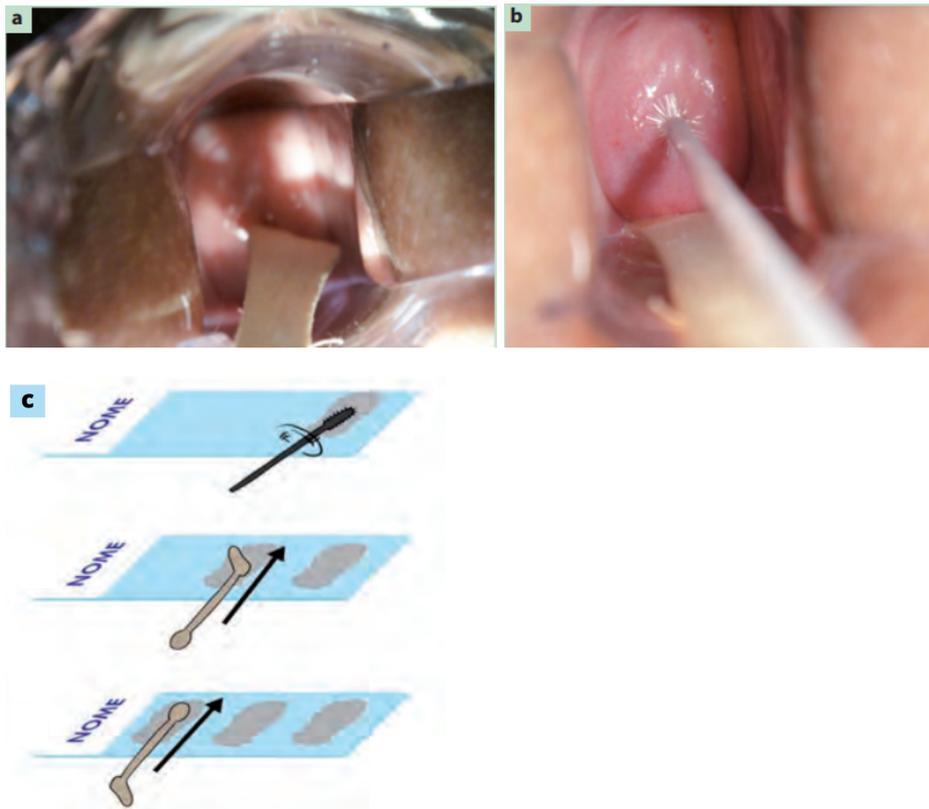


Figura 5. Coleta das amostras citológicas da ectocérvice e da endocérvice. a) sendo a rotação da espátula de Ayre para a coleta de material da ectocérvice. b) colheita da mucosa endocervical com a escovinha. c) modelo de confecção e distribuição das amostras na lâmina citológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Por fim, é realizada a confecção e coloração do esfregaço (Fig. 5 c) , que deve ser lido para identificar a existência de alterações nas células do colo uterino (Fig. 6 A e B) (MAIA, RAMON DOS SANTOS., 2022; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

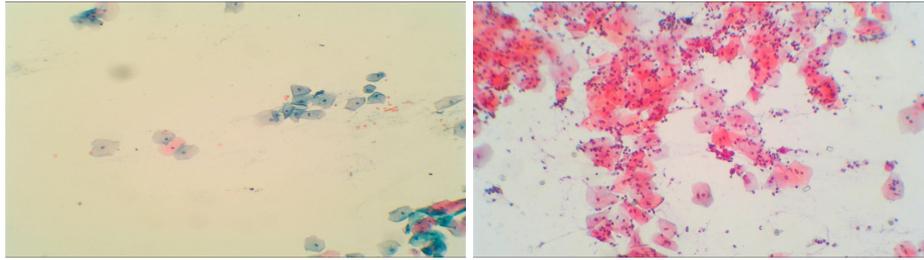


Figura 6. A) Lâmina de exame de Papanicolau com achados normais B) Achados de lesões de nível 3. Imagens concedidas pelo Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares (LPCM).

2.2.2 Técnica PCR

Atualmente a PCR é considerada a técnica de biologia molecular mais utilizada na detecção viral, principalmente se houver baixos níveis quantitativos da molécula de DNA. Contudo, essa técnica possui algumas desvantagens como erros na extração do DNA, falta de primers ou até mesmo falhas na amplificação (GABRIELA, JÉSSICA., 2014). Além disso, a técnica da PCR necessita de um local adequado e profissionais qualificados para garantir o processo correto de amplificação, tais fatores acabam limitando sua implantação em diversos laboratórios e restringe o público que pode ter acesso a tal exame (CAÑADAS, M PAZ *et al.*, 2006).

Para a realização da técnica do PCR é necessário a extração do material genético que se quer avaliar e adicionar esse material em mistura contendo primers (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), DNA polimerase e tampão. O processo para formação de novas moléculas de DNA é feito em um termociclador, onde ocorrem a desnaturação, anelamento e extensão. Por fim, o resultado é lido em gel de agarose ou poliacrilamida por meio da eletroforese (LETO, MARIA DAS GRAÇAS PEREIRA *et al.*, 2011). Este método tem uma grande vantagem, pois, através do PCR podemos selecionar regiões únicas do DNA do HPV, as quais nós tenhamos interesse, como exemplo a região E6 que está ligada com a desnaturação da proteína pd53, ou até mesmo a região L1 que está ligada com a proteína estrutural do vírus.

2.2.3 Ensaio de captura híbrida

A captura híbrida é uma técnica com muitas vantagens por ser reprodutível, simples, rápida e segura. Atualmente, é uma técnica muito utilizada para a detecção de HPV por ser facilmente aplicada em laboratórios por não necessitar de instalações especiais ou de profissionais extremamente capacitados em técnicas moleculares (CAÑADAS, M PAZ *et al.*, 2006).

Para sua realização são coletadas células do trato genital feminino ou masculino, a partir de esfoliação ou de material já coletado para biópsia (CREMONESI, ADRIANA *et al.*, 2004). Atualmente, para a realização do ensaio, são utilizadas sondas de RNA altamente sensíveis para a detecção dos vírus de HPV, que diferenciam os resultados em dois grupos: no grupo A existem sondas para detecção de HPV de baixo risco, já o grupo B possui sondas para a detecção de HPV de médio e alto risco carcinogênico (VALDERRAMA JORDÃO, ANDRÉA *et al.*, 2003). Apesar de todas as vantagens desta técnica, a mesma ainda não detecta todos os tipos de HPV de alto risco, não consegue determinar o tipo viral presente na amostra e possui uma sensibilidade de pelo menos 5 mil cópias/mL, não sendo indicado para revelar a presença do vírus no início da infecção (RODRIGUES, ADRIANA DALPICOLLI *et al.*, 2009).

2.3 Biossensores Para a Detecção do HPV

Biossensores são ferramentas que fazem a junção de biomoléculas imobilizadas (tecidos, células, anticorpos, antígenos, ácidos nucleicos, entre outros) a um transdutor de sinal, permitindo a medição quantitativa ou qualitativa de um analito específico (Fig. 6). Esses sensores vêm sendo estudados para o diagnóstico de doenças, inclusive com detecção *in situ* de agentes infecciosos (CAMPOS-FERREIRA *et al.*, 2013), e possuem 3 componentes em sua estrutura: o bioreceptor, responsável pela ligação com o analito de interesse; o transdutor, responsável por converter o sinal biológico em um sinal mensurável para medições, e por fim, o detector, responsável por amplificar os sinais vindos do transdutor (ARYA *et al.*, 2012). Portanto, o principal objetivo desses dispositivos é produzir um

sinal elétrico proporcional à concentração do analito em estudo, para análise em tempo real.



Figura 5. Componentes do biossensor. Adaptado de (102).

Figura 7. Componentes possíveis em biossensores. Retirado de (ARYA et al., 2012)

Os biossensores estão se mostrando cada vez mais como simples e promissores dispositivos de diagnóstico em comparação com a instrumentação de laboratórios e métodos clássicos. Além disso, mostram-se como alternativas rápidas e baratas para medidas analíticas convencionais, como na medição de substâncias químicas ou biológicas (AVELINO et al., 2022).

2.3.1 Tipos de Biossensores

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o seu bioreceptor (elemento de reconhecimento biológico). Este será responsável pela detecção do analito através de reconhecimento molecular, podendo ser constituído por diversas biomoléculas. Portanto, o bioreceptor é o componente que vai conferir a característica de sensibilidade e especificidade ao biossensor, e como tal, sua escolha deve ser de acordo com qual analito se quer analisar. Para que ocorra uma interação específica, com uma transdução confiável e mensurável, as moléculas do bioreceptor necessitam ser imobilizadas na superfície do sensor. Os biossensores também podem ser classificados de acordo com os transdutores, que são responsáveis pela conversão da interação do analito com o bioreceptor num sinal elétrico mensurável e quantificável. Estes podem ser divididos em diferentes

classes, tais como eletroquímicos, óticos, piezoelétricos e térmicos. Por fim podem ser divididos de acordo com a natureza do bioreconhecimento, sendo os de bioafinidade baseados na ligação seletiva entre biomolécula e analito, e os biocatalíticos baseados na detecção da reação química ou de produtos gerados pela reação química. (BARROSO et al., 2014; HVAŠTKOVŠ, Eli G., 2010)

2.3.2 Biossensores de acordo com seus bioreceptores

2.3.2.1 Genossensor

Os genossensores são biodispositivos capazes de identificar sequências específicas de ácidos nucleicos através do processo de hibridização. Este dispositivo utiliza uma sonda de ácido nucleico imobilizada, como o dispositivo de reconhecimento. É uma ferramenta promissora no diagnóstico clínico por sua determinação rápida e confiável além de poder ser usada em várias outras áreas como nas análises forenses e ambientais (HVAŠTKOVŠ, Eli G., 2010). Esse tipo de sensor foi recentemente utilizado na detecção de pacientes infectados com SARS-CoV-2 como podemos ver em (CATUNDA et al., 2023), tendo um efetivo sensor construído que detecta o material genético do vírus em amostras de saliva de pacientes infectados.

