



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

MARIA ELIZA VIEIRA DE SANTANA

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE
SONDAS DE DNA EM PLATAFORMAS BIOSSENSORAS
PARA IDENTIFICAÇÃO DO DENV-3**

Recife/PE

2024

MARIA ELIZA VIEIRA DE SANTANA

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE
SONDAS DE DNA EM PLATAFORMAS BIOSSENSORAS
PARA IDENTIFICAÇÃO DO DENV-3**

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: Valeria Visani

Coorientador: Ian Santana Resque

Recife/PE

2024

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

Santana, Maria Eliza Vieira de.

Avaliação de métodos de imobilização de sondas de DNA em plataformas biossensoras para identificação do DENV-3 / Maria Eliza Vieira de Santana. - Recife, 2024.

51 p. : il.

Orientador(a): Valeria Visani

Coorientador(a): Ian Santana Resque

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

1. Biossensor. 2. Arbovírus. 3. Dengue 3. 4. Bioconjugação. 5. Glutational. I. Visani, Valeria. (Orientação). II. Resque, Ian Santana. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

MARIA ELIZA VIEIRA DE SANTANA

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE SONDAS DE
DNA EM PLATAFORMAS BIOSENSORAS PARA IDENTIFICAÇÃO
DO DENV-3**

Graduação em Biomedicina da
Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dra Valeria Visani
iLIKA/ Laboratório de Biotecnologia

Prof. Dra. Patrícia d'Emery Alves dos Santos
iLIKA e NVC/CAA UFPE- Campus Caruaru

Prof. Dra. Carolina Ribeiro Córdula
iLiKA/UFPE

遅れて申し訳ありませんが、私は人生
の道に迷ったのではないかと心配して
います
- はたけカカシ, 六代目火影

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Valéria Visani, por todo o apoio nesses quatro anos de aprendizado, todo o suporte que recebi principalmente no início da minha caminhada nesse curso superior me manteve firme em busca dos meus objetivos, além de todo conhecimento repassado, atenção, paciência e todo o auxílio prestado para o melhor desenvolvimento dos meus projetos.

Agradeço aos colegas de laboratório, Baby Shark, Bea O., Bia S., Gabi e Andressa e Ian por toda ajuda nos momentos mais emergenciais e todas as conversas e risadas que aliviaram o peso em minhas costas.

Agradeço o iLKA, ao professor Zé Luiz, e principalmente ao laboratório de biotecnologia, que se tornou praticamente minha segunda casa e por ser o ambiente que mais me desenvolveu como profissional.

Agradeço aos técnicos, por estarem sempre dispostos a oferecer ajuda e meios para o desenvolvimento dos projetos, e os funcionários pelo zelo e carinho depositado em simples cumprimentos diários.

Agradeço aos meus pais, Alda e Elias, por me guiarem desde o momento do meu nascimento, pela confiança depositada em mim e pela dedicação para me fornecer os recursos necessários para a realização dos meus sonhos.

Aos meus irmãos, David e Elias, um pelo companheirismo desde criança, o outro pela nova experiência de cuidado e atenção, e ambos pelas brigas por comida.

Agradeço às minhas colegas de apartamento, Soraya, Brenda, Ana Júlia e Letícia, pelos momentos de conversa após os dias cansativos e pelas risadas genuínas que ecoavam por todos os ambientes nos momentos de diversão.

Finalmente, agradeço aos meus amigos que fui presenteada ao entrar no curso, como Artur, Lucas e vários outros que me ofereceram apoio nessa caminhada e a todos que participaram direta e indiretamente da minha formação.

SANTANA, Maria Eliza Vieira. **Avaliação de métodos de imobilização de sondas de DNA em plataformas biossensoras para identificação do DENV-3.** 2024. 51. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

Nos últimos anos, o vírus da dengue 3 (DENV3) reapareceu no cenário epidemiológico trazendo preocupação aos profissionais da saúde devido à falta de um método de diagnóstico específico, portátil, de baixo custo e fácil manuseio, que permita a rapidez na identificação e no fornecimento do tratamento imediato para os infectados. Sendo assim, é de suma importância o desenvolvimento de uma plataforma biossensora através da imobilização de uma sonda de DNA, que ofereça sensibilidade e especificidade para a identificação do alvo. Com o intuito de construir um biossensor com uma sonda de DENV-3 imobilizada covalentemente em sua superfície, foi incorporado um filme polimérico de glutationa na superfície do eletrodo serigrafado de carbono produzido manualmente. Em sequência, foram testadas duas metodologias de bioconjugação para formação da ligação covalente da fita simples de DNA (ssDNA) do DENV-3 com o eletrodo modificado com o polímero. Em uma das metodologias foi utilizada a combinação do N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) com o N-Hidroxissuccinimida (NHS) e na outra, foi utilizado o cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metil-morfolínio (DMTMM). Ambas as substâncias permitiram uma ligação covalente entre a extremidade carboxílica da glutationa, e a extremidade aminada da ssDNA. As análises executadas permitiram a definição de parâmetros, como velocidade de 50 mV/s e o uso de PBS pH 8,0, para a construção do filme polimérico no eletrodo. A avaliação de variáveis, como tempo e concentração, permitiram a padronização de fatores como 10 minutos e 5 mM/8 mM para o EDC/NHS, 16 horas e 2,5% para o DMTMM, permitindo a ligação mais forte entre as moléculas. Assim, a análise comparativa entre ambos os ativadores foi realizada através da interpretação das respostas na caracterização através da Voltametria de Pulso Diferencial (DPV). A leitura da oxidação do azul de metileno (MB) demonstrou a formação da ligação covalente da ssDNA na superfície modificada com ambos os ativadores, mas apresentou especificidade após a hibridização dos alvos apenas no biossensor com o EDC/NHS. Através desse estudo foi possível nortear futuros trabalhos, que contribuam para o desenvolvimento de um dispositivo rápido, específico e point-of-care para a detecção da DENV-3.

Palavras-chave: Biossensor. Arbovírus. Dengue 3. Bioconjugação. Glutaciona.

SANTANA, Maria Eliza Vieira. **Avaliação de métodos de imobilização de sondas de DNA em plataformas biossensoras para identificação do DENV-3.** 2024. 51. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

ABSTRACT

In recent years, the dengue virus 3 (DENV3) has reappeared on the epidemiological scene, causing worries for health professionals due to the lack of a specific, portable, low-cost and easy-to-use diagnostic method that allows for rapid identification and the provision of immediate treatment for those infected. It is thus of the highest importance to build a biosensor platform by immobilizing a DNA probe, which provides sensitivity and specificity for identifying the target. In order to produce a biosensor with a DENV-3 probe covalently immobilised on its surface, a polymeric film of glutathione, which is a changing agent, was incorporated onto the surface of the manually produced screen-printed carbon electrode. Next, two bioconjugation methodologies were tested to form a covalent bond between the DENV-3 single strand DNA (ssDNA) and the polymer-modified electrode. One method used a combination of N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC) and N-Hydroxysuccinimide (NHS) and the other used 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chloride (DMTMM). Both substances allow a covalent bond between the carboxylic end of glutathione and the ssDNA modified with an amino end. The analyses carried out allowed parameters to be defined, such as a speed of 50 mV/s and the use of PBS pH 8.0 to build the polymer film on the electrode. The evaluation of variables such as time and concentration allowed factors such as 10 minutes and 5 mM/8 mM for EDC/NHS and 16 hours and 2.5% for DMTMM to be standardised, providing a stronger bond between the molecules. Thus, the comparative analysis between both activators was carried out by interpreting the characterisation responses using Differential Pulse Voltammetry (DPV). The methylene blue (MB) oxidation reading demonstrated the formation of the ssDNA covalent bond on the surface modified with both activators, but showed specificity after hybridisation of the targets only on the EDC/NHS biosensor. This study has provided guidance for future work to contribute to the development of a rapid, specific and point-of-care device for the detection of DENV-3.

Key words: Biosensor. Arbovirus. Dengue 3. Bioconjugation. Glutathione.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	12
Figura 2: Distribuição geográfica mundial dos casos de dengue em 2021.....	13
Figura 3: Distribuição dos sorotipos de dengue em 2023.....	14
Figura 4: Representação do sistema do biossensor.....	16
Figura 5: Estrutura da glutathione (GSH) e o dissulfeto de glutathione (GSSG).....	20
Figura 6: Ativação dos grupos carboxílicos com EDC-NHS e ligação com a sonda.....	22
Figura 7: Representação da molécula de DMTMM.....	23
Figura 8: Ativação dos grupos carboxílicos com DMTMM e ligação amida.....	23
Figura 9: Morfologia do gráfico de Voltametria de pulso diferencial (DPV).....	25
Figura 10: Morfologia da voltametria cíclica.....	26
Figura 11: Componentes do eletrodo impresso.....	29
Figura 12: Esquema da imobilização covalente com EDC/NHS.....	30
Figura 13: Esquema da imobilização covalente com DMTMM.....	31
Figura 14: Voltamograma cíclico da eletropolimerização da L-glutathione.....	33
Figura 15: Área eletroativa do eletrodo modificado com GSH e com PBS.....	34
Figura 16: Estudo do tempo de ativação dos grupos carboxílicos com o uso de EDC/NHS empregando DPV.....	36
Figura 17: Estudo da concentração do EDC/NHS empregando DPV.....	37
Figura 18: Estudo da concentração do DMTMM empregando DPV.....	38
Figura 19: Estudo da concentração da sonda de DENV-3 na imobilização EDC/NHS e com DMTMM empregando DPV.....	38
Figura 20: Voltamograma da diferença na imobilização entre eletrodos modificados com EDC/NHS e com DMTMM.....	40
Figura 21: Voltamograma do biossensor ativado com EDC/NHS e hibridizado com alvo complementar de DENV3 e alvo não complementar (ZIKV).....	41
Figura 22: Voltamograma do biossensor ativado com DMTMM e hibridizado com alvo complementar de DENV3 e alvo não complementar (ZIKV).....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

-COOH	Grupos carboxílicos
-NH ₂	Grupos aminados
Ag/AgCl	Prata/Cloreto de Prata
CV	Voltametria Cíclica
DENV	Vírus da Dengue
DMTMM	Cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metil-morfolínio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPV	Voltametria de Pulso Diferencial
dsDNA	Fita dupla de Ácido Desoxirribonucleico
EDC	Cloridrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
FERRI	Ferricianeto de potássio
FERRO	Hexacianoferrato de potássio tri-hidratado
GSH	L-glutationa
KCl	Cloreto de potássio
MB	Azul de metileno
MES	Tampão 2-etanossulfônico
NHS	N-hidroxisuccinimida
PBS	Tampão fosfato salino
ssDNA	Fita simples de Ácido Desoxirribonucleico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Vírus da Dengue.....	12
2.1.1 Epidemiologia.....	13
2.1.2 Diagnóstico.....	14
2.2 Biossensores.....	15
2.2.1 Classificação de acordo com os Transdutores.....	17
2.2.2 Classificação de acordo com os Biorreceptores.....	18
2.3 Modificação de Superfície com Polímeros.....	19
2.4 Técnicas de Imobilização do Biorreceptor com Ácidos Nucleicos.....	21
2.4.1 EDC/NHS.....	21
2.4.2 DMTMM.....	22
2.5 Técnicas Eletroanalíticas.....	24
2.5.1 Voltametria de Pulso Diferencial (DPV).....	24
2.5.2 Voltametria Cíclica (CV).....	25
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos Específicos.....	27
4. METODOLOGIA.....	28
4.1 Materiais e reagentes.....	28
4.2 Medidas eletroquímicas.....	28
4.3 Preparo das soluções.....	28
4.4 Construção do eletrodo.....	29
4.5 Modificação da superfície com o polímero.....	30
4.6 Imobilização da ssDNA de DENV-3 com EDC/NHS.....	31
4.7 Imobilização da ssDNA de DENV-3 com DMTMM.....	31
4.8 Hibridização dos alvos complementar e não complementar.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Eletropolimerização da L-glutamina.....	33
5.2 Otimização da ativação com EDC/NHS e com DMTMM.....	35
5.3 Imobilização covalente da DENV-3.....	38
5.4 Hibridização do alvo complementar e não complementar.....	40
6. CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), desde o início de 2023, mais de 5 milhões de casos de dengue foram relatados após uma alta histórica, sendo mais de 80% desses casos nas regiões das Américas (OMS, 2023). A dengue, que pode se apresentar como uma doença febril moderada, tem a capacidade de evoluir para casos mais graves como a dengue hemorrágica e para síndrome do choque da dengue (Hosseini et al., 2014).

Os biossensores eletroquímicos apresentam diversas vantagens que incluem serem dispositivos simples, de baixo custo, alta sensibilidade, de fácil uso e portáteis (Lin et al., 2014). O desenvolvimento de um biossensor para diagnóstico do vírus da dengue (DENV) é extremamente importante para os campos de manutenção da saúde pública, análise clínica, farmacêutica e ambiental (Liu et al., 2017). A possibilidade de um sistema miniaturizado com baixo custo e rápida aplicação que permita um controle remoto principalmente em locais mais afastados atrai interesse para os biossensores serigrafados portáteis (Cordeiro et al., 2018).

