



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Instituto Keizo Asami

ANNA BEATRIZ DE OLIVEIRA BARBOSA

**DESENVOLVIMENTO DE GENOSENSOR
ELETROQUÍMICO PARA O DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

Recife
2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
INSTITUTO KEIZO ASAMI

ANNA BEATRIZ DE OLIVEIRA BARBOSA

**DESENVOLVIMENTO DE GENOSENSOR
ELETROQUÍMICO PARA O DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

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

Orientador: José Luiz de Lima Filho
Coorientadora: Valeria Visani

Recife
2024

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

Barbosa, Anna Beatriz de Oliveira.

Desenvolvimento de genossensor eletroquímico para o diagnóstico rápido de
Mycobacterium tuberculosis / Anna Beatriz de Oliveira Barbosa. - Recife, 2024.
86 p. : il.

Orientador(a): José Luiz de Lima Filho

Cooorientador(a): Valeria Visani

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

1. Biossensores. 2. Tuberculose. 3. Bioconjugação. 4. Sonda de DNA. 5.
Rv2341. I. Lima Filho, José Luiz de . (Orientação). II. Visani, Valeria.
(Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

ANNA BEATRIZ DE OLIVEIRA BARBOSA

**DESENVOLVIMENTO DE GENOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA
O DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

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: 18/03/2024

BANCA EXAMINADORA

Orientador: **Prof. Dr José Luiz de Lima Filho**
Instituto Keizo Asami/Universidade Federal de Pernambuco

Coorientadora: **Dra. Valeria Visani**
Instituto Keizo Asami

Prof. Dr. Thiago de Salazar e Fernandes
Universidade Federal de Pernambuco/Dpt de Biofísica e Radiobiologia

Dra. Carolina Ribeiro Córdula
Instituto Keizo Asami/Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a minha gloriosa mãe, Rose, por me ensinar por exemplo que desistir nunca é uma opção. Você me inspira a acreditar em dias melhores.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me dar forças para enfrentar este desafio e por ter colocado todas as pessoas certas no meu caminho.

Agradeço ao meu orientador, José Luiz de Lima Filho, por ter me ensinado que a melhor qualidade de um cientista é a ousadia e especialmente por ser a primeira pessoa a me fazer acreditar na ciência que remove fronteiras.

À Valéria Visani, minha orientadora em todos os sentidos da palavra. Agradeço não só pelos ensinamentos, mas pelo carinho, compreensão, puxões de orelha, pela dedicação ferrenha e ética de trabalho imaculada. Você é um exemplo da profissional que um dia eu quero me tornar.

Agradeço a minha mãe, Rose, por estar ao meu lado desde o primeiro passo da graduação até a linha de chegada desta jornada. É um privilégio imensurável ter alguém que me apoia incondicionalmente, em todos os aspectos que importam. Você é a pessoa mais destemida que eu conheço, quando terminar de crescer, espero que minha maior conquista seja enfrentar o mundo de frente como você.

Ao meu pai, Bruno César, que sempre respeitou todas as minhas decisões e ensinou a importância de fazer escolhas difíceis. Obrigada pelo incentivo e por sempre estar disposto a fazer qualquer coisa para facilitar o meu caminho.

À minha avó Cleide, meu porto seguro em tempestades violentas, voz da razão em meio ao caos.

À minha avó Fátima, que não me deixa esquecer que a vida é cor de rosa e nunca para de acontecer.

À Evandro e Nataly, tio e tia, que se fazem presentes todos os dias mesmo a 2130 km de distância.

Á Adja, minha fita complementar. Acho que não existe analogia melhor a nossa amizade do que aquela primeira interação: duas desconhecidas engessadas, abraçadas, apoiando uma a outra degrau por degrau, até chegar no topo. Entre vitórias e derrotas, sem você (e suas ligações) eu não estaria aqui. Obrigada por continuar a me apoiar, mesmo por caminhos tortuosos, ainda que seja com um pé só.

Á Victor Lucas, que o destino fez questão de pôr em meu caminho. Em salas de aula, no laboratório, durante o estágio, pelas ruas da cidade e até em outros estados. Chego a perder a conta de quantas vezes contamos um com o outro, às vezes parece telepatia. Só se vive uma vez, e eu não poderia ter escolhido um amigo melhor para mergulhar comigo nessa fase tão maravilhosa e assustadora que foi a graduação.

Á Cibely Siqueira de Sá, que eu conheço de outros Carnavais. Obrigada por estar aqui nos momentos felizes, nos momentos tristes e nos espaços entre o lá e o aqui. És a melhor consultora científica, pseudo-terapeuta e parceira de crime que a Várzea já viu. Não vejo a hora de estar rindo muito de tudo isso contigo lá em outro país.

Á Mateus Barbosa, designer oficial desta graduação, que estacionou na minha vida a quase uma década e não parece ter planos de ir embora. Nesse tempo todo, já nos tornamos aproximadamente vinte versões novas de nós mesmos. Mal posso esperar pelas presepadas fantásticas que o futuro trará.

Á José Lucas Mariz, por me buscar em lugares escuros e me trazer para casa, de mais maneiras além da literal.

Á Thiago de Salazar e Fernandes, que nunca deu as respostas, mas me ensinou como fazer as perguntas. Obrigada por contar que ideias são poderosas, mostrar que a ciência é uma coisa viva e vibrante, que se faz ciência toda hora, em qualquer lugar, com os recursos que se tem e da melhor maneira que der pra imaginar.

Á Dijanah Cota Machado, que derruba mil muros todos os dias, empunhando nada além de boa vontade e gentileza. Você transformou um pouco as vidas de todos os alunos em que tocou, comigo não seria diferente. A única coisa melhor do que ser sua aluna foi me tornar sua amiga.

Agradeço a Cláudio, Maria Eduarda Beatriz, Maria Izabel, Túlio, Sarah, Caio e a todos os fantásticos membros da minha primeira casa na Universidade, o Departamento de Biofísica e Radiobiologia. Em especial, sou grata a Isvânia e Jonas, que primeiro me estenderam a mão e abriram as portas do laboratório para aquela garota de dezesseis anos, com muito mais sonhos que planos.

Agradeço também a Eliza, Yanka, Sandro, Artur, Rosana, Ariane, Zion, Beatriz Salomoni, Lara e todos os amigos que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less”.

— Marie Skłodowska Curie

BARBOSA, A.B.O.B. **Desenvolvimento de genossensor eletroquímico para o diagnóstico rápido de *Mycobacterium tuberculosis***. 2024. 86 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

A tuberculose é a segunda doença infecciosa que mais leva à morte no mundo, mesmo que seja considerada uma condição tratável. Um dos fatores limitantes principais para o controle da epidemia, especialmente em países vulneráveis socioeconomicamente, é o diagnóstico. Os principais métodos diagnósticos: PCR, pesquisa sorológica e baciloscopia apresentam problemas de especificidade, são demorados e caros, além de exigirem mão de obra qualificada e estrutura laboratorial sofisticada. Na luz dessa problemática, considera-se então um método de diagnóstico rápido, barato e eficaz: os biossensores. Um passo vital no desenvolvimento destes dispositivos é a bioconjugação do biorreceptor na superfície de maneira estável. Assim, a escolha do biorreceptor também deve ser muito cuidadosa. O gene Rv2341 é um excelente candidato, com o potencial de superar vários marcadores utilizados atualmente para a detecção de TB. Está presente nas cepas de MT registradas no banco de dados NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*) e até agora não ocorreu expressão gênica do mesmo em outros microrganismos não relacionados, atestando a especificidade do mesmo. Ademais, o sistema não se tornará supérfluo ao longo dos anos, já que o gene se encontra numa região estável que provavelmente estará presente nas próximas mutações das cepas de TB. A partir da sequência deste gene, foi sintetizada uma sonda aminada de DNA para imobilização na superfície do eletrodo. Para a construção do sistema foram confeccionados eletrodos de carbono serigrafados com um eletrodo de trabalho (WE) e um contra eletrodo (CE) feitos de pasta de carbono e eletrodo de referência (RE) de Ag/AgCl. Para a ligação covalente, foi gerado, por eletropolimerização, um filme de ácido glutâmico na superfície, com o intuito de fornecer os grupos carboxílicos (COOH) exigidos para formar a ligação com os grupos amina (-NH₂) presentes na sonda de DNA. O agente bioconjugador DMTMM (4-(4,6-Dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il) foi utilizado por ser capaz de potencializar a

formação de ligações amida em meio neutro. Enfim, foi possível desenvolver um dispositivo que consegue diferenciar entre a sequência complementar da TB e uma sequência não complementar em meio sintético. Também foi possível caracterizar o sistema e comprovar o sucesso de cada etapa de modificação do sistema através de voltametria de pulso diferencial, espectroscopia de impedância eletroquímica e espectroscopia no infravermelho médio por transformada de Fourier. O desenvolvimento deste biossensor será um aliado importantíssimo no diagnóstico da TB, tanto no Brasil, com a possível implementação deste método do SUS, quanto em outros países que ainda são gravemente afetados por epidemias da doença.

Palavras-chave: Biossensores. Tuberculose. Bioconjugação. Sonda de DNA. Rv2341.

BARBOSA, A.B.O.B. **Development of an electrochemical genosensor for the rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis***. 2024. 86 pages. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is the second most deadly infectious disease in the world, even though it's considered a treatable condition. One of the main limiting factors for controlling this epidemic, especially in socio-economically vulnerable countries, is diagnosis. The main diagnostic methods: PCR, serological research and bacilloscopy present specificity problems, are time-consuming and expensive, in addition to requiring trained professionals and sophisticated laboratory structure. In light of this problem, consider a fast, cheap and effective diagnostic method: biosensors. A vital step in the development of these devices is the bioconjugation of the bioreceptor onto the electrode surface in a stable manner. Therefore, the choice of the bioreceptor must also be very careful. The Rv2341 gene is an excellent candidate, with the potential to surpass several markers currently used for TB detection. It is present in MT strains registered in the NCBI database (*The National Center for Biotechnology Information*) and until now there has been no signs of this gene expression in other unrelated microorganisms, attesting to its specificity. Furthermore, the system will not become superfluous over the years, as the gene is located in a stable region that will most likely be present in the next mutations of TB strains. From the sequence of this gene, a DNA probe modified with an amine was synthesized for immobilization on the electrode surface. To build the system, screen-printed carbon electrodes were used with a working electrode (WE) and a counter electrode (CE) made of carbon paste and a reference electrode (RE) made of Ag/AgCl. To forge the covalent bond, a glutamic acid film was generated on the surface through cyclic voltammetry, by electropolymerization, to provide the carboxylic groups (COOH) required to form the bond with the amine groups (-NH₂) present in the DNA probe. The bioconjugating agent DMTMM (4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl) was used because it is capable of enhancing the formation of amide bonds in a neutral medium. Finally, it was possible to develop a

device that can differentiate between the TB complementary sequence and a non-complementary sequence in synthetic media. It was also possible to characterize the system and prove the success of each stage of modification through differential pulse voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy and Fourier transform infrared spectroscopy. The development of this biosensor will be a very important ally in the diagnosis of TB, both in Brazil, with the possible implementation of this method in the Public Health System (SUS), as well as in other countries that are still seriously affected by epidemics of the disease.

Key words: Biosensors. Tuberculosis. Bioconjugation. DNA probe. Rv2341.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema de transmissão da tuberculose	20
Figura 2 – Granuloma rodeado por linfócitos	21
Figura 3 – Necrose caseosa	21
Figura 4 – Incidência de casos de tuberculose em 2022	23
Figura 5 – Casos de tuberculose a por 100.00 habitantes no ano de 2021	25
Figura 6 – Casos de tuberculose droga resistente no Brasil, ano de 2021	26
Figura 7 – Fluxo laboratorial para amostras suspeitas de tuberculose	28
Figura 8 – Elementos de um biossensor	32
Figura 9 – Estrutura química do Glu	37
Figura 10 – Eletropolimerização do Glu	38
Figura 11 – Técnicas de imobilização de biossensores	39
Figura 12 – Esquema de bioconjugação por EDC/NHS	41
Figura 13 – Esquema de bioconjugação com DMTMM	42
Figura 14 – Rampa de potencial (DPV)	43
Figura 15 – Representação de um voltamograma (DPV)	43
Figura 16 – Representação de um voltamograma Cíclico (CV)	45
Figura 17 – Modelo de um diagrama de Nyquist	47
Figura 18 – Circuito equivalente de Randles	47
Figura 19 – SPCE's e seus elementos	52
Figura 20 – Metodologia de construção do sistema	54
Figura 21 – Estudo de pré tratamento (Diagrama de Nyquist)	57
Figura 22 – Gráfico de barras do estudo de pré tratamento nos SPCE	57
Figura 23 – Estudo de eletropolimerização com Glu (Diagrama de Nyquist)	59
Figura 24 – Estudo de eletropolimerização com Glu (Gráfico de barras)	60
Figura 25 – Estudo da concentração do DMTMM	61
Figura 26 – Estudo do tempo de imobilização de sdTB	62
Figura 27 – Estudo de concentração de sonda TB	64
Figura 28 – Caracterização do sistema (EIS)	65
Figura 29 – Caracterização do sistema (DPV)	66
Figura 30 – Caracterização do sistema (FTIR)	67
Figura 31 – Estudo de detecção do alvo complementar e especificidade	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAN	Ensaio de Amplificação de Ácidos Nucleicos
ATR	Reflectância total atenuada
BAAR	Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
CTB	Complexo <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
CV	Voltametria Cíclica
DPV	Voltametria de pulso diferencial
DMTMM	4-(4,6-Dimetoxi-1,3,5-triazina-2-il)-4-cloreto de metilmorfolínio
EIS	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
GLU	Ácido glutâmico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IGRA	Teste de Interferon Gama
LAM	Lipoarabinomanano
MIR	Espectroscopia no infravermelho médio
MTB	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PNCT	Plano Nacional de Combate a Tuberculose
SdTB	Sonda aminada de Tuberculose
SPCE	Eletrodos de carbono impressos
TB	Tuberculose
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TSA	Teste de sensibilidade aos antibióticos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Tuberculose.....	20
2.2 Epidemiologia.....	23
2.3 Diagnóstico.....	28
2.3.1 Baciloscopia.....	29
2.3.2 Cultura.....	30
2.3.3 Imunoensaio.....	30
2.3.4 PCR.....	31
2.4 Biossensores.....	32
2.4.1 Classificação dos biossensores quanto aos biorreceptores.....	33
2.4.2 Classificação dos biossensores quanto aos transdutores.....	36
2.5 Modificação da superfície do transdutor.....	37
2.6 Técnicas de imobilização do biorreceptor.....	39
2.6 Dmtmm como agente bioconjugador.....	42
2.7 Técnicas analíticas.....	43
2.6.1 Voltametria de Pulso Diferencial (DPV).....	44
2.6.2 Voltametria Cíclica (CV).....	45
2.6.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS).....	46
2.6.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)...	49
3 OBJETIVOS.....	51
3.1 Geral.....	51
3.2 Específicos.....	51
4 METODOLOGIA.....	51
4.1 Materiais.....	52
4.2 Construção dos spce.....	52
4.3 Pré tratamento e modificação do eletrodo de trabalho.....	53
4.4 Imobilização do biorreceptor no eletrodo modificado.....	54
4.5 Detecção da molécula alvo e avaliação da especificidade.....	54
4.6 Técnicas analíticas.....	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 Pré tratamento com ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄).....	57
5.2 Modificação da superfície com filme polimérico obtido por meio da eletropolimerização do ácido glutâmico.....	59
5.3 Definição da concentração de Dmtmm.....	61
5.4 Estudo do tempo de imobilização da sonda.....	63
5.5 Estudo da concentração de sonda.....	64

5.6	Caracterização do sistema.....	65
5.6.1	Caracterização do sistema por EIS e DPV.....	65
5.6.2	Caracterização do sistema por FTIR.....	67
5.7	Detecção do alvo complementar e avaliação da especificidade por DPV	69
6	CONCLUSÃO.....	71

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa provocada pelas bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB). A transmissão ocorre de pessoa para pessoa através de aerossóis e gotículas de saliva (Natarajan et al., 2020). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2022, aproximadamente 7,5 milhões de pessoas adoeceram com TB. Esta doença está entre as dez principais causas de morte no mundo, estando em primeiro lugar entre pacientes HIV positivos (OMS 2022). Apesar da TB ser uma doença tratável, continua sendo um grande problema de saúde mundial. O obstáculo enfrentado em seu controle está na lentidão do diagnóstico, o que contribui para agravar todo o processo de transmissão, com elevação do número de casos novos da doença, principalmente em países em situação de vulnerabilidade econômica e social (Pai et al., 2017).

Atualmente, as principais estratégias para o diagnóstico da TB se concentram na visualização dos bacilos de MTB por microscopia, no crescimento bacteriano em meio de cultura específico, padrão para a OMS, na detecção da resposta imune do hospedeiro e em ensaios de amplificação de ácido nucleico (Gualano et al., 2019; Pai et al., 2017). Estes testes apresentam certas limitações no que condiz à sensibilidade e especificidade e/ou possuem custo elevado, necessitam de estruturas laboratoriais complexas e pessoal treinado (Carranza et al., 2020; Sanyaolu, 2019).

Biossensores são ferramentas analíticas que possuem biorreceptores específicos para determinados alvos. Os biorreceptores são imobilizados sobre um transdutor, o qual é responsável por traduzir a resposta biológica, gerada entre a interação do alvo com o biorreceptor, em um sinal mensurável (Ozer et al., 2020). Dentre os tipos de transdutores que podem ser utilizados, os eletroquímicos são os mais vantajosos, uma vez que podem ser facilmente miniaturizados, apresentam baixo custo, fácil manuseio e conseguem analisar amostras complexas como sangue (Ronkainen et al., 2010). Além disso, podem ser modificados por diversos

agentes inorgânicos e orgânicos, como aminoácidos, que podem melhorar a performance analítica do biossensor (Campos-Ferreira et al., 2013; Eloi et al., 2016; El Aamri et al., 2020; Nascimento et al., 2012). Estas características tornam esses transdutores os ideais para uso em grande escala e pelo público geral (Radi et al., 2021).

Existem vários tipos de eletrodos que podem ser utilizados para a montagem de um biossensor eletroquímico. Contudo, como há o objetivo de desenvolver um dispositivo para diagnóstico rápido, eletrodos de carbono impresso (SPCE) são mais vantajosos que os demais. (Mincu et al., 2020).

Com relação aos tipos de biorreceptores, uma das vertentes mais promissoras é a imobilização de sondas de DNA de fita simples (ssDNA), que ao entrar em contato com uma amostra biológica ou sintética, reconhecem seu alvo de DNA complementar, formando uma dupla hélice de DNA (dsDNA). Esta reação, por sua vez, é convertida em um sinal elétrico que pode ser quantificado e analisado. A sequência de oligonucleotídeos que dá origem à sonda de DNA deve ser selecionada, por meio de estudos utilizando ferramentas de bioinformática, do microorganismo que se deseja diagnosticar (Bezerra et al., 2019; Rashid et al., 2017; Smith, 2020).

No âmbito da genética, diversos estudos foram realizados buscando a detecção de MTB através da amplificação por PCR de alvos genômicos específicos ao microorganismo. Contudo, muitos dos marcadores selecionados, possuem níveis de especificidade e sensibilidade abaixo do desejado (Chin et al., 2018). Uma alternativa promissora para superar estes problemas apresentados é a utilização do gene Rv2341, que é específico para as cepas de MTB e está presente em todas as registradas no banco de dados NCBI. Além disso, está localizado em uma região estável do genoma, portanto, testes diagnósticos desenvolvidos a partir deste gene devem permanecer relevantes e precisos enquanto a sequência permanece conservada (Goig et al., 2019).

Tendo como premissa que a chave para erradicação da TB, principalmente em lugares de poucos recursos, é o diagnóstico rápido, sensível e específico, sem a necessidade de uma estrutura laboratorial, este trabalho visou o desenvolvimento de

um genossensor eletroquímico, livre de PCR, para detecção do MTB, utilizando a sonda de DNA, baseada no gene Rv2341, imobilizada na superfície do transdutor por meio do reagente de bioconjugação DMTMM.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que afeta humanos e é causada pelo agente *Mycobacterium tuberculosis*. É classificada como uma micobactéria Gram-positiva, não esporulada, aeróbia e imóvel, com bacilos levemente curvados (Fong,2020). Seus bacilos são chamados de álcool-ácido resistentes pois suas paredes celulares contêm diversos lipídios, como ácido micólico, ácidos graxos de cadeia longa e fosfolipídeos, que conferem esta característica de resistência ao microorganismo (Levinson et al., 2010). Os bacilos podem ser chamados também de bacilos de Koch, em referência ao pesquisador Robert Koch, que os descobriu em 1822 e subsequentemente foi agraciado com o prêmio Nobel em 1905 pelo trabalho (Bertolli-Filho, 2001; Sanyalou, 2019). Faz parte do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), um grupo com nove espécies que expressam variados fenótipos, tendo evoluído a partir de um ancestral comum e adquirido ao longo do tempo níveis de patogenicidade e alvos de infecção — humanos ou animais — diferentes (Kanabalan et al., 2021).