2.3.2.2 Microbiológicos

Os biossensores microbiológicos combinam um transdutor a um microrganismo imobilizado. Esse tipo de sensor possui uma grande vantagem, pois possuem uma capacidade de se adaptarem a condições adversas sem perderem sua sensibilidade, ao contrário de sensores enzimáticos. Atualmente, os microrganismos mais utilizados são algas, bactérias e leveduras, por serem facilmente cultivados por meio da cultura de células. Esses organismos são utilizados pois, em comparação com células mais complexas, as células microbianas são mais facilmente manipuladas e apresentam uma melhor estabilidade in vitro, o

que acaba melhorando o desempenho do biossensor. Apesar dos pontos positivos, existe uma limitação nesse método, pois ele é dependente da difusão do substrato em estudo nas células usadas, logo, sua resposta é lenta em comparação com os outros tipos de sensores (SU, HAIYAN et al., 2012). Este tipo de biossensor é majoritariamente utilizado nas indústrias alimentícias na detecção de microrganismos e substratos contaminantes (PORFÍRIO; GIAROLA; PEREIRA, 2016; BRITO, 2020).

2.3.2.3 Imunossensor

Este tipo de sensor é basicamente relacionado a uma reação imunológica específica, onde teremos um antígeno ou anticorpo imobilizado na superfície do transdutor. Portanto, os imunossensores são altamente seletivos e sensíveis, sendo capazes de identificar baixos níveis do analito alvo, pois seu processo de reconhecimento é único e existe uma forte afinidade de interação entre o antígeno e o anticorpo. Logo, esse tipo de biossensor pode ser usado na detecção de hormônios, drogas, marcadores tumorais, vírus e bactérias (BOJORGE RAMÍREZ; SALGADO; VALDMAN., 2009). Pesquisas recentes demonstram o uso de imunossensores para a detecção de proteínas virais da dengue (APRESENTADA, 2013), e o seu uso na detecção de troponina cardíaca (ZANATO *et al.*, 2016). Apesar dos pontos positivos, esse tipo de sensor possui algumas limitações quanto a estabilidade da bioatividade das moléculas aderidas em sua superfície (DOS SANTOS AVELINO *et al.*, 2018).

2.3.2.4 Enzimático

O princípio de uso desse tipo de biossensor está na catálise enzimática do analito (SERNA COCK, LILIANA *et al.*, 2009). Ele pode tanto ser usado no monitoramento do desaparecimento de um substrato (que irá ser catalisado) ou no aparecimento de novos produtos, advindos da reação. Ele pode usar diferentes sinais de leitura, seja na liberação ou absorção de gases na reação, seja na

liberação de prótons no meio (em emissão), absorção ou reflectância da luz e por emissão de calor (SERNA COCK, LILIANA *et al.*, 2009). Dentre os vários tipos de biossensores, o enzimático é o que mais se destaca comercialmente, o mais popular em uso é o glicosímetro em amostras de sangue, ele usa a glicose oxidase ou a glicose desidrogenase como elemento de reconhecimento (TAGUCHI, MASASHIGE *et al.*, 2014). Apesar do seu elevado uso, esses biossensores apresentam limitações, pois muitos fatores podem alterar o seu desempenho, como o uso em pH ou temperaturas inadequadas (MONOŠÍK *et al.*, 2012).

2.3.3 De Acordo Com a Natureza do Evento de Bioreconhecimento Com o Analito Alvo.

Os dispositivos de bioafinidade são baseados na ligação seletiva entre o analito alvo e o receptor do biossensor, assim um complexo é formado e as alterações físico-químicas são detectadas pelo transdutor, e por fim analisadas (KIRSCH, JEFFREY *et al.*, 2013). Já os dispositivos biocatalíticos são baseados na detecção da reação realizada pelo catalisador (bioreceptor) que estará imobilizado pelo transdutor. Nesse caso teremos um elemento biológico que irá converter o substrato em produtos, e as mudanças vistas nesse evento é que serão medidas e registradas pelo transdutor (RAMASAMY, RAMESH *et al.*, 2014; BARROSO *et al.*, 2014).

2.3.4 De Acordo com o Transdutor

2.3.4.1 Biossensor eletroquímico

São atualmente o tipo de transdutor mais utilizado, ele se baseia no fato que durante o processo de bio-interação entre o analito alvo e a molécula imobilizada, irão ocorrer reações químicas com produção ou consumo de íons, logo a propriedade da solução é alterada e é possível fazer a medição do processo ocorrido (MONOŠÍK *et al.*, 2012). Dependendo da propriedade elétrica em estudo eles ainda

podem ser divididos em 3 subclasses, os condutimétricos ou impedimétricos, que irão medir alterações na condutividade ou resistência elétrica da amostra ao longo da interação das moléculas do bioreceptor com o analito. Teremos os potenciométricos que possuem eletrodos seletivos de íons, que detectam uma resposta elétrica no bioreceptor. E por fim os amperimétricos que irão medir a corrente produzida por um potencial produzido entre dois eletrodos (BARROSO et al., 2014).

2.3.4.2 Biossensores ópticos e piezoelétricos

Os biossensores ópticos permitem a determinação de analitos usando características da radiação óptica (absorção, índice de refração, fluorescência, entre outros) (BOHUNICKY B et al., 2010). Este tipo de transdutores, principalmente os que se utilizam da fluorescência, apresentam uma grande sensibilidade e especificidade, sendo ideais para o uso em biossensores (BARROSO et al., 2014). Já os biossensores piezoelétricos se baseiam na frequência de ressonância de um determinado material (geralmente cristais), onde a variação da frequência está diretamente ligada à variação da massa do analito analisado (TAMAYO et al., 2013).

2.3.4.4 Biossensores Térmicos

Este tipo de biossensor se baseia na produção de energia sob a forma de calor, quando ocorre a interação entre o analito analisado e o bioreceptor escolhido. Logo a variação de entalpia do sistema, tanto por produção ou por absorção de calor, vai ser diretamente proporcional a quantidade de moléculas do analito. Esse tipo de biossensor possui uma enorme vantagem por não precisar de constantes calibrações, pois não sofre alterações de leituras por propriedades óticas e eletroquímicas (BARROSO et al., 2014; LEE et al., 2012).

2.4 Detecção eletroquímica

Atualmente os biossensores eletroquímicos são os tipos mais comuns em uso, pois apresentam vantagens devido a sua fácil portabilidade, custo, eficácia,

miniaturização, facilidade de uso e possibilidade de identificar e quantificar analitos em amostras biológicas. Este tipo de detecção também é muito vantajoso em relação a não ser afetada por componentes na amostra como fluoróforos e partículas, que muitas vezes interferem na detecção espectrofotométrica. Dessa forma, a gama de amostras que podem ser utilizadas é maior do que em outros métodos, podendo até mesmo ser usado sangue periférico sem a interferência de gordura, células ou hemoglobina na amostra (PEDRERO M et al., 2014; RONKAINEN NJ et al., 2010).

Os biossensores eletroquímicos podem ser constituídos de dois ou três eletrodos, onde geralmente é usado um eletrodo de referência composto de prata metálica revestida com uma camada de cloreto de prata. Este eletrodo deve ser mantido a uma certa distância do local da reação a fim de manter um potencial conhecido e estável. Além disso, teremos o contra eletrodo que não permitirá que a corrente, que irá passar através da solução eletrolítica, passe através do eletrodo de referência alternando seu potencial. Já o eletrodo de trabalho terá a função de ser o transdutor da reação química, e será nele que toda a plataforma biossensora será montada (GRIESHABER D et al., 2008)

2.5 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

Essa técnica tem como principal objetivo analisar as propriedades de resistividade de materiais em um sistema de excitação provocado por uma pequena tensão de amplitude sinusoidal. Essa técnica varia sua frequência ao longo de uma vasta gama para obtenção do espectro de impedância e as pequenas alterações na impedância são proporcionais às concentrações dos analitos analisados. Podemos inferir que as alterações nas capacidades resistivas de transferências de elétrons entre a solução e o eletrodo, indicam que o analito se ligou ao eletrodo (GUAN et al., 2004; WANG et al., 2012). Dessa forma, a partir desse sistema podemos criar o diagrama de Nyquist, que nos mostra o comportamento de adsorção, a determinação entre as biomoléculas e as propriedades interfaciais entre o eletrodo e a solução (RIBEIRO et al., 2015).

