

RAFAEL DA FONSECA ALVES

MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ELETRODOS DE BAIXO CUSTO COM MATERIAL DERIVADO DE ÁCIDO 3-AMINO-4-HIDROXIBENZÓICO VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE GENOSENSOR APLICADO AO DIAGNÓSTICO DO ZIKA VÍRUS

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Del Pilar Taboada Sotomayor

**Araraquara-SP
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

Alves, Rafael da Fonseca

A474m Modificação e caracterização de eletrodos de baixo custo com material derivado de ácido 3-amino-4- hidroxibenzóico visando o desenvolvimento de genossensor aplicado ao diagnóstico do Zika vírus / Rafael da Fonseca Alves. – Araraquara : [s.n.], 2019
107 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química

Orientador: Maria del Pilar Taboada Sotomayor

1. Eletroquímica. 2. Diagnostico virológico.
3. Biossensores. 4. Vírus. 5. Polímeros. I. Título.

ALVES, R.F. Modificação e caracterização de eletrodos de baixo custo com material derivado de ácido 3-amino-4-hidroxibenzóico visando o desenvolvimento de genossensor aplicado ao diagnóstico do Zika vírus. 2019. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, UNESP, Araraquara.

Página	Linha	Onde se lê	Leia-se
10	31-34	Ao Instituto de Química (IQ - UNESP- ARARAQUARA) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão das bolsas durante o período de realização deste Mestrado - Processo nº 2017/ 07436-0 e BEPE - Processo nº 2018/09596-7.	Ao Instituto de Química (IQ - UNESP- ARARAQUARA), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão das bolsas durante o período de realização deste Mestrado - Processo nº 2017/ 07436-0 e BEPE - Processo nº 2018/09596-7 e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

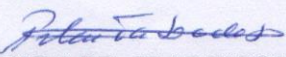
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

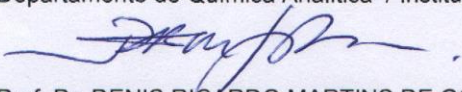
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Modificação e caracterização de eletrodos de baixo custo com material derivado de ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico visando o desenvolvimento de genossensor aplicado ao diagnóstico do Zika vírus"

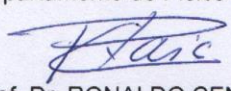
AUTOR: RAFAEL DA FONSECA ALVES

ORIENTADORA: MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:


Profª. Drª. MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. DENIS RICARDO MARTINS DE GODOI
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. RONALDO CENSI FARIA
Departamento de Química / Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR - São Carlos

Araraquara, 27 de fevereiro de 2019

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Rafael da Fonseca Alves

Nascimento: 15/10/1995

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: Patos de Minas/MG - Brasil

Estado Civil: Solteiro

Filiação: Valmir Alves Soares e Gláucia Gomes da Fonseca Alves

E-mail: ra_fa_el_fonseca@hotmail.com

Endereço: Rua Prof. Francisco Degni, 55 Bairro: Quitandinha. CEP: 14800-060
Araraquara/SP.

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Mestrado em Biotecnologia

UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara/SP.

Período: 03/2016 – 02/2019

Título da dissertação: Modificação e caracterização de eletrodos de baixo custo com material derivado de ácido 3-amino-4-hidroxibenzóico visando o desenvolvimento de genossensor aplicado ao diagnóstico do Zika vírus.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria del Pilar Taboada Sotomayor

Bolsa: FAPESP Proc. nº 2017/ 07436-0

Mestrado Sanduíche

Universitat Autònoma de Barcelona - UAB. Barcelona, Espanha.

Período: 01/09/2018 – 31/01/2019

Título: “Molecularly Imprinted Biotin Polymer for Isolation and Detection of Zika-Specific Oligonucleotides Biotinylated Viruses with Lateral Flow and Electrochemical System.”

Supervisora no exterior: Prof.^a Dr.^a María Isabel Pividori

Bolsa: BEPE (FAPESP - Proc. nº 2018/ 09596-7)

Graduação em Biotecnologia

UFU - Universidade Federal de Uberlândia, Campus - Patos de Minas, Patos de Minas/MG

Período: 2013-1 / 2016-2

Título do trabalho de conclusão de curso: Estudo das propriedades elétricas e morfológicas de camadas automontadas e materiais derivados de ácido 4-mercaptobenzóico para o desenvolvimento de genossensores.

Orientador: Diego Leoni Franco.

3. PUBLICAÇÕES

ALVES, R.F., SILVA, A.G., FERREIRA, L.F., FRANCO, D.L. Synthesis and characterization of a material derived from 4-mercaptobenzoic acid: A novel platform for oligonucleotide immobilization. **Talanta**, v 165, 69–75, 2017. (JCR 4,162)

SOARES, I.P.; DA SILVA, A.G.; ALVES, R.F.; CORRÊA, R.A.M.S.; FERREIRA, L.F.; FRANCO, D.L. Electrochemical enzymatic biosensor for tyramine based on polymeric matrix derived from 4-mercaptophenylacetic acid. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 23, p. 985-995, 2019. (JCR 2,316)

ALVES, R.F., FRANCO, D.L., CORDEIRO, M.T., MARQUES, E.O.J., DUTRA, R.A.F., and SOTOMAYOR, M.P.T. Novel electrochemical genosensor for Zika virus based on a poly-(3-amino-4-hydroxybenzoic acid)-modified pencil carbon graphite Electrode. Artigo em etapa de resposta aos revisores para re-submissão até abril de 2019 (SNB-D-19-00456)

3.1 Participação em eventos científicos:

ALVES, R. F.; FRANCO, D. L.; DUTRA, R. A. F. ; Sotomayor, M.D.P.T. . Detección electroquímica del virus del Zika basada en un electrodomodificado de grafito carbono con un nuevo poli-(ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico). In: Congreso Iberoamericano de Química y XXIX Congreso Peruano de Química: La química Peruana rumbo al Bicentenario, 2018, Lima. CD de resúmenes, 2018. p. QPV-038.

ALVES, R. F.; FRANCO, D. L. ; TABOADA-SOTOMAYOR, M.D.P.; DUTRA, R. A. F. Nova plataforma para o desenvolvimento de genossensor para zika vírus baseado em eletrodos de baixo custo modificados com poli(3-amino-4-hidroxibenzóico). In: I Simpósio de Biotecnologia Avanços e Perspectivas, 2018, Patos de Minas - MG.

SILVA, A. G.; ALVES, R. F.; SOARES I.P.; FRANCO, D. L. Otimização de técnicas eletroquímicas utilizando eletrodos de baixo custo para detecção de tiramina. In: XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - XXI SIBEE, 2017, Natal - RN.

ALVES, R. F.; SILVA, A. G.; SOARES I.P.; FRANCO, D. L. Uma nova plataforma para imobilização de oligonucleotídeos baseado em eletrodos modificados com ácido 4-mercaptobenzóico. In: XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - XXI SIBEE, 2017, Natal - RN.

ALVES, R. F.; SOARES I.P.; FRANCO, D. L.; DUTRA, R. A. F.; TABOADA-SOTOMAYOR, M. P. Caracterização espectroscópica de um novo material polimérico derivado de ácido 3-amino- 4-hidroxibenzóico. In: VII Congresso Científico da UNESP e III Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2017, Araraquara – SP.

SOARES I.P. ; ALVES, R. F. ; SILVA, A. G. ; FRANCO, D. L. . Modificação de eletrodos de carbono grafite de baixo custo com ácido 4-hidroxibenzóico para desenvolvimento de biossensor. In: VI Congresso Científico da UNESP e II Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2017, Araraquara - SP.

SILVA, A. G.; ALVES, R. F.; FRANCO, D. L. Estudo das propriedades elétricas de eletrodos de carbono grafite com derivados do monômero Ácido 4-mercaptobenilacético. In: XXI Jornada em Engenharia Química, 2016, Uberlândia - MG.

ALVES, R. F.; SILVA, A. G.; FRANCO, D. L. . Caracterização espectroscópica de um novo material polimérico derivado de ácido 4-mercaptobenzóico. In: 2º Simpósio de Tecnologia e Ciência - SimTeCi, 2016, Patos de Minas - MG.

SILVA, A. G.; ALVES, R. F.; FRANCO, D. L. Utilização de eletrodo de trabalho de carbono grafite de baixo custo para modificação: Estudo comparativo. In: 2º Simpósio de Tecnologia e Ciência - SimTeCi, 2016, Patos de Minas - MG.

ALVES, R. F.; FRANCO, D. L.. Modificação de eletrodos de ouro e de grafite com ácido 4-mercaptobenzóico para construção de genossensores. In: VI ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UFU, 2016, Uberlândia – MG

SILVA, A. G. ; ALVES, R. F. ; FRANCO, D. L. . Estudo da caracterização de derivados do ácido 4-mercaptobenilacético em eletrodos de minas de grafite. In: XXX ERSBQ - Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2016, Uberlândia-MG.

ALVES, R. F.; SILVA, A. G. ; FRANCO, D. L. . Estudo da detecção eletroquímica de oligonucleotídeos baseado em sistemascontendo ácido 4-mercaptobenzóico. In: XXX Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2016, Uberlândia - MG.

ALVES, R. F.; SILVA, A. G.; FRANCO, D. L. Effect of pH on carbon graphite electrodes with derivatives of acid 4-mercaptobenzoic. In: 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz do Iguaçu - Paraná.

ALVES, R. F.; SILVA, A. G.; FRANCO, D. L. Imobilização e detecção de oligonucleotídeos sobre superfícies de eletrodos de ouro modificadas com Ácido 4-Mercaptobenzóico. In: XXIX Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG, 2015, Belo Horizonte - MG.

ALVES, R. F.; FRANCO, D. L. Modificação eletroquímica e estudos morfológicos de derivado de Ácido 4-Mercaptobenzóico sobre eletrodos de carbono grafite. In: V Encontro de Iniciação Científica e Tecnológica da UFU, 2015, Uberlândia - MG.

ALVES, R. F.; SOUZA, A.C.; FRANCO, D. L. Study of an eletrochemical modification of 4-Mercaptobenzoic Acid Self-Assembled monolayer on Au electrodes. In: XIII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, 2014, João Pessoa-PB.

SOUZA, A.C.; ALVES, R. F.; VIEIRA, S. N.; FRANCO, D. L. Eletropolimerização e caracterização de eletrodos de carbono grafite com derivado de ácido fólico. In: XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Poços de Caldas-MG.