A TB possui um tempo de replicação de aproximadamente dezoito horas e pode sobreviver em amostras de escarro expectoradas (Sanyalou,2019). A transmissão acontece a partir de espirros, tosse ou gotículas de saliva contaminadas com bacilos, que são projetados por pacientes infectados através do ar e são inalados pelo novo hospedeiro. A maior parte das gotículas infectadas acabam retidas nas vias aéreas superiores, sendo posteriormente expelidas pelas células ciliadas da mucosa. O esquema de transmissão da TB está representado na Figura 1 (Churchyard et al., 2017; Bell et al., 2017).

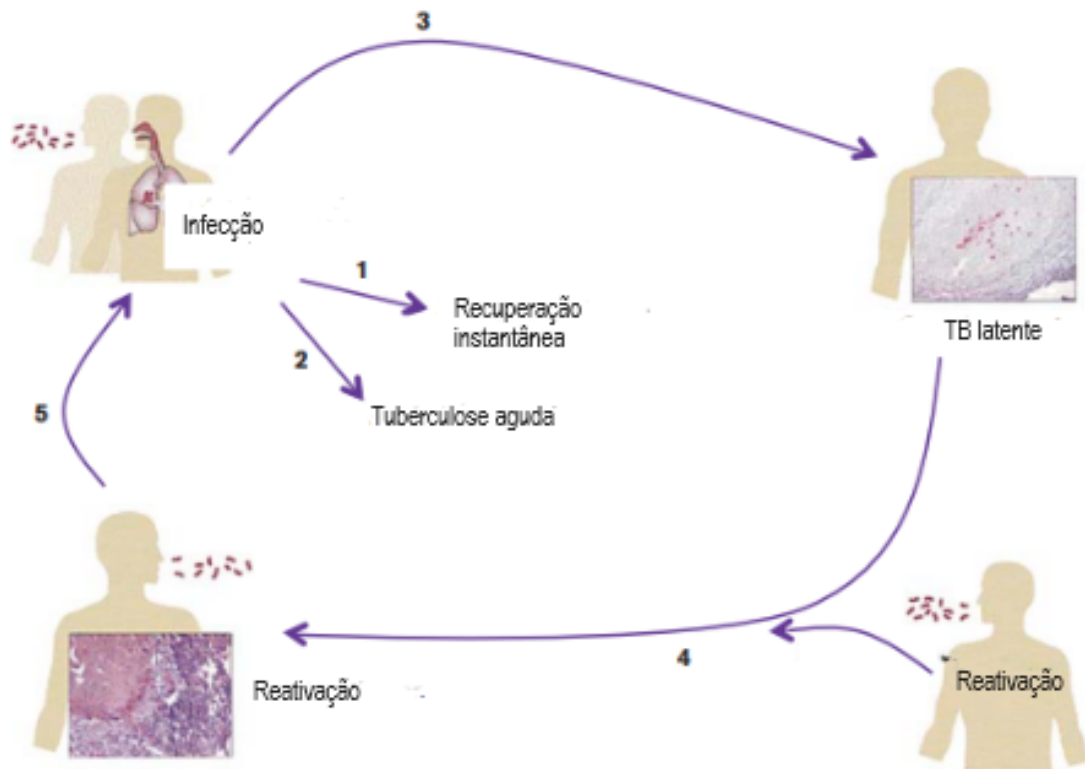


Figura 1. Esquema de transmissão da tuberculose, evidenciando diferentes possibilidades após contato com o agente etiológico. (1) Recuperação espontânea; (2) Tuberculose aguda; (3) Tuberculose latente; (4) Reativação da infecção. Fonte: Adaptado de Sanyalou et al., 2019.

As partículas que conseguem chegar aos alvéolos se ligam às superfícies celulares de macrófagos alveolares através de três receptores principais: receptor necrófago tipo A, receptor do sistema complemento e receptor de manose. Ao serem fagocitados, o lipoarabinomanano (LAM) interfere negativamente na via da calmodulina, impedindo a formação do fagolissosoma. Dessa maneira, as enzimas lisossomais não degradam os bacilos que passam a se multiplicar cada vez mais, em um processo de divisão celular bacteriana que dura de 25 a 32 horas. Posteriormente, o macrófago em que estão contidos é rompido, liberando-os no sistema para serem absorvidos por outros macrófagos e repetindo o ciclo. Posteriormente, o sistema imune promove a formação de granulomas repletos de células T ativadas e macrófagos ao redor dos microrganismos, formando lesões conhecidas como complexos de Ghon (Figura 2). Depois de um curto período, os macrófagos começam a morrer e é criada uma área de necrose caseosa na região

(Figura 3), que é rica também em exsudato alveolar e fibroblastos mas, ainda assim, a TB sobrevive, alterando seu fenótipo para se ajustar ao ambiente necrótico (Natarajan et al., 2020; Sanyaolu et al., 2019).

A MTB pode também permanecer no organismo do hospedeiro de maneira latente, replicando-se corriqueiramente mas não o suficiente para causar sintomatologia. Nestes casos, o paciente pode vir a apresentar um resultado de teste positivo para TB, mas sem sinais clínicos ou presença de alteração nos exames de imagem, além de baciloscopia negativa. Ainda assim, caso haja algum episódio que cause o enfraquecimento do sistema imune ou outro episódio de infecção, a doença pode evoluir para TB ativa (Busatto et al., 2015).

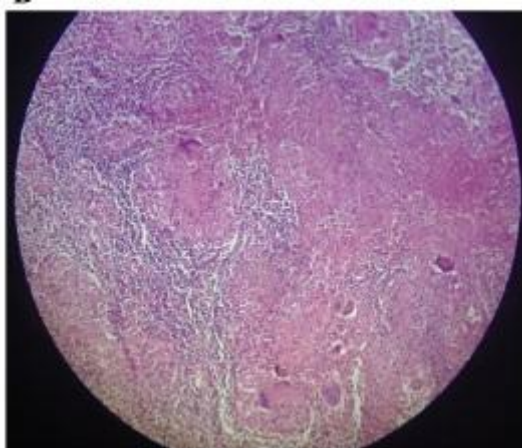


Figura 2. Granuloma rodeado por linfócitos.

Fonte: Adaptado de Natarajan, 2020.

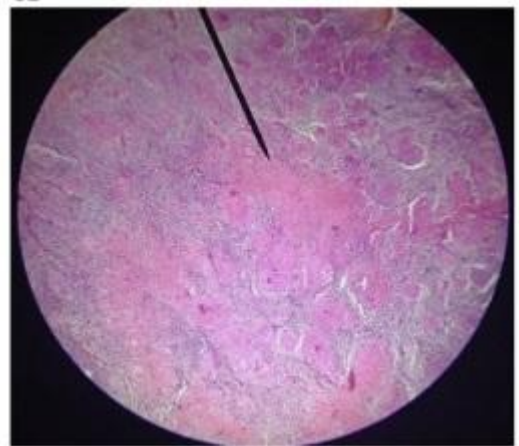


Figura 3. Necrose caseosa.

Fonte: Adaptado de Natarajan, 2020

A doença também pode ser classificada de acordo com as manifestações clínicas dos pacientes. Durante a infecção inicial, os bacilos são disseminados na corrente sanguínea e pelo sistema linfático, atingindo vários órgãos e estruturas como os linfonodos, a pleura, o sistema osteoarticular, sistema geniturinário, pele e meninges. Quando há o envolvimento de algum destes, considera-se TB extrapulmonar. Existe uma grande dificuldade em realizar o diagnóstico precoce da TB extrapulmonar, já que alguns dos sintomas principais como febre, perda de peso

e fadiga são inespecíficos e, muitas vezes, associados a outras doenças, principalmente nos casos em que os pacientes são HIV positivos. Ademais, se for constatada a presença de lesão tuberculosa no parênquima pulmonar, caracteriza-se a condição como TB pulmonar (Bussi et al., 2019; Natarajan et al., 2020)

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A infecção causada pela TB tem sido descrita nos registros da humanidade desde os primórdios de várias civilizações. É possível que tenha se originado na região Leste da África e migrado junto com as primeiras populações, se espalhando pela Ásia, Europa e posteriormente, América e Oceania. Um dos primeiros textos escritos foi da autoria do rei babilônico Hamurabi, e descrevia uma condição crônica afetando os pulmões e “consumindo” suas vítimas. No Egito, foi possível identificar evidências de dano causado por TB em múmias seladas por volta de 2.400 A.C. Assim como na era pré-Colombiana, vestígios de danos similares foram encontrados em países da América do Sul. Na Grécia, a TB já foi chamada por Hipócrates de tísica e era considerada uma doença perigosa, para a qual não havia cura (Frith, 2014). Mais tarde, foi chamada de “Grande Praga Branca” pelos europeus durante a revolução industrial, devido ao aumento severo e descontrolado da população e das condições precárias de trabalho e moradia características da época (Bañuls, 2015). Avançando para o século XX, a qualidade de vida melhorou dramaticamente em países desenvolvidos e a incidência de TB diminuiu, processo que foi beneficiado também tanto pelo desenvolvimento da vacina BCG e o uso de drogas antimicrobianas como rifampicina e estreptomicina (Barberis et al, 2017).

Por volta de 1980, o número de casos de TB voltou a subir de maneira alarmante. Dessa vez, as duas maiores causas foram a epidemia de AIDS e o surgimento de cepas resistentes aos antibióticos comumente utilizados no tratamento da doença (Sharma, 2013). Em 1995, a TB foi declarada uma emergência global pela OMS e desde então, metas, campanhas e ações de intervenção têm sido introduzidas por diversos governos e blocos econômicos em parceria com o órgão para combater o impacto da condição. Ainda assim, 7,5

milhões de novos casos foram registrados no mundo no ano de 2022, maior número já computado desde o primeiro monitoramento. O país com a maior quantidade de novos casos foi a Índia (27%), seguida pela Indonésia (10%) e China (7,1%), representados na Figura 4. A Índia é um dos países mais populosos do mundo, uma nação emergente com altos índices de desigualdade social, além de possuir uma alta parcela da população em situação de vulnerabilidade econômica e insegurança sanitária. Este panorama é, em grande parte, responsável pela atual situação de epidemia de TB no país, e se repete em menor escala em muitos outros territórios da África e da América do Sul, também suscetíveis à disseminação descontrolada de TB. Ademais, o problema não está apenas no surgimento de novos casos, mas também nas altas taxas de reinfecção e abandono do tratamento da doença, que contribuem para que mesmo depois de tantas décadas, a TB ainda seja um problema de saúde pública mundial desta magnitude (OMS, 2023).

Em questão de distribuição, a doença afeta pessoas de todas as idades e gêneros, mas no ano de 2022, os homens foram responsáveis por 55% de todos os casos relatados, enquanto mulheres e crianças registraram valores de 33% e 12%, respectivamente (OMS, 2023).



Figura 4. Estimativa da incidência de casos de tuberculose no ano de 2022, em países com mais de 100.000 casos registrados. Fonte: Relatório Global de Tuberculose, OMS, 2022.

Ainda no ano de 2022, o grupo populacional que mais sofreu o impacto da TB foi o de pacientes vivendo com HIV. O vírus é conhecido por atacar principalmente linfócitos T CD4 e macrófagos, exaurindo seus números e utilizando as maquinarias celulares para facilitar o processo de replicação viral. Coincidentemente, estes agentes também são relevantes no combate a infecções como a TB. Uma das respostas do sistema imune à infecção por TB é o recrutamento de macrófagos para a formação de granulomas, causando um fluxo grande de células a migrarem para o mesmo lugar, deixando-as ainda mais vulneráveis para a infecção pelo vírus da HIV, caso esteja presente (Sia,2019; Natarajan,2020). Outro agravante da situação é o fato de que as maiores taxas de soropositivos vivendo sem tratamento coincidem com os locais de epidemia da TB: países emergentes e socioeconomicamente carentes (OMS, 2023).

Outrossim, pacientes imunossuprimidos por outros motivos também estão particularmente suscetíveis à infecção por TB, assim como usuários de drogas intravenosas, presidiários, pessoas vivendo em situação de rua e moradores de áreas de risco pobres, sem saneamento básico (Yamamura et al., 2015). No Brasil, as populações mais vulneráveis à infecção foram os profissionais de saúde, imigrantes, população privada de liberdade e aqueles em situação de rua (BRASIL. Ministério da Saúde, 2022).

Em 1996, três anos depois da declaração liberada pela OMS, que tornou oficial o status da TB como uma emergência à saúde pública global, foi criado no Brasil o Plano Nacional de Combate à Tuberculose (PNCT), lançado pela Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária com o objetivo de curar 85% dos doentes já diagnosticados com TB, criar ações preventivas contra a doença, combater o agravamento da transmissão além de distribuir medicamentos e recursos necessários para a manutenção no tratamento da TB (BRASIL. Ministério da Saúde, 2022).

Muitas dificuldades foram encontradas pelo governo durante a implementação do PNCT e estes obstáculos continuam proeminentes até o presente momento,

anos depois do surgimento das estratégias de minimização do impacto da TB no Brasil. A população não correlaciona os sintomas apresentados no dia a dia com a TB, pode não possuir acesso a tratamento médico em sua localidade ou, ainda mais grave, mesmo que a investigação clínica leve ao diagnóstico, as instalações médicas podem não ter acesso aos medicamentos necessários. Ademais, cerca de 20% das cepas isoladas de TB são resistentes a pelo menos um tipo de medicamento, dificultando o tratamento personalizado dos pacientes em centros médicos onde há acesso a apenas um tipo de remédio (The Lancet, 2017).

De acordo com o boletim epidemiológico da TB no Brasil, que engloba dados até o ano de 2021, o coeficiente de incidência no país foi de 32 casos a cada 100 mil habitantes, mais baixo que os valores obtidos no período entre 2016 a 2019. Acredita-se que esta diminuição do coeficiente não foi causada pelo progresso nas metas de erradicação da doença, mas sim na subnotificação que ocorreu durante a pandemia de Covid-19, principalmente durante seu auge, entre 2020 e 2021. Ainda assim, como indicado na Figura 5, houveram estados que superaram significativamente o coeficiente nacional. Por exemplo, os estados do Amazonas (71,3), Rio de Janeiro (67,4), Roraima (54,6), Acre (50,3) e Pernambuco (45,9) (BRASIL, Ministério da Saúde, 2022).

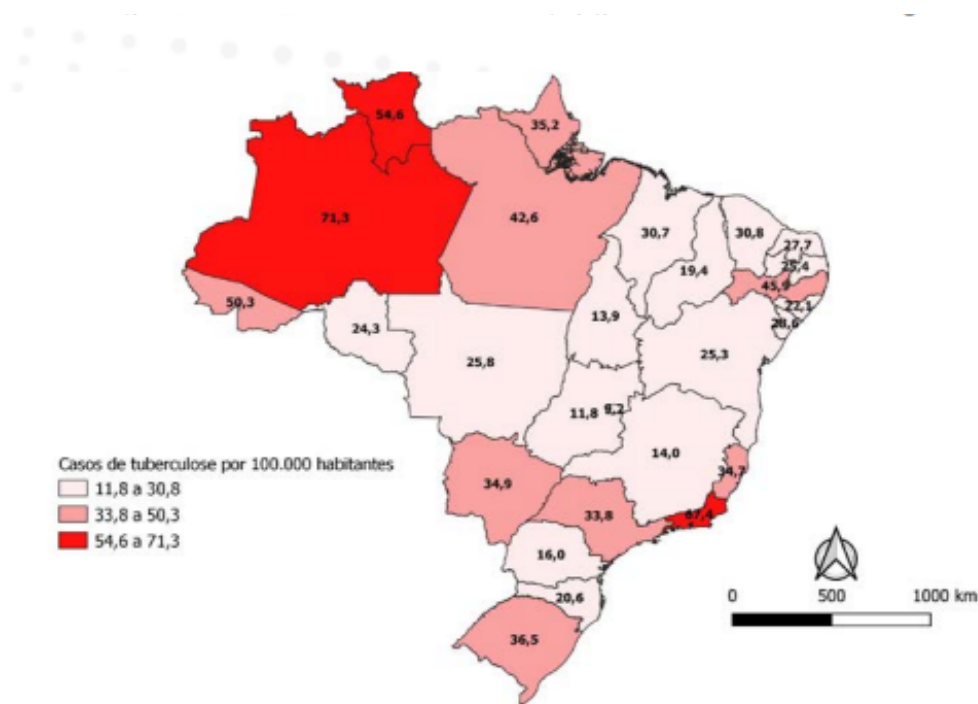


Figura 5. Casos de TB por 100.00 habitantes no ano de 2021. Fonte: Boletim Epidemiológico de Tuberculose, Ministério da Saúde, Brasil, 2022.

No Brasil, o tratamento para TB oferecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS) dura no mínimo seis meses, contando com isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol como antibióticos principais, a variar de acordo com a disponibilidade e estratégia de combate de cada município (BRASIL, Ministério da Saúde, 2022). A taxa de adesão ao tratamento e às recomendações terapêuticas é mais baixa do que o esperado, acarretando a alta de óbitos causados pela doença e o aumento do surgimento de resistência aos remédios implementados no tratamento. Esse fenômeno pode ser observado na Figura 6. (BRASIL, Ministério da Saúde, 2022).

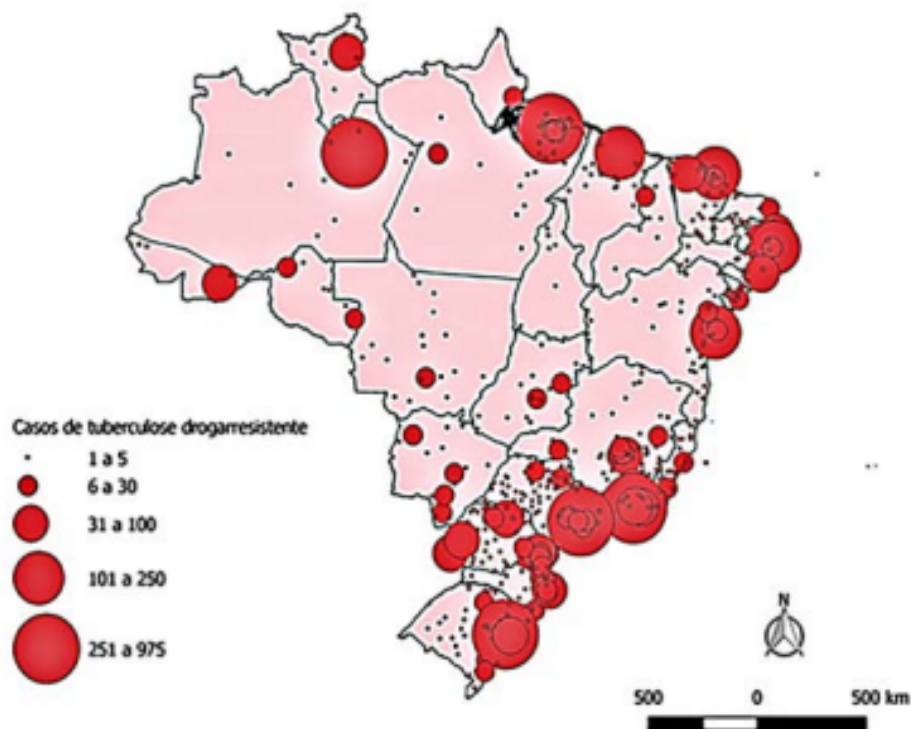


Figura 6. Casos de TB droga resistente no Brasil, ano de 2021. Fonte: Boletim Epidemiológico de Tuberculose, Ministério da Saúde, Brasil, 2022.