A)

B)

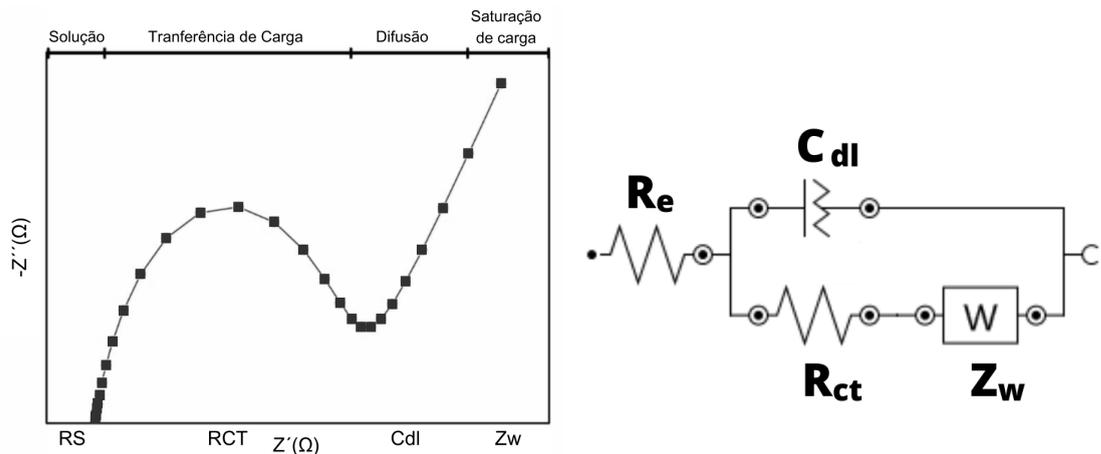


Figura 8. A) Gráfico representativo da resposta idealizada Nyquist. B) Circuito equivalente de Randles.

O diagrama de Nyquist (Fig 8 A) possui duas funções, o gráfico de cole-cole e o diagrama de Bode. Quando realizamos uma leitura impedimétrica um semicírculo será formado no diagrama de Nyquist, dele poderemos retirar dois parâmetros, a resistência à transferência de cargas (R_{ct}) que seria a medida do diâmetro do semicírculo e a frequência de relaxação característica, f_c , obtido no valor vertical máximo do semicírculo. Podemos também ver ao final do semicírculo uma linha reta, que demonstra o processo de transporte de massa por difusão (STUPIN et al., 2021). Desta forma, por meios desses parâmetros podemos descobrir os valores experimentais das reações químicas que irão acontecer no eletrodo, e usando o circuito equivalente de Randles podemos mensurar a quantidade de analitos adsorvidos na superfície do eletrodo, pois foi observado que ele se assemelha ao processo ocorrido na célula eletroquímica quando esta é submetida a leitura de compostos biológicos. Podemos notar que o circuito de Randles representado (fig. 8 B), é formado pelos seguintes componentes: impedância de Warburg (Z_w), resistência à transferência de carga (R_{ct}), resistência da solução (R_s) e pela capacitância de camada dupla (C_{dl}). (STUPIN et al., 2021).

Nesse contexto, a espectroscopia de impedância eletroquímica pode ser representada como uma obstrução ou resistência à passagem de carga elétrica. Esta resistência é característica singular das estruturas das moléculas adsorvidas e da carga do eletrodo utilizado.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar eletroquimicamente por meio da EIE uma plataforma biossensora nanoestruturada baseada em 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS), nanopartículas de ouro (AuNPs) e sonda oligonucleotídica aminada específica para identificar a sequência genômica codificadora do cDNA da proteína P53 em amostras clínicas de pacientes infectadas.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter monocamadas automontadas de MPTS através da adsorção do composto tiolado em eletrodo de trabalho com superfície de ouro;
- Avaliar o processo de montagem do biossensor e sua performance frente a amostras clínicas contendo diferentes concentrações de cDNA do HPV de baixo e alto risco;
- Obtenção de dados estatísticos de desempenho tais como reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade;
- Estudar a linearidade de resposta do sistema frente a diferentes concentrações de cDNA de amostras de HPV;
- Avaliar o controle negativo frente a amostras biológicas comuns.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil), carbodiimida (EDC), N-Hidroxisuccinimida (NHS), L-cisteína (Cys), borohidreto de sódio (NaBH_4) e cloreto de ouro (III) ($\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) foram adquiridos pela

Sigma-Aldrich (EUA). Ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) e ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$) foram obtidos pela VETEC (Brasil). A sonda p53 (5'-amina-TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA-3') foi obtida pela Invitrogen Co Ltd. (EUA). As amostras de cDNA de HPV 6, 18, 31 e 33 utilizadas no presente estudo foram gentilmente fornecidas pelo Instituto Aggeu Magalhães, todas purificadas e entregues em alíquotas concentradas (FIOCRUZ). Todos os produtos químicos foram utilizados sem purificação adicional. Em todos os experimentos foi utilizado água ultrapura obtida pelo sistema de purificação Milli-Q plus (Billerica, EUA). Este projeto trata-se de uma pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética com CAEE: 23698513.0.0000.5190, e projeto financiado pelo programa MCTI/FINEP/MS/SCTIE/DECIT-CT-SAUDE e FNS #1299/2013, de acordo com o previsto na resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

4.2 Síntese e modificação química das nanopartículas de ouro pela L-cisteína (cys)

As nanopartículas de ouro (AuNPs) foram sintetizadas pelo método de síntese pela redução química do $HAuCl_4$ pelo $NaBH_4$ (SU; ZHENG; LI, 2012), com algumas modificações. Inicialmente, 100 mL de $HAuCl_4$ 1 mM é preparado em um béquer e submetido a agitação magnética durante 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, 200 μ L de uma solução aquosa de Cys 25 mM é adicionada ao $HAuCl_4$, permanecendo em agitação por mais 20 minutos. Finalmente, 100 μ L de uma solução de $NaBH_4$ 38,8 mM é adicionado, resultando na imediata obtenção das AuNPs, caracterizada pela mudança de cor da solução (anteriormente amarelada) para uma coloração avermelhada. A adição prévia da Cys ao $HAuCl_4$ favoreceu a imediata funcionalização das nanopartículas pela presença do grupo tiol (-SH) da cisteína ter elevada sensibilidade pelo ouro, se ligando em sua superfície em um processo de quimissorção dando origem a uma ligação Au-S. As AuNPs funcionalizadas permaneceram por mais 1h em agitação magnética, sendo posteriormente estocadas a $5^\circ C \pm 1^\circ C$ até o uso.

4.3 Preparo da plataforma biossensora e leitura de amostras

Inicialmente, a superfície do eletrodo de ouro ($\phi = 2$ mm) foi polida com pasta de alumina (Al_2O_3) em temperatura ambiente, imerso em hipoclorito de sódio (NaClO) também em temperatura ambiente e seguido de várias limpezas com água ultrapura. Subsequentemente, o eletrodo foi imerso em solução etanólica de MPTS 1M (10 min), dando origem à formação de uma monocamada auto montada, o eletrodo foi submetido a leitura eletroquímica rapidamente após sair da solução de MPTS. Em seguida, com o objetivo de ativação dos grupos carboxílicos livres do MPTS, os agentes acopladores EDC NHS (0,4 M e 0,1 M, respectivamente, 1:1, v/v) (FISCHER, MARCEL 2010), foram aplicados ao eletrodo (10 min). Logo, 4 μL da solução de AuNPs funcionalizadas foram adsorvidos no eletrodo (30 min), se ligando ao MPTS devido ao grupo amina livre da Cys presente nas AuNPs e foi realizada nova leitura impedimétrica. Posteriormente, o EDC NHS foi adicionado novamente (10 min) para ativação dos grupos carboxílicos Cys (RAMACHANDRAN; MUTHUVIJAYAN, 2019), seguido da incubação da sonda aminada p53 (30 min) dando origem a uma ligação covalente amida, com nova leitura.

A partir da síntese correta da plataforma biossensora foram aplicadas as amostras de HPV (Fig. 9), as quais foram preparadas previamente com concentrações conhecidas e armazenadas em congelador de temperatura controlada entre -3 e -6°C . Para o HPV 18 foram preparadas amostras nas concentrações de 1 $\text{fg}/\mu\text{L}$, 50 $\text{fg}/\mu\text{L}$, 100 $\text{fg}/\mu\text{L}$, 50 $\text{pg}/\mu\text{L}$ e 100 $\text{pg}/\mu\text{L}$, onde cada amostra precisou ser descongelada até atingir temperatura ambiente para o seu devido uso. Para o processo de leitura foram pipetados 4 μL de cada amostra de HPV no eletrodo de ouro, seguido de 30 minutos de espera antes da leitura impedimétrica ser realizada. Todas as leituras foram executadas em ordem crescente de concentração e antes da adição de nova concentração, o eletrodo foi limpo delicadamente com água ultrapura. Já para o HPV 33 tivemos amostras preparadas nas concentrações de 1 $\text{fg}/\mu\text{L}$, 100 $\text{fg}/\mu\text{L}$, 250 $\text{fg}/\mu\text{L}$ e por fim 1 $\text{fg}/\mu\text{L}$. Para o HPV 6 foram preparadas e lidas amostras de 1 $\text{fg}/\mu\text{L}$, 50 $\text{fg}/\mu\text{L}$, 500 $\text{fg}/\mu\text{L}$ e 1 $\text{fg}/\mu\text{L}$, já para o HPV 31 só foram testadas amostras de 1 $\text{fg}/\mu\text{L}$ para testes de sensibilidade do eletrodo. Todas as amostras de HPV seguiram os mesmos passos

da amostra de HPV 18 e foram lidas em ordem crescente de concentração (AVELINO et al., 2022).