ALVES, R. F.; SOUZA, A.C.; VIEIRA, S. N.; FRANCO, D. L. Caracterização eletroquímica da modificação de eletrodos de ouro com ácido 4-mercaptobenzóico. In: 1º Simpósio de Tecnologia e Ciência, 2014, Patos de Minas - MG.

SOUZA, A.C.; ALVES, R. F.; VIEIRA, S. N.; FRANCO, D. L. Análise de reações redox da modificação de eletrodos de carbono grafite com derivado de ácido fólico. In: 1º Simpósio de Tecnologia e Ciência - UFU, 2014, Patos de Minas-MG.

ALVES, R. F.; SOUZA, A.C.; FRANCO, D. L. Modificação e caracterização eletroquímica e morfológica de derivado de Ácido 4-Mercaptobenzóico sobre eletrodos de carbono grafite. In: XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Poços de Caldas - Minas Gerais.

SOUZA, A.C.; ALVES, R. F.; FRANCO, D. L. Effect of pH in the modification of carbon graphite electrodes with derivatives of folic acid. In: XIII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, 2014, João Pessoa-PB.

4. Outros:

Bolsista de Iniciação científica PIBIC - CNPq/UFU, Carga horária: 20 h

Períodos:

2014 – 2015;

2015 – 2016;

2016 – 2017.

Monitor no curso de graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia - Campus Patos de Minas, das disciplinas:

-Biologia Celular;

-Química Orgânica;

- Bioquímica I;
- Bioquímica II;
- Biotecnologia de Produtos Naturais;
- Biorreatores e Bioprocessos.

Prêmios:

1º lugar na apresentação de trabalhos durante o I Simpósio de Biotecnologia, Comissão organizadora do - I SiBiotec. 2018.

2º melhor trabalho do eixo de Biotecnologia no 2º Simpósio de Tecnologia e Ciência, Universidade Federal de Uberlândia - UFU. 2016.

Prêmio de destaque da apresentação de trabalhos do Eixo de Engenharia de Alimentos no 2º Simpósio de Tecnologia e Ciência, Universidade Federal de Uberlândia - UFU. 2016.

Melhor trabalho da área de Eletroquímica e Eletroanalítica na sessão de pôsteres do XXX Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Universidade Federal de Uberlândia - UFU. 2016.

Menção honorífica pela apresentação de trabalho no eixo de Biotecnologia no 1º Simpósio de Tecnologia e Ciência, Universidade Federal de Uberlândia - UFU. 2014.

*Dedico este trabalho a Deus
pelo dom da vida, a Minha
Mãe Gláucia e ao meu
irmão Douglas por todos os
sacrifícios e apoio sempre.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por todas as graças recebidas, dando-me força nos momentos difíceis, coragem e sabedoria.

À minha mãe, Gláucia, e ao meu irmão Douglas, sou infinitamente grato por todo sacrifício, apoio e cuidado que têm comigo. Vocês são minha força e fonte de inspiração. Amo vocês.

À minha avó Maria (*in memoriam*) e avô João, por todos os ensinamentos, sábios conselhos e carinho que sempre tiveram por mim.

À minha família, pelo apoio e por entender os momentos que eu não pude estar com vocês.

Ao Paulo, mais que amigo, sempre me apoiando em minhas escolhas. Obrigado pelo seu amor e carinho. Te amo. Obrigado também, a sua família por todo apoio e acolhimento.

Às minhas amigas, Bruna e Raíssa, que apesar da distância física, sempre estão presentes, prontas para ouvir, me fazer sorrir e ajudar nos dias difíceis.

À Prof.^a Dr.^a Maria del Pilar Taboada Sotomayor, pela orientação, por todas as oportunidades concedidas e pelos ensinamentos essenciais ao desenvolvimento deste trabalho e construção da minha carreira.

Ao Prof Dr. Diego Leoni, meu grande tutor, obrigado por todas oportunidades, dedicação e ensinamentos, profissionais e pessoais, que levarei comigo por toda a minha vida.

A Dr.^a Carolina Venturini Uliana e o Prof. Dr. Denis Ricardo Martins de Godoi pela avaliação e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho no Exame Geral de Qualificação.

À Prof.^a Dr.^a María Isabel Pivadori pela supervisão durante o mestrado sanduíche na Universitat Autònoma de Barcelona, Espanha. E a todos os membros do grupo, pelo acolhimento, paciência e momentos divertidos.

Aos meus amigos, Lucas Silva, Suelen Fernandes, Alysson Martins, Bárbara Camila e Fernanda Rodrigues. Obrigado pela amizade construída, por todos os momentos de descontração, pelo suporte, e por toda a parceria. A todos os colegas do GEAR pelas discussões científicas e momentos de descontração durante os cafés.

Ao Instituto de Química (IQ - UNESP- ARARAQUARA) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão das bolsas durante o período de realização deste Mestrado - Processo nº 2017/ 07436-0 e BEPE - Processo nº 2018/09596-7.

“A persistência é o caminho do êxito.”

(Charles Chaplin)

“Viver é um rasgar-se e remendar-se.”

(Guimarães Rosa)

RESUMO

O vírus Zika é um agente causador de doenças infecciosas que se espalha nos seres humanos através dos vetores do vírus, os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. A transmissão durante a gravidez leva à microcefalia em recém-nascidos e também outros defeitos de nascimento. Os esforços para monitorar e controlar a infecção pelo Zika vírus globalmente são muito limitados. No contexto do desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico, a construção de sensores biológicos tem se tornado uma atividade ampla no ramo da ciência. Neste sentido eletrodos modificados com polímeros condutores e não condutores são opções viáveis, pois além de auxiliar na imobilização das biomoléculas podem melhorar a resposta analítica. Assim, realizou-se, o estudo das propriedades elétricas e morfológicas de um novo material derivado do monômero ácido 3-amino-4-hidroxibenzóico (AAHB) sobre a superfície de eletrodos de grafite de lapiseira para construção de um biossensor contendo uma sequência de oligonucleotídeo específica do Zika vírus. Foi formado um material eletroquimicamente ativo na superfície dos eletrodos de grafite de lapiseira. Analisou-se diferentes condições de eletropolimerização e comportamentos físico-químicos do monômero e foi proposto um mecanismo de formação do polímero. Vários parâmetros foram investigados para otimizar a resposta do genossensor ao substrato utilizando a voltametria de onda quadrada (VOQ). Dentre essas investigações, as melhores respostas foram obtidas, e o sensor mostrou uma faixa linear de trabalho para a sequência sintética de 14×10^{-6} a $66 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($r^2 = 0,996$), sendo a equação obtida da regressão linear: $\Delta ip (\mu A) = 43,34 + 1,38x[cDNA] (\mu\text{mol L}^{-1})$ com limite de detecção de $2,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e o limite de quantificação de $7,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. A faixa linear de trabalho obtida em amostras de soro humano enriquecidas com material genético extraído do Zika vírus foi entre $84,0 \text{ pmol L}^{-1}$ a $1410,0 \text{ pmol L}^{-1}$ ($r^2 = 0,997$). A equação obtida da regressão linear foi: $\Delta ip (\mu A) = (-7.14) + 0,195x [cDNA] (\text{pmol L}^{-1})$ sendo o limite de detecção $25,4 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$ e o limite de quantificação de $84,0 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$. Os eletrodos foram armazenados a -8°C por 30 dias e não foi observada uma perda de resposta significativa do material. Adicionalmente, o sistema se mostrou seletivo na presença de um alvo não-complementar e em amostras de soro humano enriquecidas com material genético extraído do Dengue vírus tipo 2 (DENV-2) e tipo 3 (DENV-3). Assim, o sistema mostra-se promissor no desenvolvimento de genossensor para diagnóstico do Zika vírus, com a utilização do poli(AAHB) como suporte para imobilização de biomoléculas em eletrodos de grafite de lapiseira, que foram escolhidos pela eficiência e baixo custo. Uma segunda alternativa avaliada foi o uso de polímeros molecularmente impressos (MIP) e seus controles não impressos (NIP) para biotina. Neste caso, utilizando DNA-biotinilado das sequências sintéticas do genoma do vírus Zika em imunoenaios de ELISA, nos que se avaliou a capacidade de reconhecimento do material, para posteriormente aplicar estes polímeros em ensaios de Fluxo Lateral, os quais apresentaram boa resposta no reconhecimento seletivo. Mostrando que este sistema é uma alternativa promissora para a rápida detecção do Zika vírus.

Palavras chave: Biossensores. Ácido 3-amino-4-hidroxibenzóico. Eletrodos modificados. Zika vírus.

ABSTRACT

The Zika virus is a causative agent of infectious diseases that spreads in humans through the virus vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. Transmission during pregnancy leads to microcephaly in newborns and also other birth defects. Efforts to monitor and control Zika virus infection globally are very limited. In the context of the development of new diagnostic methodologies, the construction of biological sensors has become a broad activity in the field of science. In this sense, electrodes modified with conductive and non-conductive polymers are viable options, since besides aiding in the immobilization of the biomolecules they can improve the analytical response. Thus, the study of the electrical and morphological properties of a new material derived from the 3-amino-4-hydroxybenzoic acid monomer (AHBA) on the surface of graphite electrodes was carried out to construct a biosensor containing an oligonucleotide sequence specific Zika virus. An electrochemically active material was formed on the surface of the graphite electrodes. It was analyzed the sedimentation conditions of electropolymerization and physicochemical behavior of the monomer and a mechanism of formation of the polymer was proposed. Several parameters were investigated to optimize the response of the genosensor to the substrate using square wave voltammetry (SWV). Among these investigations, the best responses were obtained, and the sensor showed a linear working range for the synthetic sequence of 14×10^{-6} to $66 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($r^2 = 0.996$), and the equation was obtained from the linear regression : $\Delta i_p (\mu\text{A}) = 43.34 + 1.38x [\text{cDNA}] (\mu\text{mol L}^{-1})$ with detection limit of $2.3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ and the quantification limit of $7.6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectively. The linear range of work obtained on human serum samples enriched with genetic material extracted from the Zika virus was between 84.0 pmol L^{-1} and $1410.0 \text{ pmol L}^{-1}$ ($r^2 = 0.997$). The equation obtained from the linear regression was: $\Delta i_p (\mu\text{A}) = (-7.14) + 0.195x [\text{cDNA}] (\text{pmol L}^{-1})$, the detection limit being $25.4 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$ and the limit of quantification $84.0 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$. The electrodes were stored at -8°C for 30 days and no significant loss of response of the material was observed. In addition, the system was selective in the presence of a non-complementary target and in human serum samples enriched with genetic material extracted from Dengue virus type 2 (DENV-2) and type 3 (DENV-3). Thus, the system is promising in the development of a genosensor for the diagnosis of the Zika virus, with the use of poly (AHBA) as a support for the immobilization of biomolecules in pencil graphite electrodes, which were chosen for efficiency and low cost. A second alternative evaluated was the use of molecularly printed polymers (MIP) and its non-printed controls (NIP) for biotin. In this case, using biotinylated DNA from the synthetic sequences of the Zika virus genome in ELISA immunoassays, in which the recognition ability of the material was evaluated, and later applied these polymers in lateral flow assays, which presented good response in selective recognition. Showing that this system is a promising alternative for the rapid detection of the Zika virus.