Os métodos de detecção com o DNA são considerados mais interessantes devido à possibilidade de diagnóstico precoce das doenças. Além disso, esses mesmos sensores são mais promissores por causa da simplicidade, alta sensibilidade e seletividade (Fabrizi et al., 2015).

Mediante a necessidade de um aparelho econômico e miniaturizado para o uso em áreas de difícil acesso, afetadas pelo vírus, biossensores surgem como alternativas vantajosas com as propriedades requisitadas, incluindo alta sensibilidade e especificidade a fim de permitir o diagnóstico rápido e preciso da dengue, principalmente em períodos iniciais e de sintomatologia mais leve da doença.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vírus da Dengue

A Dengue é uma doença aguda, sistêmica causada por um arbovírus, do gênero *flavivírus*, família *flaviviridae*, transmitido pela picada do mosquito fêmea do *Aedes aegypti* (**Figura 1**), ou *Aedes albopictus*. Trata-se de um vírus envelopado, esférico, icosaédrico, de bicamada lipídica. Com RNA de fita simples, e possui três proteínas estruturais, (capsídeo, membrana percussora e envelope) além de sete proteínas não estruturais, NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS51 (Maciel et al., 2008; Menezes et al., 2021).



Figura 1: Mosquito *Aedes aegypti*. Fonte: Tom Kiskien, vcstar.com.

A doença apresenta por quatro sorotipos distintos, sendo DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 (Biassoti et al., 2017; Maciel et al., 2008). Esses sorotipos causam diferentes manifestações com intensidades variáveis em seus portadores. Estas compreendem desde casos assintomáticos, sintomatologia de febre da dengue (como dores de cabeça, perda de apetite e erupções cutâneas), até casos graves (como febre hemorrágica e síndrome do choque da dengue), podendo evoluir para óbito (Menezes et al., 2021; Maciel et al., 2008).

O período de incubação da dengue no ser humano é de 3 a 15 dias, já o de viremia no hospedeiro humano, quando o vírus se torna detectável no sangue, inicia-se um dia antes do aparecimento da febre e permanece até o sexto dia da doença. E, o período de incubação no mosquito é de 8 a 11 dias, momento a partir do qual ele se torna infectante, assim permanecendo pelo resto da vida (Pontes et al., 1994).

2.1.1 Epidemiologia

No mundo, o vírus da dengue e seus vetores são notados em destaque nas regiões tropicais e subtropicais (**Figura 2**), tendo a infecção grave pelo DENV como uma das principais causas de doença persistente e morte em todas as idades em países asiáticos e latino-americanos (Islam et al., 2021).



Figura 2: Distribuição geográfica mundial dos casos de dengue em 2021. Fonte: ecdc, 2021 (Adaptada).

O maior número de casos já registrados globalmente foi em 2019, onde todas as regiões foram afetadas e a região americana registrou 3,1 milhões de casos, com mais de 25 mil classificados como graves (OMS, 2023).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou que em 5 décadas houve um aumento de 30 vezes dos casos de dengue em todo o mundo. Estima-se que aproximadamente 100 milhões de pessoas foram infectadas em mais de 100 países endêmicos, contando com cerca de 20.000 mortes por ano (Islam et al., 2021).

A dengue é caracterizada como uma doença de zona urbana, por possuir um maior número de ambientes favoráveis ao mosquito transmissor da infecção, onde essa variável associa-se com a concentração populacional brasileira, sendo, por sua vez, uma consequência dos movimentos migratórios (Menezes et al., 2021).

Entre as semanas epidemiológicas de 1 a 49 de 2023 foram notificados 1.607.741 casos prováveis de dengue no Brasil, com o sul, sudeste e centro oeste

se apresentando como as regiões geográficas com maiores incidências (Ministério da Saúde, 2023). Na **Figura 3**, os sorotipos DENV-1 e DENV-2 possuem presença em todos os estados, sendo predominante o DENV-1, além da presença do DENV-3 no estado de Pernambuco.

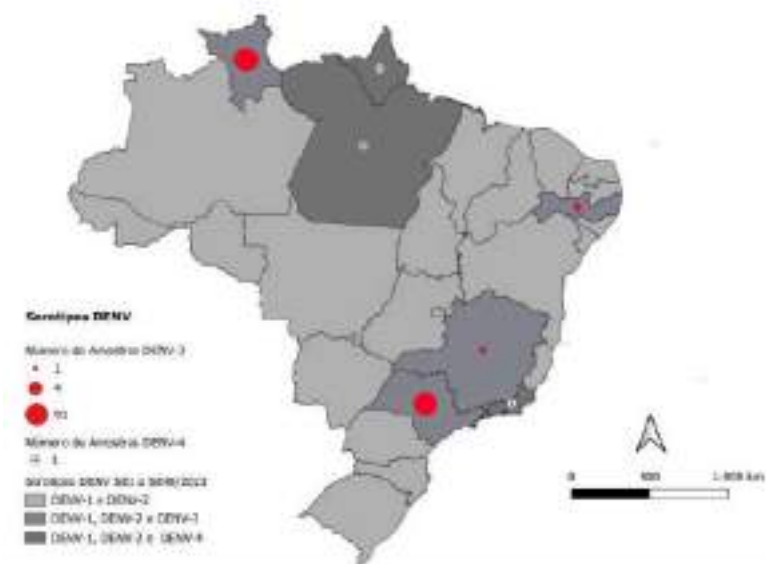


Figura 3: Distribuição dos sorotipos de dengue em 2023. Fonte: Ministério da Saúde, 2023.

De acordo com Felipe Naveca do Laboratório de Arbovírus e Vírus Hemorrágicos do IOC/Fiocruz, houve a introdução de um novo genótipo no sorotipo da DENV-3, criando-se uma nova linhagem para o vírus, e oferecendo risco de uma nova epidemia devido a falta de imunidade da população contra essa variante, resultante de um número baixo de infecções desde os anos 2000 (CNN, 2023).

2.1.2 Diagnóstico

Estabelecer o diagnóstico da infecção da dengue nos primeiros dias de sintomas é fundamental para a melhor obtenção de informações úteis sobre o tratamento indicado para o paciente. Além disso, o estudo da sorologia do vírus da dengue é muito importante para a vigilância da doença (Alcon et al., 2002).

Clinicamente, deve ser considerado como caso suspeito de dengue clássica todo paciente que apresente febre com duração máxima de sete dias acompanhada de duas ou mais das seguintes manifestações: cefaleia, dor retro-orbitária, artralgia, mialgia, prostração, erupção cutânea. Também leva-se em conta que resida, ou tenha estado, nos últimos 15 dias em zona de circulação do vírus da dengue (Dias et al., 2010).

Com intuito de evitar o retardo no diagnóstico e agravamento da doença, considera-se que, juntamente com a análise clínico-epidemiológica, sejam solicitados exames laboratoriais específicos disponíveis na unidade, como por exemplo, o hemograma e a sorologia (Biassoti et al., 2017).

Atualmente, esse diagnóstico da dengue é concentrado em 2 tipos de métodos: os específicos, como o isolamento viral, a sorologia de anticorpo e a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), que são mais lentos, possuem custo elevado e necessidade de trabalhadores especializados; e os inespecíficos, como o hemograma e a prova do laço, que apresentam maior abrangência e rapidez nos resultados, porém a especificidade necessita da combinação destes exames com demais (Biassoti et al., 2017).

O isolamento viral é o método tradicional para diagnóstico específico da dengue, sendo gradativamente substituído pela RT-PCR e pelos ensaios imunoenzimáticos (ELISAs) com o antígeno NS1 por serem técnicas mais rápidas. Embora a RT-PCR demonstre sensibilidade, especificidade e rapidez, ainda necessita de uma equipe treinada e equipamentos especializados para a sua execução, prejudicando sua realização em locais mais remotos ou sem custos, geralmente endêmicos. Os testes comerciais de pesquisa do antígeno tem interesse diminuído por ainda se restringirem apenas à análise qualitativa, indicando a presença ou ausência de anticorpos, que são afetados pela ausência da apresentação dos anticorpos em certos períodos da doença (Muller et al., 2017).

2.2 Biossensores

Sensores são dispositivos que registram uma alteração física, química ou biológica, convertendo-a em um sinal mensurável. Esse dispositivo retém um elemento de reconhecimento que permite a resposta seletiva de um analito específico ou um grupo de analitos, minimizando a interferência de outros componentes da amostra (Ronkainen et al., 2010). Os biossensores são tipos de sensores que incorporam materiais biológicos, tais como enzimas, tecidos, anticorpos, microrganismos, receptores, ácidos nucleicos, em transdutores físico-químicos ou microssistemas de transdução (Kawamura et al., 2016). Eles existem em diferentes tamanhos e formas, podendo detectar e medir até baixas

concentrações de patógenos específicos e substâncias químicas tóxicas (Naresh et al., 2021).

Um típico biossensor inclui um biorreceptor, um transdutor de sinal e um sistema eletrônico de leitura, assim como mostrado na **Figura 4**. O analito é a substância de interesse que vai ser detectada e quantificada (Naresh et al., 2021). O biorreceptor é a biomolécula ou elemento biológico que pode reconhecer o analito, podendo ser enzimas, células, aptâmeros, ácidos nucleicos e anticorpos, e esse processo de produção de sinal durante a interação do analito com o biorreceptor é chamado de biorreconhecimento (Naresh et al., 2021). O transdutor é o componente responsável por transformar determinada energia de uma forma para outra, convertendo a reação química em um sinal mensurável conhecido como sinalização e sendo proporcional ao número de interações analito-biorreceptor. O sistema eletrônico recebe, registra e transmite informações relativas a uma alteração fisiológica ou a presença de materiais químicos ou biológicos na amostra após a amplificação e conversão do sinal proveniente do transdutor (Naresh et al., 2021).

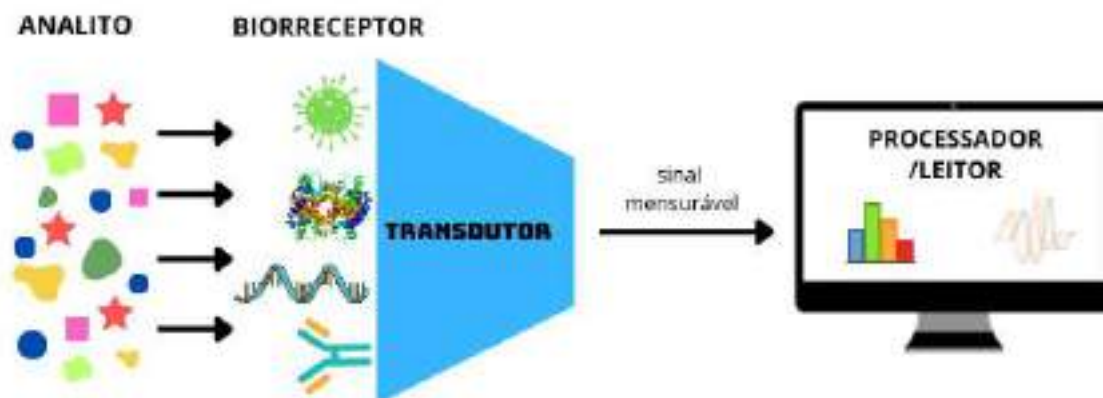


Figura 4: Representação do sistema do biossensor. Fonte: Autora, 2024.

2.2.1 Classificação de acordo com os Transdutores

Os transdutores são os componentes que convertem o sinal bioquímico em sinal elétrico quantificável, podendo ser eletroquímico, calorimétrico, ótico e gravimétrico (piezoelétrico ou magnético) (Kawamura et al., 2016; Karunakaran et al., 2015). Mesmo com todas as pesquisas desenvolvidas acerca dos transdutores para os biossensores, os eletroquímicos se mostraram os mais

utilizados pela portabilidade, simplicidade, facilidade de uso, economia e descartabilidade em alguns casos (Karunakaran et al., 2015).

Além das outras vantagens, a sensibilidade e a resposta dos sensores eletroquímicos são maiores do que as dos sensores óticos ou piezoelétricos, aumentando assim a motivação para uma maior exploração desse modelo de transdutor (Karunakaran et al., 2015).

Os biossensores eletroquímicos são considerados as escolhas mais atrativas para a detecção de proteínas por causa de sua simplicidade, seletividade, sensibilidade e capacidade de miniaturização do sistema (Eissa et al., 2018; Naresh et al., 2021). Baseiam-se nas propriedades eletroquímicas do analito e transdutor (Naresh et al., 2021), eles medem a corrente produzida pelas reações de oxidação e redução, podendo ser relacionada com a concentração da molécula eletroativa ou a sua taxa de produção/consumo (Perumal et al., 2014). O sinal elétrico produzido está relacionado com o processo de reconhecimento pelo alvo e com a substância analisada (Perumal et al., 2014).