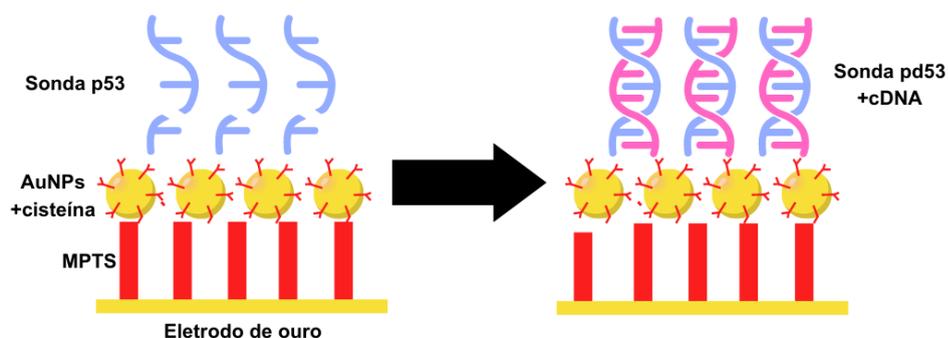


Figura 9. Ilustração da plataforma biossensorial com MPTS- AuNPs-Sonda p53-cDNA de HPV.

4.4 Medidas eletroquímicas

As análises eletroquímicas foram realizadas por meio do potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 128N (Ecochemie, Países Baixos), associado ao software NOVA 1.11, com plotagem dos gráficos usando o OriginPro9. Todos os experimentos foram realizados em uma célula eletroquímica contendo três eletrodos: ouro como eletrodo de trabalho, prata-cloreto de prata (Ag/AgCl) como eletrodo de referência e platina como contra-eletrodo. Todos foram imersos em 20 ml de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 10 mM, usado como sonda redox. Todas as análises foram realizadas no interior de uma gaiola de Faraday. As análises impedimétricas foram registradas na faixa de frequência de 100 mHz a 100 kHz com amplitude do potencial de onda senoidal de 10 mV (OLIVEIRA et al., 2008).

4.5 Simulação do circuito equivalente de Randles nas análises de EIE

Os gráficos de impedância eletroquímica (diagramas de Nyquist) foram submetidos à análise de dados através do programa NOVA 1.11 (AVELINO et al., 2022), com o objetivo de explorar o comportamento interfacial do sistema.

4.6 Medidas de espectrofotometria de UV-VIS

As medidas de absorvância da região ultravioleta das soluções coloidais das nanopartículas de ouro e das funcionalizadas com L-cisteína foram medidas em um espectrofotômetro da marca kasvi (BRASIL) modelo K37-UVVIS usando a Faixa de comprimento de onda 300-800nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Medidas de absorção UV-VIS

O espectro de absorção na região do UV-vis da solução coloidal de AuNPs puras apresentaram um pico de absorção em torno de 525 nm, enquanto as funcionalizadas com Cys demonstraram um deslocamento do pico de absorção para 531 nm (Fig 10), indicando o recobrimento das AuNPs pela Cys (LUTHULI, SIFISO et al., 2013).

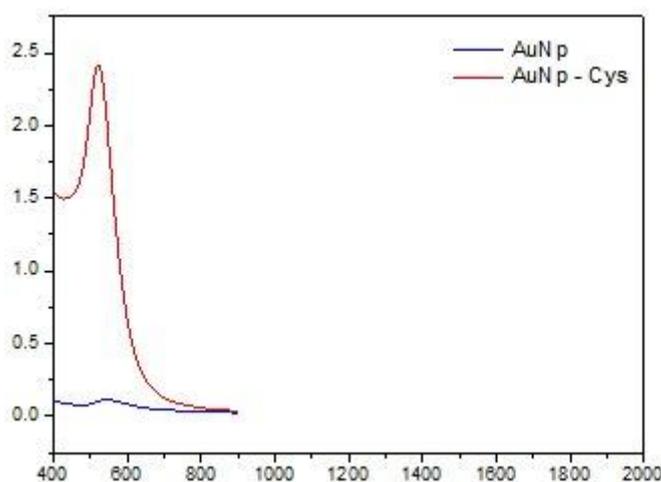


Figura 10. Mudança no do espectro de absorção após funcionalização com Cys.

Nesse sentido, obtivemos uma diminuição da intensidade da banda de absorção UV-Vis. Este resultado indica a agregação das moléculas de L-cisteína à superfície das nanopartículas de Ouro, como foi demonstrado por Luthuli et al 2013 , característica essa que pode ser indicativo de funcionalização pela mudança de

coloração original das partículas, que era avermelhada/roxo e após a modificação com a L-cisteína a mesma adquiriu uma coloração rosa claro, conforme a fig. 11.



Figura 11. Mudança no espectro de absorção após funcionalização com Cys, visualização na alteração de coloração.

5.2 Caracterização Eletroquímica da plataforma biossensora

Podemos observar por meio da fig. 12 a caracterização eletroquímica da plataforma por meio da EIE. Todas as análises ocorreram por meio de sonda redox de ferro-ferrocianeto de potássio $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, que garantiu um meio ideal para o sistema realizar trocas eletrolíticas.

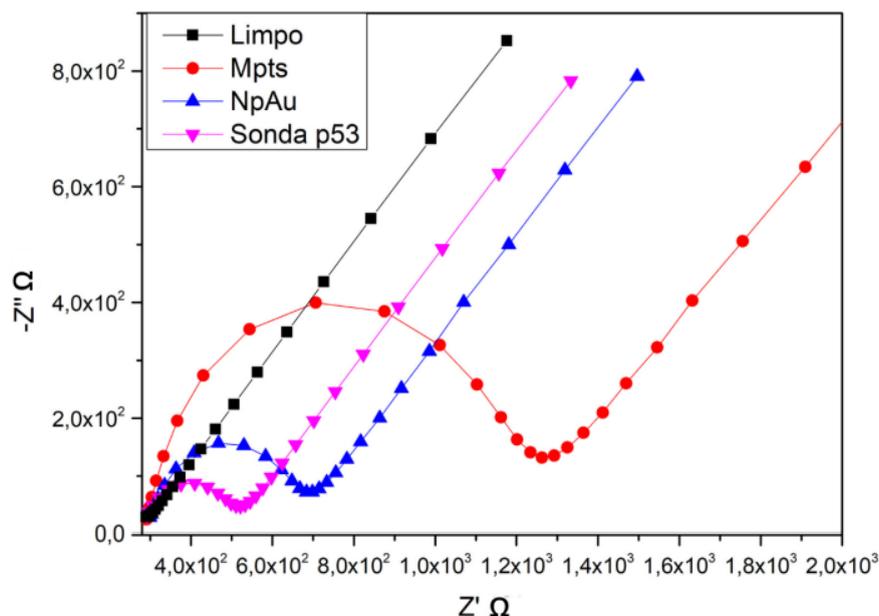


Figura 12. Diagrama de Nyquist referente à caracterização eletroquímica da plataforma biosensora.

A fig. 12 demonstra o diagrama de Nyquist, no qual sua parte linear demonstra o processo de difusão na superfície do eletrodo e podemos retirar a resistência à transferência de cargas (RCT) por meio da medida do diâmetro do semicírculo formado. Desta forma, podemos avaliar as interações que ocorreram no eletrodo de trabalho. Após a limpeza do eletrodo (espectro preto), nenhum semicírculo é observado, indicando uma superfície limpa e livre de compostos contaminantes. Em seguida a adsorção do MPTS faz o RCT aumentar para 1132 Ω, demonstrando um aumento na resposta impedimétrica (espectro vermelho) indicando a formação da monocamada auto montada, fomentada pela interação do grupo tiol (-SH) do MPTS com o ouro do eletrodo de trabalho em um processo de quimissorção, resultando na perda do hidrogênio molecular (HASAN; PANDEY, 2018). Isso se deve a condutância elétrica dos pares de elétrons dos três oxigênios que estão disponibilizados na interação com a camada das nanopartículas e por estarem desemparelhados (ativados pelo EDC/NHS), ou seja, com a camada incompleta, ao serem colocados na sonda redox, forma-se na superfície da monocamada uma nuvem de elétrons, que ao se aplicar o campo elétrico se organizam para fluir do polo negativo para o positivo, aumentando a resistência. De acordo com os trabalhos de Hasan et al 2018 e Su et al 2012, essa é uma resposta esperada para o sistema em questão.

A ativação dos grupos carboxílicos pelos agentes acopladores EDC NHS em associação com as AuNPs (espectro azul) resultou na diminuição da resposta impedimétrica devido ao aumento da condutividade conferida pelas partículas, aumentando o fluxo de elétrons na interface eletrodo-solução redox, demonstrando um RCT de 681 Ω (ISLAM et al., 2020). Por fim, para completar a plataforma nanossensora, foi aplicada novamente os agentes acopladores para a ativação dos grupos carboxílicos da cisteína, presentes na nanopartícula de ouro, seguido de adsorção da sonda P53 (espectro rosa) no eletrodo de trabalho funcionalizado. Houve uma diminuição na resposta do sistema, com RCT de 502 Ω , por conta da criação do éster NHS que anula a carga negativa do grupo carboxílico da AuNPs, permitindo que a ligação amida seja concretizada de forma estável e prolongada, resultando na diminuição do diâmetro do semicírculo, indicando a efetiva adsorção na sonda. Podemos confirmar a resposta da impedância por meio do trabalho de Geng et al 2008, que também confirma a mudança no potencial elétrico por meio de reações químicas e propriedades das moléculas usadas em seu trabalho.