Key words: Biosensors. 3-Amino-4-hydroxybenzoic acid. Modified electrodes. Zika virus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estados com casos reportados de Zika vírus no Brasil em 2014, 2015 e 2016, sinalizado em preto	27
Figura 2 - Ciclo de infecção pelo vírus da zika: o quadro verde ilustra o ciclo típico da infecção; o quadro azul identifica os efeitos severos que podem estar relacionados às infecções.	28
Figura 3 - Comparação entre perímetro cefálico, normal e em diferentes graus de gravidade e recém-nascidos.....	29
Figura 4 - Estrutura molecular (1) ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico e (2) 2-aminofenol.	35
Figura 5 - Esquema da célula eletroquímica onde os experimentos foram realizados utilizando eletrodos de prata/cloreto de prata, KCl 3,0 mol L ⁻¹ como referência (A), eletrodos modificados e não modificados como trabalho (B) e eletrodo de platina como auxiliar (C). Volume 20 mL.....	37
Figura 6 - Esquema da reação de ativação do grupo carboxilato com EDC/NHS e formação de ligação amida.....	40
Figura 7 – Ilustração das principais etapas de preparo dos eletrodos de grafite.....	41
Figura 8 - Voltamogramas cíclicos obtidos sobre os eletrodos de grafite após limpeza mecânica em solução de cloreto de potássio 0,5 mol L ⁻¹ contendo (A) ferricianeto de potássio 5x10 ⁻³ mol L ⁻¹ e (B) cloreto de hexaaminorutênio II 5x10 ⁻³ mol L ⁻¹ a 100 mV s ⁻¹	43
Figura 9 - Voltamogramas cíclicos obtidos sobre os eletrodos de grafite após limpeza mecânica em solução aquosa de ácido sulfúrico 0,5 mol L ⁻¹ a 50 mV s ⁻¹	44
Figura 10 - Voltamogramas cíclicos obtidos sobre os eletrodos de grafite em solução aquosa 2,5 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ de AAHB contendo ácido sulfúrico 0,5 mol L ⁻¹ , 100 ciclos, 50 mV s ⁻¹ . As setas indicam aumento ou diminuição de corrente no decorrer das varreduras.	45
Figura 11 - Estrutura molecular da (1) 3-aminofenoxazona e (2) unidades de fenoxazina.	47
Figura 12 - Voltamogramas cíclicos obtidos sobre os eletrodos de grafite em solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L ⁻¹ a 50 mV s ⁻¹ . Experimentos realizados (----) após limpeza e (----) após modificação pela aplicação de 100 ciclos de potencial em solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L ⁻¹ contendo 2,5 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ de AAHB a 50 mV s ⁻¹	47
Figura 13 - (A) Voltamogramas cíclicos obtidos do primeiro ciclo de varredura a 50 mV s ⁻¹ da eletropolimerização do de 3-4-AAHB 2,5 mmol L ⁻¹ sobre os eletrodos de grafite em diversas soluções de tampão BR com diferentes pH.(B) Relação entre o potencial de pico versus o pH obtido dos Voltamogramas da Figura (A).....	48
Figura 14 - Absorbância do monômero AAHB 4,0x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ em função do comprimento de onda (----) Branco, (----) pH 0,25 , (----) pH 3,5, (----) pH 7 e (----) pH 12.	50

- Figura 15** - Voltamogramas cíclicos obtidos sobre os eletrodos de grafite após limpeza (-----) e; modificado após aplicação de 100 ciclos de potencial em solução aquosa de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AAHB a 50 mV s^{-1} , em pH de preparo (-----) pH 0,25, e em pH ajustados com NaOH para: (-----) pH 3,5, (-----) pH 7 e (-----) pH 12, em (A) solução aquosa de ferricianeto de potássio $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ contida em cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e (B) solução aquosa de cloreto de hexaaminorutênio II $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ contida em cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ 54
- Figura 16** - Espectros de infravermelho obtidos do (A) monômero e do (B) material extraído, resolução de 4 cm^{-1} , 64 varreduras..... 55
- Figura 17** - Proposta de mecanismo para eletropolimerização do AAHB..... 57
- Figura 18** - Voltamogramas cíclicos obtidos sobre os eletrodos de grafite (-----) após limpeza e (-----) modificados após aplicação de 100 ciclos de potencial em solução aquosa de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AAHB a 50 mV s^{-1} , em: (A) solução aquosa de ferricianeto de potássio $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ contida em cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e (B) solução aquosa de cloreto de hexaaminorutênio II $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ contida em cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ 60
- Figura 19** - Voltamogramas cíclicos obtidos sobre os eletrodos de grafite (-----) após limpeza e (-----) modificados após aplicação de 100 ciclos de potencial em solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AAHB a 50 mV s^{-1} , em solução de cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$: Experimentos realizados na janela de potencial adequada ao (A) ferricianeto e (B) hexaaminorutênio II. 61
- Figura 20** - Voltamogramas cíclicos obtidos sobre os eletrodos de grafite: (-----) Após limpeza e (-----) modificados com o material derivado de AAHB em: solução de cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo: (A) ferricianeto de potássio a $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) cloreto de hexaaminorutênio II a $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; e (-----) Em solução de eletrólito suporte de cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Medidas realizadas a 100 mV s^{-1} , nas respectivas janelas de potencial para cada sonda redox. 62
- Figura 21** - Voltamogramas cíclicos obtidos sobre os eletrodos de grafite (-----) após limpeza; (-----) modificado após aplicação de 10 ciclos; (-----) 25 ciclos; (-----) 50 ciclos; (-----) 100 ciclos e (-----) 150 ciclos de varredura de potencial em solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AAHB em solução ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 63
- Figura 22** - Micrografias eletrônicas de varredura de eletrodos de grafite de lapiseira com ampliação de 60.000 vezes: (A) eletrodo limpo e (B) modificado com 10 ciclos, (C) 25 ciclos, (D) 50 ciclos, (E) 100 ciclos e (F) 150 ciclos..... 64
- Figura 23** - Micrografias eletrônicas de varredura de eletrodos de grafite com diferentes ampliações: (A) eletrodo limpo e (B) modificado com 100 ciclos em ampliação de 50.000 e (C) eletrodo limpo e (D) modificado com 100 ciclos em ampliação de 100.000 vezes. 66

- Figura 24** – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos sobre os eletrodos de grafite (-----) em solução aquosa de cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, (-----) eletrodo limpo e (-----) eletrodo modificado com 10 ciclos de varreduras de potencial os dois últimos em solução de cloreto de potássio $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ contendo ferricianeto a $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Experimentos realizados usando os seguintes parâmetros voltamétricos: $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = -50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. (B) Corrente versus tempo de armazenagem para o eletrodo modificado (•) e o eletrodo limpo (◦). 68
- Figura 25** – Voltamogramas de onda quadrada obtidos sobre os eletrodos de grafite em solução de cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo ferricianeto de potássio $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, variando em (A) o incremento de potencial (ΔE_s), em (B) a amplitude de pulso e em (C) a frequências. 69
- Figura 26** – Diferença de corrente de pico entre eletrodo de grafite modificado com poli(AAHB) em solução de cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de ferricianeto de potássio $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, e após a variação dos seguintes parâmetros: (A) variação da concentração e (B) tempo de ativação em EDC/NHS e (C) tempo de imobilização da sequência de ssDNA aminada. 70
- Figura 27** – (A) VOQ em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo ferricianeto de potássio a $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para o PG/PAAHB-ssDNA (-----) e para o PG/PAAHB-dsDNA (-----). Medidas realizadas a $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = -50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. (B) Diagramas de Nyquist obtidos para (a) PG/PAAHB, (b) PG/PAAHB + ativação em EDC/NHS e (c) PG/PAAHB-ssDNA em solução aquosa de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo ferricianeto de potássio $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 71
- Figura 28** - Curva de analítica para alvo complementar cDNA de oligonucleotídeo específico do Zika vírus, a diferentes concentrações, sob as condições previamente otimizadas. 73
- Figura 29** – Voltamogramas de onda quadrada obtidos em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo ferricianeto de potássio a $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para (----) PG/PAAHB-ssDNA (----) PG/PAAHB-dsDNA e (----) PG/PAAHB-não complementar. Medidas realizadas em $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = -50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ 74
- Figura 30** – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo ferricianeto de potássio $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para PG/PAAHB-ssDNA (-----) e PG/PAAHB-RNAzika 84 pmol L^{-1} (-----), 171 pmol L^{-1} (-----), 342 pmol L^{-1} (-----), 691 pmol L^{-1} (-----), 141 pmol L^{-1} (-----), 2810 pmol L^{-1} (-----), 5620 pmol L^{-1} (-----). Medidas realizadas em $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = -50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. (B) curva analítica em soro humano enriquecido com (•) RNA-alvo complementar Zika vírus total, (◻) RNA total do vírus da Dengue tipo 2 e (▲) RNA total do vírus da Dengue tipo 3 em diferentes concentrações. Inserção: Ampliação na faixa de concentração menor. 75
- Figura 31** – Diferentes abordagens e formatos de teste ELISA 80
- Figura 32** - (a) Componentes da tira de fluxo lateral e (b) visão geral de uma tira de fluxo lateral montada e contendo a linha de teste. 81