2.3 DIAGNÓSTICO

Atualmente, as principais estratégias para o diagnóstico da TB se concentram na visualização dos bacilos de MTB por microscopia, no crescimento bacteriano em meio de cultura específico, padrão para a OMS, na detecção da resposta imune do hospedeiro e em ensaios de amplificação de ácido nucleico (AAN) (Gualano et al., 2019; Pai et al., 2017). Estes testes apresentam várias limitações que vão desde baixa sensibilidade e especificidade, a longos períodos de tempo para obtenção do resultado. Por outro lado, os AAN como o PCR, são específicos, sensíveis e precisos, no entanto, apresentam custos relativamente elevados de equipamentos e reagentes, necessitam de profissionais altamente qualificados e uma estrutura laboratorial mais complexa, fatores que podem ser limitantes (Carranza et al., 2020; Sanyaolu, 2019), principalmente em regiões que contam com poucos recursos financeiros (Parsons et al., 2011). Em seguida, serão descritos os principais métodos para o diagnóstico aplicados no Brasil e o fluxo laboratorial para amostras suspeitas de TB, representado pela Figura 7.

O fluxo laboratorial serve para amostras suspeitas de TB, TB drogarresistente ou micobactéria não tuberculosas. Em primeiro lugar, a amostra é coletada seguindo os devidos procedimentos de biossegurança e enviada a unidade LACEN mais próxima. Em seguida, a depender das particularidades do caso, é encaminhada para a baciloscopia ou diretamente para o teste molecular. O teste molecular é confirmatório, mas a baciloscopia, principalmente em casos de tuberculose latente, pode gerar um falso negativo. De qualquer forma, a amostra é semeada no meio apropriado e analisada durante um período de oito semanas. Através da análise da morfologia e aspecto da cultura, é realizada a identificação preliminar da espécie e ao mesmo tempo, aplica-se o teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA) com antibióticos de primeira linha. Posteriormente, obtém-se a confirmação da espécie a qual pertence o microorganismo, e caso o TSA apresente indícios de resistência aos fármacos de primeira linha testados, repete-se o teste, desta vez com os fármacos considerados de segunda linha. Em casos especiais, o diagnóstico também pode se dar através de outros métodos de alta complexidade.

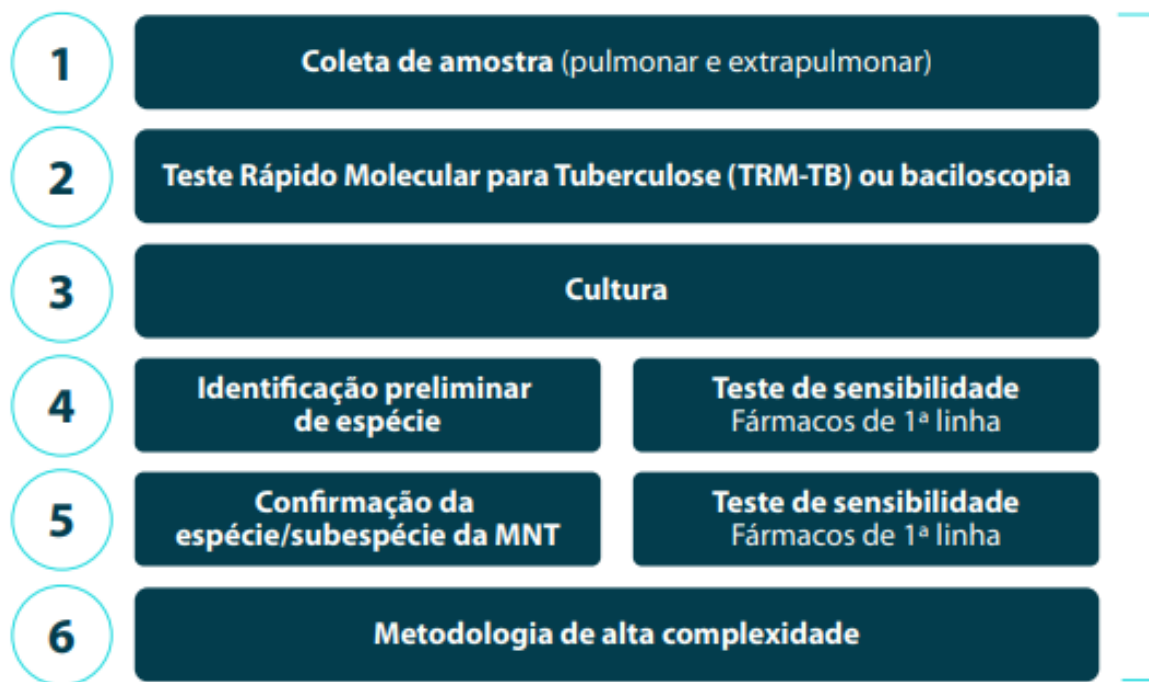


Figura 7. Fluxo laboratorial para amostras suspeitas de tuberculose vigente para todos os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) no Brasil. Fonte: Adaptada de Ministério Público, 2022.

2.3.1 Baciloscopia

Previamente à coloração e análise dos bacilos de TB via microscopia óptica, é necessário tratar a amostra com uma solução de NaOH a 4% para destruir os vestígios de outras células, proteínas, bactérias menos resistentes e fluidos presentes no escarro (Levinson, 2010). A MTB é uma micobactéria do grupo das Gram- positivas, portanto, possui uma parede celular majoritariamente constituída por peptideoglicanos. Especificamente, a parede contém ácido diaminopimérico como diaminoácido no peptidoglicano, o que resulta numa permeabilidade alterada da estrutura (Brennan et al, 1995). Esta característica permite que o microorganismo resista à coloração de Gram, inviabilizando o uso desta técnica. Sendo assim, utiliza-se o método de coloração de Ziehl-Neelsen. Nesta metodologia, as micobactérias e outras estruturas são coradas de vermelho pelo corante primário, a fucsina fenicada. Depois, a amostra é submetida a tratamento álcool-ácido, que torna todos os componentes do sistema incolores, com exceção dos bacilos de TB,

que mantêm sua cor avermelhada. Por esse motivo, ficaram conhecidos como Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR). Por fim, a amostra é novamente corada com azul de metileno ou verde malaquita e observada ao microscópio com objetivas de imersão, sendo possível enxergar os bacilos corados de vermelho e os outros componentes presentes de azul (Winn; Koneman, 2006). O resultado da análise pode detectar entre 60% e 80% dos casos e é liberada em até 48h, desde que seja realizada conforme o procedimento padrão (BRASIL. Ministério da Saúde, 2022)

2.3.2 Cultura

As culturas devem ser semeadas no meio Lowenstein-Jensen, específico para o isolamento inicial de micobactérias, devendo ser mantidas em estufa selada a 37°C e lidas uma vez por semana, num período total de oito semanas (Sanyaolu, 2019). Os crescimentos positivos para TB usualmente apresentam pigmentação bege, além de colônias rugosas, opacas e secas (BRASIL, Ministério da Saúde, 2019). Se possível, o teste de sensibilidade aos antibióticos deve ser realizado logo após a cultura, já que é fundamental para a prescrição dos medicamentos corretos e monitoramento do perfil de resistência da TB na região onde foi identificada.

De acordo com o PNCT, a cultura é indicada principalmente para pacientes que já foram tratados previamente, aqueles que convivem com vírus HIV e membros dos grupos especiais, como crianças. A cultura pode evitar a liberação de resultados falso negativos, já que aumenta em 30% a chance de diagnóstico da doença, mesmo que a baciloscopia seja negativa.

2.3.3 Imunoensaio

Entre os imunoensaios disponíveis para o diagnóstico de doenças infecciosas, o teste de interferon-gama (IGRA) é o mais indicado para TB, recentemente substituindo o clássico teste tuberculínico (PPD) no Brasil (BRASIL. Ministério da Saúde, 2021). Consiste na análise da resposta imune do paciente através da análise de frascos de sangue de cada paciente. O primeiro é o controle negativo, contendo

apenas o sangue e um anticoagulante; o segundo possui ESAT-6, TBT-7.7 e CFP-10, peptídeos específicos para TB; e o último possui o mitógeno fitohemaglutinina. As amostras são incubadas por 18h a 37°C e depois centrifugadas para a obtenção de plasma, que é utilizado num ensaio imunoenzimático (ELISA) . Majoritariamente, os pacientes afetados pela TB detêm linfócitos T sensibilizados que detectam a presença dos antígenos através da produção e liberação de IFN- γ , que por sua vez é uma citosina detectada e quantificada pelo teste de ELISA (Mazurek et al., 2010; Dinnes et al., 2007; Siqueira, 2019; Ang et al., 2016). Existem muitos fatores de risco, como idade (avançada ou jovem), imunodeficiência, tabagismo e TB concomitante, que foram associados a resultados falso negativos de IGRA (Siqueira, 2019; Pai et al., 2014; Chang et al., 2012).

2.3.4 PCR

Atualmente, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada padrão ouro para o diagnóstico de muitas doenças infecciosas. Ainda assim, é um processo complexo e custoso, principalmente em locais com restrição de recursos. O teste busca sequências nucleotídicas específicas para a TB e pode ser realizado a partir de amostras clínicas e isolados cultivados (Assis et al., 2007). Outrossim, o DNA das amostras deve ser extraído corretamente, os *primers* devem ser precisamente desenhados para gerar amplificação das sequências corretas e o material genético deve estar livre de contaminantes, já que a técnica não diferencia entre agentes infectantes e não infectantes, estando sujeita a falsos positivos oriundos de contaminação ambiental (Ruggiero et al., 2022).

Ainda no âmbito da genética, diversos estudos foram realizados buscando a detecção de MTB através da amplificação por PCR de alvos genômicos específicos ao micro-organismo. Contudo, muitos dos marcadores selecionados, possuem níveis de especificidade e sensibilidade abaixo do desejado (Chin et al., 2018). Até agora, o marcador que obteve mais sucesso foi o teste Xpert MT/ RIF, que amplifica uma região conservada dentro do gene *rpoB* para identificar o DNA da MTB e mutações de resistência a antibióticos. Todavia, este marcador enfrenta outro problema, já que o gene é expresso em outros microrganismos e não está presente

em todas as cepas de MTB (Goig et al., 2019). Uma alternativa promissora para superar estes problemas apresentados é a utilização do gene Rv2341, que é específico para as cepas de MTB e está presente em todas as registradas no banco de dados NCBI. Além disso, está localizado em uma região estável do genoma, portanto, testes diagnósticos desenvolvidos a partir deste gene devem permanecer relevantes e precisos enquanto a sequência permanece conservada (Goig et al., 2019).

2.4 BIOSSENSORES

Biossensores podem ser definidos como dispositivos analíticos que possuem elementos de reconhecimento biológico, também conhecidos como biorreceptores, que são específicos para cada analito. Este, por sua vez, é imobilizado sobre um transdutor capaz de traduzir a resposta biológica, física ou química gerada pela interação entre o biorreceptor e o analito, em um sinal mensurável de maneira qualitativa ou quantitativa (Ozer et al., 2020). Para que seja considerado um dispositivo efetivo e de qualidade, é necessário que o biossensor possua certos atributos: sensibilidade e especificidade, reprodutibilidade, precisão, acurácia, estabilidade e um tempo rápido de resposta (T). Na Figura 8, é apresentado um esquema geral da composição de um biossensor.

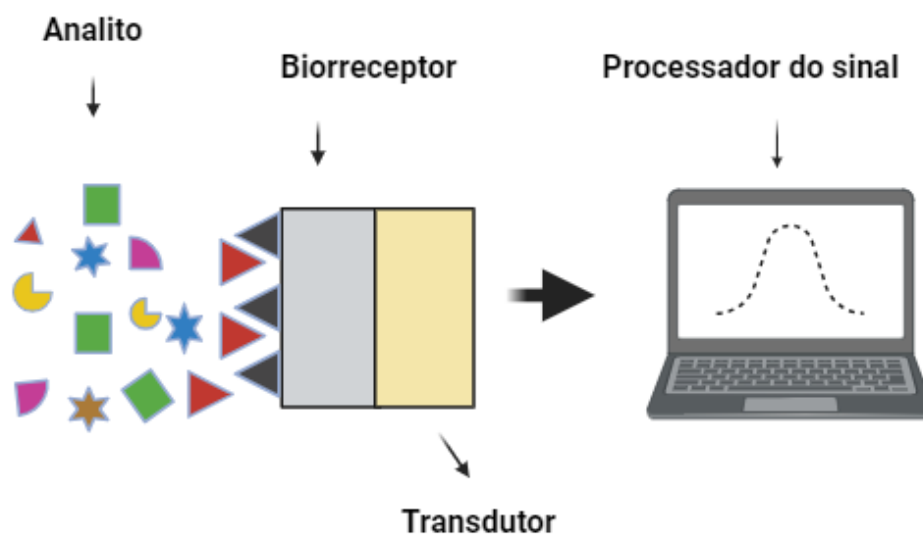


Figura 8. Elementos de um biossensor. Fonte: Autora, 2023.

Os biossensores podem ser classificados de várias maneiras, as principais sendo de acordo com seus transdutores ou elementos de reconhecimento biológico, conforme detalhado nas seções 2.4.1 e 2.4.2. É possível também separar os exemplares de biossensores em catalíticos e não catalíticos (Nguyen et al., 2019). Na primeira modalidade, a interação entre o elemento de reconhecimento biológico e o analito alvo resulta na produção de um novo metabólito, como é o caso dos biossensores para detecção de glicose, pois através da imobilização da enzima glicose oxidase, há reação com a glicose presente no sistema e é gerado o peróxido de hidrogênio (Donmez et al., 2017). Por sua vez, com biossensores não catalíticos, o biorreceptor se liga de maneira irreversível ao analito, não gerando nenhuma outro produto da reação no processo (Shukla et al., 2016).

2.4.1 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOSSENSORES QUANTO AOS BIORRECEPTORES

Quando relacionados aos biorreceptores, os biossensores podem ser classificados em: imunossensores, genossensores, biossensores enzimáticos ou de célula inteira.

Os biossensores enzimáticos são bastante versáteis, e o mecanismo de detecção do analito varia de acordo com a reação a ser catalisada e o processo de imobilização do biorreceptor (Zhang et al., 2022). Por exemplo, uma enzima pode ser inibida ou ativada pelo analito, então a concentração do mesmo pode ser definida pelo aumento ou pela diminuição da produção de um metabólito, de acordo com a concentração de analito empregada. Outro exemplo seria o biossensor para detecção de glicose, o qual atua através da imobilização da enzima glicose oxidase, onde é medida a concentração de peróxido de hidrogênio produzida após reação entre analito e biorreceptor (Lim et al., 2015). Também é possível simplesmente detectar alterações na conformação das enzimas após interação (Perumal et al., 2014). Os biossensores desenvolvidos com base nestas proteínas são bastante custosos, considerando todo o processo de síntese e purificação das enzimas. Além disso, suas estruturas são bastante sensíveis e propensas a degradação ou desnaturação, acarretando na diminuição da estabilidade, sensibilidade e robustez dos sistemas que empregam este tipo de biorreceptor (Newman et al., 2006; Gupta et al., 2022).

Aqueles sensores que contêm um anticorpo como biorreceptor e funcionam através da formação de um imunocomplexo estável gerado pela interação antígeno-anticorpo são chamados de imunossensores. Um dos grandes benefícios da utilização destes é a alta especificidade das ligações antígeno-anticorpo (Lim; Ahmed, 2019). Todavia, ainda há a possibilidade da ocorrência de ligações inespecíficas com moléculas que não são analito alvo (Malhotra; Ali, 2018). Ademais, o custo de purificação e obtenção dos anticorpos a serem usados é exorbitante, principalmente ao considerar o valor de produção em massa destes dispositivos (Mollarasouli; Kurbanoglu; Ozkan, 2019).

Os biossensores celulares utilizam microrganismos inteiros como elementos de reconhecimento biológico por serem capazes de se replicar e produzir seus próprios elementos de reconhecimento, como anticorpos, proteínas e metabólitos específicos (Kylilis, 2019). Dependendo do objetivo para construção do biossensor, é possível utilizar espécies fungos, vírus, bactérias, algas e protozoários. Estes são vantajosos pois dispensam a necessidade de extração e purificação de um

componente específico, são fáceis de manusear e podem interagir com uma quantidade diversa de analitos (Lobsiger, 2019).

Os genossensores são uma modalidade recente de biossensores que dependem de técnicas de detecção baseadas em ácidos nucleicos para identificar seu analito de escolha. Contam com atributos como alto nível de especificidade, sensibilidade, facilidade de síntese do biorreceptor, estabilidade da ligação e baixo custo de produção. Nestes tipos de biossensores, o mecanismo mais comum na área de biossensores consiste na imobilização de sondas de DNA de fita simples (ssDNA) que, ao entrar em contato com uma amostra biológica ou sintética, reconhecem seu alvo de DNA complementar por meio da complementaridade de bases, formando uma dupla hélice de DNA (dsDNA), num processo biológico chamado de hibridização. A sequência de oligonucleotídeos que dá origem à sonda de DNA deve ser selecionada, por meio de estudos de bioinformática, a partir da sequência genética do agente causador da patologia que está para ser diagnosticada. (Bezerra et al., 2019; Rashid et al., 2017; Smith, 2020).

Aliando os benefícios já citados dos genossensores com a possibilidade de miniaturização, baixo custo de produção e facilidade de operação dos biossensores eletroquímicos, os genossensores eletroquímicos são um subgrupo muito promissor na comunidade de desenvolvimento de plataformas biossensoras. Especialmente no que se diz respeito ao diagnóstico viral, bacteriano e fúngico, assim como na detecção de micro-RNAs. Estas plataformas dependem da imobilização da sonda escolhida na superfície do transdutor, seguida de hibridização com o alvo complementar. A detecção do sinal gerado por esse processo, por sua vez, pode ser direta: através da obtenção de dados gerados pela oxidação dos ácidos nucleicos presentes na reação ou indireta: utilizando um indicador do processo de hibridização, como o azul de metileno ou ferroceno (Pänke; Kirby; Lisdat, 2007; Honorato-Castro et al., 2014; Babaei et al., 2022).

Os aptassensores são uma subclassificação dos genossensores, assim nomeados pois dispõem de aptâmeros como elementos de reconhecimento biológico. Aptâmeros são sequências de oligonucleotídeos de fita simples, de DNA ou RNA, que podem ser manipuladas em estruturas bidimensionais e tridimensionais

através de choque térmico para facilitar a ligação aos alvos (Villalonga, 2020). Esta flexibilidade concede uma densidade maior de superfície para ligação e diminui as chances de falha na ligação causada por posicionamento errôneo das estruturas presentes na superfície do transdutor. São extremamente específicos, já que são sintetizados a partir da tecnologia de Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX), uma técnica de recombinação química que permite a criação de sequências personalizadas para se ligarem com outra sequência alvo (Adachi, 2019; Saad; Faucher, 2021). Devido à natureza dos ácidos nucleicos, os aptâmeros são estáveis em faixas de pH extremamente ácidas ou básicas e conseguem manter por um grande período de tempo a sua estrutura e funcionalidade em diversas condições de armazenamento e sob a influência de temperaturas variadas (Teng et al., 2016).

2.4.2 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOSENSORES QUANTO AOS TRANSDUTORES

De acordo com os transdutores, os biossensores podem ser classificados como eletroquímicos, eletrônicos, calorimétricos, ópticos ou piezoelétricos.

Os biossensores eletroquímicos convertem sinais biológicos em sinais elétricos que podem ser analisados qualitativamente e/ou quantificados. A análise dos dados gerados por este tipo de biossensor depende majoritariamente das características químicas dos analitos, dos biorreceptores escolhidos e das interações entre eles. Esta categoria detém, também, características como alta especificidade, sensibilidade, capacidade de detecção, possibilidade de miniaturização, baixo custo, estabilidade e versatilidade. Outra grande vantagem é a possibilidade de criação de interfaces simples, que podem ser usadas para diagnóstico em campo, sem a necessidade de recorrer a pessoal treinado. A interação entre o elemento de reconhecimento biológico e o analito ocorre sobre o transdutor, resultando em um sinal eletroquímico que pode ser expressado por meio de tensão, corrente, capacitância ou impedância. De acordo com a resposta, é possível subclassificar a categoria em biossensores potenciométricos, impedimétricos, amperométricos, condutimétricos e voltamétricos (Naresh, 2021; Leva-Bueno; Peyman; Millner, 2020; Thevenot et al, 1999; Singh, 2021).

Existem vários tipos de eletrodos que podem ser utilizados para a montagem de um biossensor eletroquímico. Contudo, como há o objetivo de desenvolver um dispositivo para diagnóstico rápido, eletrodos de carbono impresso (SPCE), do inglês, *screen printed carbon electrodes* são mais vantajosos que os demais, pois possuem baixo custo de produção, necessitam de poucos reagentes para serem usados, tem potencial para produção em massa, seu design pode ser adequado especialmente para trabalhar com microvolumes e existe grande facilidade em modificar sua superfície de trabalho (Mincu et al., 2020; Ye et al., 2022).