5.3 Análise da sensibilidade do biossensor

A avaliação da sensibilidade do biossensor foi realizada pela adsorção do cDNA de HPV 33 (100 pg/ μ L), obtido a partir de células cervicais de pacientes infectados pelo HPV. Este analito foi submetido na superfície do eletrodo durante 30 minutos. Após a limpeza do eletrodo funcionalizado com água deionizada ultrapura para remover moléculas não adsorvidas, o eletrodo foi novamente submetido a análise impedimétrica. Como demonstrado na Fig. 13, foi observado um aumento no diâmetro do semicírculo de Cole-Cole (espectro vermelho) quando comparado com a resposta impedimétrica do biossensor (espectro preto), indicando a efetiva detecção e sucessiva hibridização da sonda com o cDNA alvo, como podemos notar no trabalho de Avelino et al 2022.

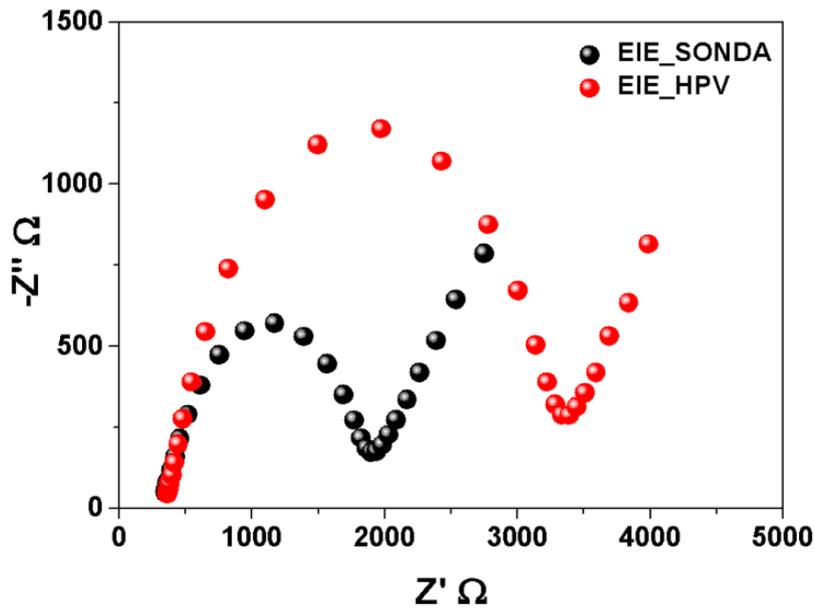


Figura 13. Análise de sensibilidade do biosensor frente a amostra de HPV 33.

5.4 Resultados da espectroscopia de impedância em relação a bioatividade da plataforma

Conforme o andamento do projeto com a montagem e otimização da plataforma nanosensora, foi realizado o estudo mediante as diferentes concentrações das moléculas de HPV, cada amostra foi incubada por um tempo de 30 minutos antes da sua leitura. Podemos concluir por meio da Fig. 14 que o sistema proposto se mostrou responsivo às diferentes concentrações do cDNA de HPV 18, por meio do aumento do diâmetro dos semicírculos conforme o aumento das diferentes concentrações.

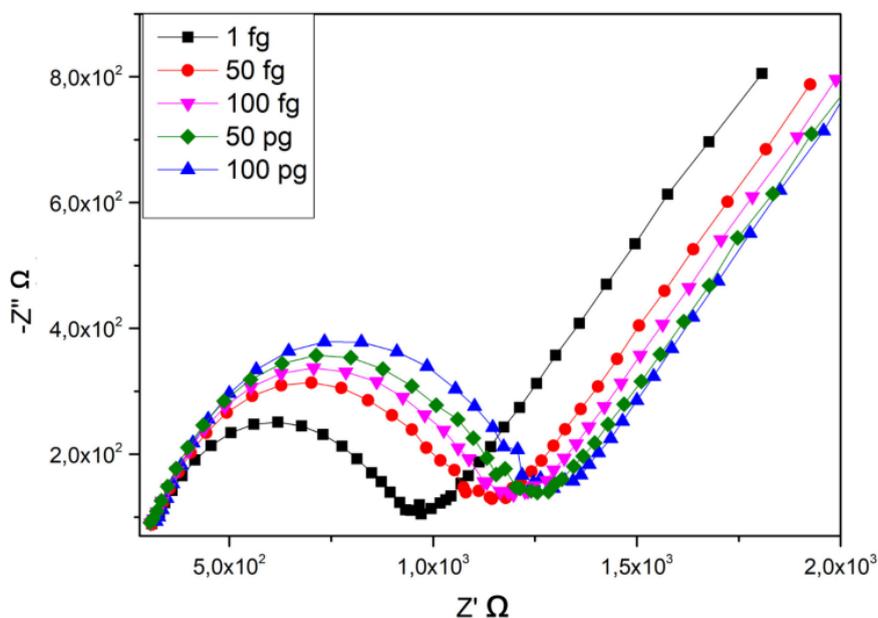


Figura 14. Espectroscopia de impedância com análise de concentração do HPV 18.

As amostras utilizadas foram de 3 tipos de HPV de alto risco (HPV 18, 31 e 33), enquanto apenas uma amostra de HPV de baixo risco foi utilizada, sendo ela o HPV 6. Na fig. 14 podemos observar o aumento nos diâmetros do semicírculo de Cole-Cole de acordo com o aumento da concentração das amostras, indicando a efetiva detecção e sucessiva hibridização da sonda com o cDNA alvo do HPV 18. A sonda se mostrou sensível às diferentes concentrações da amostra do HPV de alto risco (TABELA 3), sendo essas 1 fg/ μ L (preto), 50 fg/ μ L (vermelho), 100 fg/ μ L (rosa), 50 pg/ μ L (verde) e finalmente 100 pg/ μ L (azul). Podemos notar o aumento no RCT referente ao incremento na concentração do analito alvo, dessa forma, é observado que após adicionar a primeira amostra com 1 fg/ μ L, o RCT aumentou de 502 Ω (sonda) para 685 Ω , indicando a sucessiva hibridização da amostra. Após a primeira amostra foi adicionado uma concentração maior de HPV 18, sendo esta 50 fg/ μ L, havendo novamente o aumento do RCT para 842 Ω , logo, podemos identificar o comportamento crescente do aumento no RCT em relação ao aumento de concentração do analito alvo, sendo estes 100 fg/ μ L (910 Ω), 50 pg/ μ L (936 Ω) e 100 pg/ μ L (942 Ω). Comportamento semelhante pode ser observado no trabalho de Avelino et al 2022.

Eletrodo Modificado	Tempo de quimissorção	CPE (μMho)	n	RCT ($\text{K}\Omega$)	RS (Ω)	ZW (μMho)
Eletrodo limpo	-----	5,72 $\pm 0,09$	0,73 $\pm 0,01$	117,3 $\pm 1,15$	299 ± 0	1000,3 $\pm 1,15$
MPTS	10 min	2,05 $\pm 0,7$	0,83 $\pm 0,01$	1132 ± 179	280 $\pm 0,57$	1206,6 $\pm 11,54$
AuNPs	30 min	3,21 $\pm 0,06$	0,74 $\pm 0,01$	681,3 $\pm 7,23$	266,6 $\pm 1,52$	1116,6 $\pm 15,27$
Sonda P53	30 min	3,87 $\pm 0,05$	0,721 $\pm 0,01$	502,3 $\pm 5,13$	251,6 $\pm 2,08$	1007,6 $\pm 0,57$
HPV 18 1 fg/μL	30 min	3,31 $\pm 0,18$	0,73 $\pm 0,03$	685,9 $\pm 5,1$	268,3 $\pm 23,5$	1008,6 $\pm 0,57$
HPV 18 50 fg/μL	30 min	2,69 $\pm 0,09$	0,781 ± 0	842 $\pm 2,64$	269,6 $\pm 1,15$	1076,3 $\pm 58,31$
HPV 18 100 fg/μL	30 min	2,67 $\pm 0,09$	0,78 $\pm 0,01$	910 $\pm 10,44$	269,6 $\pm 3,78$	1009 ± 1
HPV 18 50 Pg/μL	30 min	2,42 $\pm 0,25$	0,79 $\pm 0,01$	936,3 $\pm 19,73$	274 $\pm 8,71$	1009,6 $\pm 1,15$
HPV 18 100 Pg/μL	30 min	2,52 $\pm 0,10$	0,79 $\pm 0,01$	942,6 $\pm 2,30$	267,3 $\pm 2,3$	1076 $\pm 58,88$

Tabela 3. Resultados eletroquímicos da plataforma e teste utilizando material de HPV 18. Todos realizados em triplicata.