- Figura 33** – Esquema do magneto ELISA e da reação do H_2O_2 catalisada pela enzima HRP utilizando o TMB como um doador de hidrogênio, seguido pela protonação do grupo amino com a adição do H_2SO_4 85
- Figura 34** - Fita de ensaio Lateral Flow contendo linha do MIP já depositado. 87
- Figura 35** - Ensaio de tempo de ligação do oligonucleotídeo biotinilado com sua fita complementar marcada com digoxigenina nos polímeros magnéticos (5 mg mL^{-1} de MMIP e MNIP) por magneto-ELISA; no intervalo de tempo de 5 a 90 minutos e 1,5 ng de antiDIG-HRP. Barras de erro ilustram o desvio padrão para as medidas (n=3)..... 88
- Figura 36** - Ensaio de concentração do oligonucleotídeo biotinilado para ligação no material, com sua fita complementar marcado com digoxigenina nos polímeros magnéticos (5 mg mL^{-1} de MMIP e MNIP) por magneto-ELISA; no intervalo de concentração de 50 à 300 ng mL^{-1} e 1,5 ng de antiDIG-HRP. Barras de erro ilustram o desvio padrão para as medidas (n=3)..... 89
- Figura 37** - Ensaio de oligonucleotídeo biotinilado com a variação da concentração da sua fita complementar marcado com digoxigenina nos polímeros magnéticos (5 mg mL^{-1} de MMIP e MNIP) por magneto-ELISA; no intervalo de concentração de 0,39 a 200 ng mL^{-1} e 1,5 ng de antiDIG-HRP. Barras de erro ilustram o desvio padrão para as medidas (n=3). 90
- Figura 38** - Fita de ensaio de Lateral Flow contendo MIP/NIP a esquerda (Contendo amostra: Positivo) contendo a sequência de oligonucleotídeo biotinilado com a fita complementar marcada com digoxigenina e a direita (Sem amostra: Negativo) contendo a sequência de oligonucleotídeo biotinilado com a fita não complementar marcada com digoxigenina. 91
- Figura 39** - Ensaio de retenção de biotina- HRP com a variação da concentração (5 mg mL^{-1} de MIP e NIP) por absorvância; no intervalo de concentração de 100 a 2500 ng mL^{-1} . Barras de erro ilustram o desvio padrão para as medidas (n=3). 92
- Figura 40** - Fitas de ensaio em Lateral Flow (MIP/NIP) contendo biotina-HRP (1500 ng mL^{-1}). 93
- Figura 41** - Fita de ensaio de *Lateral Flow* utilizando MIP/NIP contendo a sequência de oligonucleotídeo biotinilado (10 ng mL^{-1} e 2000 ng mL^{-1}) com fita complementar marcada com digoxigenina (2000 ng mL^{-1}). 93
- Figura 42**- Fita de ensaio em Lateral Flow contendo MIP/NIP a esquerda (Positivo) contendo a sequência de oligonucleotídeo biotinilado com a fita complementar marcada com digoxigenina e a direita (Negativo) contendo a sequência de oligonucleotídeo biotinilado com a fita não complementar marcada com digoxigenina. 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comprimento de onda de máxima absorção de alguns grupos funcionais benzênicos absorventes (cromóforo).....	50
Tabela 2 - Parâmetros eletroquímicos de VOQ estudados e escolhidos para a realização das medidas eletroanalíticas	69
Tabela 3 - Variáveis de desempenho do sensor proposto obtidos a partir da curva analítica da Figura 28.	73
Tabela 4- Variáveis de desempenho do sensor proposto para amostras de soro humano enriquecido com RNA total do Zika vírus obtidos da Figura 30.	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Fe(CN)₆]⁻³: Ferricianeto de Potássio

Δip: Diferença de picos de corrente

β₁: Inclinação da reta

2AP: 2-aminofenol

AAHB: Ácido 3-amino-4-hidróxidobenzóico

ADE: *Antibody-dependent infection enhancement*

Ag: Prata

AgCl: Cloreto de Prata

ALP: *Alkaline Phosphatase*

ATR: *Attenuated Total Reflectance*

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BR: *Britton-Robinson*

BSA: *Bovine serum albumin*

cDNA: DNA complementar

DENV: Vírus da Dengue

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

dsDNA: *duble-stranded DNA*

EDC: [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

E_p: Potencial de pico

Fe²⁺: Ferro II

Fe³⁺: Ferro III

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

FT-IR: *Fourier-transform infrared spectroscopy*

GS: Glicoproteínas séricas

HQ: Hidroquinona

HRP: *Horseradish peroxidase*

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

KCl: Cloreto de Potássio

LF: *Lateral Flow*

LFA: *Lateral Flow Assays*

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

MES: 2 (*N*-Morpholino) Ethanesulfonic Acid

MEV-FEG: Microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo

MIP: *Molecularly Imprinted Polymers*

MMIP: *Magnetic Molecularly Imprinted Polymers*

MNIP: *Magnetic Non Imprinted Polymer*

NIP: *Non Imprinted Polymer*

NHS: N-hidroxisuccinimida

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAAHB: Poli(ácido 3-amino-4-hidróxidobenzóico)

PBS: *Phosphate-buffered saline*

PC: Perímetro cefálico

PG: *Pencil Graphite*

pKa: Constante de dissociação ácida

r²: Coeficiente de determinação

RN: Recém-nascidos

RNA: *Ribonucleic acid*

RT-PCR: *Reverse transcription polymerase chain reaction*

s*: Desvio padrão do branco

SSC: *Saline-sodium citrate*

ssDNA: *single-stranded DNA*

TMB: 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina

TRIS: Trisaminometano

UV-Vis: Ultravioleta-Visível

V: Volt

VC: Voltametria cíclica

VOQ: Voltametria de onda quadrada

VPD: Voltametria de pulso diferencial

ZIKV: Vírus da Zika

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	24
1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1 O vírus da Zika	25
1.2 A Febre do Zika.....	25
1.3 Epidemiologia e modos de transmissão	26
1.4 Microcefalia	29
1.5 Diagnóstico de infecções pelo vírus Zika.....	30
1.6 Biossensores	31
1.7 Genossensores	31
1.8 Utilização de eletrodos modificados com polímeros	33
2. OBJETIVOS	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Montagem da célula eletroquímica.....	37
3.2 Limpeza e preparo dos eletrodos de grafite	38
3.3 Preparo das soluções.....	38
3.4 Medidas Eletroquímicas	38
3.5 Micrografias Eletrônicas de Alta resolução – MEV-FEG.....	39
3.6 Espectroscopia de infravermelho	39
3.7 Imobilização e detecção dos Oligonucleotídeos	39
3.8 Seletividade	42
3.9 Amostras de soro humano enriquecidas com material genético extraído do Zika vírus.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Limpeza dos eletrodos de Carbono Grafite	43
4.2 Estudo das propriedades eletroquímicas do AAHB	44
4.3 Características espectrais do AAHB.....	49
4.4 Estudo da formação de filmes em soluções com diferentes valores de pH	53
4.5 Espectroscopia de infravermelho do material formado	54
4.6 Proposta de mecanismo de polimerização do AAHB	56
4.7 Estudo do comportamento de sondas redox sobre a superfície dos eletrodos de Grafite modificados com poli-AAHB	59
4.8 Estudo do número de ciclos para modificação da superfície dos eletrodos de grafite	

4.9 Caracterização morfológica dos filmes imobilizados nos eletrodos de grafite através de Microscopia eletrônica de varredura	63
4.10 Estudo da estabilidade do material sobre o eletrodo	67
4.11 Otimização de parâmetros (eletro)analíticos da resposta do sensor	68
4.12 Avaliação das características analíticas do genossensor proposto	71
4.13 Seletividade do sensor	74
4.14 Curva analítica de soro humano enriquecido com RNA total extraído do Zika vírus	75
5. CONCLUSÕES PARCIAIS	77
CAPÍTULO II.....	78
1. INTRODUÇÃO.....	79
1.1 ELISA - <i>Enzyme-Linked Immunosorbent assay</i>	79
1.2 Ensaio de fluxo lateral	80
1.3 Polímeros biomiméticos	82
2. OBJETIVOS	83
3. MATERIAL E MÉTODOS	84
3.1 Magneto ELISA	84
3.2 Ensaio de fluxo lateral	86
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
4.1 Magneto ELISA	88
4.2 Ensaio de fluxo lateral	91
5. CONCLUSÕES PARCIAIS	95
6. CONCLUSÃO GERAL.....	96
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	97
REFERÊNCIAS	98

PREFÁCIO

A presente dissertação aborda o uso de um novo material eletropolimerizado sobre eletrodos de grafite de lapiseira para imobilização e detecção de oligonucleotídeos específicos do vírus Zika. A utilização deste novo material polimérico como suporte para imobilização de biomoléculas é inédita, visando o desenvolvimento de um método de diagnóstico rápido e de baixo custo para a febre do Zika.

O Capítulo 1 apresenta os procedimentos realizados e os resultados obtidos nos estudos de eletropolimerização e caracterizações do material sobre os eletrodos de grafite de lapiseira, bem como sua utilização como suporte para imobilização e detecção de oligonucleotídeos e amostras do material genético do vírus Zika.

O Capítulo 2 mostra os estudos iniciais de teste de imunoenaios do tipo ELISA e fluxo lateral, realizados durante o período de estágio pesquisa no exterior (BEPE) na Universitat Autònoma de Barcelona – UAB – Espanha, os quais, visam obter os melhores resultados para o desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido do vírus Zika, viável, estável, reprodutível, seletivo e de baixo custo.

Por fim, apresenta-se as perspectivas futuras em relação ao trabalho.

Capítulo I

**Desenvolvimento de biossensor eletroquímico,
visando a detecção do Vírus Zika**

1. INTRODUÇÃO

1.1 O vírus da Zika

Originário da floresta Zika em Uganda, este vírus foi isolado, pela primeira vez em 1947, de um macaco *Rhesus* que havia sido colocado em uma gaiola em uma plataforma de árvores (DICK et al., 1952; HENRY, 2014). O macaco era um animal sentinela no programa da *Fundação Rockefeller* para pesquisas sobre a febre amarela. Assim, o macaco febril foi levado ao laboratório da Fundação em Entebbe e seu soro foi inoculado em camundongos. Após 10 dias todos os camundongos que foram inoculados intracerebralmente estavam doentes, e um agente transmissível filtrável, mais tarde denominado vírus Zika, foi isolado dos cérebros dos camundongos (HAYES, 2009). Posteriormente, também foi identificado em seres humanos, em 1952, em Uganda e na República Unida da Tanzânia (OMS, 2016). Após cerca de 60 anos da sua identificação em humanos, foi reportado em 2015, o primeiro caso de infecção, pelo vírus Zika no Brasil, espalhando-se rapidamente por todo o continente Americano (FAUCI; MORENS, 2016).