2.5 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO TRANSDUTOR

Os biossensores eletroquímicos dependem da detecção e análise de uma interação biológica que ocorre através do contato do analito com o biorreceptor na superfície do transdutor. Sendo assim, as propriedades de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade da plataforma sensora são afetadas diretamente pelas modificações realizadas na superfície. Além disso, o sucesso da imobilização também depende em grande parte da funcionalização da superfície do transdutor. Várias estratégias de modificação contando com diversos materiais estão disponíveis na literatura, as principais sendo eletropolimerização de biomoléculas, eletrodeposição de nanomateriais, modificação com nanopartículas (prata, ouro, cobre), nanotubos (carbono e grafeno) ou estruturas metálicas orgânicas (Sandhyrani et al., 2019; Fortunati et al., 2017).

A eletropolimerização de biomoléculas (agentes modificadores) recobre totalmente a superfície do eletrodo. O revestimento proporciona uma superfície para imobilizar o elemento de reconhecimento biológico, aumentando a estabilidade do sistema e criando uma base dielétrica que permitirá a passagem de corrente. A espessura do polímero, assim como a velocidade de deposição do mesmo na superfície do eletrodo pode ser manipulada através de CV. Esse processo permite alterar a rugosidade e a formatação da superfície, de acordo com o objetivo do estudo. As biomoléculas mais utilizadas para eletropolimerização de superfície são os aminoácidos, pois podem possuir vários grupos funcionais em sua estrutura, o

que facilita a sua interação com a superfície (Alhedabi et al., 2017). Em especial, os mais utilizados são: lisina, cisteína e ácido glutâmico (Glu) (Bezerra et al., 2019; Honorato Castro et al., 2014; Guo et al., 2015). Os polímeros gerados podem ser condutores, como é o caso da polianilina e polipirrol, ou semicondutores, como é o caso do Glu (Kokkinos; Economou; Prodromidis, 2016)

O Glu é um aminoácido não essencial que foi descrito pela primeira vez no ano de 1800, pelo bioquímico alemão Karl Heinrich Ritthausen. Em sua estrutura (Figura 9), possui dois ácidos carboxílicos como grupos funcionais em sua cadeia lateral e um grupo amino.

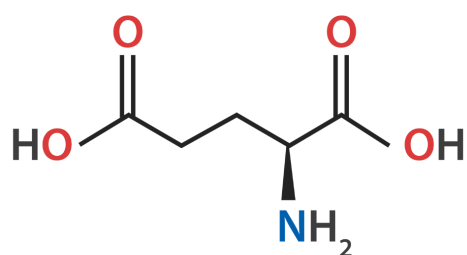


Figura 9. Estrutura química do Glu. Fonte: Autora, 2024.

Glu pode ser eletropolimerizado na superfície de um transdutor a partir de uma solução de seus monômeros. O tamanho e a espessura do polímero podem ser ajustados de acordo com o objetivo do estudo. O polímero gerado também possui várias unidades de glutamato, unidas entre si através dos grupos carboxílicos e grupos amino (Figura 10). Estes grupos carboxílicos livres são protonados, (pK_A= 4,45) podendo formar interações estáticas e se ligar covalentemente a outra molécula (Liu et al., 2011; Lin et al., 2014; Zhang et al., 2010; Benvidi et al., 2018).

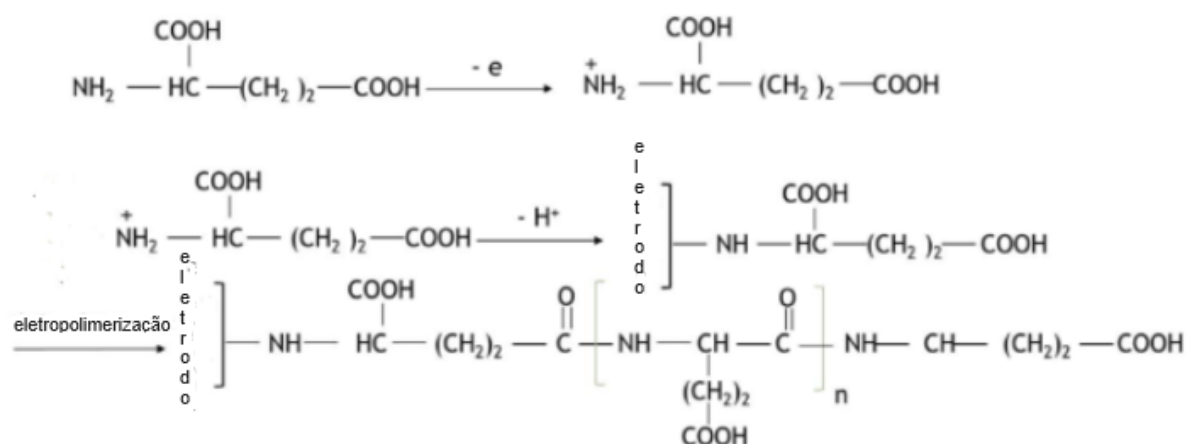


Figura 10. Representação da eletropolimerização do Glu sobre a superfície de um eletrodo. Fonte: Adaptado de Benvidi et al, 2018.

A eletropolimerização com Glu vem sendo usada com sucesso para diversos propósitos, especialmente na construção de plataformas sensoras e imobilização de biorreceptores. Em seus estudos, o grupo de Benvidi et al (2018) imobilizou um aptasensor para tetraciclina através da modificação de eletrodo de carbono vítreo com polímero de Glu. Previamente, Lin et al (2014) utilizou nanotubos de carbono associados a um filme polimérico de Glu para realizar a detecção eletroquímica do bisfenol a. Enquanto isso, pesquisadores do grupo de González-Vargas et al (2017) estudaram duas técnicas de polimerização (eletropolimerização e enxerto eletroquímico) com Glu a fim de construir um sistema de detecção para o medicamento hidroclorotiazida.

2.6 TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO DO BIORRECEPTOR

Uma das etapas vitais no desenvolvimento de qualquer biossensor é a imobilização do biorreceptor na superfície do transdutor. A estabilidade da imobilização é o que vai conferir robustez, tempo de prateleira e garantir sensibilidade e especificidade ao sistema a ser desenvolvido (Liebana, 2016). É imprescindível que a molécula imobilizada seja preservada, mantendo a sua função biológica durante o momento de utilização do biossensor. Existem diversas maneiras de realizar a imobilização, como indicado na Figura 11. As principais

técnicas aplicadas são físicas: adsorção, aprisionamento e encapsulamento; ou químicas: ligação covalente e ligação cruzada (*cross-linking*) (Putzbach, 2013; Sassolas, 2012; Martinkova, 2017).

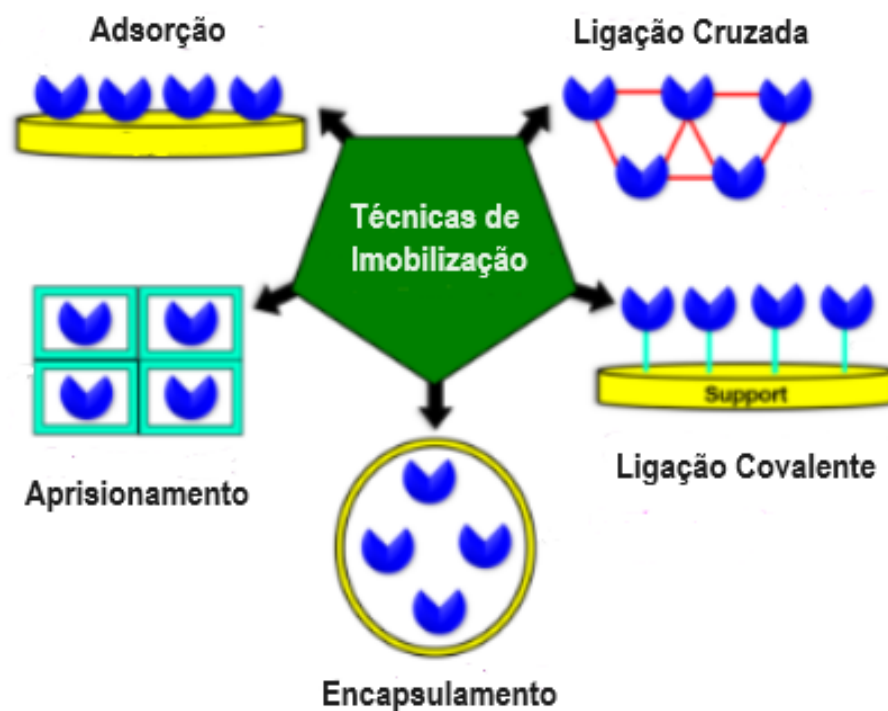


Figura 11. Métodos de imobilização de biorreceptores. Fonte: adaptado de Naresh, 2021

A técnica de adsorção é a mais simples e econômica entre as metodologias conhecidas. Consiste na imobilização do biorreceptor diretamente sobre a superfície do eletrodo, através de ligações consideradas fracas, como a força eletrostática, ligações de hidrogênio ou forças de Van der Waals. Mesmo que seja mais fácil de obter a imobilização, este processo deixa o sistema vulnerável a mudanças de pH e temperatura, consequentemente resultando em instabilidade e pouco tempo de prateleira (Liebana, 2016).

Na metodologia por aprisionamento, os biorreceptores são fisicamente aprisionados em uma matriz tridimensional por meio de ligações não covalentes. A matriz pode ser composta por elementos orgânicos (alginato, celulose, quitosana, polipropileno, poli(acrilamida) e etc) e inorgânicos (carvão ativado, cerâmica). O processo de aprisionamento pode ser alcançado também através da

eletropolimerização de uma uma solução contendo monômeros misturados ao elemento de reconhecimento biológico, que fica preso ao polímero formado. Os monômeros mais comumente usados são pirrol, anilina e tiofeno (Sneha, 2019; Naresh, 2021).

A técnica de encapsulamento é realizada através do encapsulamento do elemento de reconhecimento biológico em uma membrana esférica e semipermeável, que pode ser lipoproteica, polimérica ou lipoidal. Usualmente, o encapsulamento ocorre por eletropolimerização de um monômero na interface de duas soluções imiscíveis (Naresh, 2021).

A técnica de imobilização via ligação covalente funciona através da imobilização de um elemento de reconhecimento biológico sobre um polímero gerado na superfície do transdutor. Os polímeros são constituídos de monômeros ricos em grupos funcionais que fornecem os sítios de ligação para o biorreceptor. Os grupos funcionais mais populares para formação de ligações covalentes são os aminoácidos, grupos carboxílicos, hidroxilas, tióis e cisteína. É um método irreversível, que sintetiza ligações mais estáveis do que as geradas pelas técnicas anteriormente discutidas, concedendo robustez e reprodutibilidade ao sistema. Ademais, é importante que o processo de imobilização não interfira negativamente nos atributos do elemento de reconhecimento biológico, pois o biorreceptor deve manter sua estrutura, função e atividade biológica. Para garantir o sucesso da imobilização, se faz necessária a utilização de agentes de bioconjugação, substâncias responsáveis por ativar os grupos funcionais presentes na superfície do eletrodo. Alguns exemplos são EDC-NHS, glutaraldeído e DMTMM (Naresh, 2020; Radi, 2021; Weber, 2000;).

A imobilização por ligação cruzada consiste num mecanismo similar ao da ligação covalente direta, já que nesta metodologia a ligação não ocorre diretamente entre o biorreceptor e a superfície do transdutor. Neste caso, é formado um agente bioconjugador que possibilita a imobilização. Os reagentes mais utilizados nesta técnica são 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)/N-hidroxisuccinimida (NHS). O EDC reage com os grupos funcionais carboxílicos disponíveis na superfície do transdutor, formando um intermediário ativo, o-acilisourea. Posteriormente, o intermediário é deslocado via ataque nucleofílico dos grupos

amina presentes no biorreceptor, resultando finalmente na composição de uma ligação covalente e liberação do metabólito isouréia (Oberhaus et al., 2020; Fuh, 2014)(Figura 12). Entretanto, o intermediário formado é instável e recorre-se ao NHS para minimizar esse efeito. Ainda assim, não é possível garantir totalmente a estabilidade da reação, e o efeito do EDC começa a decair imediatamente depois do preparo da solução. (Ligaj et al, 2006).

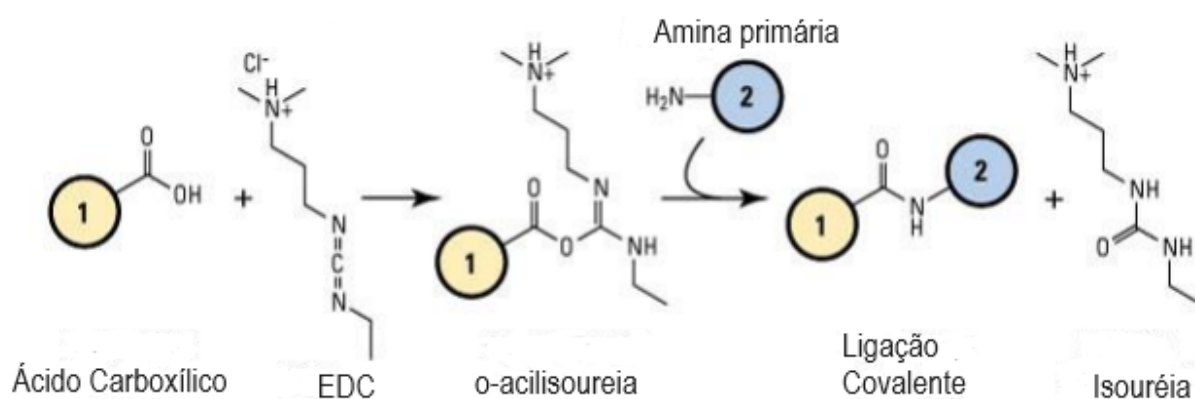


Figura 12. Esquema de bioconjugação por EDC. Fonte: Adaptado de Fuh, 2014.

2.6 DMTMM COMO AGENTE BIOCONJUGADOR

Os agentes bioconjugadores são substâncias que induzem ou facilitam a formação das ligações covalentes no âmbito de imobilização dos biorreceptores. O DMTMM entrou no mercado recentemente, portanto, não existe um grande número de estudos publicados em sua utilização como agente bioconjugador. É um derivado da triazina, que se mostra um candidato extremamente promissor para o desenvolvimento de plataformas biossensoras, devido a sua habilidade de ativação de ácidos carboxílicos, particularmente para síntese de ligações amidas. Um dos primeiros estudos que empregou DMTMM como agente bioconjugador pertence a Yoon; Ko; Jang (2008), na construção de um biossensor enzimático para a detecção de glicose. Atua por meio do efeito do sal de amônio contido na substância, que age através de uma substituição nucleofílica aromática, constituindo um éster triazínico capaz de reagir com os nucleófilos e facilitar a ligação entre as aminas e os grupos carboxílicos (Farkas; Bystricky, 2007; Leitner et al., 2014), (Figura 13).

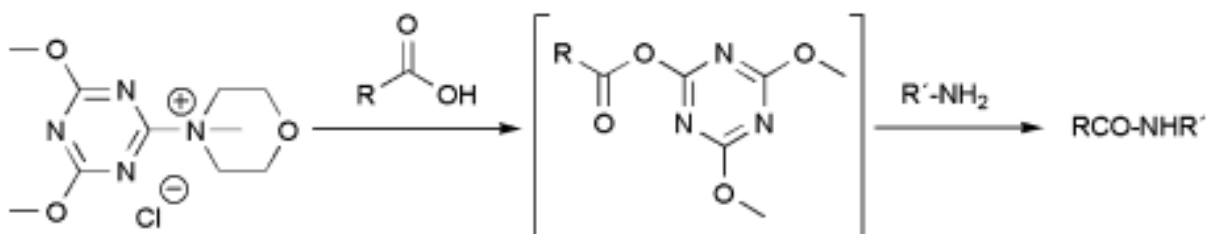


Figura 13. Esquema de ativação de grupos carboxílicos e formação de ligações amida via DMTMM.

Fonte: Adaptado de Farkas; Bystricky, 2007.

2.7 TÉCNICAS ANALÍTICAS

Os sinais eletroanalíticos são adquiridos através de medidas obtidas por meio de fenômenos em que uma espécie redox entra em contato com os componentes no meio onde está inserida. Os resultados desta reação são captados e analisados, podendo indicar algum parâmetro específico do eletrólito de suporte ou uma modificação significativa no sistema que está sendo estudado. As técnicas eletroquímicas lidam com diferenças de potencial, acúmulo e perda de cargas energéticas, variação da intensidade da corrente elétrica e outras propriedades mensuráveis. Podem ser utilizadas para diversos fins, inclusive no desenvolvimento e caracterização de dispositivos como os biossensores. Voltametria de Pulso Diferencial (DPV), Voltametria Cíclica (CV), Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) e Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram as técnicas empregadas neste trabalho e serão descritas detalhadamente em seguida.

2.6.1 Voltametria de Pulso Diferencial (DPV)

A voltametria é uma técnica dinâmica que se baseia na análise das reações que ocorrem entre a superfície de um eletrodo de trabalho e a solução de suporte em contato com esta superfície. Depende da medição de uma corrente elétrica que varia em função da aplicação controlada de um potencial (Aleixo, 2018). Na pulso DPV, a intensidade de corrente é medida duas vezes. Inicialmente, antes da aplicação de potencial e depois da aplicação de uma rampa de potenciais crescentes no sistema (Figura 14), durante um período de tempo pré determinado. A primeira corrente é subtraída da segunda e a diferença é compilada em função do potencial aplicado, em um gráfico chamado de voltamograma (Figura 15). A área dos picos expressa no voltamograma resultante é proporcional à concentração do analito de suporte (Pacheco, 2013).

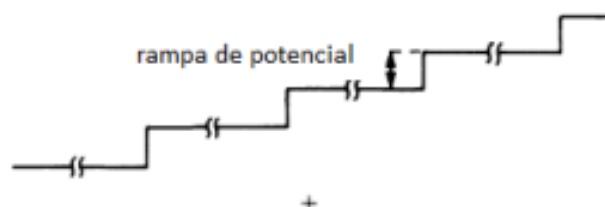


Figura 14 . Rampa de potencial (DPV). Fonte: Adaptado de Fonseca, 2015.

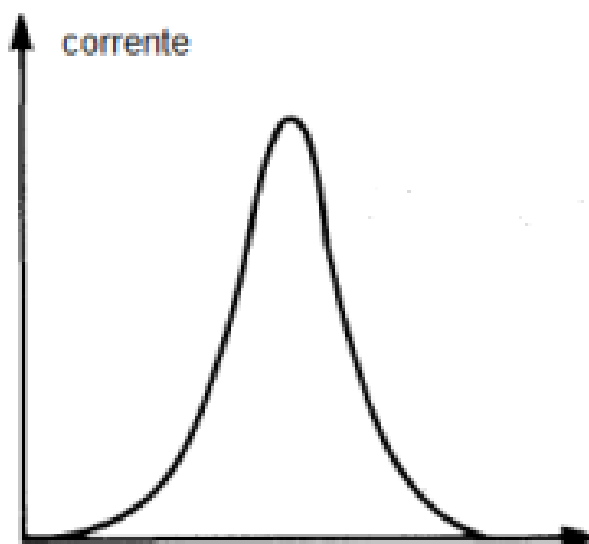


Figura 15. Representação de um voltamograma (DPV). Fonte: Adaptado de Fonseca, 2015.

2.6.2 Voltametria Cíclica (CV)

A CV é uma técnica utilizada para extrair informações quantitativas e qualitativas sobre reações eletroquímicas em diversos sistemas, como os biossensores (Pacheco et al., 2013). Neste âmbito, possibilita realizar modificações na superfície do transdutor, além de gerar polímeros na superfície através da eletropolimerização de monômeros. Sistemas no qual o processo redox segue as condições previstas pela equação de Nernst são chamados de reversíveis. Em processos reversíveis, as correntes de pico anódico e catódico são lineares em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Ao se deslocar para os potenciais positivos, obtém-se a curva anódica por meio do processo de oxidação. Quando o deslocamento é em direção a potenciais negativos, a curva obtida é a catódica, que está relacionada aos processos de redução. Os dados obtidos por meio da análise dos picos são as correntes de pico catódico e anódico (I_{pc}/I_{pa}), assim como os potenciais de pico catódico e anódico (E_{pc}/E_{pa}), usualmente representados num voltamograma, como mostra a Figura 16. CV é uma ferramenta que permite avaliar a cinética da transferência eletrônica num sistema, caracterizar o comportamento redox dos componentes e estudar processos químicos que ocorrem antes, durante e depois das modificações no eletrodo (Fonseca, 2015; Holler et al., 2009).