Baseado no princípio de transdução, os biossensores eletroquímicos são classificados em: potenciométricos, amperométricos, voltamétricos, impedimétricos e condutimétricos. Os biossensores **potenciométricos** medem a carga acumulada devido a interação entre o alvo e o biorreceptor no eletrodo de trabalho, em relação ao eletrodo de referência sob corrente zero (Naresh et al., 2021). Os biossensores **amperométricos** baseiam-se na medição da corrente em função do tempo resultante da oxidação e redução de uma espécie eletroativa numa reação bioquímica que depende da concentração de um analito com potencial fixo (Perumal et al., 2014). Os biossensores **voltamétricos** detectam o analito através da medição da corrente durante a variação controlada do potencial aplicado, a resposta de corrente observada normalmente como um pico redox, ou um platô, que é proporcional à concentração do analito (Naresh et al., 2021; Ronkainen et al., 2010). Os biossensores **impedimétricos** medem a impedância elétrica produzida na interface do eletrodo/eletrólito quando um pequeno sinal de excitação sinusoidal é aplicado (Naresh et al., 2021). E os biossensores **condutimétricos** quantificam a alteração da condutância entre o par de eletrodos por causa de uma reação eletroquímica (alteração das propriedades de condutividade do analito), e eles são comumente utilizados para monitorar processos metabólicos e sistemas biológicos vivos (Naresh et al., 2021).

2.2.2 Classificação de acordo com os Biorreceptores

Além da classificação de acordo com os transdutores de sinal, os biossensores podem ser classificados de acordo com a molécula alvo usada na identificação, podendo ser anticorpo, enzima, células, ácidos nucleicos e outros.

O imunossensor é baseado no reconhecimento específico de anticorpos imobilizados num transdutor com o analito, onde o sinal analítico varia de acordo com a sua concentração. São as técnicas analíticas mais específicas, proporcionam limites de detecção extremamente baixos e podem ser utilizados para uma gama maior de substâncias (Pacheco et al., 2017; Karunakaran et al., 2015). Nos enzimáticos, a enzima imobilizada reconhece uma molécula alvo e catalisa a reação alvo utilizando reações de hidrólise e redox. Num biossensor eletroquímico típico, os eventos de reconhecimento molecular pelas enzimas são traduzidos em alterações na corrente (amperométrica), no potencial (potenciométrica) ou nas propriedades condutoras de um meio (condutimétricas) induzidas pelas reações enzimáticas (Kawamura et al., 2016). Os biossensores de células inteiras geralmente têm um tempo de vida útil mais longa que outros biossensores, já que os componentes ativos estão contidos e são produzidos num ambiente natural e não numa matriz de polímero na superfície de um sensor, que consequentemente tem uma biocompatibilidade limitada (Borisov et al., 2008).

Nos biossensores à base de ácidos nucleicos é utilizada a reação de hibridização altamente específica entre duas cadeias de DNA de cadeia simples (ssDNA) para formar DNA de cadeia dupla (dsDNA), qualificando essas biomoléculas como o elemento de reconhecimento biológico (Karunakaran et al., 2015). Esse método é muito eficiente e sensível já que o sensor de DNA pode detectar o analito mesmo na mistura de diferentes ácidos nucleicos (Ligaj et al., 2006).

A alta estabilidade da fita de DNA ligada na superfície do eletrodo através da ligação covalente estabelecida entre os grupos carboxílicos do eletrodo de carbono vítreo e o terminal aminado da sequência explorada, foi uma vantagem destacada por Tabrizi et al. (2015) no biossensor para salmonella. Por meio dessa construção, obteve-se boa seletividade e alta sensibilidade para concentrações baixas do alvo de DNA e formação da fita dupla, chegando a níveis picomolares.

2.3 Modificação de Superfície com Polímeros

Uma das etapas mais importantes da fabricação do biossensor é a modificação da superfície que pode envolver ligações covalentes, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas ou de van der Waals (Eissa et al., 2018; Turner et al., 2013). O uso de polímeros condutores (polianilina, polipirrol, polifenileno e outros), polímeros naturais (quitosana, gelatina, amido e outros) e aminoácidos ou peptídeos (ácido glutâmico, glicina, glutatona e outros) no desenvolvimento do biossensor é muito comum pela característica homogênea e maleável da película formada, habilidade de modificação das propriedades físicas e óticas, estabilidade e biocompatibilidade, produção fácil e reprodutiva e eficiente habilidade de transferência de elétrons (Guler et al., 2014; Khan et al., 2008; Guler et al., 2014).

A escolha minuciosa da superfície do eletrodo de trabalho modificado é necessária, já que as suas propriedades influenciam na eficiência da imobilização (Rashid et al., 2017), requerendo a presença de moléculas específicas pelo polímero usado para permitir a ligação covalente. Os aminoácidos são boas escolhas por compor polipeptídeos e apresentarem vários grupos funcionais, como -NH_2 , -OH , -SH e/ou -COOH na mesma molécula (Alhedabi et al., 2016).

A glutatona (GSH) é um tripeptídeo composto pelos aminoácidos L-glutamato, L-cisteína e L-glicina, sendo o tiol proteico mais presente nas células (**Figura 5**). Ela contribui com uma variedade de funções para manter a homeostase celular, incluindo a função de ser o oxidante celular mais abundante (Matuz-Mares et al., 2021).

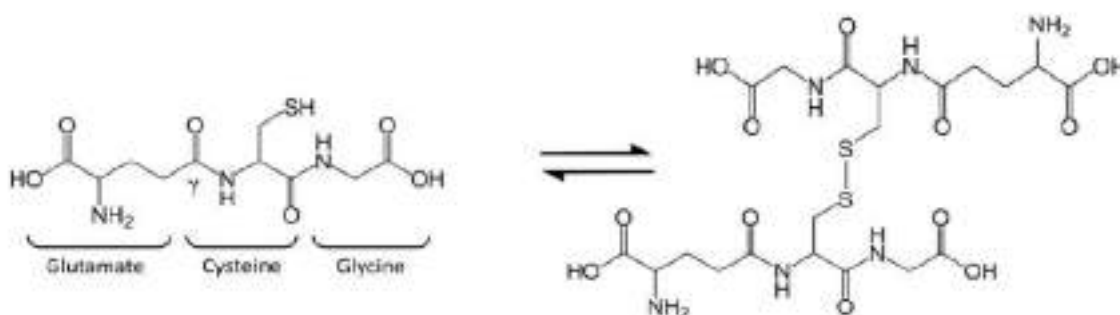


Figura 5: Estrutura da glutatona (GSH) e o dissulfeto de glutatona (GSSG) Fonte: Varietti et al., 2021.

A principal fonte de GSH é o fígado que tem a capacidade de sintetizar a cisteína a partir de fontes endógenas por meio da via de transulfuração, ou

através da quebra de proteínas e dos alimentos. Sendo assim, o fígado desempenha papel central na manutenção da GSH, exportando quase por completo ela para o plasma e a bile (Varietti et al., 2021).

A estrutura da molécula de L-glutathiona (**Figura 5**) apresenta extremidades necessárias tanto para a formação do biofilme na superfície do eletrodo de trabalho quanto na disponibilidade de terminais carboxílicos (-COOH) (Xia et al., 2016). Estes, são necessários para a imobilização covalente da fita simples de DNA (ssDNA) no transdutor quando se utilizam reagentes de bioconjugação como o N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) com o N-Hidroxissuccinimida (NHS).

A modificação com o GSH através de um enxerto eletroquímico é apresentada por Pérez-Ràfols et al. (2016), onde a aplicação do potencial eletroquímico é responsável pela ligação covalente da molécula de GSH (cujos grupos -COOH foram ativados com EDC/NHS) e a superfície com o sal de diazônio (que fornece terminal -NH₂). Esse biossensor apresentou bom desempenho analítico, sendo usado para detecção de íons metálicos em amostras ambientais sem perda de sensibilidade, necessitando de uma simples etapa de limpeza entre as análises.

No estudo de Xia et al. (2016), foi mostrada a aplicação de Voltametria Cíclica (CV), numa varredura de -1.0 a 2.5 V, para eletropolimerização da GSH, com o objetivo de construir o biofilme como primeira etapa do desenvolvimento de uma interface de reconhecimento para o ácido ascórbico e o ácido isoascórbico, onde obteve como resultado a construção de uma grande área de superfície eletroativa e com boas propriedades eletroquímicas que facilitaram a transferência de elétrons e aceleraram o processo de oxidação/redução na superfície.

2.4 Técnicas de Imobilização do Biorreceptor com Ácidos Nucleicos

É fundamental a seleção da técnica de imobilização adequada que permita alta reatividade, orientação da sonda de DNA facilitando o evento de hibridização e boa fixação na superfície, visto que, dependendo do método utilizado, há chances consideráveis da molécula de biorreconhecimento ser inativada ou arrastada da superfície (Rashid et al., 2017; Naresh et al., 2021).

A imobilização de ácidos nucleicos na superfície do eletrodo a fim de obter a camada de reconhecimento biológica, pode ser fornecida por diferentes técnicas como a adsorção, que não necessita de modificação na sonda ou algum reagente químico; ligação covalente, que demanda moléculas específicas para a reação, entre outras (Rashid et al., 2017; Ligaj et al., 2006).

A **imobilização covalente** oferece uma detecção estável dos ácidos nucleicos, prevenindo sua dessorção e permitindo a formação de uma ligação forte entre o elemento de reconhecimento e a superfície (Ligaj et al., 2006). Essa técnica demonstra boa estabilidade, flexibilidade e alta força de ligação, além de proporcionar uma orientação vertical em que uma extremidade da sonda se fixa na superfície do eletrodo, aumentando a eficácia na futura hibridização (Rashid et al., 2017). As estratégias incluem o aquecimento de carboximetilado dextrano, ligação mediada pelo glutaraldeído, química do EDC/NHS, formação de ligações peptídicas com o DMTMM (Raghav et al., 2016), onde as duas últimas foram utilizadas nesse trabalho e serão detalhadas a seguir.

2.4.1 EDC/NHS

A ligação covalente do ssDNA na superfície do eletrodo modificado necessita de uma região de grupos ativos que permitam a fixação da molécula no eletrodo. A natureza genérica do procedimento de ligação do EDC/NHS, permite a formação de ligações amidas entre aminas primárias e grupos de ácidos carboxílicos possibilitando a fabricação de eletrodos com diferentes biorreceptores (Situmorang et al., 1998).

De acordo com a literatura, na presença do EDC e do NHS (**Figura 6**), o grupo carboxílico do eletrodo forma uma ligação covalente forte com o grupamento amino da ssDNA modificada (Ligaj et al., 2006). O EDC atua como reagente ativador que forma um intermediário éster reativo proporcionando a ligação entre -COOH e -NH_2 , e que se torna mais estável com a junção do reagente NHS (Hinterwirth et al., 2012; Jahanbani et al., 2016). Ainda há uma variação do NHS onde ele é utilizado como sulfo-NHS, fazendo com que a presença do enxofre (proveniente do sulfo-NHS) na superfície do eletrodo permita que os grupamentos carboxílicos sejam ativados com sucesso e maior estabilidade (Tsai et al., 2016).



Figura 6: Ativação dos grupos carboxílicos com EDC-NHS e ligação com a sonda aminada. Fonte: Autora, 2024.

Como demonstrado por Raghav et al. (2016), a ativação dos grupos carboxílicos do citrato, fornecida pelo EDC/NHS, combinado com nanopartículas de ouro (AuNP) permite, além da ligação forte com o grupamento amina dos anticorpos, a imobilização ortogonal da molécula, melhorando a sensibilidade e ampliando o alcance da detecção.

Tsai et al. (2018), avaliou, através do uso do reagente de bioconjugação, a imobilização do ácido 11-mercaptoundecanóico na superfície de ouro onde, após a formação dessa camada, foi visto que a melhor performance do EDC/NHS em MES e PBS foi em pH 5,8 (solução ácida), após a análise da reação em pH 7,0 se apresentar relativamente inativa durante o estudo da imobilização covalente.

2.4.2 DMTMM

O DMTMM (**Figura 7**) é um agente de desidrocondensação eficiente que promove a formação de amidas e ésteres através de uma reação entre grupos carboxílicos com grupos aminos e álcoois, respectivamente (Sole et al., 2022; Huang et al., 2022). Essa reação ocorre eficientemente em soluções aquosas ou alcoólicas, fornecendo produtos com eficientes rendimentos (Huang et al., 2022).