O vírus da Zika, é um arbovírus, ou seja, um vírus que é essencialmente transmitido por artrópodes, como os mosquitos, do gênero *Flavivírus*, da família *Flaviviridae* (MOTA et al., 2016). É um vírus de RNA (*Ribonucleic acid*) de fita simples e sentido positivo, contendo 10.794 nucleotídeos que codificam 3.419 aminoácidos. Está intimamente relacionado ao vírus Spondweni (LANCIOTTI et al., 2008). Os parentes mais próximos incluem os vírus da encefalite de Ilhéus; o vírus da febre amarela, dengue, encefalite japonesa e o vírus do Nilo Ocidental (KUNO et al., 1998; COOK; HOLMES, 2006; LANCIOTTI et al., 2008).

1.2 A Febre do Zika

O primeiro relato bem documentado da doença pelo vírus da Zika em humanos foi em 1964, sendo os principais sintomas: dor de cabeça leve, erupção maculopapular no rosto, pescoço, tronco e braços, se espalhando também para as palmas das mãos e solas dos pés, febre transitória, mal-estar e dor nas costas (SIMPSON, 1964).

Filipe et al., em 1973, relataram a doença com início agudo de febre, dor de cabeça e dor nas articulações, mas sem erupção cutânea. Neste caso o vírus da Zika foi isolado do soro coletado no primeiro dia dos sintomas; a doença teve fim em 1 semana (FILIPE et al., 1973). Em 2007, ocorreu um surto na Ilha Yap, onde houveram 5000 casos de infecção de uma população total de 6700 habitantes. Este surto foi caracterizado por erupção cutânea, conjuntivite e artralgia (LANCIOTTI et al., 2008; DUFFY et al., 2009). Outras manifestações menos frequentes incluíram mialgia, cefaleia, dor retro-orbitária, edema e vômito (DUFFY et al., 2009).

Apesar de apresentar sintomas brandos, foram constatados recentemente quadros mais graves como o comprometimento do sistema nervoso central (síndrome de Guillain-Barré, mielite transversa e meningite) (CAMPOS et al., 2015; ZANLUCA et al., 2015). No caso da transmissão horizontal, durante a gravidez, pode causar microcefalia em recém-nascidos e também outros defeitos de nascimento (CUGOLA et al., 2016; MLAKAR et al., 2016; RUBIN et al., 2016; LI et al., 2016).

O Brasil enfrentou em 2016 seu primeiro surto de vírus Zika, iniciado particularmente na região nordeste. A maioria dos casos de infecção pelo Zika vírus é autolimitada e sem sequelas, mas houve aglomerados de casos de microcefalia em algumas áreas da transmissão. O aumento do número de casos de microcefalia no Brasil levou a um alto nível de preocupação entre as mulheres grávidas em todo o país. Assim em fevereiro de 2016, o Comitê de Emergência de Regulamentos Sanitários Internacionais da OMS (Organização Mundial da Saúde) recomendou emergência de saúde pública, de preocupação internacional (VICTORA et al., 2016).

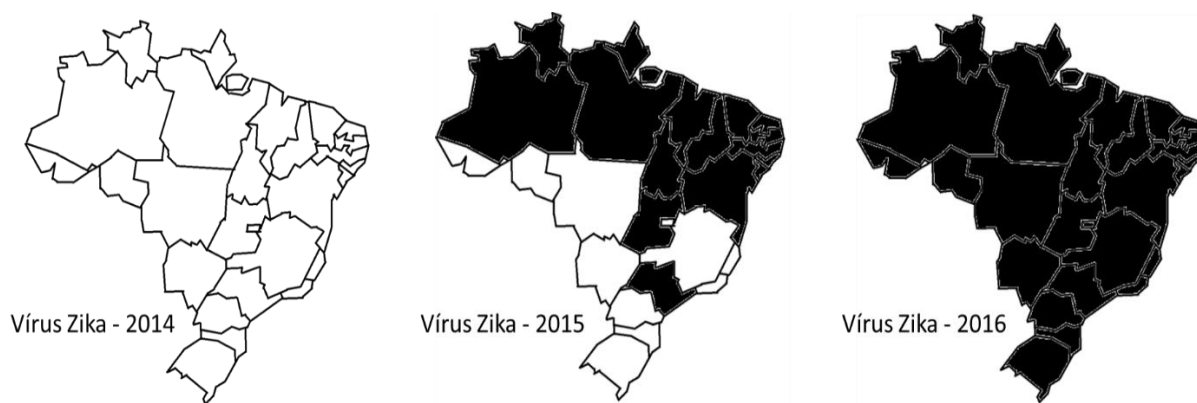
1.3 Epidemiologia e modos de transmissão

Com os avanços nas tecnologias, o deslocamento de pessoas a nível mundial em velocidade e frequência maiores, com o uso do transporte aéreo, têm viabilizado também o deslocamento de vetores para áreas onde o mesmo não era presente. Assim como o encontro direto do homem com áreas inexploradas, onde se encontravam agentes desconhecidos (LUNA, 2002).

Surgindo nas Américas apenas em 2015, o vírus da Zika foi identificado quando um surto de uma doença, ainda desconhecida, que apresentava como um dos seus sintomas exantema, ocorreu na Bahia, Brasil (ZANLUCA et al., 2015). Logo, o vírus já havia se espalhado por 16 estados brasileiros. O ministério da saúde do Brasil estimou

em 1,3 milhões de casos suspeitos até o final de 2015 e até março de 2016, já haviam cerca de 50 mil casos na Colômbia. No início de 2016 o vírus da Zika já estava presente em 35 países e em todo território brasileiro (“Zika Virus | CDC”; MÉNDEZ et al., 2017), como mostra a Figura 1.

Figura 1 - Estados com casos reportados de Zika vírus no Brasil em 2014, 2015 e 2016, sinalizado em preto



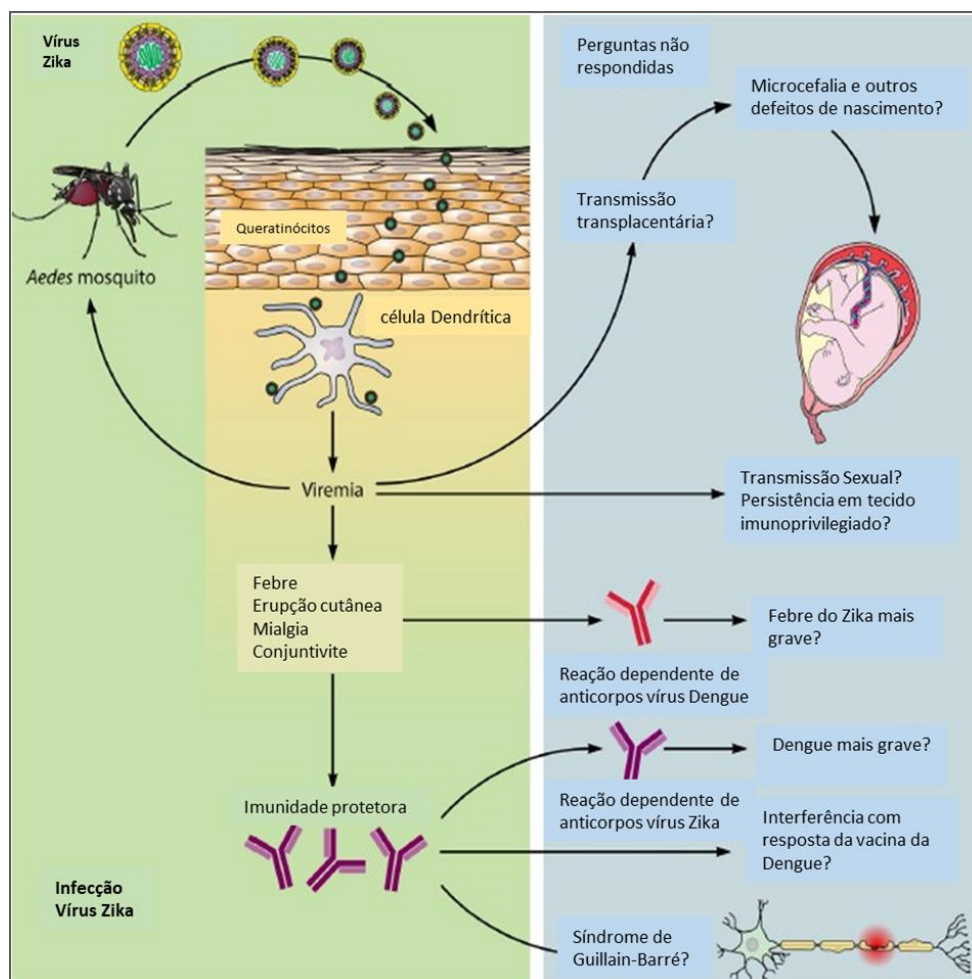
Fonte: Próprio autor, baseado em (“Zika Virus | CDC”) e (MESSINA et al., 2016)

Por se tratar de um arbovírus, a transmissão ocorre principalmente a partir da picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti* ou também do *Aedes albopictus*, sendo estes apenas vetores. Após esse processo o vírus se multiplica no sistema hospedeiro levando à progressão da doença (LAZEAR; DIAMOND, 2016). Ainda não se tem informações se o vírus da Zika se tornará endêmico em macacos e estabelecerá um ciclo de transmissão silvestre na América Latina análogo ao observado com o vírus da febre amarela ou, se será mantido exclusivamente através de ciclos de transmissão urbana sem ciclo silvestre, similar ao vírus da dengue (HANLEY et al., 2013).