Podemos observar na fig.15 A o circuito equivalente de Randles, que foi utilizado para a realização dos ajustes dos gráficos de impedância e utilização dos elementos elétricos dos dados experimentais referentes ao EIE. Portanto, a partir do RCT, extraído do circuito, foi confeccionada a curva de calibração da resposta do sensor (fig. 15 B), como podemos conferir em Ribeiro et al 2015, Avelino et al 2022 . Os dados que foram usados para construção do circuito equivalente foram retirados da fig. 14 e podem ser confirmados pela TABELA 3. Logo, a fig. 15 B demonstra a relação linear do $\Delta RCT\%$ e a concentração das moléculas de HPV 18, esta relação foi obtida pela seguinte equação (COSTA et al., 2017):

$$\Delta RCT \% = \left(\frac{RCT (HPV18) - RCT (Anti-HPV18)}{RCT (Anti-HPV18)} \right) \quad \text{Eq. 1}$$

Onde o RCT (anti-HPV18) é o representante de toda a plataforma (MPTC-NPAus- Sondap53), já o RCT (HPV 18) é referente às mudanças na resistência após as alterações nas concentrações de HPV 18. Dessa forma, é esperado um aumento no RCT proporcional à maior concentração de HPV adsorvido na plataforma, de acordo com Costa et al 2017. Dessa forma, foi visto uma relação satisfatória dos dados referentes ao sensor, já que seu R^2 foi de aproximadamente 0,85 devendo ser o mais próximo possível de 1, sendo a equação usada para calibração e determinação dos valores do RCT como ($y=8,1x + 48,70$) (COSTA et al., 2017). Por fim, podemos inferir por meio dos valores apresentados o limite de detecção da plataforma que ficou estimado em ($LOD= 13,54 \text{ fg}/\mu\text{L}$), sendo um limite bastante baixo e útil na detecção de baixas cargas virais.

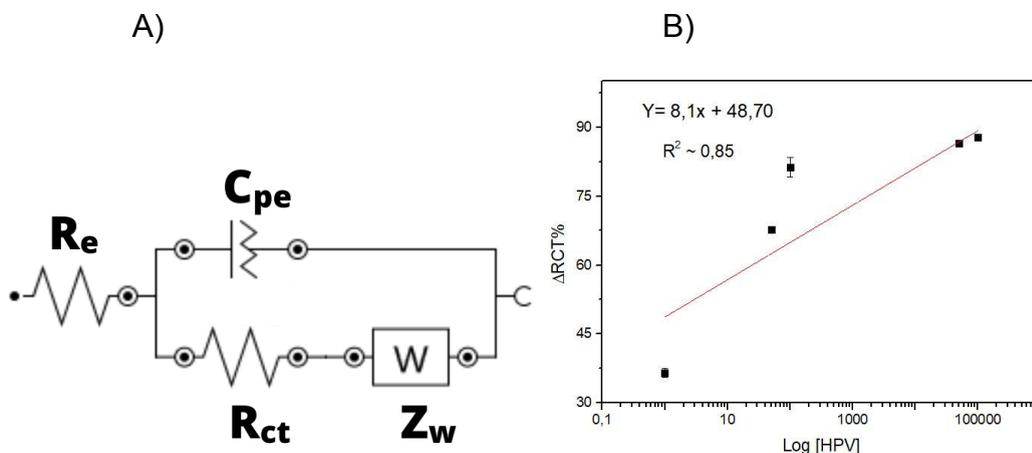


Figura 15. A) Circuito equivalente de Randles, retirados do programa NOVA 1.11. B) Curva de calibração obtida usando os valores de $\Delta RCT\%$.

Já na fig. 16 A, se demonstra a espectroscopia de impedância da plataforma montada junto a leitura do HPV 31, que se mostrou responsivo à plataforma por conta do aumento do diâmetro do semicírculo no Cole-Cole na amostra de 1fg/μL, não foram lidas outras concentrações de amostra do HPV em questão, pois esse tipo de HPV foi utilizado apenas para testar a sensibilidade de plataforma. Enquanto na fig. 16 B temos o espectro de impedância das amostras de HPV 33, esse se mostrou responsivo nas concentrações de 1fg/μL, 100 fg/μL, 250 fg/μL e 1 pg/μL. Ambos são considerados amostras de HPV de alto risco.

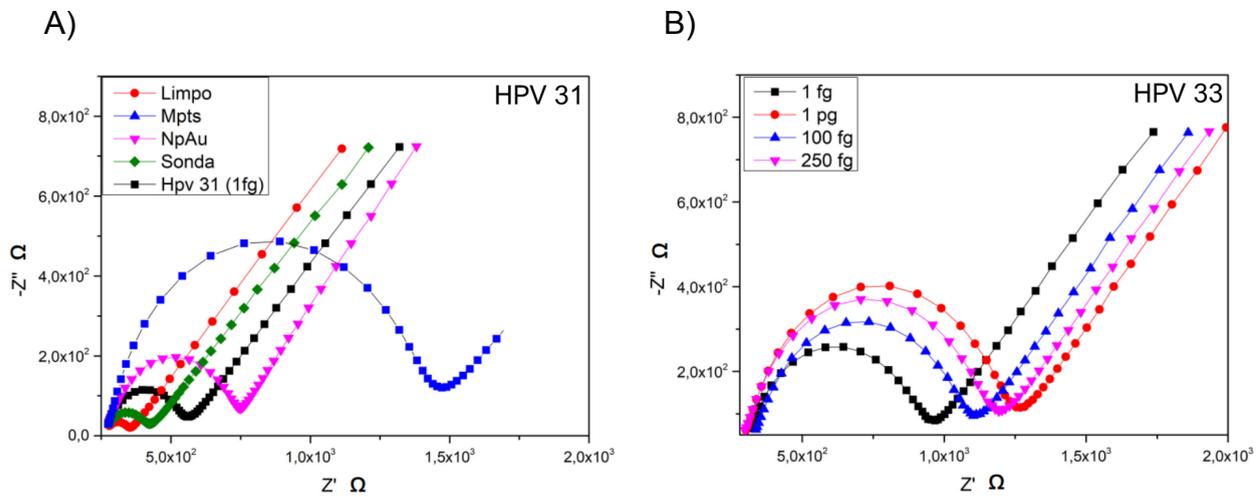


Figura 16. A) Resposta impedimétrica do HPV 31 em 1fg/μL B) Resposta impedimétrica de diferentes amostras do HPV 33 em 1fg/μL, 100 fg/μL, 250 fg/μL e pg/μL.

Por fim, na fig. 17 temos o espectro de impedância da amostra de HPV 6, a única amostra de HPV de baixo risco analisada. Podemos observar o aumento nos diâmetros do semicírculo de Cole-Cole de acordo com o aumento da concentração das amostras, indicando a efetiva detecção e sucessiva hibridização da sonda com o cDNA alvo do HPV 6. As concentrações utilizadas nessa amostra foram 1 fg/μL, 50 fg/μL, 500 fg/μL e 1pg/μL. Contudo, a sonda não se mostrou responsiva para a diferenciação na detecção da amostra de 50 fg/μL e de 500 fg/μL.

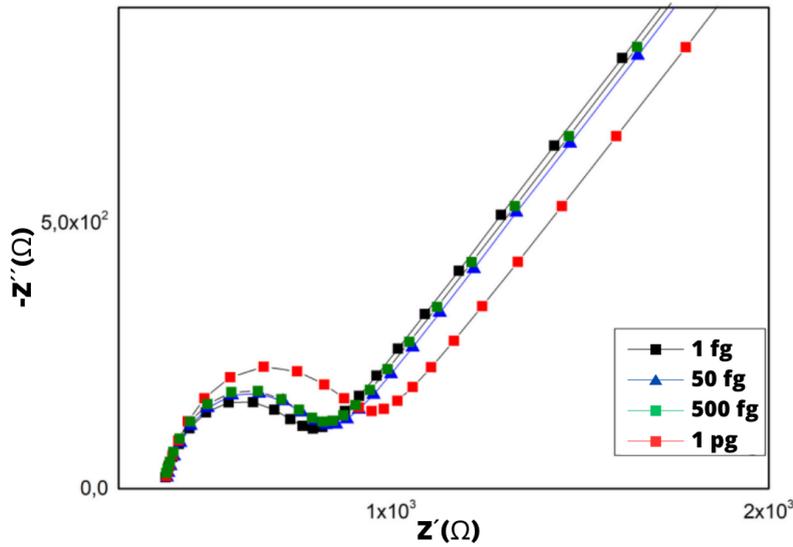


Figura 17. Resposta impedimetrica do HPV 6 em concentrações de 1fg/μL, 50 fg/μL, 500 fg/μL e 1 pg/μL.

5.5 Controle negativo com glicose e ácido cítrico, moléculas comuns.

Nas Figs. 18 A e 18 B, são apresentadas as respostas eletroquímicas respectivamente pela glicose e o ácido cítrico, caracterizadas pela espectroscopia de impedância. Os diferentes graus de resistência de transferência de carga para a sonda redox fornecem informações úteis acerca das propriedades interfaciais do biossensor.