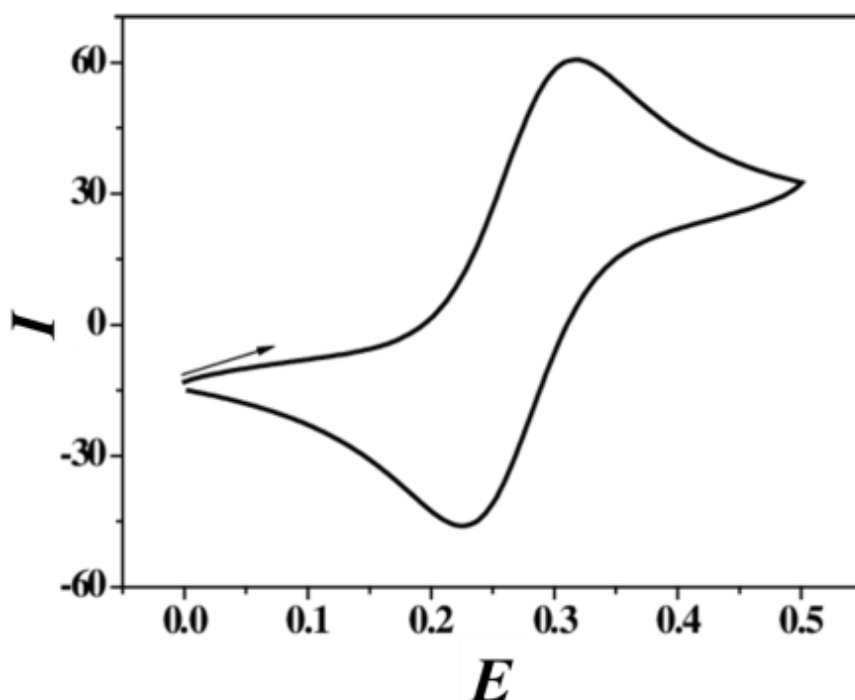


Figura 16. Representação de um voltamograma cíclico onde E se refere a potencial e I a corrente.
Fonte: Lima, 2017.

2.6.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

EIS é uma técnica extremamente versátil, apta a oferecer uma ampla gama de dados sobre o sistema a ser estudado. Em biossensores, é útil principalmente para avaliar as modificações de superfície feitas durante o processo de construção do dispositivo e caracterizar o sistema finalizado. Impedância pode ser definida como a oposição ao fluxo de corrente em um circuito elétrico. A resistência a transferência de carga (R_{ct}) é o que dificulta a passagem de elétrons por um circuito alternado. Na física, a resistência é regida pela lei de Ohm e está presente em circuitos de corrente contínua, onde não existem lacunas entre a tensão aplicada e a corrente. A impedância, por sua vez, ocorre em circuitos de corrente alternada, onde existem lacunas entre a tensão aplicada e a corrente, devido a presença de efeitos de capacitância e indutância (Randviir;Banks,2013; Dinçkaya et al., 2011)

Para estimar a impedância de um sistema, aplica-se um sinal alternado de amplitude variável em um eletrodo acoplado a uma célula de impedância. Analisa-se então a perturbação de potencial do tipo senoidal aplicada no sistema e a resposta do eletrodo através da medida de mudança de fase dos componentes de corrente e voltagem, e pela medida de suas amplitudes, por meio da lei de Ohm (Ribeiro, 2015; Carvalho et al., 2006). Ao avaliar a impedância em um biossensor eletroquímico, é necessário que a superfície do eletrodo de trabalho e de referência estejam em contato direto com uma solução suporte contendo um mediador eletrônico. O agente redox mais usado é o $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{3-/4-}$ (ferricianeto/ferrocianeto) (Rushworth et al., 2013).

Existem vários parâmetros a serem avaliados na interpretação das medidas de EIS. A impedância obtida inicialmente, que pode ser chamada de Z , é separada em componente real e imaginário. Detalhadamente, Z' (eixo x) nos gráficos, é o componente resistivo e é gerado pela superfície do eletrodo através da oposição ao fluxo de corrente. Enquanto isso, o elemento capacitivo $-Z''$ (eixo y) nos gráficos, é obtido a partir da medida de armazenamento de carga num sistema após a aplicação de tensão (Ribeiro, 2015; Hou et al., 2013). Tipicamente, a R_{ct} tende a aumentar à medida que o sistema sofre modificações de superfície e ganha mais complexidade. Como existe mais resistência, os elétrons presentes na solução encontram mais dificuldade para fazer passagem pela superfície. Entretanto, em alguns casos, é possível que uma diminuição no valor de R_{ct} ocorra após a ligação do analito, pois este processo pode alterar a estrutura do polímero na superfície e facilitar a movimentação dos elétrons (Rushworth et al., 2014; Leva-Bueno; Peyman; Millner, 2020).

A representação gráfica dos dados de impedância se dá através de diagramas de Nyquist, que permitem a avaliação da R_{ct} . Como representado na Figura 17, o $-Z''$ imaginário é plotado contra o Z' real em diversas frequências altas e baixas. O sistema é representado através da utilização do circuito equivalente de Randles, exibido na Figura 18.

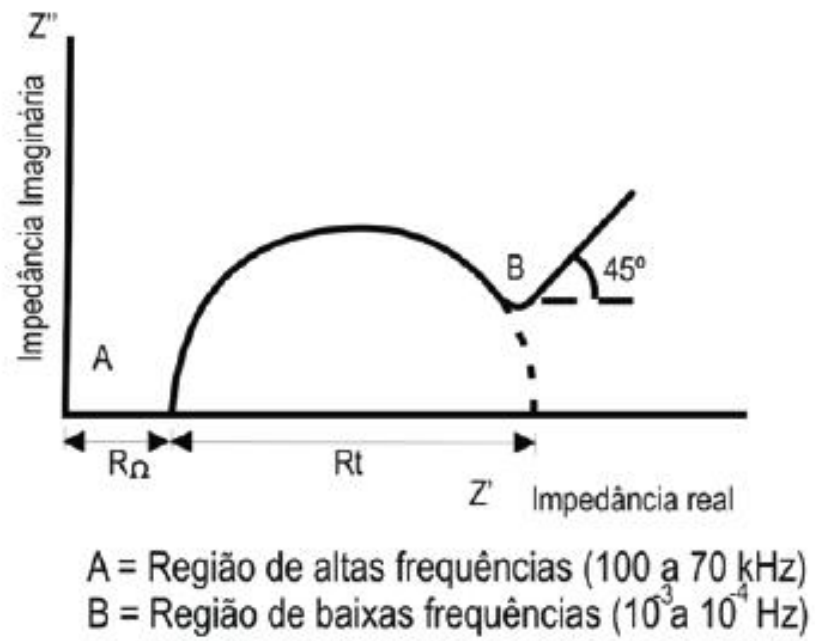


Figura 17 . Modelo de diagrama de Nyquist. Fonte: Ribeiro, 2015.

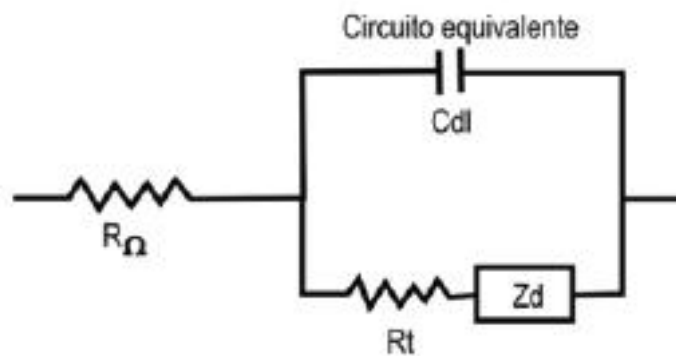


Figura 18. Circuito equivalente de Randles. Fonte: Ribeiro, 2015.

2.6.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de espectroscopia no infravermelho consiste na absorção ou emissão de energia radiante em uma região do espectro eletromagnético que varia de 12800 cm^{-1} a 10 cm^{-1} . A radiação empregada não é energética o suficiente para causar transições eletrônicas, contudo, provoca a transição de moléculas de estados de energia vibracional ou rotacional para outros, gerando dados qualitativos e quantitativos traduzidos em seus espectros. Para que uma molécula absorva a radiação infravermelha, é necessário que esta possua frequência igual a frequência vibracional da molécula, sofrendo variação no momento de dipolo durante seu movimento vibracional. Dentro deste escopo, o espectro eletromagnético é dividido em três sub-regiões: infravermelho próximo, que vai de 12800 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} ; infravermelho médio, de 4000 cm^{-1} a 200 cm^{-1} e infravermelho distante, de 200 cm^{-1} a 10 cm^{-1} (Coates, 2006; Subramanian, 2009).

A espectroscopia no infravermelho médio (MIR), do inglês, *Mid Infrared*, é extensamente usada na identificação de compostos orgânicos. Grupos funcionais existentes nas moléculas apresentam bandas ou picos característicos na região de frequência de grupos, que compreende a faixa de 3600 cm^{-1} a 1250 cm^{-1} (Pavia et al., 2010). Na faixa do espectro conhecida como região de impressão digital, que vai de aproximadamente 1200 cm^{-1} a 600 cm^{-1} , diferenças mínimas na estrutura e constituição de uma molécula originam alterações significativas na banda de absorção. Assim, é possível identificar compostos desconhecidos (Coates, 2006; Holler et al., 2009). Um dos principais métodos de medida é por reflectância total atenuada (ATR), do inglês *Attenuated Total Reflectance*. Consiste na reflexão completa da luz infravermelha ao passar de um meio de maior índice de refração para outro de menor índice. Durante a reflexão, o feixe de onda evanescente penetra na amostra e perde energia nos comprimentos de onda em que o material estudado absorve (Karoui; Downey; Blecker, 2010). ATR é vantajoso pois permite a obtenção de espectros de maneira rápida, não destrutiva e com pouco ou nenhum preparo da amostra. Existem dois tipos de espectrômetros baseados no interferômetro de Michelson usados para MIR: os dispersivos e os com transformada de Fourier. O segundo tipo apresenta muitas vantagens em relação ao

primeiro, como por exemplo, maior sensibilidade, menor tempo de análise, melhor resolução de comprimento de onda e razão sinal/ruído (Berthomieu, 2019; Guillén, 1997; Van de Voort, 1992).

Atualmente, em função das muitas vantagens descritas, FTIR é uma técnica de análise de substâncias vastamente empregada em vários campos, desde a indústria de alimentos, fármacos e petróleo até a pesquisa científica, na prospecção de novos compostos terapêuticos, monitoramento ambiental, produção de plataformas biossensoras e diversas outras linhas de pesquisa.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Desenvolver um genossensor eletroquímico para detecção de MTB, utilizando DMTMM como reagente de bioconjugação entre a sonda de DNA e a modificação realizada no transdutor.

3.2 ESPECÍFICOS

- Confeccionar os SPCE a serem usados durante o estudo;
- Realizar a modificação do eletrodo do trabalho, utilizando o aminoácido ácido glutâmico (Glu), a partir da técnica de voltametria cíclica (CV);
- Estudar os fatores que influenciam a reação de bioconjugação, por meio do DMTMM, da sonda de DNA com a superfície do eletrodo modificada com o filme de poli ácido glutâmico;
- Caracterizar as etapas de modificação e imobilização da sonda aminada de TB (sdTB) por técnicas eletroquímicas CV, DPV, EIS e FTIR ;
- Avaliar a especificidade do biossensor;
- Avaliar o desempenho do biossensor na detecção de alvo sintético;

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

As soluções e tampões utilizados foram preparados com Água MilliQ Ultrapura. O substrato de poliéster foi adquirido da empresa Isotek Brasil Indústria e Comércio Ltda. A pasta de carbono para confecção de eletrodos foi obtida pela empresa Loctite (Holanda) e a tinta condutiva de Ag/AgCl pela SunChemical (Estados Unidos). O Ácido Glutâmico (Glu), o 4-(4,6-Dimetoxi-1,3,5-triazina-2-il)-4-cloreto de metilmorfolínio (DMTMM), o tampão fosfato salino (PBS) e tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (Brasil). Glu foi dissolvido em PBS 1x pH 7,4 e o DMTMM em PBS 1x pH 7,4, TRIS HCL 10mM pH 7,4 e Água MilliQ. Os oligonucleotídeos de fita simples com 24 pb, com modificação de grupo amina na extremidade 5' (sondas) e suas sequências complementares (alvos) foram adquiridos liofilizados da empresa *Integrated DNA Technologies* LTDA. As soluções estoque das sondas e alvos foram ressolubilizadas em água MilliQ a 200 μ M e 100 μ M respectivamente e armazenadas em freezer a $\pm 2^{\circ}\text{C}$. Posteriormente foram diluídas de acordo com a necessidade, em PBS 1X (sonda e alvo) ou TRIS-HCl 20 mM (alvo), ambos em pH 7,4.

4.2 CONSTRUÇÃO DOS SPCE

Os eletrodos impressos foram construídos em suporte polimérico sólido e resistente, constituídos por múltiplas linhas condutoras de corrente elétrica. As pastas condutoras de carbono e prata foram aplicadas e curadas conforme as especificações do fabricante. O eletrodo de referência foi impresso com pasta de Ag/AgCl sobre o suporte, enquanto os eletrodos de trabalho e auxiliar foram impressos com pasta de carbono. Depois, os eletrodos foram recobertos com uma máscara adesiva para facilitar o manuseio da tira. Em seguida, as áreas dos eletrodos de trabalho, referência e auxiliar foram submetidas a lavagem por uma hora com solução de ácido sulfúrico 1% (v/v) para remoção de possíveis contaminantes. Por fim, os eletrodos secos a temperatura ambiente foram

armazenados a vácuo. Na figura 19 , pode-se observar um eletrodo finalizado e a descrição de seus elementos.

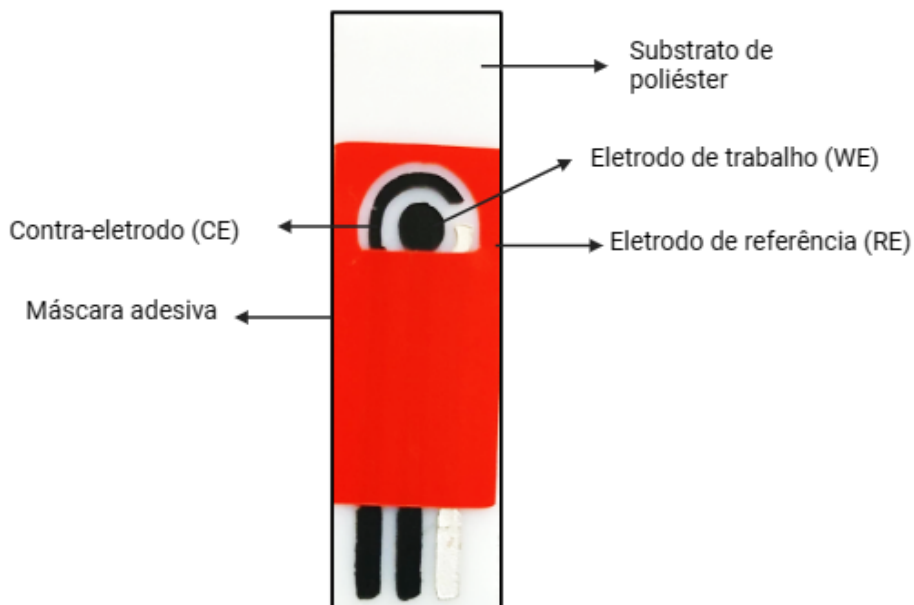


Figura 19. SPCE's confeccionados em laboratório e utilizados no desenvolvimento do trabalho.

Fonte: Autora, 2023.

4.3 PRÉ TRATAMENTO E MODIFICAÇÃO DO ELETRODO DE TRABALHO

A primeira modificação realizada no eletrodo de trabalho foi um pré tratamento com ácido sulfúrico (H_2SO_4) utilizando a técnica de CV. Consistiu na deposição de 50uL de H_2SO_4 na concentração de 0,5M na superfície do eletrodo, submetidos a um ciclo de na faixa de potencial de -2,5V a +2,5V, com velocidade de 100 mV/s (Gomes et al., 2020). Em seguida, o eletrodo foi lavado com água MilliQ e deixado secar à temperatura ambiente.

Posteriormente, o eletrodo de trabalho sofreu modificação com Glu utilizando a técnica de deposição eletroquímica por CV. A superfície do eletrodo foi modificada através da eletropolimerização do Glu em concentração de 10mM — utilizando os

seguintes parâmetros: faixa de varredura -0,8V a 2,0 V; velocidade de 100 mV/s e dez ciclos de polimerização, com duração de um minuto cada (Benvidi et al., 2018). Os parâmetros de experimentação foram definidos através de estudos publicados previamente, e o protocolo escolhido foi o mais vantajoso para a construção do sistema. A eficácia de tais modificações foi avaliada por meio das técnicas eletroquímicas utilizando indicadores redox apropriados.

4.4 IMOBILIZAÇÃO DO BIORRECEPTOR NO ELETRODO MODIFICADO

A sdTB foi imobilizada sobre o eletrodo de trabalho modificado por meio de ligações covalentes formadas entre os grupos funcionais (grupos carboxílicos e grupos amino) presentes no polímero de Glu e a sdTB, por meio da bioconjugação via DMTMM. Os fatores que influenciam na ligação covalente foram otimizados e selecionados levando em conta o objetivo de criar um dispositivo funcional e efetivo. Os parâmetros estudados foram as concentrações/razões do reagente de bioconjugação e sdTB, tampões de diluição, pH da solução e tempo de reação para que a ligação covalente ocorresse de forma satisfatória. Foram utilizados como critérios de seleção a intensidade das correntes obtidas por DPV e CV, como também a magnitude da R_{ct} obtida por EIS.

4.5 DETECÇÃO DA MOLÉCULA ALVO E AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE

Para a etapa de detecção, o alvo sintético complementar a 500nM foi depositado sobre o biossensor a 60°C conforme indicado pelo fornecedor, sob agitação por 10 minutos em uma câmara de hibridização (combi-H12, FINEPCR). Em seguida, o transdutor foi lavado com TRIS-HCl em pH 7,4 a 20mM para remoção das moléculas do alvo não hibridizadas. Com o objetivo de avaliar a especificidade do sistema para TB, o mesmo processo descrito anteriormente foi repetido, desta vez utilizando um alvo sintético não complementar de ZIKA vírus, também a 500nM. Adiante, uma ilustração completa da metodologia de construção do sistema está disponível na Figura 20.

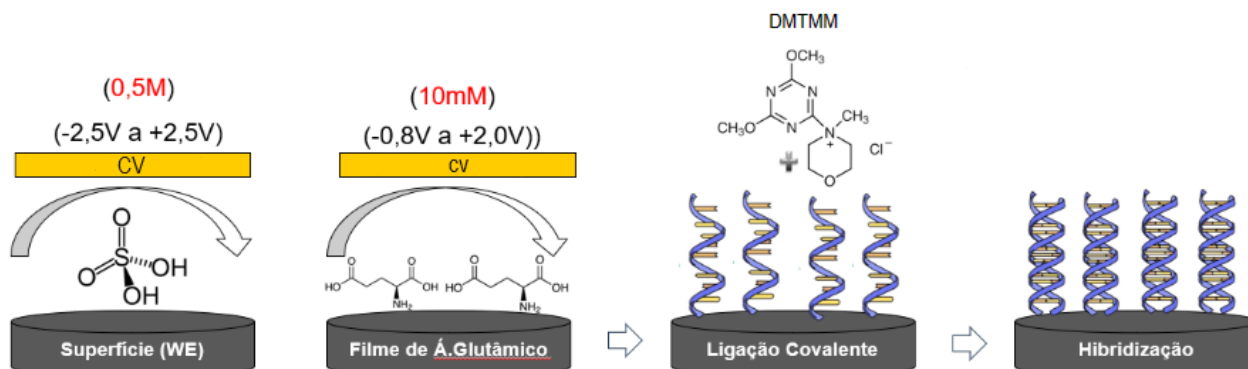


Figura 20. Metodologia de modificação, imobilização e hibridização do sistema. Fonte: Autora, 2024.

4.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS

As medidas foram realizadas em células eletroquímicas com sistema de três eletrodos: o eletrodo de trabalho (WE) de carbono, onde ocorrem as modificações e reações; um eletrodo auxiliar (CE) feito do mesmo material; e um eletrodo de referência (RE) de prata e cloreto de prata Ag/AgCl.

As análises de CV, DPV e EIS foram realizadas com um potenciostato Autolab PGSTAT128N com módulo FRA32M adquirido da Metrohm (Brasil).