Atualmente, não há evidências de que animais, não humanos e primatas sirvam como hospedeiros amplificadores para o vírus Zika, sugerindo um modo de transmissão similar ao de outros Flavivírus, como o vírus da dengue, febre amarela e chikungunya. Embora a transmissão por mosquitos seja claramente a principal causa de surtos da febre do vírus Zika, outros modos de transmissão também foram relatados, como: de mãe para filho, através de transfusão de sangue, transplantes de medula óssea ou transplantes de órgãos e também pode ser transmitido pelo ato sexual (MUSSO et al., 2015; BOGOCH et al., 2016; HOFER, 2016). A Figura 2

esquematiza o ciclo de infecção pelo vírus da zika e os efeitos severos relacionados à doença.

Figura 2 - Ciclo de infecção pelo vírus da zika: o quadro verde ilustra o ciclo típico da infecção; o quadro azul identifica os efeitos severos que podem estar relacionados às infecções.



Fonte: (Adaptado de LAZEAR; DIAMOND, 2016)

Apesar de apresentar sintomas brandos, foram constatados recentemente quadros mais graves como o comprometimento do sistema nervoso central (síndrome de Guillain-Barré, mielite transversa e meningite) (CAMPOS et al., 2015; ZANLUCA et al., 2015). No caso da transmissão horizontal, durante a gravidez, pode causar microcefalia em recém-nascidos e também outros defeitos de nascimento (CUGOLA et al., 2016; MLAKAR et al., 2016; RUBIN et al., 2016).

1.4 Microcefalia

Por ter sido o maior problema da contaminação pelo vírus da Zika, a microcefalia merece destaque. Esta é uma anomalia que ocorre no perímetro cefálico (PC) de neonatos, os quais apresentam uma medida menor, quando comparada com a de outras crianças do mesmo sexo e idade. Associada a um crescimento insuficiente do cérebro, os bebês com microcefalia poderão ter problemas de desenvolvimento. A gravidade da microcefalia oscila entre ligeira a grave. O diagnóstico precoce da microcefalia pode, por vezes, ser realizado por ecografia do feto, mas na maioria das vezes, o diagnóstico é feito à nascença ou mais tarde por comparação, conforme ilustrado na Figura 3. Segundo recomendações da OMS é considerada microcefalia quando o PC for menor ou igual a 30,54 cm para meninos e menor ou igual a 30,24 cm para meninas, segundo os parâmetros de ("INTERGROWTH-21st"). Os recém-nascidos (RN) afetados, podem apresentar atraso no desenvolvimento e incapacidade intelectual, até mesmo desenvolvendo convulsões e incapacidades físicas, incluindo dificuldades auditivas e visuais ("OMS | Microcefalia," 2016).

Figura 3 - Comparação entre perímetro cefálico, normal e em diferentes graus de gravidade e recém-nascidos.



Fonte: Adaptado de ("Facts about Microcephaly | CDC").

Com etiologia complexa e dependente de diversos fatores, a microcefalia pode ocorrer devido a infecções durante a gestação, como as infecções por herpes simples, rubéola, citomegalovírus, sífilis e toxoplasmose. Com transmissão horizontal, tais infecções cruzam a membrana chegando à circulação sanguínea embrionária e fetal (MOORE, 2013). A microcefalia é uma condição rara. A incidência estimada de microcefalia tem grandes variações, devido a diferenças na definição e na população-

alvo. No Brasil a partir de agosto de 2015, ocorreu um aumento inesperado do número de casos de microcefalia ao nascimento. Esse aumento do número de casos de microcefalia foi relacionado à inserção e rápida distribuição do vírus Zika no Brasil (MÉNDEZ et al., 2017).

A suspeita de transmissão horizontal estava relacionada ao surto do vírus Zika ser um novo elemento e ter tido correspondência espaço-temporal com os casos de microcefalia ao nascimento (TEIXEIRA et al., 2016). Esta transmissão foi reforçada quando detectado este vírus, no líquido amniótico de duas mulheres grávidas de bebês com microcefalia e no tecido de um recém-nascido com microcefalia que morreu após o nascimento no estado da Paraíba (CALVET et al., 2016).

1.5 Diagnóstico de infecções pelo vírus Zika

Atualmente, o diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus Zika é realizado através da técnica de RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) a partir do RNA diretamente extraído do soro do paciente (FAYE et al., 2008; OEHLER et al., 2014). Esta é usada como técnica de referência para detecção do vírus Zika, na fase de incubação e também na fase de latência do vírus (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Entretanto, o RNA viral já foi detectado em soro de mulheres grávidas aproximadamente 10 semanas após a infecção, nas quais foi identificada a ocorrência de infecção congênita (DRIGGERS et al., 2016).

Outro método também utilizado é o teste de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ou de imunofluorescência, para a confirmação da presença do vírus Zika. Porém, devido à baixa concentração de anticorpos IgM e o IgG na fase de incubação, se torna mais difícil a identificação do vírus. Os anticorpos IgM podem ser encontrados a partir do terceiro dia da doença e os anticorpos IgG devem ser pesquisados no soro agudo e convalescente (LANCIOTTI et al., 2008). O diagnóstico por sorologia (ELISA) além de ser um método oneroso, também é dificultado devido, o vírus Zika apresentar reação cruzada com outros Flavivírus, como o da dengue, febre do Nilo Ocidental e febre amarela (MEANEY-DELMAN et al., 2016).

Neste sentido, novos métodos de diagnóstico como os biossensores podem ser uma excelente opção, devido à alta sensibilidade e seletividade acopladas à possibilidade de miniaturização, portabilidade, baixo custo e mínima quantidade de energia necessária para funcionamento (WANG, 2002).

1.6 Biossensores

Um biossensor ou sensor biológico é um dispositivo analítico que contém um material biológico imobilizado a um transdutor, para produzir um sinal quantitativo, proporcional à concentração do analito em questão (HEALY et al., 2007). Desde o desenvolvimento do primeiro biossensor por Clark e Lyons para a detecção de glicose utilizando a enzima glicose oxidase (CLARK; LYONS, 1962), uma nova área na pesquisa científica foi criada com o surgimento de vários pesquisadores ao redor do globo, trabalhando em prol de novos dispositivos, como pode ser comprovado por recentes publicações e revisões bibliográficas (REN et al., 2016; DU; ZHOU, 2018; GUPTA et al., 2018; RAGAVAN et al., 2018) e a existência de periódicos voltados exclusivamente para o assunto.

Os sensores biológicos contribuem para o estabelecimento das técnicas analíticas, representando uma nova ferramenta para determinação de analitos no sangue (glicose, uréia, lactato, colesterol, DNA, antígenos, anticorpos, entre outros), *screening* de bibliotecas de cDNA (DNA complementar), monitoramento ambiental, análise e controle em alimentos, e determinação seletiva de doenças. Sendo então classificados de acordo com o sistema reconhecedor a ser usado. Dentre a gama de possibilidades de desenvolvimento de biossensores estão os genossensores ou sensores biológicos baseados em DNA.

1.7 Genossensores

No decorrer das últimas décadas, muito conhecimento foi adquirido sobre as estruturas, composições e funções dos ácidos desoxirribonucleicos. Um dos estudos mais importantes na área foi desenvolvido por James Watson e Francis Crick em que postularam um modelo tridimensional que consistia de duas cadeias em forma de hélice de DNA em torno do próprio eixo para formar uma dupla hélice (WATSON; CRICK, 1953). As duas, assim chamadas fitas de DNA são mantidas unidas por ligações de hidrogênio envolvendo os grupos amino e carbonila das bases nitrogenadas. Os padrões de ligação mais importantes foram definidos por Erwin Chargaff na qual a base nitrogenada adenina se liga especificamente com a timina e guanina com citosina (VISCHER; CHARGAFF, 1948).

Os genossensores são construídos baseados nas forças e nas especificidades das interações entre as fitas que geram a dupla hélice. Desta maneira, por processos denominados desnaturações, na qual a dupla fita é aberta, o DNA, o RNA, oligonucleotídeos menores e produtos de PCR, todos na forma de simples fita, são utilizados como material biológico a serem imobilizados nas superfícies de transdutores. Deste modo deseja-se, assim como anticorpos apresentam afinidade por antígenos e enzimas especificidade na catálise de substratos, que o genossensor possa detectar a fita complementar presente em uma amostra a ser analisada.

Devido à utilização de DNA, os genossensores são muito aplicados na área biológica nos estudos de expressão gênica, genotipagem, classificação patológica, descoberta de novas drogas, sequenciamento e diagnóstico molecular (LIU et al., 2012). As aplicações dos genossensores atingem vários ramos, como monitoramento de poluição (PALCHETTI; MASCINI, 2008), em análise de águas residuais (LUCARELLI et al., 2002), detecção de doenças (MERIC et al., 2002), dentre outros. Oliveira e colaboradores relataram, em um estudo realizado em 2015, o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico de DNA para a detecção de sequências do vírus Dengue tipo 3 (DENV-3). A detecção foi realizada utilizando voltametria de pulso diferencial (VDP). Os resultados mostraram um limite de detecção de $3,09 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. Além disso, este sistema permite a detecção seletiva de sequências de DENV-3 em tampão e soluções de soro humano (OLIVEIRA, R. M. L. et al., 2009).

De maneira similar, utilizando o sistema proteína-ligante estes pesquisadores também desenvolveram um biossensor eletroquímico para glicoproteínas séricas (GS) de pacientes infectados com vírus dengue (DENV) baseado em nanopartículas de ouro e polivinil-butiral adsorvido em eletrodos de ouro, através do uso da técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica. Os espectros de impedância mostraram um aumento na resistência à transferência de carga quando a proteína específica interagiu com GS. Além disso, a resistência à transferência de carga obtida com soro de DENV positivo foi maior do que a obtida com soro negativo. O biossensor resultante é capaz de reconhecer GS de pacientes infectados por VD (OLIVEIRA, M. D. L. et al., 2009).

O desenvolvimento de biossensores para Dengue continua sendo alvo de pesquisas em busca de melhores resultados de análise (SINGHAL et al., 2017; LIM et al., 2018). Os estudos atuais no campo dos sistemas de detecção disponíveis para a

detecção do ZIKV permanecem em um estágio inicial (SHAN et al., 2016; KAUSHIK et al., 2017), não sendo encontrado ainda um sistema totalmente confiável, simples, rápido e de baixo custo.