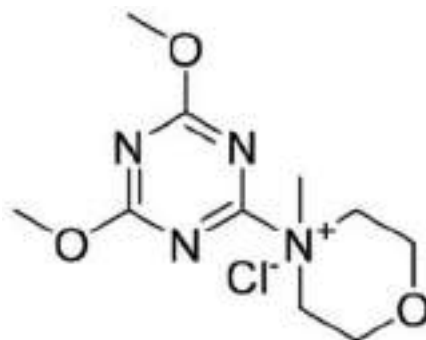


Figura 7. Representação da molécula de DMTMM. Fonte: Sperry et al., 2018

Os estudos da utilização do DMTMM se iniciaram com a possibilidade de encontrar um agente ativador dos grupos carboxílicos com mais eficácia e estabilidade (Farkas et al., 2007). As maiores vantagens do DMTMM são a pureza estrutural dos produtos e os rendimentos da reação (Farkas et al., 2007). Além disso, apresenta solubilidade e estabilidade em água à temperatura ambiente por um longo período de tempo, vantagem importante em comparação com outros ativadores (D'Este et al., 2014). Ainda, é visto que a melhor solubilização do DMTMM é adquirida com o uso de tampões em pH 7,0 (Farkas et al., 2013).

Na **Figura 8**, está representada a ligação entre a molécula de DMTMM e os grupos carboxílicos, promovendo sua ativação e permitindo a formação da ligação covalente com o terminal amidado de uma molécula.

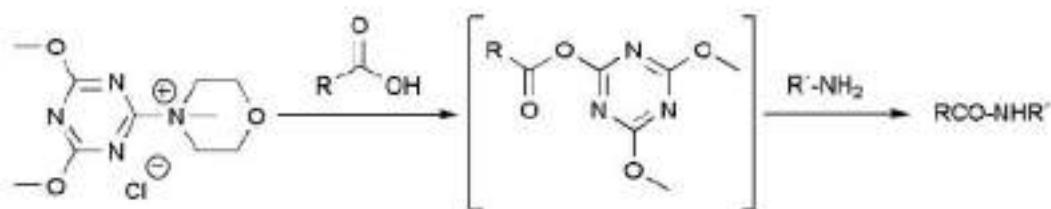


Figura 8. Ativação dos grupos carboxílicos com DMTMM e ligação amida. Fonte: Farkas et al., 2007.

Nos estudos de Sole et al. (2022), ele analisou detalhes do uso do DMTMM como agente bioconjugador, em um biossensor modificado com quitosana, e observou que a ligação fornecida com o uso do DMTMM promoveu a formação de estruturas rígidas, atrativas na construção de um biossensor reprodutível, onde mesmo sem melhorar a elasticidade do biopolímero de quitosana, apresentou essa propriedade após a adição do glicerol.

Em Huang et al., foi desenvolvida uma técnica para identificação de 20 ácidos carboxílicos em soluções complexas, onde o DMTMM foi usado no fortalecimento das ligações entre esses ácidos e o ácido trifluoroperacético (R-TFPA), molécula seletiva e identificadora dos ácidos carboxílicos. Neste trabalho, destaca-se o uso eficaz do DMTMM em amostras biológicas em solução neutra, possibilitando o uso em amostras de pacientes.

2.5 Técnicas Eletroanalíticas

Várias técnicas eletroquímicas são usadas para a análise da interface eletrodo e solução. Para o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico, as técnicas Voltametria de Pulso Diferencial (DPV), Voltametria Cíclica (VC), Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) são utilizadas para caracterizar a superfície do eletrodo a cada etapa da modificação (Tsai et al., 2018).

2.5.1 Voltametria de Pulso Diferencial (DPV)

A DPV é definida como um método eletroquímico de baixo limite de detecção e alta sensibilidade (Lin et al., 2014). Ela é usada na medição voltamétrica devido a sua boa adequação para a análise de mistura de componentes, visto que é necessário uma diferença relativamente pequena para determinação simultânea de potenciais dos picos dos analitos. Essa corrente depende de fatores como o pH do meio, a concentração, a composição química do tampão e dos outros parâmetros usados para a análise (Baranowska et al., 2008).

Na técnica de DPV, a corrente é avaliada em dois locais, sendo um antes do início do pulso (I_1) e outro ao final do pulso (I_2). A diferença entre as correntes medidas em cada pulso é plotada em relação ao potencial aplicado (Wang et al., 2010). Após a aplicação de pulsos em sequência, as correntes resultantes associadas ao potencial são dispostas de forma linear em um gráfico. A **Figura 9**, um gráfico padrão de DPV, possui no eixo X a varredura de potencial aplicada através de pulsos ao longo do tempo de execução, e o eixo Y representa a corrente lida de acordo com o potencial emitido que, dependendo da reação eletroquímica, forma uma curva e um pico referente a oxidação da solução redox utilizada para a caracterização, posicionada em sua respectiva faixa de oxidação (Melville et al., 2000).

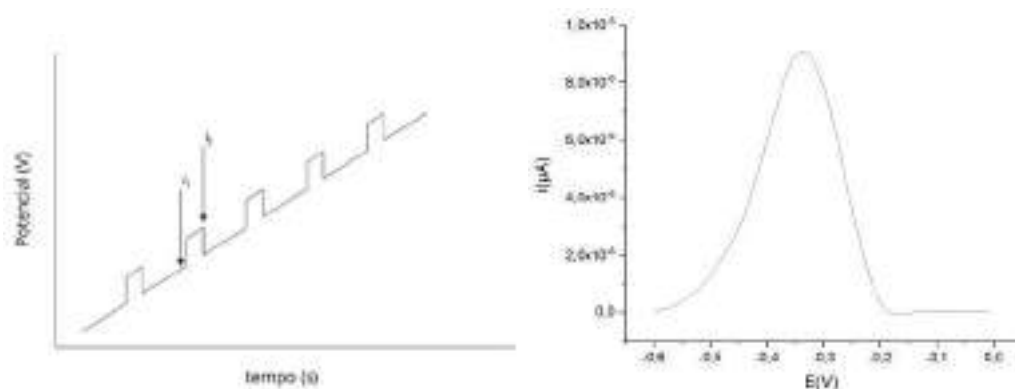


Figura 9. Morfologia do gráfico de Voltametria de pulso diferencial (DPV). Fonte: Westbroek, 2005 (Adaptado).

2.5.2 Voltametria Cíclica (CV)

A CV é usada tanto para a caracterização de mudanças na superfície do eletrodo quanto para a aplicação de corrente com a intenção de construção de um biofilme polimérico que modifique a superfície de trabalho e permita a imobilização de moléculas como os receptores.

Na CV, a varredura começa no momento que o potencial inicial é aplicado, e vai até o potencial final definido, onde a taxa de varredura é descrita como essa variação e a durante essa variação a corrente é registrada plotando combinada com o potencial em função do tempo (Harnisch et al., 2012). A **Figura 10**, mostra a morfologia comum de um gráfico de CV. Ao início da aplicação do potencial não há mudança na corrente, apenas no potencial de oxirredução do analito há o aumento da corrente representando uma reação de oxidação eletroquímica na superfície do eletrodo (Harnisch et al., 2012). Após esse pico, no sentido de varredura inverso, os valores de corrente negativos crescem na reação de redução do analito, formando um novo pico durante o retorno ao potencial inicial.

Na **Figura 10 (a)**, E_{pA} e E_{pC} representam o potencial de pico anódico e catódico, onde ocorrem a oxidação e a redução, respectivamente. Na **Figura 10 (b)**, I_{pA} e I_{pC} representam as correntes de pico anódico e catódico, da oxidação e redução do analito, respectivamente.

Na caracterização, essa técnica é geralmente usada para provar as mudanças na superfície através da sua performance na solução de sonda redox

reversível, tal como $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em eletrólito suporte de 0,1 M KCl (Benvidi et al, 2015).

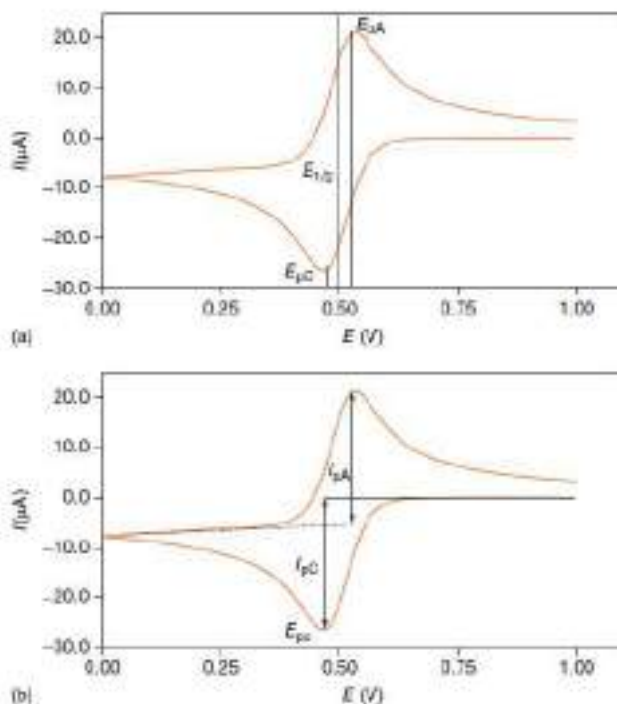


Figura 10. Morfologia da voltametria cíclica. (a) E_{pA} = potencial de pico anódico, E_{pC} = potencial pico catódico, (b) i_{pA} = corrente de pico anódica, i_{pC} = corrente de pico catódica. Fonte: Khalifa et al., 2017.

Entre as principais informações que podem ser extraídas da CV estão: os potenciais redox de substâncias, a reversibilidade das espécies redox e sua dependência da taxa de varredura, estudo da influência da transferência de massa entre outros fatores, além de parâmetros cinéticos de outros sistemas (Harnisch et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Comparar sistemas produzidos com reagentes de bioconjugação para formação de ligação covalente entre a superfície de um eletrodo modificado com filme polimérico de GSH e sondas de DNA, para a identificação do DENV-3.

3.2 Objetivos Específicos

- Promover a modificação da superfície do eletrodo de trabalho por meio da criação de um filme polimérico a partir da eletropolimerização da GSH;
- Promover a ativação dos grupos carboxílicos da superfície do eletrodo de trabalho modificado com os reagentes EDC-NHS;
- Promover a ativação dos grupos carboxílicos da superfície do eletrodo de trabalho modificado com o reagente DMTMM;
- Promover a ligação da sonda de DNA na superfície do eletrodo de trabalho modificado e ativado com os diferentes reagentes de bioconjugação;
- Avaliar eletroquimicamente as etapas de construção do biossensor;
- Avaliar a detecção do alvo complementar e especificidade do biossensor.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais e reagentes

A tinta condutiva de carbono e a tinta de Ag/AgCl foram adquiridas da Loctite Group® (Holanda) e da SunChemical® (EUA), respectivamente. Da Sigma-Aldrich Chemical Company® (EUA) foram adquiridos GSH, tampão 2-etanossulfônico (MES), Tris (hidroximetil) aminometano (base TRIS HCl), Ferricianeto de potássio (FERRI), Hexacianoferrato de potássio tri-hidratado (FERRO), EDC, NHS e o azul de metileno (MB). Da Gibco Company® (EUA) foi

adquirido o tampão fosfato salino – PBS (10x). Da Exxtend Biotecnologia® (Brasil) foram adquiridas as sondas de DNA, alvos complementar e não complementar com suas sequências definidas após estudos preliminares de demais projetos do grupo. Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura.

4.3 Preparo das soluções

O tampão MES a 0,1M foi preparado com pH 5,5. O PBS pH de 7,4 foi diluído da concentração de 100 mM (10x) para 10 mM (1x). O Tris HCl foi preparado na concentração de 20 mM no pH 7,4. O MB foi preparado na concentração de 500 µM. O FERRI/FERRO ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$) foi preparado em Cloreto de potássio (KCl) 0,1 M, na concentração de 5 mM. Todas as soluções foram armazenadas na geladeira até o uso.

A sonda e o alvo liofilizados de DENV-3 (ambos com 19 nucleotídeos), foram ressuspensos com água ultrapura Milli-Q na concentração de 100 µM e 200 µM (soluções estoque), respectivamente, e armazenadas a -20°C. Suas soluções de trabalho foram preparadas pela diluição das soluções estoque com PBS a 10 mM em pH 7,4. As sequências dos nucleotídeos das ssDNA são descritas abaixo:

Sonda de DNA de DENV-3: 5'-TAACATCATGAGACAGAGC-3'-NH₂;

Alvo complementar de DENV-3: 5'-TAACATCATGAGACAGAGC-3';

Alvo não complementar de ZIKV: 5'-CCATCTGTGGCATGAACCCAATAA
GC-3'

A GSH foi preparada na concentração de 5 mM utilizando PBS pH 6,0 e PBS pH 8,0. O DMTMM foi preparado em PBS pH 7,4 nas concentrações de 0,5%, 1%, 2,5% e 5%. Essas soluções foram homogeneizadas em vórtex por aproximadamente 1 minuto, e o DMTMM foi homogeneizado no banho ultrassônico por cerca de 2 horas.