As análises de CV e EIS foram efetuadas com a espécie redox Fe(II)/Fe(III)(CN)₆ na concentração de 5 mM em KCl 0,1M como eletrólito suporte. Alíquotas de 50µl desta solução foram depositadas sobre os eletrodos para as análises. A CV foi realizada em uma faixa de potencial de -0,7 a +0,7V vs Ag/Cl, com taxa de varredura de 10mV/s, durante três ciclos. A EIS foi realizada em uma faixa de frequência de 100kHz a 0,1Hz, com amostragem de 10 pontos por década, aplicando o potencial de 0,16V e amplitude de potencial de 0,01V.

Todas as análises por DPV foram realizadas empregando o azul de metileno (MB) como indicador de hibridização (DPV-MB). As medidas foram realizadas após

deposição de 5 μ L de solução de MB 0,5 mM na superfície do eletrodo de trabalho durante cinco minutos, posterior lavagem com 1,0mL de água MilliQ e secagem à temperatura ambiente. Finalmente, 50 μ L de solução TRIS-HCL 20 mM foram depositados sobre os eletrodos, servindo de eletrólito suporte durante a leitura. Os parâmetros da medida foram a faixa de varredura de -0,6V a 0,0V, com 50 mV de amplitude, 10 mV de faixa de potencial, tempo de modulação 0,05 s e intervalo 0,5 s.

As análises feitas a partir de FTIR foram realizadas em um espectrofotômetro IRSpirit (SHIMADZU) com acessório QATR-S . Os espectros foram obtidos na região de 400cm⁻¹ a 4000cm⁻¹, com média de 32 scans e resolução de 4cm⁻¹.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRÉ TRATAMENTO COM ÁCIDO SULFÚRICO (H_2SO_4)

De acordo com os estudos de Gomes et al., o desempenho dos SPCE varia de acordo com as propriedades da superfície e composição química da pasta de carbono utilizada em sua produção. Sendo assim, é possível melhorar o comportamento eletroquímico dos eletrodos através de modificações em sua superfície. Logo, os SPCE's foram modificados com H_2SO_4 através da técnica de CV com o objetivo de ativar a superfície, limpar a área de trabalho e aumentar o fluxo de transferência de elétrons no sistema.

A performance dos eletrodos foi averiguada a partir da técnica de EIS, onde estimou-se a R_{ct} dos SPECS antes e após o tratamento com H_2SO_4 . Como apresentado na Figura 21, o valor de R_{ct} dos SPCE's brancos, ou seja, que não sofreram nenhuma modificação prévia, foi de $29,5 \pm 7,75 \text{ k}\Omega$. Depois do pré-tratamento, constatou-se um aumento na condutividade da superfície, indicado pela diminuição da R_{ct} para $3,43,5 \pm 0,71 \text{ k}\Omega$. Observou-se também, um aumento na reprodutibilidade do sistema, sugerido pelo baixo valor de desvio padrão. Para avaliar o efeito exclusivamente da técnica de CV no sistema, foi realizada a medida empregando apenas PBS 1x pH 7,4 (ou seja, sem a presença do ácido sulfúrico), resultando num valor de R_{ct} de $4,8 \pm 1,06 \text{ k}\Omega$. Sem a presença de H_2SO_4 , o valor da R_{ct} foi ainda mais alto, assim como o desvio padrão. Constata-se assim que o pré tratamento com H_2SO_4 alterou as propriedades eletroativas do eletrodo, facilitando a passagem de elétrons. Ainda, mesmo que exista um efeito averiguado no sistema quando se aplica apenas um ciclo de CV, não acarreta um impacto tão efetivo ou reprodutível quanto o pré tratamento. A representação dos resultados descritos pode ser observada nas Figuras 21 e 22.

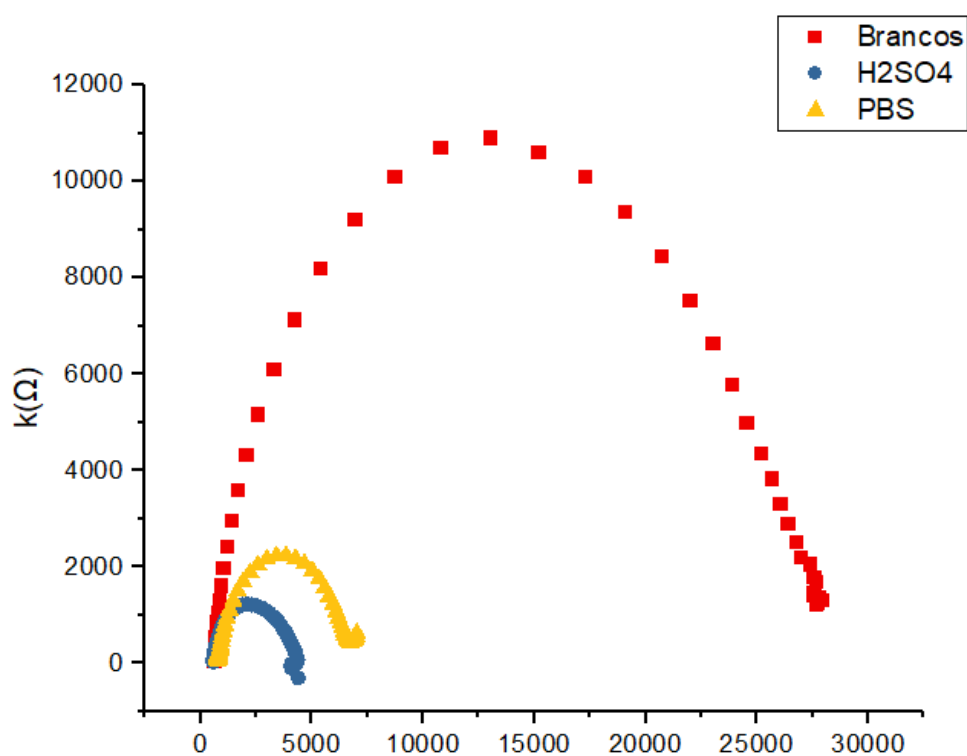


Figura 21: . Diagrama de Nyquist obtido através da equação de Randles. Eletrodos não modificados (vermelho), eletrodos pré tratados com H_2SO_4 (azul), eletrodos “pré tratados” com PBS. Análises realizadas em quintuplicatas.

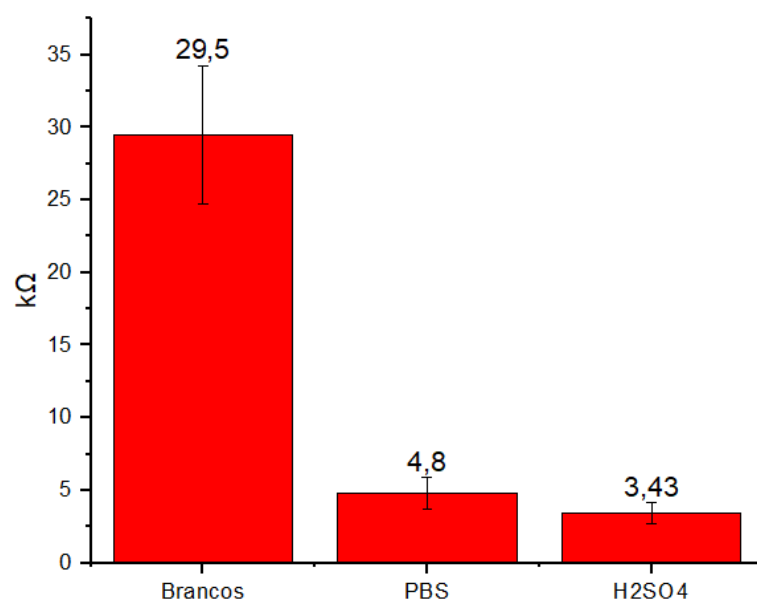


Figura 22: Gráfico de barras representando valores de R_{ct} em eletrodos brancos, eletrodos pré tratados com H_2SO_4 e eletrodos “pré tratados” com PBS. Análises realizadas em quintuplicatas.

5.2 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE COM FILME POLIMÉRICO OBTIDO POR MEIO DA ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO ÁCIDO GLUTÂMICO

Glu foi o aminoácido escolhido para modificação da superfície do transdutor por ser rico em grupos carboxílicos, capaz de formar um filme polimérico, a fim de possibilitar a formação da ligação covalente entre estes grupos ($-COOH$) e os grupamentos amino ($-NH_2$) presentes na extremidade 5' da sdTB. No estudo a seguir, foi averiguado o efeito do pré tratamento com H_2SO_4 aliado a eletropolimerização do Glu na superfície do eletrodo. O Glu foi selecionado mesmo que não seja considerado um aminoácido eletrocondutivo, pois a quantidade de grupos disponíveis para a ligação e a formação do polímero se mostraram suficientes para proceder com o processo de construção do biossensor, principalmente após o pré tratamento com H_2SO_4 , que mitigou a diminuição de eletrocondutividade causada pela polimerização do Glu.

Na Figura 23 verifica-se que os eletrodos polimerizados com Glu mas não pré tratados com H_2SO_4 (em vermelho), resultaram em R_{ct} de $(12 \pm 5,86 k\Omega)$. Este valor é inferior ao R_{ct} dos eletrodos brancos, o que se pode atribuir à formação do polímero no eletrodo. Quando realizada a eletropolimerização do Glu após o pré-tratamento com H_2SO_4 (em azul), obteve-se R_{ct} de $(6,27 \pm 4,27 \Omega)$, demonstrando uma diminuição significativa em relação àqueles que foram modificados com Glu sem o pré-tratamento ácido. O valor de R_{ct} obtido para os eletrodos pré-tratados com H_2SO_4 e submetidos ao processo de CV na ausência do Glu (amarelo) $(3,8 \pm 1,04 \Omega)$, reitera a eficácia do pré-tratamento em aumentar a eletrocondutividade do sistema e confirma a formação do filme de ácido poli-L-glutâmico. Existe Portanto, verifica-se que o sistema possui tanto a modificação necessária para imobilização do biorreceptor, por meio dos grupos carboxílicos presentes na superfície do filme polimérico formado, quanto menor R_{ct} do que o SPCE sem nenhuma modificação, conferindo melhores propriedades elétricas à etapas posteriores de construção do biossensor (Figura 24)

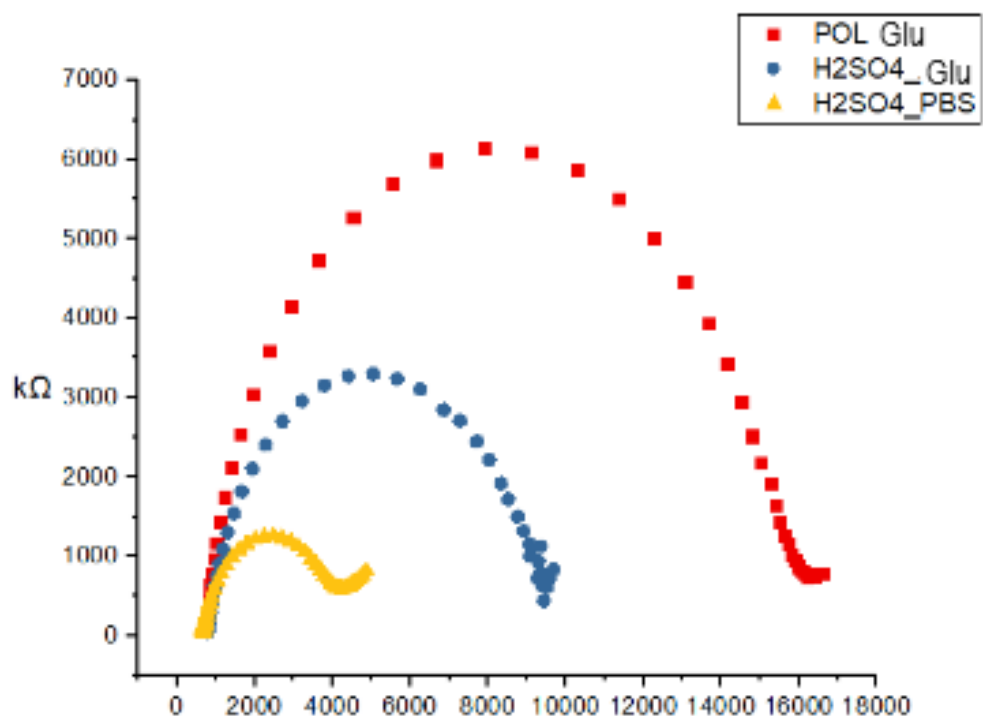


Figura 23: Diagrama de Nyquist obtido através da equação de Randles. Eletrodos eletropolimerizados com Glu (vermelho), eletrodos pré tratados com H_2SO_4 e eletropolimerizados com Glu (azul) e eletrodos pré tratados com H_2SO_4 e eletrodos “eletropolimerizados com PBS (amarelo).

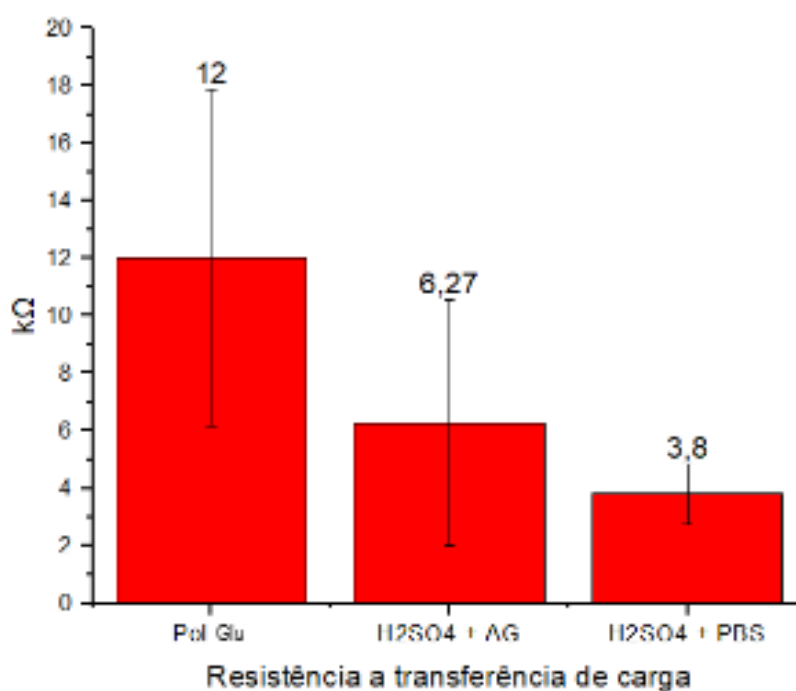


Figura 24. Resultados de Rct para os SPCEs eletropolimerizados com Glu; pré tratados com H₂SO₄ e eletropolimerizados com Glu; e pré tratados com H₂SO₄ e eletropolimerizados com PBS. Análises realizadas em quintuplicatas.

5.3 DEFINIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DMTMM

Os valores de corrente da análise de DPV-MB são apresentados na Figura 25 para diferentes concentrações de DMTMM. O DMTMM foi preparado no dia de realização dos experimentos em solução de água MilliQ. Neste estudo, os SPCE foram pré tratados com H₂SO₄, eletropolimerizados com Glu na concentração de 10mM, imobilizados com sdTB a 20uM por 16h. A concentração de sonda e o tempo de imobilização aplicados neste estudo foram parâmetros fixos escolhidos de acordo com trabalhos realizados previamente pelo nosso grupo de pesquisa. Subsequentemente, no curso de desenvolvimento deste trabalho, estes dois parâmetros foram estudados e otimizados.

A concentração selecionada do reagente foi de 1%, pois apresentou maior corrente ($6,6 \pm 1,2 \mu\text{A}$) entre as opções estudadas e o menor desvio padrão. A partir da concentração de 2% houve a inibição da corrente do MB, o qual pode ser ocasionado pela reação cruzada do filme de Glu na superfície, acarretando na diminuição no rendimento da imobilização da sdTB.

Em seguida, conforme o trabalho experimental realizado por Leitner et al (2014), DMTMM tem a capacidade de acoplar ácidos carboxílicos na faixa de pH 7 a 7,5, processo que vem gerando excelentes rendimentos da reação apresentando alto nível de biocompatibilidade. Logo, visto que a água MilliQ possui um pH menor que 7, decidiu-se testar a mudança do pH do meio de reação do DMTMM, empregando PBS 1x a pH 7,4.

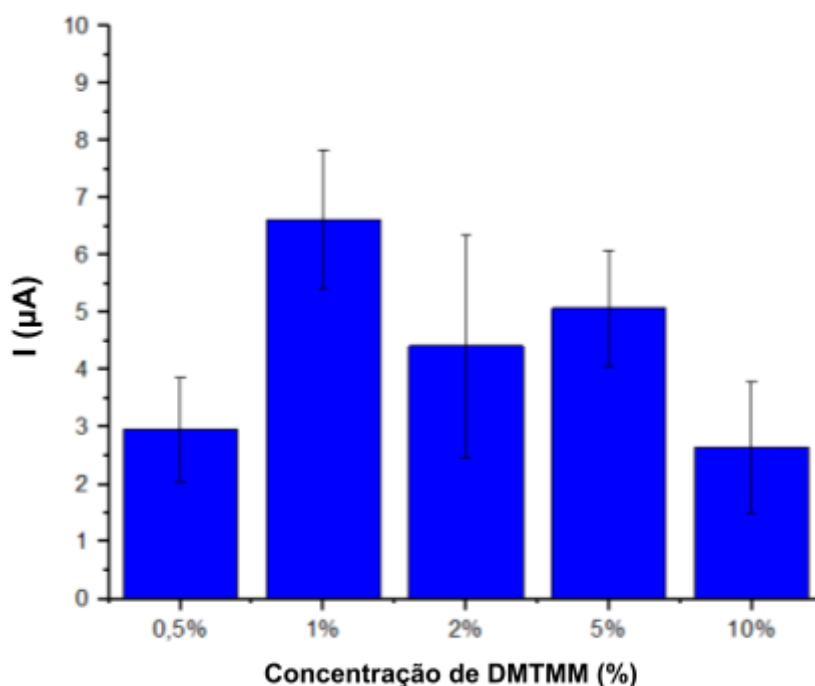


Figura 25. Resultados de correntes de DPV-MB obtidas com a concentração de DMTMM variando de 1% a 10% em água MilliQ. Análises realizadas em quintuplicatas.

5.4 ESTUDO DO TEMPO DE IMOBILIZAÇÃO DA Sonda

O tempo necessário para a ocorrência da imobilização foi estudado nos intervalos de 3h, 6h, 12h, 16h e 24h, com os valores de corrente de DPV-MB apresentados na Figura 26. Os SPCE foram pré tratados com H_2SO_4 , eletropolimerizados com Glu na concentração de 10mM, ativados com DMTMM a 1% em solução de PBS 1x pH 7,4 e imobilizados com sdTB nas concentrações previamente citadas.

Assim, verifica-se que a corrente aumentou com o tempo, atingindo o maior valor em 12h ($11,4 \pm 5 \mu A$) e 16h ($11,4 \pm 0,9 \mu A$). Entretanto, a reprodutibilidade do resultado com 12h foi baixíssima, desqualificando este tempo de imobilização como possibilidade. Após esse período de 12h, observa-se ausência de variação da corrente em relação ao próximo tempo e uma diminuição acentuada no desvio padrão, indicando que a reação alcançou seu rendimento máximo em 16h. Desse modo, o tempo de imobilização selecionado para os próximos estudos foi de 16h.