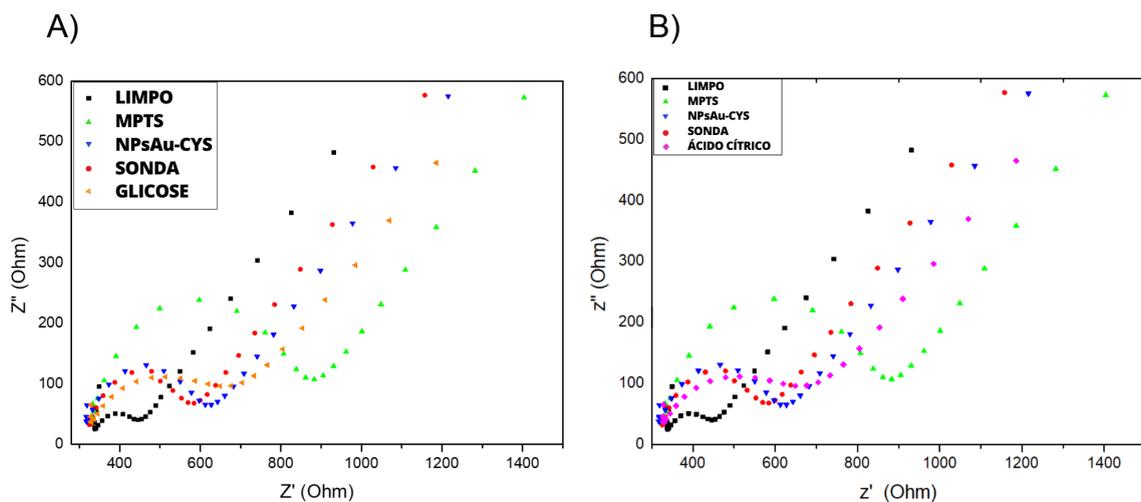


Figura 18. A) Resposta eletroquímica do controle negativo com glicose B) resposta eletroquímica do controle com ácido nítrico.

Estas moléculas foram empregadas para testar a especificidade frente a interferentes que não sejam o analito de interesse. As concentrações usadas foram, uma solução de glicose 1 mM e ácido cítrico 1 mM, respectivamente conforme a fig. 18 A e 18 B, e não foi observado um aumento no diâmetro do semicírculo de Cole-Cole (espectro rosa e laranja) quando comparado com a resposta impedimétrica da sonda (espectro vermelho), evidenciando a não ligação dos analitos a camada anterior. Portanto, a sonda não se mostrou responsiva ao controle negativo de moléculas biológicas comuns, sendo um ponto positivo já que as amostras podem conter contaminantes.

5.6 Reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade da plataforma biossensora

Podemos confirmar a reprodutibilidade da plataforma por meio dos testes realizados em triplicata no estudo do HPV 18 (fig. 14), e na realização dos experimentos envolvendo os outros tipos de HPV, nos quais a plataforma se mostrou reprodutível e responsiva aos analitos alvo. Juntamente, estatisticamente a plataforma se mostrou reprodutível por ter uma variação de resposta pequena em relação ao resultado de sua impedância. Já no quesito sensibilidade a plataforma se mostrou sensível às concentrações mínimas de HPV, se mostrando responsiva em amostras com 1×10^{-18} g/ μ L tendo LOD de 13,54 fg/ μ L. Concluindo, a especificidade da mesma foi comprovada ao não responder a moléculas biológicas comuns tais quais glicose e ácido cítrico, demonstrando uma especificidade ao analito alvo e a não interferência de outras moléculas. Assim como no trabalho de Avelino et al 2022, a plataforma se mostrou responsiva para o seu analito alvo.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, um biossensor eletroquímico baseado em monocamadas automontadas de MPTS, nanopartículas de ouro modificadas com L-cisteína e sonda aminada p53 foi desenvolvido para detecção de cDNA de HPV em amostras de

células cervicais. As nanopartículas sintetizadas demonstraram o efetivo recobrimento com Cys, indicado pelo aumento da condutividade do sistema, bem como a imobilização da sonda. A análise eletroquímica da montagem do biossensor indicou o recobrimento do eletrodo pelos componentes, revelado pela variação do diâmetro do semicírculo. A interação do biossensor com as amostras de cDNA do HPV 33, 31, 18 e 6 indicou a bem-sucedida detecção do analito e suas concentrações, resultando no aumento da resistividade do sistema, e por sua vez, aumento do diâmetro do semicírculo. Este biossensor se mostrou mais específico, sensível e reprodutível para a detecção e análise do HPV 18, sendo deste tipo de HPV as melhores respostas da plataforma biossensora. Deste modo a reprodução estatística do biossensor se mostrou satisfatória, e seu limite de detecção demonstrou poder detectar cargas virais mínimas de HPV (LOD=13,54 fg/ μ L), sendo este fator muito importante para pacientes com baixas cargas virais. Destarte, os resultados obtidos sugerem uma possível futura aplicação do biossensor desenvolvido como técnica de apoio a técnicas consideradas “padrão ouro”, auxiliando de maneira rápida e sensível a identificação de analitos relacionados ao HPV.

REFERÊNCIAS

APRESENTADA, Dissertação. ALESSANDRA FIGUEIREDO Imunossensores potenciométricos para a detecção da proteína NS1 do vírus da dengue. [s. l.], 2013.

ARYA, Sunil K. *et al.* Recent advances in ZnO nanostructures and thin films for biosensor applications: review. **Analytica chimica acta**, [s. l.], v. 737, p. 1–21, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2012.05.048>. Acesso em: 8 abr. 2023.

AVELINO, Karen Y.P.S. *et al.* Impedimetric sensing platform for human papillomavirus and p53 tumor suppressor gene in cervical samples. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 100411, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.JSAMD.2021.100411>

BARROSO, Alexandre Filipe Águas da Avó. Nanobiossensores: conceito e aplicações na avaliação de parâmetros bioquímicos e diagnóstico precoce de patologias. **Dissertação de Mestrado, Universidade do Algarve**, [s. l.], p. 54, 2014. Disponível em: [https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/8304/1/Dissertação Alexandre Barroso.pdf](https://sapientia.ualg.pt/bitstream/10400.1/8304/1/Dissertação%20Alexandre%20Barroso.pdf)

BOHUNICKY, Brian; MOUSA, Shaker A. Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. **Nanotechnology, science and applications**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–10, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/NSA.S13465>. Acesso em: 8 abr. 2023.

BOJORGE RAMÍREZ, N; SALGADO, A M; VALDMAN, B. THE EVOLUTION AND DEVELOPMENTS OF IMMUNOSENSORS FOR HEALTH AND ENVIRONMENTAL MONITORING: PROBLEMS AND PERSPECTIVES. [s. l.], v. 26, n. 02, p. 227–249, Disponível em: www.abeq.org.br/bjche. Acesso em: 8 abr. 2023.

BORDIGONI, Alexia *et al.* Development and validation of a multiplex qPCR assay for detection and relative quantification of HPV16 and HPV18 E6 and E7 oncogenes. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83489-2>

BRITO, Francisca Airline Esteves de. Desempenho e estabilidade de biossensor eletroquímico utilizando eletrodos descartáveis para detecção de *Salmonella* sp. em

leite. [s. l.], 2020. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/52226>. Acesso em: 13 abr. 2023.

CAMPOS-FERREIRA, Danielly S. *et al.* Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16 detection in real samples. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 804, p. 258–263, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2013.10.038>

CAÑADAS, M Paz *et al.* Evaluación de las técnicas de detección del VPH en los programas de cribado para cáncer de cuello uterino. **Salud Pública de México**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 373–378, 2006b. Disponível em: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342006000500003&lng=es&nrm=iso&tlng=es. Acesso em: 7 abr. 2023.

CATUNDA, Lucas Gomes da Silva *et al.* SARS-CoV-2 detection enabled by a portable and label-free photoelectrochemical genosensor using graphitic carbon nitride and gold nanoparticles. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 451, n. February, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2023.142271>

CONTROLE INTEGRAL DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO GUIA DE PRÁTICAS ESSENCIAIS. [s. l.], Disponível em: www.paho.org. Acesso em: 8 abr. 2023 a.

CREMONESI, Adriana *et al.* REPRODUTIBILIDADE DO TESTE DE CAPTURA HÍBRIDA DE SEGUNDA GERAÇÃO NA DETECÇÃO DE HPV DE ALTO RISCO EM MATERIAL CERVICOVAGINAL DE AUTOCOLETA REPRODUCIBILITY OF HYBRID CAPTURE II SECOND GENERATION FOR HIGH GRADE HPV DETECTION IN CERVICO-VAGINAL SELF-COLLECTING SAMPLES. **DST-J bras Doenças Sex Transm.** [S. l.: s. n.], 2004.

DA ROSA, Maria Inês *et al.* Papilomavírus humano e neoplasia cervical. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 953–964, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2009000500002>. Acesso em: 8 abr. 2023.

DE VILLIERS, Ethel Michele *et al.* **Classification of papillomaviruses.** [S. l.: s. n.], 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>

DETECÇÃO PRECOCE DO CÂNCER MINISTÉRIO DA SAÚDE INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA) MINISTÉRIO

DA SAÚDE INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). [s. l.], Disponível em: <http://controlecancer.bvs.br/>. Acesso em: 8 abr. 2023.

DOS SANTOS AVELINO, Karen Yasmim Pereira *et al.* Impedimetric gene assay for BCR/ABL transcripts in plasmids of patients with chronic myeloid leukemia. **Mikrochimica acta**, [s. l.], v. 185, n. 9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00604-018-2958-4>. Acesso em: 8 abr. 2023.

ENTIAUSPE, LUDMILA *et al.* PAPILOMAVÍRUS HUMANO: UMA ABORDAGEM ATUAL. **VITTALLE - Revista de Ciências da Saúde**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 51–62, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.14295/VITTALLE.V18I2.7666>. Acesso em: 8 abr. 2023.