4.4 Construção dos eletrodos

Os eletrodos impressos foram construídos a partir da deposição das tintas condutivas sobre um substrato de poliéster com o auxílio de uma máscara

adesiva, cortada na impressora STIKA SV-15 da Roland DG (Brasil), no formato dos eletrodos, possuindo cerca de 3 mm² de diâmetro na área de trabalho. A tinta condutiva de carbono foi usada para produzir o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo, e a tinta de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) foi usada para o eletrodo de referência (**Figura 11**).

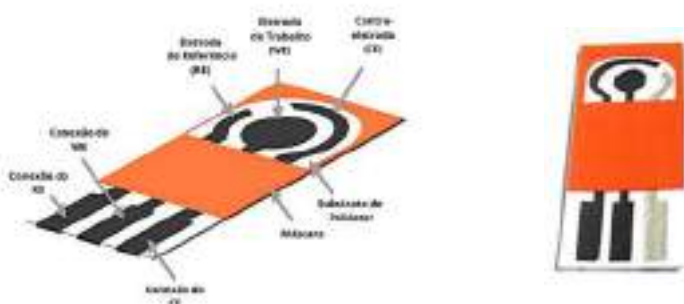


Figura 11. (a) Componentes do eletrodo impresso, (b) eletrodo de pasta de carbono com eletrodo de referência de Ag/ClAg. Fonte: Carneiro et al., 2018 (Adaptada).

Após a pintura, os eletrodos foram submetidos a um processo de cura de acordo com as recomendações dos fabricantes das tintas (120°C por 15 minutos e 60°C por 10 minutos para a tinta de carbono e de Ag/AgCl, respectivamente). Ao final da deposição das tintas, foi aplicado um adesivo para isolamento dos eletrodos. Depois de produzidos, os eletrodos passaram por uma limpeza através da submersão em ácido sulfúrico a 1% por 1 hora e, em sequência, foram lavados com água Milli-Q três vezes, deixando-os secar em temperatura ambiente e armazenando-os em local protegido da luz.

4.5 Modificação da superfície com o polímero

O filme polimérico foi construído na superfície do eletrodo com o uso de 50 µL de L-glutationa oxidada a 5 mM, aplicando um potencial de -1 V a 2,5 V, durante 8 ciclos de voltametria cíclica. A fim de encontrar os melhores parâmetros para a construção de um filme polimérico mais eficiente, foram testados o pH do tampão no qual foi preparada a GSH (PBS pH 6,0 e pH 8,0) e a velocidade de varredura da faixa de potencial aplicada (50 mV/s e de 100 mV/s). Após a aplicação do potencial, os eletrodos foram lavados com 1 mL de água Milli-Q para retirar o excesso do agente modificador. Para a avaliação da área eletroativa da

superfície de trabalho do eletrodo, valores de potencial dos picos e corrente dos picos anódicos e catódicos foram extraídos e aplicados na equação de Randles-Sevcik, descrita na seção 5.1.

4.6 Imobilização da ssDNA de DENV-3 com EDC/NHS

Uma alíquota de 5 μL da solução de EDC/NHS em tampão MES pH 5,5 foi depositada no eletrodo de trabalho modificado com o biofilme produzido pelo polímero de GSH. Para obter a maior eficiência de bioconjugação foram avaliados diferentes concentrações dos reagentes EDC/NHS (2mM/5mM, 5mM/8mM, 8mM/8mM e 50mM/80mM) e duração da formação do intermediário reativo (10 a 180 minutos). Depois, os eletrodos foram lavados com 1 mL de água ultrapura para remover o excesso de reagentes. Então, adicionou-se uma alíquota de 5 μL da solução de DENV-3 a diferentes concentrações (2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM e 20 μM) por um tempo de 16 horas. Por fim, lavou-se o eletrodo com 1 mL de solução de Tris HCl, que foram deixados secar à temperatura ambiente.

A rota reacional proposta com os reagentes de bioconjugação EDC/NHS é representada na **Figura 12** abaixo.



Figura 12. Esquema da imobilização covalente com EDC/NHS. Fonte: Autora, 2024.

4.7 Imobilização da ssDNA de DENV-3 com DMTMM

A solução de DMTMM foi utilizada para fornecer a ligação covalente entre os grupos carboxílicos do polímero e o grupamento amina da sonda. As alíquotas de 5 μL da solução do DMTMM em tampão PBS pH 7,4 combinado com a sonda de DENV-3 foram depositadas nos eletrodos modificados com o filme de GSH. Em busca da melhor combinação de parâmetros para a bioconjugação, foram testadas diferentes concentrações do DMTMM (0,5%, 1%, 2,5% e 5%), pelo

tempo correspondente à imobilização da sonda na superfície (16 horas). Além do estudo da concentração do DMTMM, foram feitas análises das diferentes concentrações da sonda de DENV-3 (2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M e 20 μ M). Por fim, lavou-se os eletrodos com 1 mL de solução de Tris HCl e deixou-se secar à temperatura ambiente.

A rota reacional proposta com agente de bioconjugação DMTMM é representada na **Figura 13** abaixo.

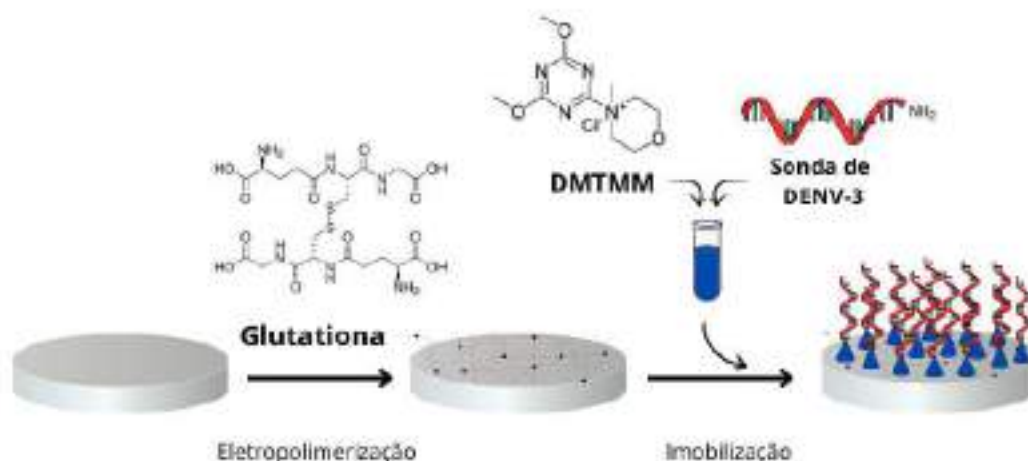


Figura 13. Esquema da imobilização covalente com DMTMM. Fonte: Autora, 2024.

4.8 Hibridização do alvos complementares e avaliação de especificidade

Alíquotas de 5 μ L da solução de cada um dos alvos (DENV-3 e ZIKV) foram depositados na superfície do biossensor, durante 10 min a 60°C, no forno de hibridização da Amersham Pharmacia Biotech, sob agitação. Após a reação, lavou-se os eletrodos com 1 mL da solução de 20 mM de Tris HCl pH 7,4 e deixou-se para secar à temperatura ambiente. Todos os alvos foram diluídos em PBS pH 7,4 para a concentração de 500 nM.

4.2 Medidas eletroquímicas

As análises foram executadas através do software do NOVA 2.10 utilizando o equipamento potenciostato AUTOLAB PGSTAT® PGSTAT302N da Metrohm AG (Suiça). Para a caracterização da modificação com polímero de GSH foi utilizada a técnica de CV, através da deposição de FERRI/FERRO na superfície do eletrodo e aplicação de potenciais cíclicos de -1 V a 1 V, durante 5

ciclos distintos, onde a velocidade de varredura foi alterada entre 20 mV/s e 100 mV/s. Para a caracterização das etapas de ativação de superfície, imobilização e hibridização foi utilizada a técnica de DPV, através da deposição da solução de Tris HCl 20 mM, pH 7,4, numa varredura de potencial de 0 V a 0,6 V, com intervalo de 0,5 s entre os pulsos. Essa aplicação de potencial, foi feita após a reação de 5 minutos de uma alíquota de MB na área de trabalho, e lavagem com Tris HCl 20 mM, pH 7,4.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Eletropolimerização da GSH

Para iniciar o desenvolvimento do biossensor foi necessária a composição de um biofilme polimérico construído a partir da eletropolimerização da GSH, por meio de voltametria cíclica. Esse filme polimérico foi responsável por fornecer as extremidades -COOH envolvidas na ligação com a ssDNA de DENV-3.

A eletropolimerização foi executada como descrito na seção 4.5. Na **Figura 14**, é possível observar a corrente anódica aumentando gradativamente, conforme o potencial é aplicado ao decorrer dos ciclos, indicando a provável formação de um biofilme. Ao final dos ciclos é possível observar picos mais próximos indicando uma sugestiva saturação da polimerização. É visto que o aumento da corrente de pico que tende a ser estável e quase constante demonstra que a polimerização atingiu o nível de saturação (Ganesh et al., 2015).

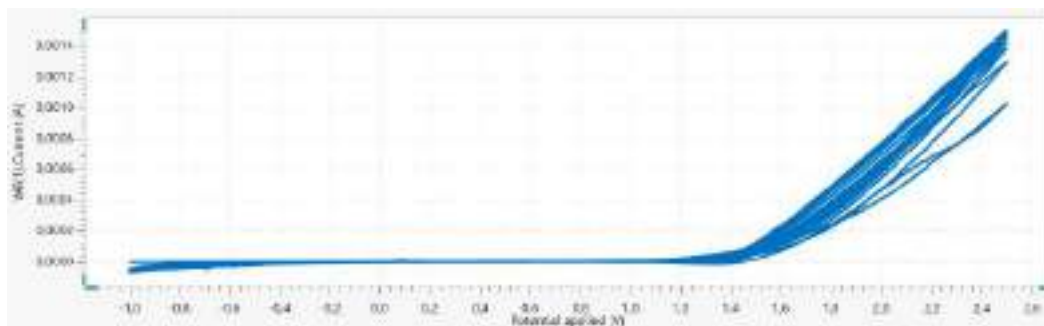


Figura 14. Voltamograma cíclico da eletropolimerização da L-glutathione 5mM em PBS pH 8,0, por 8 ciclos e velocidade= 50 mV/s.

A fim de otimizar a eletropolimerização da GSH, foram executados testes onde se variou a velocidade de varredura aplicada, sendo usadas o intervalo de 50 mV/s a 100 mV/s, e o pH do PBS utilizado na solução de GSH (pH 6,0 e pH 8,0). Para essas análises, foram calculadas as áreas eletroativas (A_e) das superfícies polimerizadas dos eletrodos aplicando a equação de Randles-Sevcik, exibida na **Equação 1**. Nela, i_p é a intensidade da corrente de pico (em A), n é o número de elétrons transferidos na reação, A é a área de superfície do eletrodo (em cm^2), C é a concentração do analito (em mol/cm^3) e D é o coeficiente de difusão (em cm^2/s), e v é a taxa de varredura (em V/s) (Carneiro et al., 2017).

$$i_p = \left(2.65 \times 10^5\right) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2}$$

Equação 1. Equação de Randles-Sevcik

Os valores de área eletroativa obtidos dos eletrodos modificados com a polimerização da GSH, exibidos na **Figura 15 (A)**, demonstraram que a eletropolimerização na velocidade de 50 mV/s e PBS pH 8,0 apresentaram média de $0,027\text{cm}^2$, sendo menor em relação aos demais, sugerindo a melhor construção do biofilme já que o polímero tende a ser um filme isolante. A queda desses valores, refletiu a diminuição da área eletroativa devida à diminuição da corrente transferida através do eletrodo, além da velocidade de eletropolimerização mais baixa favorecer a construção de um filme mais uniforme.

Com fins comparativos, foi executado o processo de eletropolimerização do PBS sem a GSH, cujos resultados são apresentados na **Figura 15 (B)**. Nesse caso, os resultados apresentaram valores mais altos do que os com o biofilme na

superfície, sugerindo que, como não houve a presença do monômero, não existiu o mesmo isolamento da superfície demonstrada com a presença do polímero.