Dessa forma, dentre os possíveis transdutores utilizados nas detecções, destacam-se os eletroquímicos. Desde a detecção eletroquímica, seletiva de sequências de DNA por Mikkelsen (MILLAN; MIKKELSEN, 1993), vários estudos têm sido reportados, sejam eles utilizando marcadores eletroativos nas fitas complementares (alvos) (XU, CHUN et al., 2000; XU, C et al., 2000), ou indicadores e intercaladores de DNA (MINASYAN et al., 2006; LOAIZA et al., 2007), utilizando as respostas do próprio transdutor modificado (CHONG, 2006), entre outros.

Das etapas do desenvolvimento de um biossensor, a imobilização do material biológico sobre a superfície do transdutor é a crucial. Não somente a biomolécula deve ser imobilizada com eficiência, mas deve ser imobilizada sem perder a atividade ou sítio ativo, não pode sofrer processos de lixiviação, deterioração com tempo ou desnaturação nem impedir a transferência eletrônica com o transdutor (WANG, 2002).

1.8 Utilização de eletrodos modificados com polímeros

A utilização de polímeros condutores contendo grupos funcionais presentes em suas estruturas são alternativas viáveis para imobilização de biomoléculas na superfície de eletrodos. Pode-se assim direcionar a superfície do transdutor com grupos funcionais desejáveis e ainda manter ou ampliar a condutividade. Vários polímeros foram utilizados para construção de genossensores, como: polipirrol (PENG et al., 2006; QI et al., 2007), polianilina (WU et al., 2005), derivados de politiofeno (CHA et al., 2003), ácido 2-aminobenzóico (LI et al., 2004), ácido 3- hidroxifenilacético (OLIVEIRA, R. M. L. et al., 2009), dentre outros.

O 2-aminofenol é um monômero que apresenta estrutura aromática contendo um grupamento amina e uma hidroxila. Polimerizando uma estrutura aromática sobre a superfície de um transdutor eletroquímico, pode-se construir uma fina camada, com grupos funcionais orientados para se ligarem às estruturas biológicas derivadas do DNA modificadas, havendo ainda a possibilidade da mesma camada apresentar condutividade de um polímero intrinsecamente condutor (LUKKARI et al., 1998).

Franco, D.L. relata em um de seus trabalhos que foi possível a eletropolimerização de 2-aminofenol, na qual o material formado apresentou

tendências condutoras em solução contendo o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ e valores de resistência baixos através de estudos de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica. Análises morfológicas mostraram a formação de um filme com características rugosas. Os resultados por FTIR sugeriram possível polimerização via $-\text{NH}_2$ com presença de bandas de $-\text{OH}$ livres, pela possibilidade de ligações tipo $\text{C}-\text{N}-\text{C}$ de bandas de aminas aromáticas secundárias. Foram realizados experimentos de imobilização de produtos de PCR de genes específicos para câncer de próstata, desnaturados e hibridizados, com a utilização do ferrocenocarboxialdeído como mediador do processo de detecção, onde pôr fim constatou que o polímero pode ser usado como matriz de detecções de bases nitrogenadas de DNA e para construção de biossensores (FRANCO, 2007).

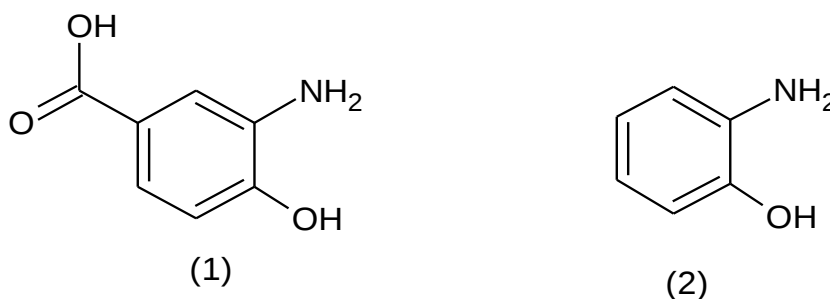
Apesar de importante, os experimentos realizados por Franco D.L foram resultados de imobilização de material biológico através de adsorção física, que apresenta uma grande desvantagem, por meio da fraca interação com o transdutor, principalmente pela possibilidade de lixiviação e pouco controle da quantidade de material imobilizado. Uma maneira de contornar esta desvantagem, é a introdução de grupos funcionais disponíveis para serem utilizados em ligações químicas com as biomoléculas seletivas. Desta forma para construção de um dispositivo a partir de oligonucleotídeos contendo grupos terminais amino, é interessante a presença de um grupo ácido carboxílico na estrutura molecular de um monômero. Isso porque através de uma reação de substituição nucleofílica do grupo acila pode ser formado uma amida através do ácido carboxílico presente no transdutor e do grupo amina presente na extremidade dos oligonucleotídeos.

À vista disso, o monômero ácido 3-amino-4-hidroxibenzóico (AAHB) (Figura 4) apresenta-se sendo um monômero altamente promissor para essa finalidade. O mesmo apresenta o grupo ácido carboxílico ligado diretamente a um anel aromático. Além disso, a estrutura é muito similar ao já estudado 2-aminofenol (FRANCO et al., 2008) (Figura 4) que gera um material com características condutoras.

O monômero, AAHB é um derivado do benzeno, e metabólito intermediário na biossíntese da grixazona, e serve como um precursor para o polibenzoxazol, um bioplástico termoe estável. Também serve como um precursor de vários metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces* (SUZUKI et al., 2006; KAWAGUCHI et al., 2015). O AAHB foi copolimerizado eletroquimicamente com anilina para melhorar a atividade redox da polianilina em altos valores de pH, o que é desejável para algumas

aplicações exigentes, como baterias recarregáveis e eletrocatalise usadas em ambientes altamente básicos (CHEN et al., 2013).

Figura 4 - Estrutura molecular (1) ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico e (2) 2-aminofenol.



Fonte: Próprio autor

Desta forma, nesta dissertação foi realizado o estudo da imobilização do ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico sobre a superfície de um transdutor eletroquímico de grafite através de eletropolimerização, fornecendo um novo substrato para incorporação de biomoléculas visando o desenvolvimento de um genossensor mais sensível e estável. O sistema apresenta potencial de ser miniaturizado e poderá ser construído em poucas etapas. Assim, um dispositivo sensível, específico e de baixo custo poderá se tornar um sensor biológico aplicável à detecção de amostras de DNA e similares do vírus da Zika.

2. OBJETIVOS

Desenvolvimento de um biossensor construído sobre transdutor eletroquímico de grafite modificado eletroquimicamente, com filme polimérico do monômero ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico, utilizando como material biológico amostras de oligonucleotídeos específicos do genoma do Zika vírus.

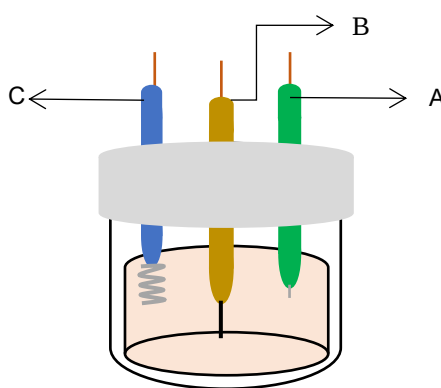
3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos eletroquímicos foram realizados no Laboratório de Eletroanalítica (GEAr) do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus Araraquara. As análises de infravermelho foram obtidas no Laboratório de Multiusuário do Instituto de Química da UNESP em Araraquara e as Micrografias Eletrônicas de Varredura (MEV-FEG) foram realizadas no laboratório de Microscopia Eletrônica de Alta Resolução também do Instituto de Química da UNESP em Araraquara. As soluções foram preparadas utilizando água purificada no sistema mili-Q-Milipore® e reagentes de grau analítico.

3.1 Montagem da célula eletroquímica

Foi utilizada uma célula eletroquímica de compartimento único, sem agitação (Figura 5), limpa quimicamente em solução de 1:1 de ácido nítrico e ácido sulfúrico por 20 minutos e lavada em abundância com água mili-Q.

Figura 5 - Esquema da célula eletroquímica onde os experimentos foram realizados utilizando eletrodos de prata/cloreto de prata, KCl 3,0 mol L⁻¹ como referência (A), eletrodos modificados e não modificados como trabalho (B) e eletrodo de platina como auxiliar (C). Volume 20 mL.



Fonte: Próprio autor

O eletrodo de prata, cloreto de prata, cloreto de potássio 3,0 mol L⁻¹ (Ag/AgCl - KCl 3,0 mol L⁻¹) foi utilizado como referência e o eletrodo de platina foi utilizado como auxiliar ambos limpos com água mili-Q antes de cada ensaio para todos os estudos eletroquímicos realizados. Como eletrodos de trabalho foram utilizadas minas de grafite de lapiseira de grossura 0,9 mm e dureza HB da marca Pentel®

(WANG et al., 2000; ALVES et al., 2017; SAID et al., 2018), a área geométrica utilizada foi de 0,289 cm², essa área é equivalente a 1 cm do eletrodo disponível para imersão e foi mantida de um eletrodo para o outro, utilizando esmalte incolor da marca Risque®. Foi utilizada uma lapiseira com tubo metálico adaptada como base do eletrodo.

3.2 Limpeza e preparo dos eletrodos de grafite

Os eletrodos de trabalho de mina de grafite foram usados inicialmente nos estudos da formação do polímero, na escolha do pH ideal para varreduras, e para caracterização pelas técnicas de Voltametria cíclica (VC) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV- FEG). Considerando que são minas de grafite comuns, suas produtoras adicionam em sua superfície parafina (INOCÊNCIO, 2008), com a finalidade de lubrificar e facilitar o mecanismo de ejeção do grafite. Esta substância pode interferir na resposta, sendo necessária sua remoção. As minas doravante chamadas de eletrodos de grafite (PG - do inglês *pencil graphite*) foram então lixadas em lixa d'água com granulometria 320, lavados com água deionizada e levados a banho de ultrassom por 20 minutos em água, para remoção de resíduos de grafite.

3.3 Preparo das soluções

Foram preparadas soluções aquosas de ácido 3-amino-4-hidroxibenzóico (AAHB) $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em ácido sulfúrico a 0,5 mol L⁻¹, soluções contendo apenas o eletrólito suporte ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹, soluções de ferricianeto de potássio 5×10^{-3} mol L⁻¹ contendo cloreto de potássio 0,5 mol L⁻¹ e soluções de cloreto de hexaaminorutênio II 5×10^{-3} mol L⁻¹ contendo cloreto de potássio 0,5 mol L⁻¹. Para medidas de espectros UV – visível foram preparadas soluções 4×10^{-4} mol L⁻¹ de AAHB contendo ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ e o pH ajustado com solução de NaOH.