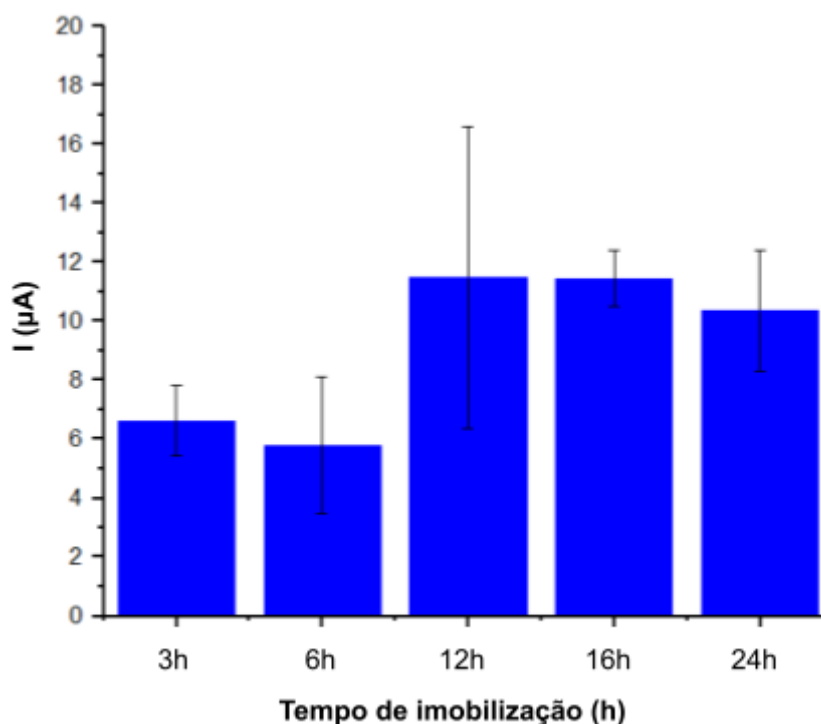


Figura 26 - Correntes de DPV-MB obtido pelo estudo do tempo de imobilização da sdTB, dados adquiridos na solução com $[sdTB] = 20 \mu M$ e DMTMM 1% em PBS. Análises realizadas em quintuplicatas.

5.5 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE Sonda

Estabelecidas as condições da reação para imobilização de sdTB, sua concentração foi avaliada para descobrir qual fornece o maior sinal analítico para o biossensor. Diferentes concentrações de sdTB foram avaliadas, variando de 5 μ M a 20 μ M, com intervalos de 5 μ M. Os resultados das correntes obtidas por de DPV-MB são apresentados na Figura 27. Verifica-se que, de 5 μ M até 15 μ M ocorreu o aumento da corrente com a concentração (8,3 $\pm$ 4,4 μ A para 13,7 $\pm$ 2,2 μ A). e Esses dados evidenciam a formação da ligação covalente entre a sdTB e a superfície do WE modificado, visto que quanto maior a concentração de sdTB, maior a quantidade de material imobilizado e guaninas disponíveis para interação com MB. Entretanto, a 20 μ M houve a inibição da corrente (11,3 $\pm$ 2,1 μ A), a formação da ligação covalente começa a alterar a região de interface eletroquímica de forma desfavorável à medida de DPV-MB. Existe uma quantidade limitada de sítios de ligação disponíveis para imobilização da sdTB na superfície do transdutor, e a concentração de 20 μ excedeu esse limite. De tal forma, a queda de corrente está provavelmente associada a um processo de impedimento estérico, com o MB sendo repelido e se tornando incapaz de interagir com todas as guaninas presentes na área do WE.

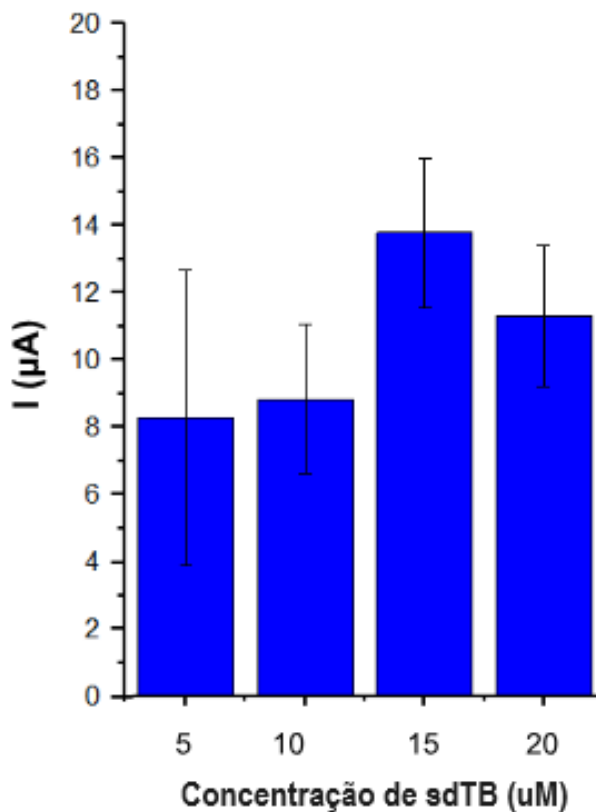


Figura 27 - Resultados de correntes de DPV-MB para avaliar a concentração de sdTB na reação de imobilização. As outras condições de reação de imobilização foram tempo de 16h, DMTMM 1% em PBS x1 pH 7,4. Análises realizadas em quintuplicatas.

Desse modo, as condições estabelecidas para desenvolvimento do genossensor de TB foram: DMTMM a 1% e sdTB a 15μM, ambos em PBS x1 pH 7,4, com um tempo de imobilização de 16h.

5.6 CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA

5.6.1 CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA POR EIS E DPV

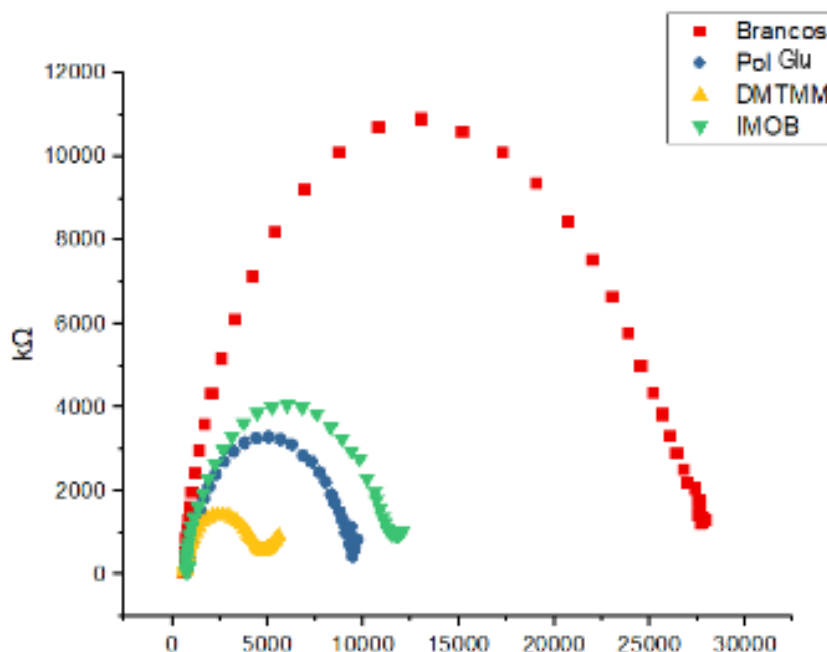


Figura 28. Diagrama de Nyquist obtido através da equação de Randles. Caracterização das fases de modificação do sistema até a etapa de imobilização de sdTB. Análises realizadas em quintuplicatas.

Para garantir a ocorrência e sucesso de cada etapa empregada na construção do biossensor, utilizou-se a técnica de EIS para estimar a R_{ct} de cada uma das fases e analisar o significado das oscilações destes valores de acordo com as modificações estabelecidas, (Figura 28). Quanto mais se aumenta a complexidade de um sistema, habitualmente se dificulta a passagem de corrente pelo mesmo, exacerbando os valores de R_{ct} . Os SPCEs brancos apresentaram valores de R_{ct} elevados ($29,5k\pm 4,75\Omega$), que diminuíram após a modificação com polímero de Glu ($6,2\pm 4,2k\Omega$). Ao adicionar DMTMM, a superfície tornou-se mais eletroativa, resultando nos valores mais baixos ($3,4k\pm 0,5\Omega$). Após formar a ligação covalente, houve um aumento na R_{ct} ($11,9\pm 1,71k\Omega$), provavelmente ocasionada pela repulsão entre a carga negativa dos oligonucleotídeos presentes e o agente redox.

As evidências eletroquímicas de construção do biossensor são mostradas na Figura 29, onde cada etapa de modificação do WE apresentou alteração na corrente obtida por DPV-MB. A maior corrente obtida foi após a formação da ligação covalente com a sdTB, pois como o MB interage com as guaninas disponíveis do

oligo, ocorre um aumento da quantidade deste indicador na interface eletroquímica.

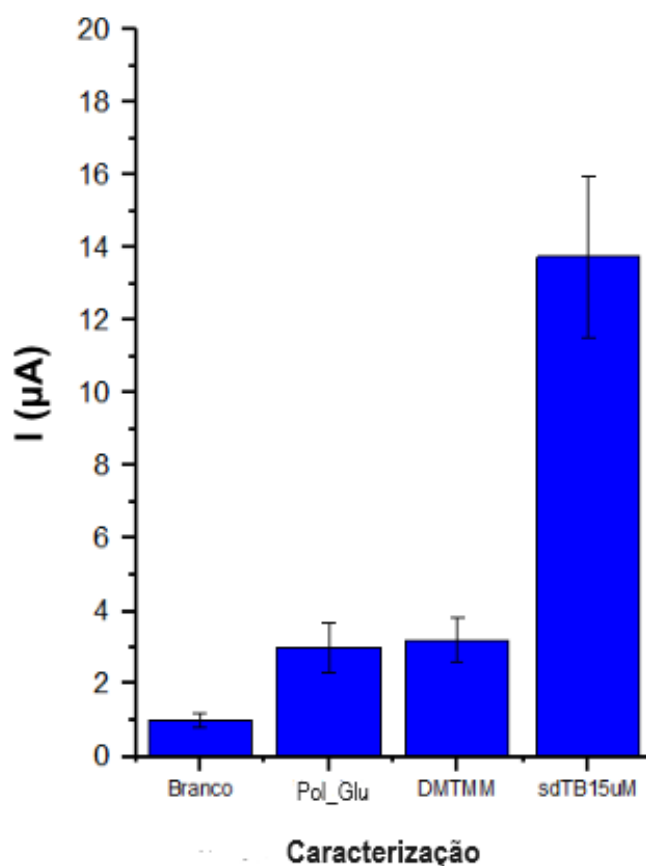


Figura 29. Caracterização do sistema, desde o SPCE branco até a etapa imobilização de sdTB. Análises realizadas em quintuplicatas.

5.6.2 Caracterização do sistema por FTIR

Várias etapas foram necessárias para construção do biossensor para detecção de TB. Para comprovar a modificação eficiente entre cada uma dessas etapas, além da caracterização eletroquímica, também foi realizada a caracterização empregando FTIR (Figura 30). No espectro obtido a partir do filme polimérico de Glu (verde), detectam-se bandas entre 1400cm⁻¹ e 1450cm⁻¹, referentes ao dobramento de CH₂ e bandas entre 1150cm⁻¹ e 1100cm⁻¹ associadas ao estiramento de COO⁻, que podem ser atribuídas ao polímero. Verifica-se também estiramento C=O constatado entre 1750cm⁻¹ e 1700cm⁻¹, que pode ser atribuído às carbonilas presentes no

filme polimérico. Entre 2950cm^{-1} e 3000cm^{-1} , existe absorção indicativa de estiramento C-H assimétrico e simétrico em CH_3 . Nota-se que estas bandas permanecem visíveis nos eletrodos ativados com DMTMM (preto), mas apresentam uma intensidade menor. Ademais, é possível visualizar novamente as bandas quando se analisa a amostra onde a sdTB foi imobilizada (azul) .

Analisando os espectros obtidos a partir da amostra dos SPCEs com a sdTB imobilizada (azul), é possível observar as vibrações de estiramento do grupo amida secundária entre 3050cm^{-1} e 3100cm^{-1} e dobramento também do grupo amida entre 1550cm^{-1} e 1600cm^{-1} . Ademais, é possível visualizar a estrutura do esqueleto de fósforo. As bandas localizadas entre 1300cm^{-1} e 1350cm^{-1} fazem alusão a $(\text{RO})_3\text{P}=\text{O}$, enquanto as bandas presentes entre 1000cm^{-1} e 1060cm^{-1} ao POH. Assim, é possível constatar que a sdTB foi imobilizada sobre a superfície do SPCE com sucesso.

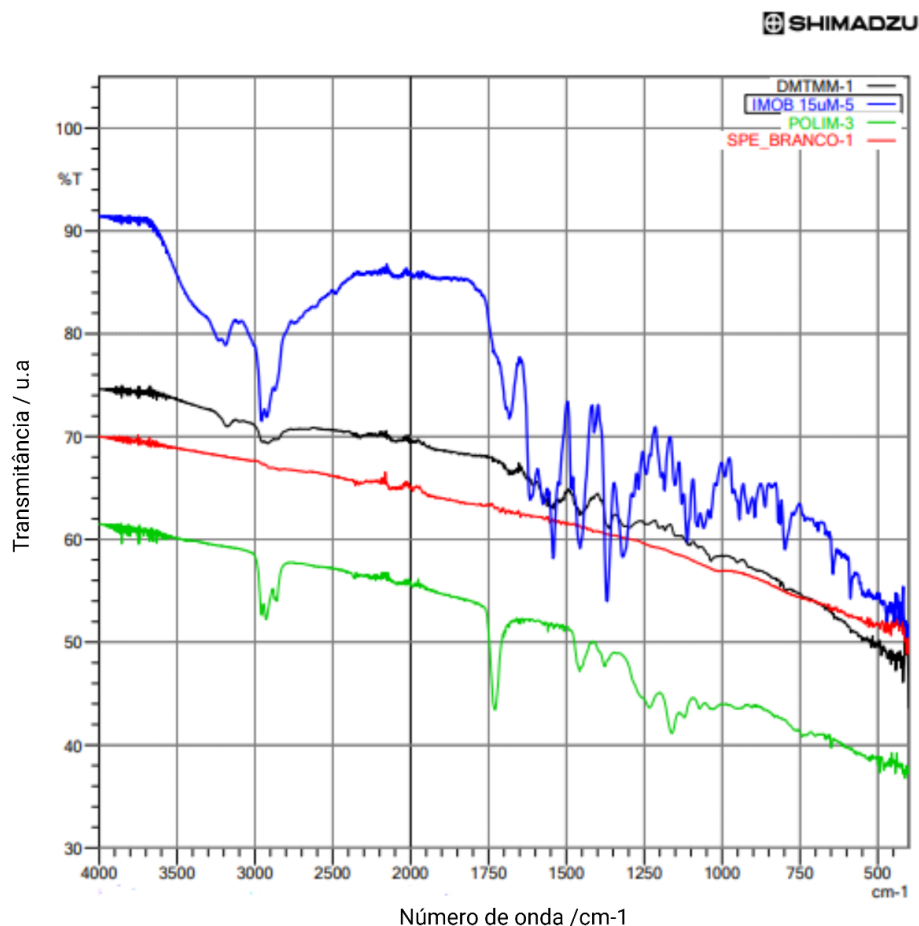


Figura 30 - Espectros de infravermelho obtidos em diferentes momentos da construção do biossensor. SPCE branco (vermelho), filme polimérico de Glu (verde), ativação com DMTMM (preto) e imobilização da sdTB (azul).

5.7 Detecção do alvo complementar e avaliação da especificidade por DPV

Para avaliar a eficiência do sistema, foi escolhido o método de DPV por meio da oxidação do MB, um marcador com alta afinidade para a base nitrogenada guanina. Contudo, o MB não mostra tal afinidade para os eletrodos não modificados (Figura 31), resultando em uma baixa corrente ($0,5 \pm 0,2 \mu\text{A}$). Após a etapa de eletropolimerização com Glu, a superfície se torna mais eletroativa e a corrente aumenta ($7,5 \pm 1,5 \mu\text{A}$), assim como a taxa de oxidação do MB. Em seguida, pode-se observar o efeito do DMTMM na superfície, sem a presença da sonda aminada, diminuindo a corrente para ($5,4 \pm 0,4 \mu\text{A}$). Após a imobilização da sonda, o MB interage com as guaninas, ocasionando o aumento significativo da intensidade de corrente ($14,6 \pm 2 \mu\text{A}$). Finalmente, a sdTB é hibridizada com sua sequência complementar e o valor de corrente cai ($4,61 \pm 0,8 \mu\text{A}$), visto que as guaninas estão ligadas aos seus pares e não mais disponíveis para interagir com o MB. Para atestar a especificidade do sistema, repetiu-se o processo com alvo não complementar (sequência de ZIKA vírus), obtendo uma corrente de ($8,42 \pm 1,9 \mu\text{A}$). Esta intensidade de corrente atesta que ainda existem muitos sítios livres de guanina para ligação com MB, já que não ocorreu hibridização devido a não complementaridade das sequências. Contudo, ainda há um certo nível de similaridade entre as duas, fenômeno que causou uma queda de corrente com o ANC ao ser comparado com o IMOB, mas não foi o suficiente para ser confundido com a hibridização do AC.

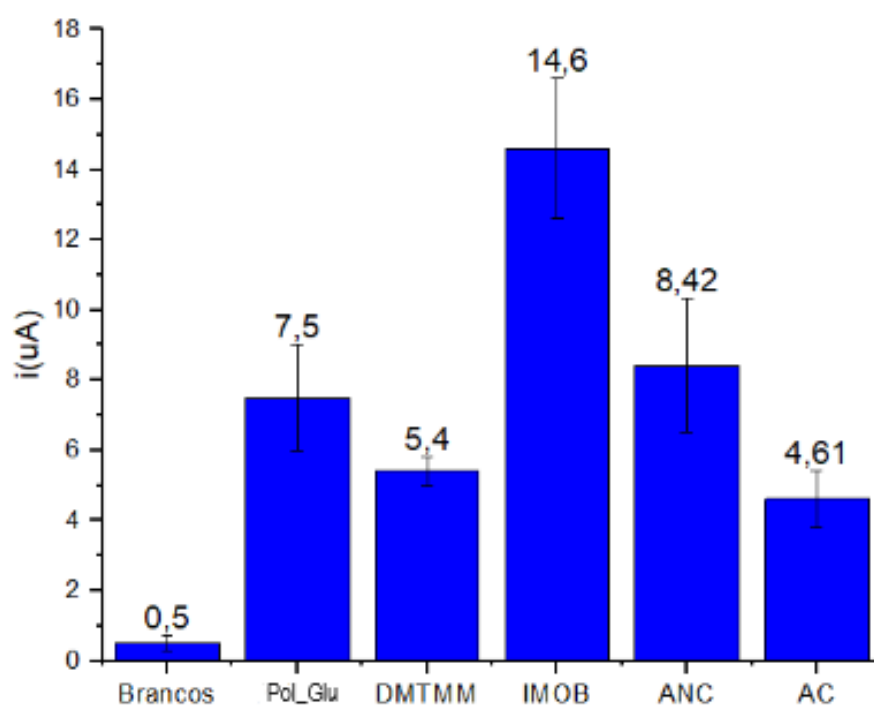


Figura 31 - Resultados de correntes obtidas por DPV-MB para todas as fases de construção do biossensor e detecção com alvos complementar (AC) e não complementar (ANC). Análises realizadas em quintuplicatas.

6 CONCLUSÃO

A TB é uma das doenças mais antigas do mundo, considerada tratável e curável, mas, ainda assim, é uma das condições que mais causa óbitos no planeta, em especial naqueles países em situação de vulnerabilidade social e econômica. Os métodos de diagnóstico disponíveis no Brasil e no mundo possuem limitações significativas, como custo, disponibilidade de estrutura laboratorial sofisticada e pessoal treinado, problemas de especificidade e sensibilidade ou tempo de realização. Frente a essa problemática, fez-se clara a necessidade imediata por um método diagnóstico mais efetivo que possa ser acessado por aqueles que mais precisam, combatendo a difusão da doença em áreas de endemia e facilitando o acesso dos doentes a tratamento vital, por meio do diagnóstico precoce.

Os biossensores eletroquímicos estão presentes em diversas áreas de atuação, desde a monitoração ambiental à indústria alimentar e é claro, ao diagnóstico de patógenos. São uma excelente resposta à demanda por inovação no âmbito de combate a TB. São dispositivos versáteis, de fácil manuseio, que permitem a realização do diagnóstico em campo, tem baixo custo de produção e podem ser miniaturizados. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um genossensor eletroquímico para facilitar o diagnóstico rápido de *Mycobacterium tuberculosis*.

O sistema foi construído em diversas etapas, culminando na produção de um genossensor dinâmico e eficaz. A primeira etapa foi o pré tratamento do eletrodo com H_2SO_4 para limpar a sua superfície e torná-la mais eletroativa. Em seguida, a superfície foi eletropolimerizada, produzindo um polímero de Glu que serviu como base para a imobilização da sdTB. A imobilização foi realizada por meio da técnica de ligação covalente, empregando o DMTMM como agente de bioconjugação. Enfim, para constatar a eficiência do sistema, foi realizada a detecção de alvos complementar e não complementar.