FERREIRA, DANIELLY. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE DESENVOLVIMENTO DE GENOSENSORES PARA O DIAGNÓSTICO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV). [S. l.: s. n.], [s. d.].

FISCHER, Marcel J.E. Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 627, p. 55–73, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-670-2_3. Acesso em: 7 abr. 2023.

GABRIELA, Jéssica; ASSUNÇÃO, Fernandes. ANÁLISE COMPARATIVA DAS TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA GENOTIPAGEM DO PAPILOMA VÍRUS HUMANO-HPV. [S. l.: s. n.], [s. d.].

GENG, Ping *et al.* Self-assembled monolayers-based immunosensor for detection of Escherichia coli using electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 53, n. 14, p. 4663–4668, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2008.01.037>

GRIESHABER, Dorothee *et al.* Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 1400–1458, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/S80314000>. Acesso em: 8 abr. 2023.

GUAN, Jian-Guo; MIAO, Yu-Qing; ZHANG, Qing-Jie. Impedimetric biosensors. **Journal of bioscience and bioengineering**, [s. l.], v. 97, n. 4, p. 219–226, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70195-4](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70195-4). Acesso em: 8 abr. 2023.

HASAN, A.; PANDEY, L. M. Self-assembled monolayers in biomaterials. **Nanobiomaterials: Nanostructured Materials for Biomedical Applications**, [s. l.], p. 137–178, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100716-7.00007-6>

HVASTKOV, Eli G.; BUTTRY, Daniel A. Recent advances in electrochemical DNA hybridization sensors. **The Analyst**, [s. l.], v. 135, n. 8, p. 1817–1829, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C0AN00113A>. Acesso em: 8 abr. 2023.

ISLAM, Tamanna *et al.* Metal Nanoparticles for Electrochemical Sensing: Progress and Challenges in the Clinical Transition of Point-of-Care Testing. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 25, n. 24, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25245787>. Acesso em: 8 abr. 2023.

KIRSCH, Jeffrey *et al.* Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine. **Chemical Society reviews**, [s. l.], v. 42, n. 22, p. 8733–8768, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C3CS60141B>. Acesso em: 8 abr. 2023.

LEE, Wonhee; LEE, Jinyoung; KOH, Joonyoung. Development and applications of chip calorimeters as novel biosensors. **Nanobiosensors in Disease Diagnosis**, [s. l.], v. 1, p. 17–29, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/NDD.S26438>. Acesso em: 8 abr. 2023.

LETO, Maria das Graças Pereira *et al.* Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 306–317, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000200014>. Acesso em: 7 abr. 2023.

LUÍS, Francisco; PAES, Almeida. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM

PATOLOGIA ASSOCIAÇÃO DO Papilomavírus humano COM OS TUMORES ESOFÁGICOS E GÁSTRICOS RECIFE 2017. [s. l.], 2017.

LUTHULI, Sifiso D. *et al.* Cysteine-capped gold nanoparticles suppress aggregation of proteins exposed to heat stress. **IUBMB life**, [s. l.], v. 65, n. 5, p. 454–461, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/IUB.1146>. Acesso em: 8 abr. 2023.

MAIA, Ramon dos Santos; PASSOS, Sandra Godoi de. O CONHECIMENTO DAS MULHERES SOBRE O EXAME PAPANICOLAU NA PREVENÇÃO DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO. [s. l.], 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.5281/ZENODO.6946353>. Acesso em: 7 abr. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Técnico em citopatologia**. [S. l.: s. n.], 2012.

MIYASAKI, Marcelo Takio Almeida; JUNIOR, Lacy Cardoso de Brito. A importância do diagnóstico primário de lesões sugestivas de efeito citopático compatível com HPV em colo uterino – Uma breve revisão / The importance of the primary diagnosis of suggestive lesions of cytopathic effect compatible with HPV in uterine – a short on revision. **Brazilian Journal of Development**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 70922–70933, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n7-321>

MONOŠÍK, Rastislav; STREĎANSKÝ, Miroslav; ŠTURDÍK, Ernest. Biosensors - classification, characterization and new trends. **Acta Chimica Slovaca**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 109–120, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2478/v10188-012-0017-z>

MUSTAFA, Reem A. *et al.* **Systematic reviews and meta-analyses of the accuracy of HPV tests, visual inspection with acetic acid, cytology, and colposcopy**. [S. l.]: Elsevier Ireland Ltd, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2015.07.024>

N DE LIMA CAMARA, Geni N *et al.* Papilomavírus humanos Os papilomavírus humanos-HPV: histórico, morfologia e ciclo biológicoUniversitas Ciências da Saúde. [S. l.: s. n.], [s. d.].

OLIVEIRA, Maria D.L. *et al.* Electrochemical evaluation of lectin–sugar interaction on gold electrode modified with colloidal gold and polyvinyl butyral. **Colloids and**

Surfaces B: Biointerfaces, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 13–19, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2008.05.002>

OLIVEIRA, Marta Laura da Silva *et al.* Imunização contra o HPV no processo de prevenção ao câncer do colo de útero: uma revisão de literatura / Immunization against HPV in the process of preventing cervical cancer: a literature review. **Brazilian Journal of Development**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 70189–70197, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n7-274>

ONON, Toli S. **History of human papillomavirus, warts and cancer: What do we know today?**. [S. l.]: Bailliere Tindall Ltd, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2011.05.001>

PEDRERO, María; CAMPUZANO, Susana; PINGARRÓN, José M. Electrochemical Biosensors for the Determination of Cardiovascular Markers: a Review. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 1132–1153, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ELAN.201300597>. Acesso em: 8 abr. 2023.

PORFÍRIO, Flávia F.O.; GIAROLA, Juliana De Fátima; PEREIRA, Arnaldo César. Biosensor and beverages - review. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 1366–1391, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160097>

PUROHIT, Buddhadev *et al.* Biosensor nanoengineering: Design, operation, and implementation for biomolecular analysis. **Sensors International**, [s. l.], v. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.SINTL.2020.100040>

RAMACHANDRAN, Balaji; MUTHUVIJAYAN, Vignesh. Cysteine immobilisation on the polyethylene terephthalate surfaces and its effect on the haemocompatibility. **Scientific reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/S41598-019-53108-2>. Acesso em: 7 abr. 2023.

RAMASAMY, Ramesh *et al.* Biosensors in clinical chemistry: An overview. **Advanced biomedical research**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 67, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/2277-9175.125848>. Acesso em: 8 abr. 2023.

REVISTA ATUALIZA SAÚDE REVISTA ELETRÔNICA DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA. [s. l.], Disponível em: www.atualizacursos.com.br. Acesso em: 8 abr. 2023.

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**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 529–546, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1983-41952015000400007>

RODRIGUES, Adriana Dalpicolli *et al.* Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas Comparison of hybrid capture and PCR for HPV detection in clinical samples. [s. l.],

RONKAINEN, Niina J.; HALSALL, H. Brian; HEINEMAN, William R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society reviews**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 1747–1763, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/B714449K>. Acesso em: 8 abr. 2023.

SERNA COCK, Liliana *et al.* Use of Enzymatic Biosensors as Quality Indices: A Synopsis of Present and Future Trends in The Food Industry. **Chilean journal of agricultural research**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 270–280, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.4067/S0718-58392009000200017>. Acesso em: 8 abr. 2023.

STUPIN, Daniil D. *et al.* Bioimpedance Spectroscopy: Basics and Applications. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, [s. l.], v. 7, n. 6, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1021/ACSBMATERIALS.0C01570/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AB0C01570_0017.GIF. Acesso em: 8 abr. 2023.

SU, Haiyan; ZHENG, Qiuling; LI, Haibing. Colorimetric detection and separation of chiral tyrosine based on N-acetyl-L-cysteine modified gold nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry**, [s. l.], v. 22, n. 14, p. 6546–6548, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c2jm16746h>

SUMMARY, Resumo /. HPV detection in the oral and genital mucosa of women with positive histopathological exam for genital HPV, **by means of the PCR** **BRAZILIAN JOURNAL OF OTORHINOLARYNGOLOGY**. [S. l.: s. n.], 2009. Disponível em: <http://www.rborl.org.br/>.

TAGUCHI, Masashige *et al.* Nanomaterial-mediated biosensors for monitoring glucose. **Journal of Diabetes Science and Technology**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 403–411, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1932296814522799/FORMAT/EPUB>

TAMAYO, Javier *et al.* Biosensors based on nanomechanical systems. **Chemical Society Reviews**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 1287–1311, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C2CS35293A>. Acesso em: 8 abr. 2023.

VALDERRAMA JORDÃO, Andréa *et al.* Importância da aplicação de critérios morfológicos não-clássicos para o diagnóstico citológico de papilomavírus humano Application of non-classical morphological criteria in the cytological diagnosis of human papillomavirus. [s. l.],

VISTA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO: UMA ABORDAGEM ATUAL. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://periodicos.furg.br/vittalle/article/view/7666/4981>. Acesso em: 8 abr. 2023.

WANG, Yixian; YE, Zunzhong; YING, Yibin. New Trends in Impedimetric Biosensors for the Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria. **Sensors (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 3449, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/S120303449>. Acesso em: 8 abr. 2023.

ZANATO, Nicole *et al.* UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE TROPONINA CARDÍACA UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE OURO E NANOPLAQUETAS DE GRAFITE. [s. l.], 2016.