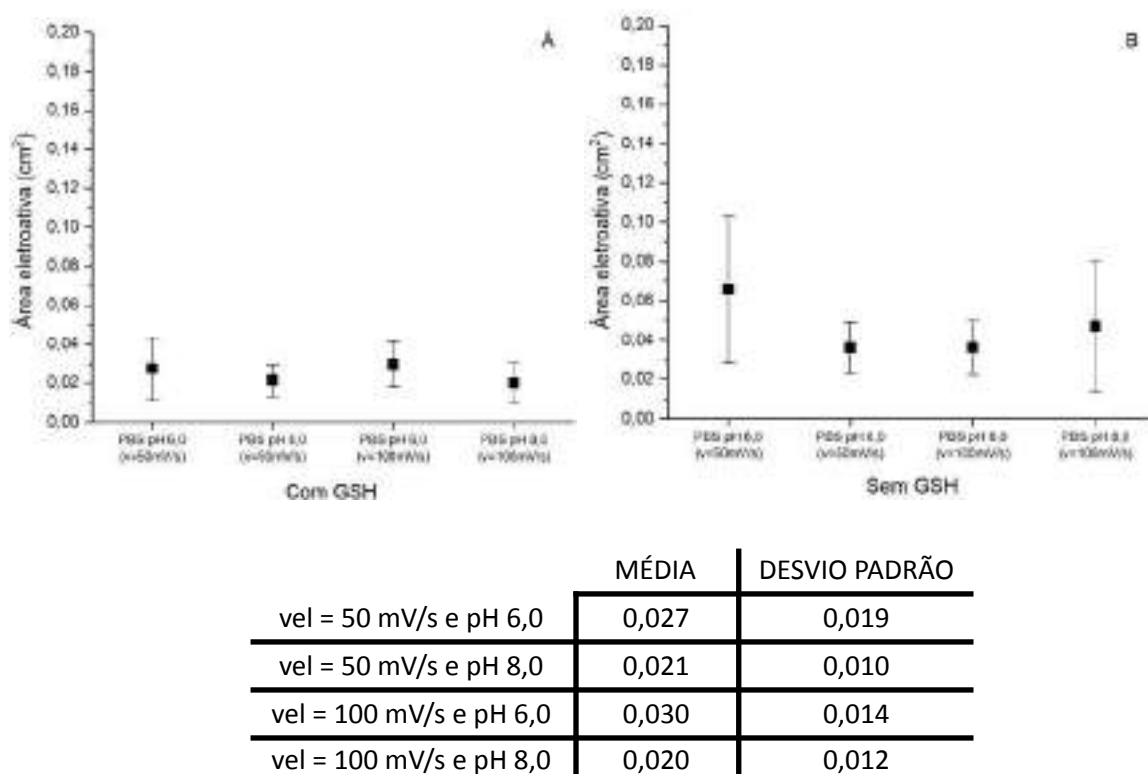


Figura 15. (A) área eletroativa do eletrodo modificado com GSH, (B) área eletroativa do eletrodo modificado com PBS e tabela com valores de médias e desvio padrão da polimerização com GSH. Número de repetições: 5.

5.2 Ativação com os reagentes EDC/NHS e DMTMM

Após a modificação com o polímero, o EDC/NHS e o DMTMM foram as moléculas utilizadas para o favorecimento de uma ligação forte entre o biofilme de GSH e a ssDNA. As análises após a construção do biofilme foram realizadas com o MB, onde há uma reação de oxidação do MB ligado nas guaninas livres do DNA emitindo um sinal mensurável que representa a presença dessas bases nitrogenadas livres no eletrodo, demonstrando também a inacessibilidade das guaninas após a hibridização do DNA através da diminuição deste sinal (Benvidi et al., 2015).

Parâmetros como o meio de solubilização, pH da solução, tampão de lavagem e temperatura foram definidas a partir de análises de artigos que seguiram protocolos semelhantes com o EDC/NHS, sendo usado o tampão MES a pH 5,5 e temperatura ambiente para o preparo desses reagentes e para a etapa

de limpeza (Eissa et al., 2018; Tsai et al., 2018; Pérez-Ràfols et al., 2016; D'Este et al., 2014).

Inicialmente, foram testados os tempos de ativação dos -COOH na superfície com GSH com o uso do EDC/NHS. Na **Figura 16**, é possível observar um aumento ($7,15 \mu\text{A} \pm 0,64$) na corrente referente ao tempo de ativação de 15 minutos, em relação ao tempo de ativação de 10 minutos que, além da média mais baixa, demonstrou uma baixa reprodutibilidade, representada pelo alto desvio padrão. Os três demais tempos testados demonstraram valores semelhantes entre si (médias e desvios padrões), porém mais baixos que a corrente obtida com 15 min, podendo sugerir uma queda da estabilidade da molécula que necessita de preparação imediata antes da deposição na superfície do eletrodo modificado.

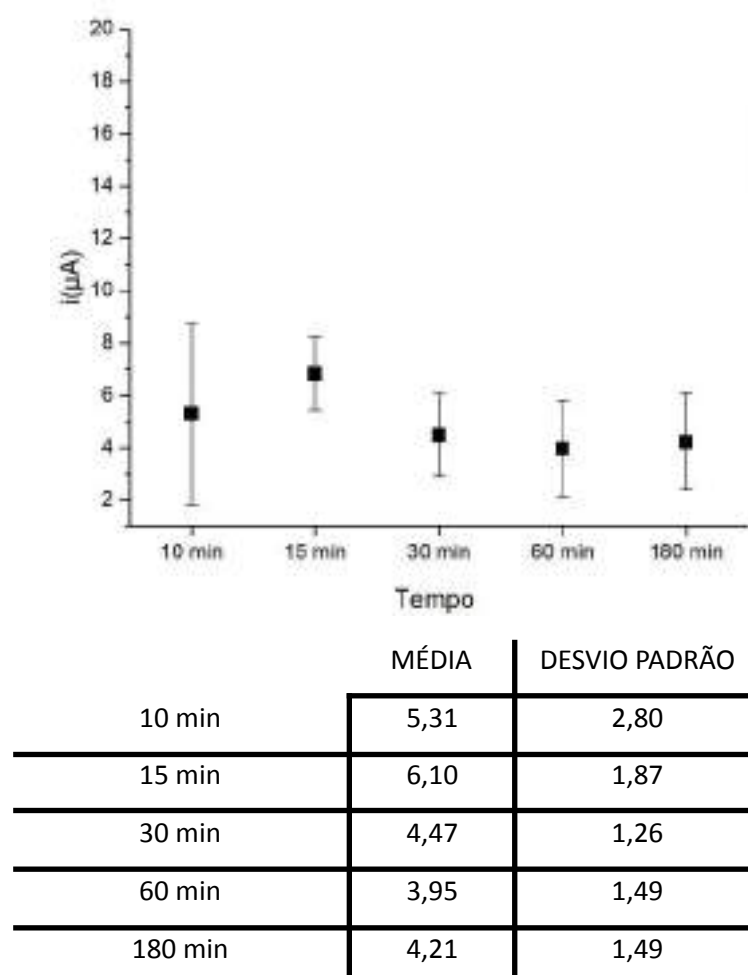
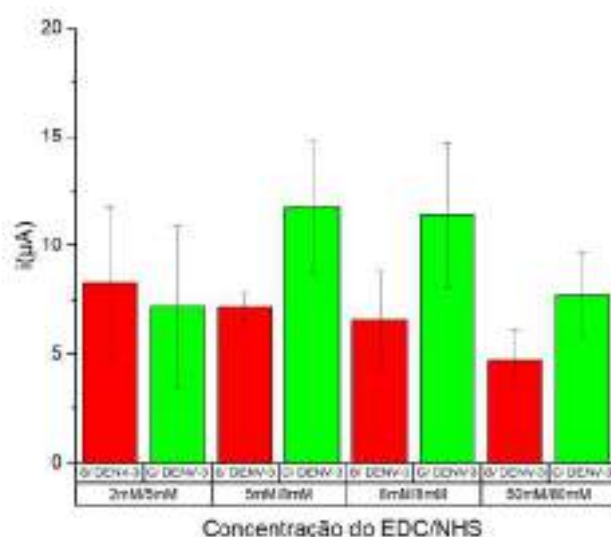


Figura 16. Estudo através de DPV do tempo de ativação dos grupos carboxílicos com o uso de EDC/NHS. Número de repetições: 5.

Em sequência, após a definição do tempo de ativação dos grupos carboxílicos em 15 minutos, foi feito o estudo de concentração dos reagentes EDC/NHS (**Figura 17**). A concentração de EDC 2 mM/NHS 5 mM foi a única que permaneceu com a resposta inalterada após a imobilização da sonda, sugerindo uma provável não ligação da sonda na superfície do eletrodo. As demais concentrações demonstraram a característica comum do aumento da corrente após a imobilização, sinalizando a conjugação específica do MB com as guaninas livres da sonda. Entretanto, a concentração de EDC 5mM/ NHS 8mM se destacou tanto no aumento na corrente após a imobilização, sugerindo uma maior quantidade de sonda firmada na superfície, quanto na reprodutibilidade na análise dos ativados.



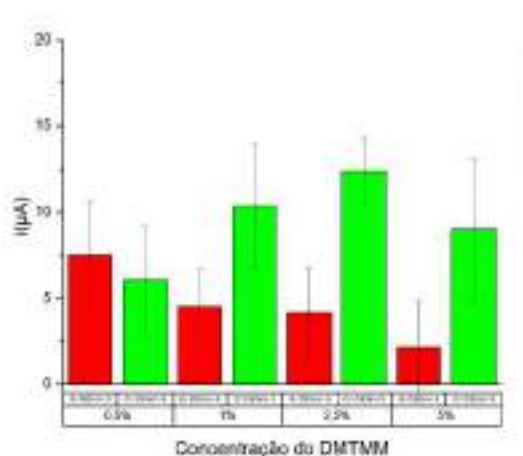
	2mM/5mM		5mM/8mM		8mM/8mM		50mM/80mM	
	S/DENV-3	C/DENV-3	S/DENV-3	C/DENV-3	S/DENV-3	C/DENV-3	S/DENV-3	C/DENV-3
MÉDIA	6,89	7,20	5,72	11,74	5,47	11,40	3,94	7,71
DESV PAD	4,61	3,75	3,24	3,10	3,36	3,33	2,28	1,98

Figura 17. Estudo através de DPV da concentração do EDC/NHS por 15 minutos e imobilização da sonda de 10μM DENV-3 por 16 horas. Número de repetições: 5.

Durante as análises realizadas com o DMTMM foi subtraído o estudo de tempo, já que estudos prévios, como o de Carter et al. (2011), que investigou estratégias de bioconjugação, apresentou 16 horas como período ideal de imobilização de sonda de ssDNA. Os outros parâmetros para a utilização do DMTMM foram retirados de diversos artigos, sendo o meio PBS no pH 7,4 e em temperatura ambiente definidos (D'Este et al., 2014; Sperry et al., 2018; Sole et

al., 2022). Na **Figura 18**, é possível observar uma diminuição da corrente após a imobilização empregando DMTMM a 0,5%. As outras concentrações utilizadas demonstraram o aumento da corrente de oxidação do MB, indicando que houve imobilização da sonda, visto que o MB possui afinidade pelas guaninas que estão disponíveis.

Entretanto, na concentração de 2,5% houve o maior aumento na média das correntes de pico do imobilizado e uma diminuição do desvio padrão em relação aos demais, sugerindo melhor performance e reprodutibilidade que as demais concentrações investigadas.



	0,5%		1%		2,5%		5%	
	S/DENV-3	C/DENV-3	S/DENV-3	C/DENV-3	S/DENV-3	C/DENV-3	S/DENV-3	C/DENV-3
MÉDIA	6,25	6,03	3,72	10,37	3,44	12,39	1,79	8,99
DESV PAD	4,16	3,12	2,72	3,61	2,90	1,97	2,60	4,11

Figura 18. Estudo através de DPV da concentração do DMTMM por 16 horas e imobilização do DMTMM + sonda de 10μM DENV-3 por 16 horas. Número de repetições: 5.

5.3 Imobilização covalente da DENV-3

Para a imobilização foi realizado um estudo entre concentrações de 2,5 μM a 20 μM da ssDNA, diluídas em PBS pH 7,4 e com 16 horas de imobilização para ambos os reagentes de bioconjugação. Os parâmetros empregados na interpretação dos resultados foram a intensidade das correntes de pico e seus desvios padrão.

Percebe-se certa semelhança entre as intensidades das correntes de pico para cada concentração de ssDNA empregando ambos os reagentes de bioconjugação (**Figura 19**).

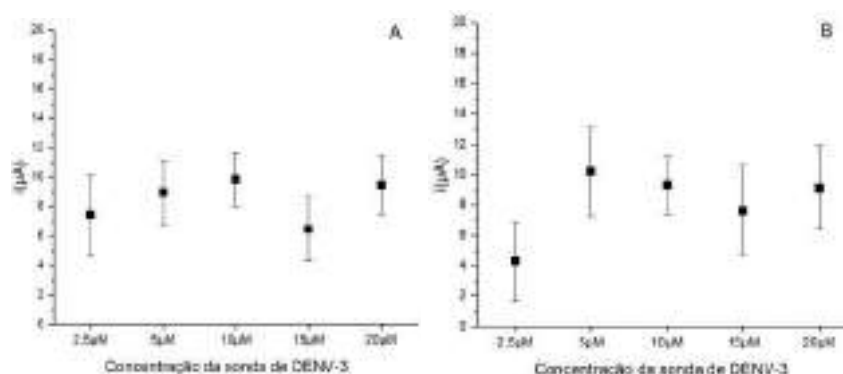


Figura 19. Estudo através de DPV da concentração da ssDNA de DENV-3 na imobilização por 16 h (A) com EDC 5mM/NHS 8mM e (B) com DMTMM a 2,5%. Número de repetições: 5.