De acordo com as leituras realizadas por DPV, o biossensor desenvolvido distinguiu o alvo complementar (correspondente a MTB) do alvo não complementar (sequência pertencente a ZIKA vírus), demonstrando sua funcionalidade e

especificidade. Todavia, mais estudos são necessários para encerrar a etapa de detecção, considerando que a reprodutibilidade do sistema, principalmente na fase de hibridização, ainda deixa a desejar.

Tendo como objetivo a diminuição dos valores de desvio padrão obtidos, propõe-se uma otimização no processo de fabricação dos eletrodos, introduzindo o método de serigrafia na produção das tiras, padronizando a metodologia de manufatura para uma modalidade semi automática, o que deverá reduzir significativamente o tempo de produção, a quantidade de reagentes utilizados per eletrodo e os erros durante a fabricação. Outra possibilidade é a realização de um estudo para evitar ligações inespecíficas empregando bloqueadores de superfície, como etanolamina e albumina de soro bovino (Ma et al., 2016; Liu et al., 2012; Farzin et al., 2020; Flauzino et al., 2022). São vertentes interessantes no que diz respeito à diminuição do desvio padrão já que, além da ligação covalente e hibridização das sondas e alvos, a literatura atesta que outras ligações podem estar ocorrendo entre os sítios livres expostos na superfície do eletrodo, fenômeno que pode diminuir a acurácia e a especificidade do dispositivo.

É de suma importância também determinar o limite de detecção do sistema em amostras sintéticas, para então avançar em direção à validação clínica, que contará com a avaliação da performance do biossensor em amostras de pacientes infectados e não infectados.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, T.; NAKAMURA, Y. Aptamers: A Review of Their Chemical Properties and Modifications for Therapeutic Application. **Molecules**, v. 24, n. 23, p. 4229, 21 nov. 2019.
- ALEIXO, L. M. Voltametria: conceitos e técnicas. **Revista Chemkeys**, n. 3, p. 1–21, 17 set. 2018.
- ALHEDABI, T. et al. Experimental and theoretical studies on electropolymerization of polar amino acids on platinum electrode. **Materials Chemistry and Physics**, v. 185, p. 183–194, 1 jan. 2017.
- ANG, M. et al. Diagnosis of Ocular Tuberculosis. **Ocular Immunology and Inflammation**, v. 26, n. 2, p. 208–216, 5 jul. 2016.
- ASSIS, N. C. S. DE et al. Diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 1, fev. 2007.
- BABAEI, A. et al. Genosensors as an alternative diagnostic sensing approaches for specific detection of virus species: A review of common techniques and outcomes. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 155, p. 116686, 1 out. 2022.
- BAÑULS, A.-L. et al. Mycobacterium tuberculosis: ecology and evolution of a human bacterium. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 1261–1269, 1 nov. 2015.
- BARBERIS, I. et al. The History of Tuberculosis: from the First Historical Records to the Isolation of Koch's Bacillus. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 1, mar. 2017.
- BELL, L. C. K.; NOURSADEGHI, M. Pathogenesis of HIV-1 and Mycobacterium tuberculosis co-infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 80–90, 7 nov. 2017.

BENVIDI, A. 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, 1 jan. 2018.

BERTOLLI FILHO, C. A Medicina e o Fato Tuberculoso. In: BERTOLLI FILHO, C. **História Social da Tuberculose e do Tuberculoso: 1900 - 1950**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2001. cap. 1.

BERTHOMIEU, C.; HIENERWADEL, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Photosynthesis Research**, v. 101, n. 2-3, p. 157–170, 10 jun. 2009.

BEZERRA, Giselda. et al. Electrochemical aptasensor for the detection of HER2 in human serum to assist in the diagnosis of early stage breast cancer. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, n. 25, p. 6667–6676, 5 ago. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico da Tuberculose. 1ª edição, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico da Tuberculose. 1ª edição, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para o diagnóstico laboratorial da tuberculose e micobactérias não tuberculosas de interesse em saúde pública no Brasil. 1ª edição, Brasília, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias. Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 3ª edição comemorativa, Rio de Janeiro, 2005.

BRENNAN, P. J.; NIKAIIDO, H. The Envelope of Mycobacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 29–63, jun. 1995.

BUSATTO, C. et al. Tuberculose ativa versus Tuberculose Latente: uma revisão de literatura. **Journal of Infection Control**, v. 4, n. 3, 1 jan. 2015.

BUSSI, C.; GUTIERREZ, M. G. Mycobacterium tuberculosis infection of host cells in space and time. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 4, p. 341–361, 1 jul. 2019.

CAMPOS-FERREIRA, Danielly. S. et al. Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16 detection in real samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 804, p. 258–263, dez. 2013.

CARRANZA, C. et al. Diagnosis for Latent Tuberculosis Infection: New Alternatives. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 10 set. 2020.

CARVALHO, L. A. DE; ANDRADE, A. R. DE; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 796–804, jul. 2006.

CHANG, B. et al. Interferon- γ release assay in the diagnosis of latent tuberculosis infection in arthritis patients treated with tumor necrosis factor antagonists in Korea. **Clinical Rheumatology**, v. 30, n. 12, p. 1535–1541, 10 maio 2011.

CHIN, Kai Ling. et al. DNA markers for tuberculosis diagnosis. **Tuberculosis**, v. 113, p. 139–152, dez. 2018.

CHURCHYARD, G. et al. What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl_6, p. S629–S635, 1 out. 2017.

COATES, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, 2006.

DHEDA, K. et al. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 5, n. 4, p. 291–360, 1 abr. 2017.

DINÇKAYA, E. et al. Development of an impedimetric aflatoxin M1 biosensor based on a DNA probe and gold nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 9, p. 3806–3811, maio 2011.

DINNES, J. et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. **Health Technology Assessment**, v. 11, n. 3, jan. 2007.

DONMEZ, S. et al. Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase on a carbon paste electrode modified with microsphere-attached L -glycine. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 64, n. 5, p. 745–753, 18 abr. 2017.

EL AAMRI, Maliana. et al. Electrochemical Biosensors for Detection of MicroRNA as a Cancer Biomarker: Pros and Cons. **Biosensors**, v. 10, n. 11, p. 186, 20 nov. 2020.

ELOI, Paulo. et al. Toward a point-of-care diagnostic for specific detection of Mycobacterium tuberculosis from sputum samples. **Tuberculosis**, v. 121, p. 101919, 1 mar. 2020.

FARKAS, P.; BYSTRICKY, S. Efficient activation of carboxyl polysaccharides for the preparation of conjugates. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 1, p. 187–190, 1 mar. 2007.

FARZIN, L. et al. Electrochemical genosensor based on carbon nanotube/amine-ionic liquid functionalized reduced graphene oxide nanoplatfrom for detection of human papillomavirus (HPV16)-related head and neck cancer. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 179, p. 112989–112989, 1 fev. 2020.

FLAUZINO, J. M. R et al. Label-free and reagentless electrochemical genosensor based on graphene acid for meat adulteration detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 195, p. 113628–113628, 1 jan. 2022.

FONG, I. W. Emerging and Difficult to Treat Nontuberculous Mycobacteria Infections. **Current Trends and Concerns in Infectious Diseases**, p. 289–317, 2020.

FONSECA, I.; PROENÇA, L.; CAPELO, S. A voltametria cíclica e de varrimento linear unidirecional: suas potencialidades na caracterização de processos de corrosão. **Corros. Prot. Mater**, v. 34, p. 1, 2015.

FORTUNATI, S. et al. Novel amperometric genosensor based on peptide nucleic acid (PNA) probes immobilized on carbon nanotubes-screen printed electrodes for the determination of trace levels of non-amplified DNA in genetically modified (GM) soy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 129, p. 7–14, mar. 2019.

FOX W; GA, E.; DA, M. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications. **PubMed**, v. 3, n. 10 Suppl 2, p. S231-79, 1 out. 1999.

FUH, D. Self-Assembled Surface Layer Proteins from *Corynebacterium glutamicum* as a Matrix for Cutinase Immobilization, 2014. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://projekter.aau.dk/projekter/files/198671519/Self_assembled_surface_layer_proteins_from_Corynebacterium_glutamicum_as_a_matrix_for_cutinase_immobilization.pdf> Acesso em: 2 jan. 2024.

FRITH, J. History of tuberculosis. Part 1 - phthisis, consumption and the white plague. **Journal of Military and Veterans' Health**, v. 22, n. 2, p. 29–35, 1 jun. 2014.

GUILLÉN, M. D.; CABO, N. Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 75, n. 1, p. 1–11, set. 1997.

GOIG, Galo. A. et al. Towards next-generation diagnostics for tuberculosis: identification of novel molecular targets by large-scale comparative genomics. **Bioinformatics**, 3 out. 2019.

GOMES, N. et al. Bacterial cellulose-based electrochemical sensing platform: A smart material for miniaturized biosensors. **Electrochimica Acta** v. 349, p. 136341–136341, 20 jul. 2020.

GUALANO, G. et al. Tuberculin skin test – Outdated or still useful for Latent TB infection screening? **International Journal of Infectious Diseases**, v. 80, p. S20–S22, mar. 2019.

GUO, Z. et al. Graphene oxide-Ag/poly-L-lysine modified glassy carbon electrode as an electrochemical sensor for the determination of dopamine in the presence of ascorbic acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 759, p. 113–121, 1 dez. 2015.

GUPTA, U. et al. Recent advances in enzymatic biosensors for point-of-care detection of biomolecules. **Biotechnology and Bioengineering**, 17 out. 2022.

HOLLER, J et al. **Princípios de análise instrumental**. [s.l.] Porto Alegre Bookman, 2009.

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

HOU, L. et al. Graphene oxide-labeled sandwich-type impedimetric immunoassay with sensitive enhancement based on enzymatic 4-chloro-1-naphthol oxidation. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 47, p. 149–156, 1 set. 2013.

KANABALAN, R. D. et al. Human tuberculosis and Mycobacterium tuberculosis complex: A review on genetic diversity, pathogenesis and omics approaches in host biomarkers discovery. **Microbiological Research**, v. 246, p. 126674, maio 2021.

KAROU, R.; DOWNEY, G.; BLECKER, C. Mid-Infrared Spectroscopy Coupled with Chemometrics: A Tool for the Analysis of Intact Food Systems and the Exploration of Their Molecular Structure–Quality Relationships – A Review. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 10, p. 6144–6168, 30 ago. 2010.

KOKKINOS, C.; ECONOMOU, A.; PRODRMIDIS, M. I. Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 88–105, maio 2016.

KYLILIS, N. et al. Whole-Cell Biosensor with Tunable Limit of Detection Enables Low-Cost Agglutination Assays for Medical Diagnostic Applications. **ACS Sensors**, v. 4, n. 2, p. 370–378, 9 jan. 2019.

LEITNER, A. et al. Chemical cross-linking/mass spectrometry targeting acidic residues in proteins and protein complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 26, p. 9455–9460, 17 jun. 2014.

LEVA-BUENO, J.; PEYMAN, S. A.; MILLNER, P. A. A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 209, n. 3, p. 343–362, 3 abr. 2020.

LIEBANA, S.; DRAGO, G. A. Bioconjugation and stabilization of biomolecules in biosensors. **Essays In Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 59–68, 30 jun. 2016.

LIGAJ, M. 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, 15 jul. 2006.

LIN, Y. et al. Electrochemical sensing of bisphenol A based on polyglutamic acid/amino-functionalised carbon nanotubes nanocomposite. **Electrochimica Acta**, v. 133, p. 492–500, 1 jul. 2014.

LIM, B.; KIM, Y.-P. Enzymatic Glucose Biosensors Based on Nanomaterials. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, p. 203–219, 1 jan. 2013.

LIM, S. A.; AHMED, M. U. CHAPTER 1. Introduction to Immunosensors. **Immunosensors**, p. 1–20, 2019.

LIMA, C.V. **Eletrodos de pasta de carbono modificados com Mn-porfirina ou Mn-porfirina imobilizada em argilominerais: Caracterização eletroquímica e eletrocatalise de redução do peróxido de hidrogênio**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

LIU, A.-L. et al. A sandwich-type DNA electrochemical biosensor for hairpin-stem-loop structure based on multistep temperature-controlling method. **International Journal of Nanomedicine**, p. 4953, set. 2012.

LIU, X. et al. Poly-glutamic acid modified carbon nanotube-doped carbon paste electrode for sensitive detection of L-tryptophan. **Bioelectrochemistry**, v. 82, n. 1, p. 38–45, ago. 2011.

LOBSIGER, N.; STARK, W. J. Strategies of Immobilizing Cells in Whole-cell Microbial Biosensor Devices Targeted for Analytical Field Applications. **Analytical Sciences**, v. 35, n. 8, p. 839–847, 10 ago. 2019.

LYON, S. M.; ROSSMAN, M. D. **Pulmonary Tuberculosis**. Microbiology Spectrum, v. 5, n. 1, 1 fev. 2017.

MA, H. et al. Electrochemiluminescent immunosensing of prostate-specific antigen based on silver nanoparticles-doped Pb (II) metal-organic framework. **Biosensors and Bioelectronics** v. 79, p. 379–385, 15 maio. 2016.

MALHOTRA, B. D.; ALI, M. A. **Nanomaterials for biosensors : fundamentals and applications**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2018.

MARTINKOVA, P. Main streams in the Construction of Biosensors and Their Applications. **International Journal of Electrochemical Science**, p. 7386–7403, ago. 2017.

MAZUREK, G. H. et al. Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection - United States, 2010. MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. **Recommendations and reports**, v. 59, n. RR-5, p. 1–25, 25 jun. 2010.

MINCU, Nicolae.-Bogdan. et al. Screen-Printed Electrodes (SPE) for In Vitro Diagnostic Purpose. **Diagnostics**, v. 10, n. 8, p. 517, 26 jul. 2020.

MOLLARASOULI, F.; KURBANOGU, S.; OZKAN, S, A. The Role of Electrochemical Immunosensors in Clinical Analysis. **Biosensors**, v. 9, n. 3, p. 86, 9 jul. 2019.

NATARAJAN, A. et al. A systemic review on tuberculosis. **The Indian Journal of Tuberculosis**, v. 67, n. 3, p. 295–311, 1 jul. 2020.

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

NEWMAN, J. D.; SETFORD, S. J. Enzymatic Biosensors. **Molecular Biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 249–268, 2006.

NGUYEN, H. H. et al. Immobilized Enzymes in Biosensor Applications. **Materials**, v. 12, n. 1, p. 121, 2 jan. 2019.

OMS. **Organização Mundial da Saúde**. Relatório Global da Tuberculose 2023. Genebra, 2023.

OZER, Tugba.; GEISS, B. J.; HENRY, C. S. Review—Chemical and Biological Sensors for Viral Detection. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 167, n. 3, p. 037523, 2 jan. 2020.

PACHECO, W. et al. Voltamétrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos Voltammetry: A Brief Review About Concepts. **Rev. Virtual Quim**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PAI, M. et al. Gamma Interferon Release Assays for Detection of Mycobacterium tuberculosis Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 3–20, 1 jan. 2014.

PAI, M.; NICOL, M. P.; BOEHME, C. C. Tuberculosis Diagnostics: State of the Art and Future Directions. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 5, 13 out. 2016.

PÄNKE, O.; KIRBS, A.; LISDAT, F. Voltammetric detection of single base-pair mismatches and quantification of label-free target ssDNA using a competitive binding assay. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 11, p. 2656–2662, 15 maio 2007.

PAVIA, D. L et al. Introdução a Espectroscopia. 4ª edição. CENGAGE Learning, 2010.

PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 1 jan. 2014.

PUTZBACH, W.; RONKAINEN, N. Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. **Sensors**, v. 13, n. 4, p. 4811–4840, 11 abr. 2013.

RADI, Abd.El Gawad.; ABD-ELLATIEF, M. R. Electrochemical Aptasensors: Current Status and Future Perspectives. **Diagnostics**, v. 11, n. 1, p. 104, 11 jan. 2021.

RANDVIIR, E. P.; BANKS, C. E. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. **Analytical Methods**, v. 5, n. 5, p. 1098, 2013.

RASHID, J. I. Abdul.; YUSOF, N. A. The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 16, p. 19–31, nov. 2017.

RAWAL, R.; CHAWLA, S.; PUNDIR, C. S. An electrochemical sulfite biosensor based on gold coated magnetic nanoparticles modified gold electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 31, n. 1, p. 144–150, jan. 2012.

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

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

RUGGIERO, A. P. et al. Tuberculose bovina: Alternativas para o diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, p. 55–65, 10 jan. 2022.

RUSHWORTH, J. V. et al. **Impedimetric biosensors for medical applications : current progress and challenges**. New York, NY: ASME Press : Momentum Press, 2013.

RUSHWORTH, J. V. et al. A label-free electrical impedimetric biosensor for the specific detection of Alzheimer's amyloid-beta oligomers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 56, p. 83–90, jun. 2014.

SAAD, M.; FAUCHER, S. P. Aptamers and Aptamer-Coupled Biosensors to Detect Water-Borne Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 19 fev. 2021.

SANDHYARANI, N. Surface modification methods for electrochemical biosensors. **Electrochemical Biosensors**, p. 45–75, 2019.

SANYAOLU, A. Tuberculosis: A Review of Current Trends. **Epidemiology International Journal**, v. 3, n. 2, 2019.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489–511, maio 2012.

SHARMA, S. K.; MOHAN, A. Tuberculosis: From an incurable scourge to a curable disease - journey over a millennium. **PubMed**, v. 137, n. 3, p. 455–93, 1 mar. 2013.

SHUKLA, S. K.; GOVENDER, P. P.; TIWARI, A. Polymeric Micellar Structures for Biosensor Technology. **Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly**, p. 143–161, 2016.

SIA, J. K.; RENGARAJAN, J. Immunology of mycobacterium tuberculosis infections. **Gram-Positive Pathogens**, Third Edition, v. 7, n. 4, p. 1056–1086, 1 jan. 2019.

SINGH, A. et al. Recent Advances in Electrochemical Biosensors: Applications, Challenges, and Future Scope. **Biosensors**, v. 11, n. 9, p. 336, 14 set. 2021.

SIQUEIRA, R. C.; ORÉFICE, F. The potential of the IGRA (Interferon Gamma Release Assay) test for the diagnosis of ocular tuberculosis . Review and comparative analysis with the tuberculosis skin test. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 78, n. 3, 2019.

SMITH, Soshana. et al. A Comprehensive Review of the Covalent Immobilization of Biomolecules onto Electrospun Nanofibers. **Nanomaterials**, v. 10, n. 11, p. 2142, 27 out. 2020.

SNEHA, H.P; BEULAH, K. C.; MURTHY, P. S. Enzyme Immobilization Methods and Applications in the Food Industry. **Elsevier eBooks**, p. 645–658, 1 jan. 2019.

SUBRAMANIAN, A.; RODRIGUEZ-SAONA, L. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. Infrared **Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control**, p. 145–178, 2009.

TENG, J. et al. Aptamer-Based Technologies in Foodborne Pathogen Detection. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 12 set. 2016.

THEVENOT, D. R. et al. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 12, p. 2333–2348, 1 jan. 1999.

VAN DE VOORT, F. R. Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Research International*, v. 25, n. 5, p. 397–403, jan. 1992.

VILLALONGA, A.; PÉREZ-CALABUIG, A. M.; VILLALONGA, R. Electrochemical biosensors based on nucleic acid aptamers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, n. 1, p. 55–72, jan. 2020.

WEBER, C.; REISS, S.; LANGER, K. Preparation of surface modified protein nanoparticles by introduction of sulfhydryl groups. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 211, n. 1-2, p. 67–78, 1 dez. 2000.

WINN, W. C.; KONEMAN, E. W. **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

YAMAMURA, M. et al. Epidemiological characteristics of cases of death from tuberculosis and vulnerable territories. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 23, n. 5, p. 910–918, out. 2015.

YE, Q. et al. Screen-printed electrode-based biosensors modified with functional nucleic acid probes and their applications in this pandemic age: a review. **Analytical Methods**, v. 14, n. 31, p. 2961–2975, 1 jan. 2022.

YOON, H.; KO, S.; JANG, J. Field-Effect-Transistor Sensor Based on Enzyme-Functionalized Polypyrrole Nanotubes for Glucose Detection. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 32, p. 9992–9997, 23 jul. 2008.

ZHANG, J. et al. Nanomaterial-based electrochemical enzymatic biosensors for recognizing phenolic compounds in aqueous effluents. **Environmental Research**, v. 214, p. 113858, nov. 2022.

ZHANG, Y. et al. A highly sensitive method for determination of paracetamol by adsorptive stripping voltammetry using a carbon paste electrode modified with nanogold and glutamic acid. **Microchimica Acta**, v. 171, n. 1-2, p. 133–138, 29 jul. 2010.