Inicialmente, houve a exclusão das concentrações 2,5µM e 15µM para ambos os reagentes de bioconjugação, visto que apresentaram as menores médias das correntes de pico. No caso da ativação com o EDC/NHS, mostrada na **Figura 19 (A)**, a concentração de 10µM apresentou o maior pico e o menor desvio padrão, sugerindo a maior imobilização das fitas simples e a melhor reprodutibilidade, em comparação com os demais. Já na ativação com o DMTMM, mostrada na **Figura 19 (B)**, a concentração de 10µM não apresentou a maior média, mostrando-se muito semelhante às demais concentrações, mas apresentou o menor desvio, indicando a melhor reprodutibilidade entre elas. Logo, a concentração de 10µM foi selecionada para ambos os sistemas.

Na **Figura 20**, é apresentado o voltamograma comparativo entre os resultados dos dois métodos de imobilização (ambos com 10µM de ssDNA), do modificado com o biofilme polimérico de GSH e do branco. Nele, é possível observar nitidamente a diferença na intensidade das correntes de pico para cada etapa de construção. Percebe-se, ainda, diferença entre os métodos de imobilização, onde a ativação dos grupos carboxílicos por DMTMM teve um leve destaque ($12,39\mu A \pm 1,97$) superior ao obtido com a imobilização covalente fornecida pelo EDC/NHS ($11,74\mu A \pm 3,1$). Entretanto, para concluir qual dos dois métodos de imobilização é mais eficiente, é necessário avaliar critérios como a eficiência na hibridização com o alvo complementar e a especificidade do biossensor, resultados estes que serão apresentados a seguir.

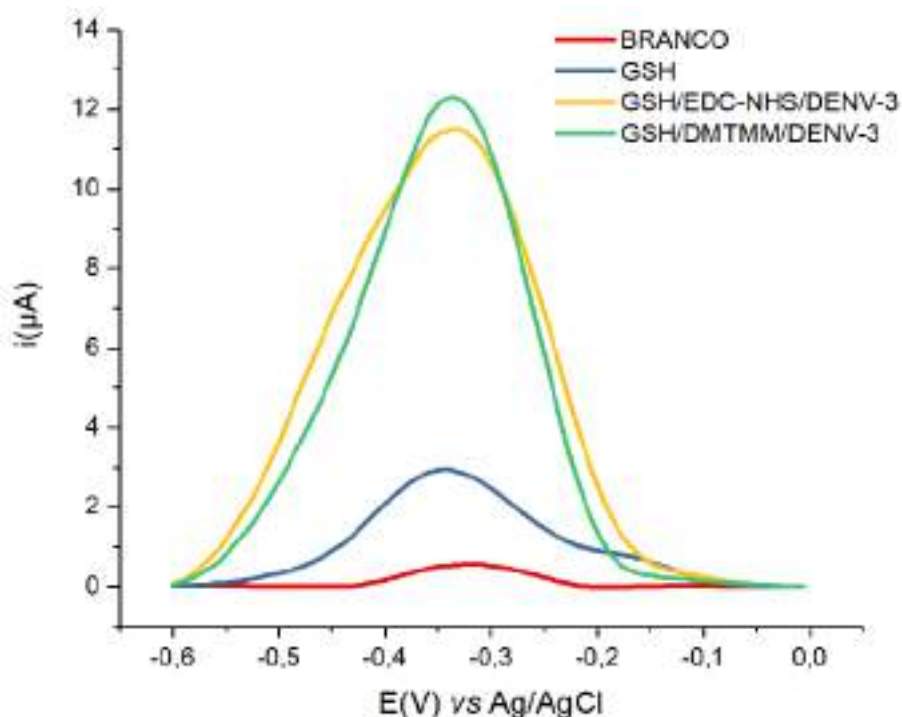


Figura 20. Voltamogramas da diferença na imobilização da ssDNA de DENV-3 entre eletrodos ativados com EDC 5mM/NHS 8mM e com DMTMM a 2,5%, eletropolimerizados com GSH. Número de repetições: 5.

5.4 Hibridização do alvo complementar e avaliação de especificidade

Na **Figura 21**, é apresentado o voltamograma da sequência de modificações executadas para a construção do biossensor ativado com EDC/NHS e sua detecção. No voltamograma, é possível observar o aumento na corrente de pico, do eletrodo ativado ($7,15\mu\text{A} \pm 0,64$) para o eletrodo imobilizado com a ssDNA ($11,74\mu\text{A} \pm 3,10$), que corresponde à imobilização covalente da ssDNA na superfície com os grupamentos $-\text{COOH}$ ativados. Dos alvos empregados para avaliar a eficiência da hibridização e a especificidade, apenas o alvo complementar apresentou queda na corrente ($8,47\mu\text{A} \pm 3,22$) em relação ao imobilizado ($11,47\mu\text{A} \pm 3,22$). O alvo não complementar de ZIKV ($11,15\mu\text{A} \pm 1,87$) não apresentou queda em relação ao imobilizado, sugerindo uma provável especificidade através da permanência da disponibilidade das guaninas livres da ssDNA, devido a não formação da dsDNA.

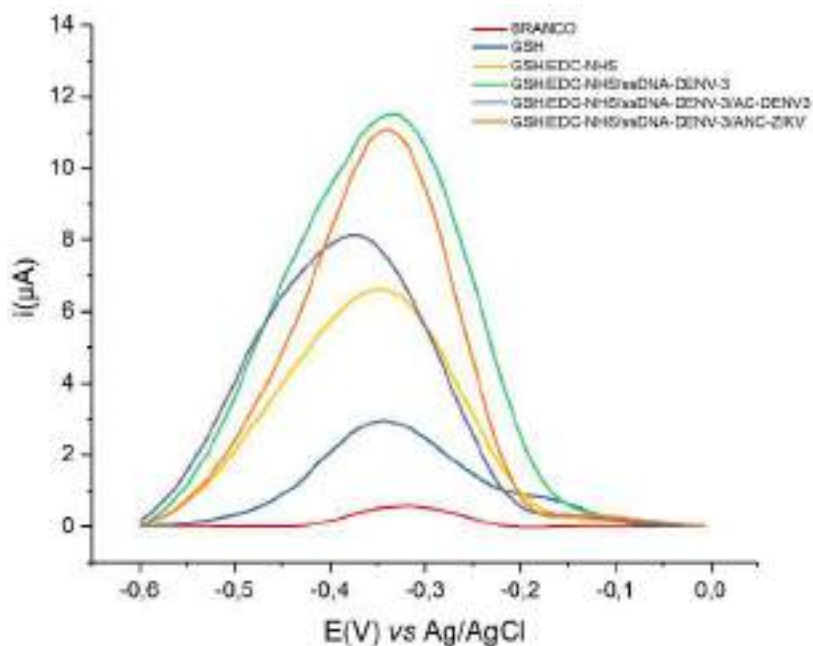


Figura 21. Voltamograma do biossensor branco, modificado com GSH, ativado por 15 minutos com EDC 5mM/NHS 8mM, imobilizado com ssDNA de DENV3 por 16 horas e hibridizado com alvo complementar de DENV3 e alvo complementar de ZIKV, por 10 minutos a 60°C. Número de repetições: 5.

Na **Figura 22**, é apresentado o voltamograma da sequência de modificações executadas para a construção do biossensor ativado com DMTMM e a detecção do AC e do ANC. No voltamograma, é possível observar o aumento na corrente de pico do GSH/DMTMM com média de $4,13\mu\text{A} \pm 2,46$ para o GSH/DMTMM/ssDNA-DENV3 com média de corrente de $12,39\mu\text{A} \pm 1,97$, que corresponde à imobilização covalente da ssDNA na superfície. Para todos os alvos avaliados houve a diminuição na corrente de pico, onde a hibridização com o alvo complementar demonstrou a maior queda, indo para $5,02\mu\text{A} \pm 1,41$, e o alvo não complementar de ZIKV, demonstrou valor similar ao apresentar, média de $5,8\mu\text{A} \pm 1,40$. Portanto, podemos verificar que, apesar do DMTMM apresentar resultado de imobilização semelhante ao EDC-NHS (quando se fala em intensidade da corrente de pico), o biossensor construído não apresentou especificidade.

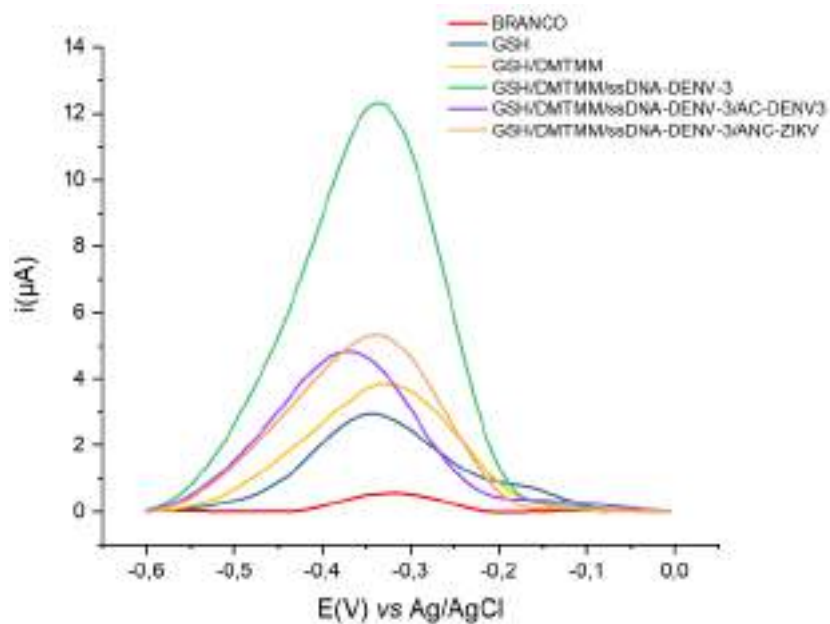


Figura 22. Voltamograma do biossensor ativado por 15 minutos com 2,5% de DMTMM, imobilizado combinado com a ssDNA de DENV3 por 16 horas e hibridizado com alvo complementar de DENV3 e alvo não complementar ZIKV por 10 minutos a 60°C. Número de repetições: 5.

6. CONCLUSÃO

A DENV-3 apresentou-se como preocupante para os cientistas devido ao seu retorno para os balanços de infecções anuais, após mais de 15 anos de falta de relatos desse sorotipo específico, necessitando, com maior urgência, de dispositivos sensíveis, específicos, portáteis e de fácil uso como os biossensores. Neste trabalho, variáveis responsáveis por modificar a superfície de carbono com o biofilme da GSH e dois métodos de bioconjugação covalente, responsáveis por garantir a imobilização eficiente da ssDNA na construção de um dispositivo resistente e sensível, foram avaliados para o desenvolvimento de um biossensor para a identificação de DENV-3.

Em primeiro lugar, foi realizada a modificação da superfície de trabalho com filme polimérico de GSH no pH 8,0, que produziu o biofilme a partir da aplicação da velocidade de varredura de 50mV/s na CV e apresentou um melhor isolamento da superfície eletroativa do eletrodo. Desse modo, o filme polimérico forneceu grupos -COOH livres que, em seguida, foram ativados empregando os reagentes de bioconjugação EDC/NHS e DMTMM. Foram selecionadas as concentrações de 5mM/8mM para o EDC/NHS e de 2,5% para o DMTMM. Para ambos os reagentes de bioconjugação foi selecionada a concentração de 10 μ M da ssDNA de DENV-3.

Ambos os ativadores apresentaram sinais de que foram eficientes na imobilização da ssDNA, demonstrada pelo aumento das respostas (intensidades das correntes de pico) obtidas por DPV. Entretanto, na etapa de hibridização, o sistema formado a partir da utilização do EDC-NHS apresentou desempenho superior ao sistema com DMTMM, onde foi possível verificar a eficiência da detecção do alvo complementar de DENV-3 e a especificidade do biossensor. Já com o DMTMM, apesar de verificarmos a queda do sinal que seria típico do evento de hibridização com o alvo complementar, o mesmo ocorreu com o alvo não complementar de ZIKV, demonstrando falta de especificidade deste biossensor.

Desse modo, podemos concluir que a metodologia de bioconjugação via EDC-NHS foi mais eficaz no desenvolvimento de um biossensor para detecção de DENV-3. Entretanto, faz-se necessário ainda a análise de diferentes concentrações do alvo complementar com a finalidade de determinar o limite de

detecção deste biossensor, bem como avaliar a eficiência do mesmo em amostras biológicas. Além disso, melhorias na construção do biossensor ainda podem ser implementadas, como por exemplo, a utilização de bloqueadores de superfície como BSA, glicina, etanolamina, para impedir a formação de ligações inespecíficas (Jaramillo et al., 2013; SHAMSIPUR et al., 2021; Lima et al., 2007; Basso et al., 2018). Dessa forma, caminharemos no sentido de fornecer garantias de que o biossensor em questão identifique especificamente e com precisão o DENV-3 de acordo com as necessidades requeridas.

REFERÊNCIAS

ALCON, Sophie et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 2, p. 376-381, 2002.

ALHEDABI, Taleb et al. Experimental and theoretical studies on electropolymerization of polar amino acids on platinum electrode. **Materials Chemistry and Physics**, v. 185, p. 183-194, 2017.

ALZATE, Daniel et al. Genosensors for differential detection of Zika virus. **Talanta**, v. 210, p. 120648, 2020.

BASSO, Caroline R. et al. An easy way to detect dengue virus using nanoparticle-antibody conjugates. **Virology**, v. 513, p. 85-90, 2018.

BENVIDI, Ali et al. Designing and fabrication of a novel sensitive electrochemical aptasensor based on poly (L-glutamic acid)/MWCNTs modified glassy carbon electrode for determination of tetracycline. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 808, p. 311-320, 2018.

BENVIDI, A. et al. A highly sensitive and selective electrochemical DNA biosensor to diagnose breast cancer. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 750, p. 57-64, 2015.

BIASSOTI, Amabile Visioti; ORTIZ, Mariana Aparecida Lopes; DA DENGUE, DIAGNÓSTICO LABORATORIAL. Diagnóstico laboratorial da dengue. **Uningá Review**, v. 29, n. 1, 2017.

BORISOV, Sergey M.; WOLFBEIS, Otto S. Optical biosensors. **Chemical reviews**, v. 108, n. 2, p. 423-461, 2008.

CARNEIRO, Mariana CCG et al. Homemade 3-carbon electrode system for electrochemical sensing: Application to microRNA detection. **Microchemical Journal**, v. 138, p. 35-44, 2018.

CARTER, Joshua D. et al. Coupling strategies for the synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates for patterned synthetic biomineralization. **Journal of nucleic acids**, v. 2011, 2011.

CNN Brasil. Cidade do interior paulista registra subtipo de dengue que estaria fora de SP há 15 anos. Disponível em:

<<https://www.cnnbrasil.com.br/saude/cidade-do-interior-paulista-registra-subtipo-dengue-que-estaria-fora-de-sp-ha-15-anos/>>. Acesso em: 7 mar. 2024.

CORDEIRO, Taís AR et al. Label-free electrochemical impedance immunosensor based on modified screen-printed gold electrodes for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Talanta**, v. 195, p. 327-332, 2019.

D'ESTE, Matteo; EGLIN, David; ALINI, Mauro. A systematic analysis of DMTMM vs EDC/NHS for ligation of amines to hyaluronan in water. **Carbohydrate polymers**, v. 108, p. 239-246, 2014.

D'ORAZIO, Paul. Biosensors in clinical chemistry. **Clinica chimica acta**, v. 334, n. 1-2, p. 41-69, 2003.

DIAS, Larissa BA et al. Dengue: transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. **INCID: Revista de Ciência da Informação e Documentação**, v. 43, n. 2, p. 143-152, 2010.

EISSA, Shimaa et al. Electrochemical immunosensors for the detection of survival motor neuron (SMN) protein using different carbon nanomaterials-modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 101, p. 282-289, 2018.

FARKAŠ, Pavol et al. Comparison of EDC and DMTMM efficiency in glycoconjugate preparation. **International journal of biological macromolecules**, v. 60, p. 325-327, 2013.

FARKAŠ, Pavol; BYSTRICKÝ, Slavomír. Efficient activation of carboxyl polysaccharides for the preparation of conjugates. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 1, p. 187-190, 2007.

GULER, Emine et al. A novel functional conducting polymer as an immobilization platform. **Materials Science and Engineering: C**, v. 40, p. 148-156, 2014.

HAMMOND, Jules L. et al. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. **Essays in biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 69-80, 2016.

HARNISCH, Falk; FREGUIA, Stefano. A basic tutorial on cyclic voltammetry for the investigation of electroactive microbial biofilms. **Chemistry—An Asian Journal**, v. 7, n. 3, p. 466-475, 2012.

HINTERWIRTH, Helmut; LINDNER, Wolfgang; LÄMMERHOFER, Michael. Bioconjugation of trypsin onto gold nanoparticles: effect of surface chemistry on bioactivity. **Analytica chimica acta**, v. 733, p. 90-97, 2012.

HOSSEINI, Samira et al. Synthesis and characterization of methacrylic microspheres for biomolecular recognition: Ultrasensitive biosensor for dengue virus detection. **European Polymer Journal**, v. 60, p. 14-21, 2014.

HUANG, Biling et al. A novel in-situ strategy for enantiomeric discrimination and selective identification of multicomponent carboxylic acids in foods. **Analytica Chimica Acta**, v. 1230, p. 340402, 2022.

ISLAM, Muhammad Torequl et al. Production, transmission, pathogenesis, and control of dengue virus: A literature-based undivided perspective. **BioMed Research International**, v. 2021, 2021.

JAHANBANI, Shahriar; BENVIDI, Ali. Comparison of two fabricated aptasensors based on modified carbon paste/oleic acid and magnetic bar carbon paste/Fe₃O₄@ oleic acid nanoparticle electrodes for tetracycline detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 553-562, 2016.

JARAMILLO, M. et al. Design of a piezoelectric immunosensor for tuberculosis biomarker detection. In: **2013 Pan American Health Care Exchanges (PAHCE)**. IEEE, 2013. p. 1-7.

KARUNAKARAN, Chandran; RAJKUMAR, Raju; BHARGAVA, Kalpana. Introduction to biosensors. In: **Biosensors and bioelectronics**. Elsevier, 2015. p. 1-68.

KAUR, Gurpreet; TOMAR, Monika; GUPTA, Vinay. Realization of a label-free electrochemical immunosensor for detection of low density lipoprotein using NiO thin film. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 80, p. 294-299, 2016.

KAVITA, VJJBBS. DNA biosensors-a review. **J. Bioeng. Biomed. Sci**, v. 7, n. 2, p. 222, 2017.

KAWAMURA, Akifumi; MIYATA, Takashi. Biosensors. In: **Biomaterials nanoarchitectonics**. William Andrew Publishing, 2016. p. 157-176.

KAZEMI-DARSANAKI, Reza et al. Biosensors: functions and applications. **J. Biol. Today's World**, v. 2, n. 1, p. 53-61, 2013.

KHALAFI, Lida; RAFIEE, Mohammad. Cyclic Voltammetry. **Encyclopedia of Physical Organic Chemistry**, v. 5, p. 3437-3478, 2017.

LIGAJ, Marta et al. Covalent attachment of single-stranded DNA to carbon paste electrode modified by activated carboxyl groups. **Electrochimica acta**, v. 51, n. 24, p. 5193-5198, 2006.

LIMA, Roberval Soares et al. Biossensor enzimático para detecção de fungicidas ditiocarbamatos: estudo cinético da enzima aldeído desidrogenase e otimização do biossensor. **Química Nova**, v. 30, p. 9-17, 2007.

LIN, Yuqing et al. Electrochemical sensing of bisphenol A based on polyglutamic acid/amino-functionalised carbon nanotubes nanocomposite. **Electrochimica Acta**, v. 133, p. 492-500, 2014.

LIU, Chen et al. Graphene oxide functionalized long period grating for ultrasensitive label-free immunosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 94, p. 200-206, 2017.

MACIEL, Ivan José; JÚNIOR, João Bosco Siqueira; MARTELLI, Celina Maria Turchi. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 37, n. 2, p. 111-130, 2008.

MATUZ-MARES, Deyamira et al. Glutathione participation in the prevention of cardiovascular diseases. **Antioxidants**, v. 10, n. 8, p. 1220, 2021.

MEHROTRA, Parikha. Biosensors and their applications—A review. **Journal of oral biology and craniofacial research**, v. 6, n. 2, p. 153-159, 2016.

MENEZES, Ana Maria Fernandes et al. Perfil epidemiológico da dengue no Brasil entre os anos de 2010 à 2019/Epidemiological profile of dengue in Brazil between 2010 and 2019. **Brazilian Journal of Health Review**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 13047-13058, 2021.

MULLER, David A.; DEPELSENAIRE, Alexandra CI; YOUNG, Paul R. Clinical and laboratory diagnosis of dengue virus infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 215, n. suppl_2, p. S89-S95, 2017.

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

PACHECO, J. G. et al. Biosensors. In: **Current developments in biotechnology and bioengineering**. Elsevier, 2017. p. 627-648.

PALMA, Alberto et al. Determination of antioxidant activity of spices and their active principles by differential pulse voltammetry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 3, p. 582-589, 2014.

PÉREZ-RÀFOLS, Clara et al. Glutathione modified screen-printed carbon nanofiber electrode for the voltammetric determination of metal ions in natural samples. **Talanta**, v. 155, p. 8-13, 2016.

PERUMAL, Veeradasan; HASHIM, Uda. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **Journal of applied biomedicine**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2014.

PONTES, Ricardo JS; RUFFINO-NETTO, Antonio. Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, p. 218-227, 1994.

RAGHAV, Ragini; SRIVASTAVA, Sudha. Immobilization strategy for enhancing sensitivity of immunosensors: L-Asparagine–AuNPs as a promising alternative of EDC–NHS activated citrate–AuNPs for antibody immobilization. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 78, p. 396-403, 2016.

RASHID, Jahwarhar Izuan Abdul; YUSOF, Nor Azah. The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review. **Sensing and bio-sensing research**, v. 16, p. 19-31, 2017.

SAHA, Bedabrata et al. The influence of covalent immobilization conditions on antibody accessibility on nanoparticles. **Analyst**, v. 142, n. 22, p. 4247-4256, 2017.

SAINI, Anuj K.; SAHOO, Suban K. A copper (II) displacement approach for fluorescent turn-on sensing of glutathione using salicylaldehyde modified polydopamine nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 430, p. 113987, 2022.

SHAMSIPUR, Mojtaba et al. Development of an ultrasensitive electrochemical genosensor for detection of HIV-1 pol gene using a gold nanoparticles coated carbon paste electrode impregnated with lead ion-imprinted polymer nanomaterials as a novel electrochemical probe. **Microchemical Journal**, v. 160, p. 105714, 2021.

SHU, Pei-Yun et al. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 10, n. 4, p. 622-630, 2003.

SITUMORANG, Manihar et al. Electrodeposited polytyramine as an immobilisation matrix for enzyme biosensors. **Biosensors and bioelectronics**, v. 13, n. 9, p. 953-962, 1998.

SPERRY, Jeffrey B. et al. Thermal stability assessment of peptide coupling reagents commonly used in pharmaceutical manufacturing. **Organic Process Research & Development**, v. 22, n. 9, p. 1262-1275, 2018.

SOLE, Roberto et al. Boosting physical-mechanical properties of adipic acid/chitosan films by DMTMM cross-linking. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 209, p. 2009-2019, 2022.

STEVENS, Andrew J. et al. The medicinal chemistry of dengue fever. **Journal of medicinal chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7911-7926, 2009.

TABRIZI, Mahmoud Amouzadeh; SHAMSIPUR, Mojtaba. A label-free electrochemical DNA biosensor based on covalent immobilization of salmonella DNA sequences on the nanoporous glassy carbon electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 69, p. 100-105, 2015.

TSAI, Jang-Zern et al. Screen-printed carbon electrode-based electrochemical immunosensor for rapid detection of microalbuminuria. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 1175-1182, 2016.

TSAI, Tien-Chun et al. In situ study of EDC/NHS immobilization on gold surface based on attenuated total reflection surface-enhanced infrared absorption spectroscopy (ATR-SEIRAS). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 300-305, 2019.

TURNER, Anthony PF. Biosensors: sense and sensibility. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 8, p. 3184-3196, 2013.

VARIETTI, Mariapia et al. Changes in glutathione content in liver diseases: an update. **Antioxidants**, v. 10, n. 3, p. 364, 2021.

WANG, H. Y. et al. Comparison of Differential Pulse Voltammetry (DPV)—a new method of carbamazepine analysis—with Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA). **Journal of Analytical Chemistry**, v. 66, p. 415-420, 2011.

WESTBROEK, P.; PRINIOTAKIS, G.; KIEKENS, P. Electrochemical methods. **Analytical electrochemistry in textiles**, v. 356, 2005.

World Health Organization (WHO). Disease Outbreak News: **Dengue - Global situation**. Disponível em:

<https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON498>.
Acesso em: 17/02/2023.

XIA, Qiao et al. The application of poly (glutathione disulfide)-poly (L-lysine) multilayer films for the enantioselective interaction with ascorbic acid and isoascorbic acid. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 163, n. 14, p. B744, 2016.