3.4 Medidas Eletroquímicas

Após limpeza da célula, dos eletrodos, preparo das soluções e desoxigenação da célula com N₂ puro, o sistema eletroquímico foi montado contendo os três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar) dentro da célula. Medidas eletroquímicas foram

realizadas utilizando um potenciostato μ Autolab PGSTAT 101, software Nova 2.1 para configurações de parâmetros e software de tratamento de dados para obtenção das gráficas, todos utilizando eletrodo de referência Ag/AgCl - KCl 3,0 mol L⁻¹.

Os estudos das propriedades eletroquímicas do AAHB foram realizados inicialmente em eletrodo de trabalho de grafite utilizando a técnica de voltametria cíclica.

3.5 Micrografias Eletrônicas de Alta resolução – MEV-FEG

Foram obtidas micrografias eletrônicas das superfícies modificadas dos eletrodos de grafite de lapiseira e impressos (Drop sens DS 150), utilizando o microscópio eletrônico de alta resolução MEV-FEG da JEOL modelo JSM-7500F.

3.6 Espectroscopia de infravermelho

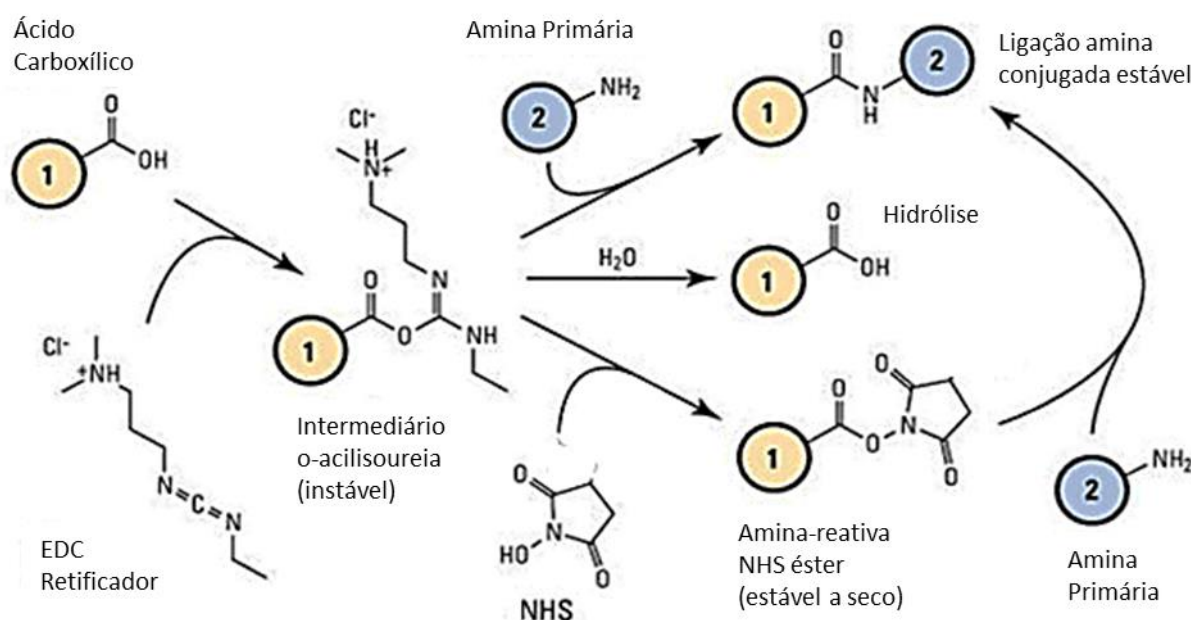
Experimentos foram realizados com eletrodos de grafite com grande área superficial visando extrair o material formado. Foram aplicados 100 ciclos de varredura de potencial, em solução contendo o monômero em ácido sulfúrico. Após o experimento, os eletrodos foram lavados em abundância com água mili-Q e colocados em um tubo Falcon contendo acetonitrila. Os eletrodos banhados em acetonitrila foram levados a um aparelho de ultrassom por 2 horas para extração do polímero depositado. O material extraído foi seco por rotaevaporação e deixado em dessecador à vácuo. As amostras, secas, foram enfim levadas a um espectrofotômetro de infravermelho. Os dados foram registrados em transmitância na faixa de 600 a 4000 cm⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹, 64 varreduras utilizando um espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier VERTEX 70 da BRUKER com módulo ATR.

3.7 Imobilização e detecção dos Oligonucleotídeos

Após a modificação da superfície dos eletrodos PG com a formação do filme polimérico do AAHB (PAAHB) e posterior caracterização, estes foram lavados em solução tampão fosfato salino 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 (PBS) (CRUZ et al., 2017) sob agitação para então iniciar o processo de imobilização e detecção dos

oligonucleotídeos. Primeiramente para a ativação do filme polimérico, foi usada uma solução contendo $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida] (EDC) e $1,25 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de N-hidroxissuccinimida (NHS) (4:1) (FERNANDES, 2015) em meio de tampão MES $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 4,5 (GRABAREK; GERGELY, 1990). O EDC/NHS promovem uma ativação do grupo ácido carboxílico, tornando o carbono da carboxila um melhor eletrófilo. Como nucleófilo, foram utilizados os grupos amino presentes nos oligonucleotídeos modificados com um grupo amino na extremidade 5', obtidos pela Invitrogen®. Um esquema desse sistema pode ser visto abaixo na Figura 6, a qual forneceu todas as sequências utilizada no trabalho.

Figura 6 - Esquema da reação de ativação do grupo carboxilato com EDC/NHS e formação de ligação amida.



Fonte: Adaptado de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/24510>

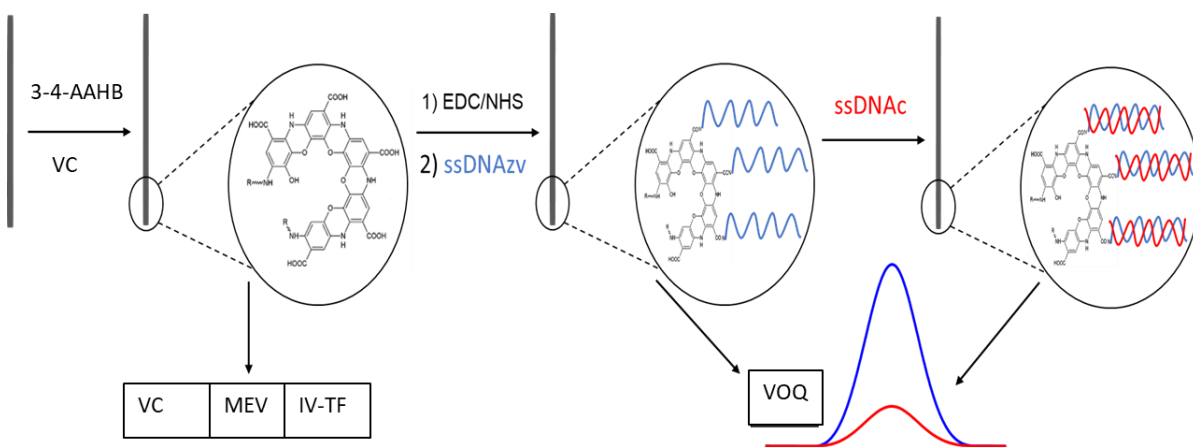
Os eletrodos foram colocados imersos em uma solução de EDC/NHS. Após 30 minutos foram lavados em tampão MES e com o uso de uma pequena ponteira, imersos em $15 \mu\text{L}$ de uma solução $66 \mu\text{mol L}^{-1}$, previamente preparada, da fita simples de oligonucleotídeos (ssDNA) específica ao Zika vírus (SONG et al., 2016), adaptada após alinhamento global utilizando a ferramenta BLAST, a qual apresentou similaridade total com o genoma do vírus Zika. A sequência usada foi 5' $\text{H}_2\text{N-AGGGCGTGTGCATACTCCTTGTG}$ 3' adequadamente desenhada para permitir a

reação com o grupamento carboxila do filme polimérico (PAAHB), agora ativado e mais reativo devido ao EDC/NHS previamente adicionados.

Após 45 minutos de interação os eletrodos foram lavados em solução tampão PBS e realizada uma medida eletroquímica utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ) em solução aquosa de ferricianeto de potássio $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ contendo cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, o eletrodo foi lavado em solução tampão PBS e imerso em solução contendo fitas simples de oligonucleotídeos complementares à sequência anteriormente imobilizada ssDNA: 5' CACAAGGAGTATGACACGCCCT 3', para realizar a reação de hibridização mais 45 minutos de interação. Após este tempo o sensor foi lavado em tampão PBS e realizada uma medida eletroquímica como anteriormente descrito.

O esquema mostrado na Figura 7, representa as principais etapas realizadas durante o processo de preparação dos eletrodos até a detecção das sequências complementares.

Figura 7 – Ilustração das principais etapas de preparo dos eletrodos de grafite.



Fonte: Próprio autor

A detecção do processo de hibridização deu-se pela análise do pico de redução de ferricianeto de potássio (+0,5 a 0 V), na qual foi feita a verificação das diferenças de corrente entre as duas medidas (Δip). Após o processo de hibridização observou-se o decréscimo da corrente do pico de redução da sonda redox, devido ao acúmulo de carga negativa do esqueleto de DNA após a hibridização, que gera repulsão dos ânions de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$, diminuindo a quantidade de corrente gerada pela conversão redox da sonda na superfície do eletrodo (KAFKA et al., 2008).

3.8 Seletividade

Para avaliação da seletividade foi realizada a imobilização e detecção de maneira semelhante ao executado na seção 3.7, alterando apenas a sequência complementar por uma não complementar (5' AAAATTTTTTCCCCCGGGGG 3').

3.9 Amostras de soro humano enriquecidas com material genético extraído do Zika vírus

Conforme descrito anteriormente na seção 3.7, foram preparados os eletrodos com o ssDNA imobilizado. A seguir, foi realizado o teste de hibridização em amostras de soro humano enriquecidas com extrato de RNA completo do Zika vírus, obtidos em parceria com o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães FIOCRUZ de Pernambuco, em colaboração com a Profa. Dra. Rosa A. Dutra da UFPE.

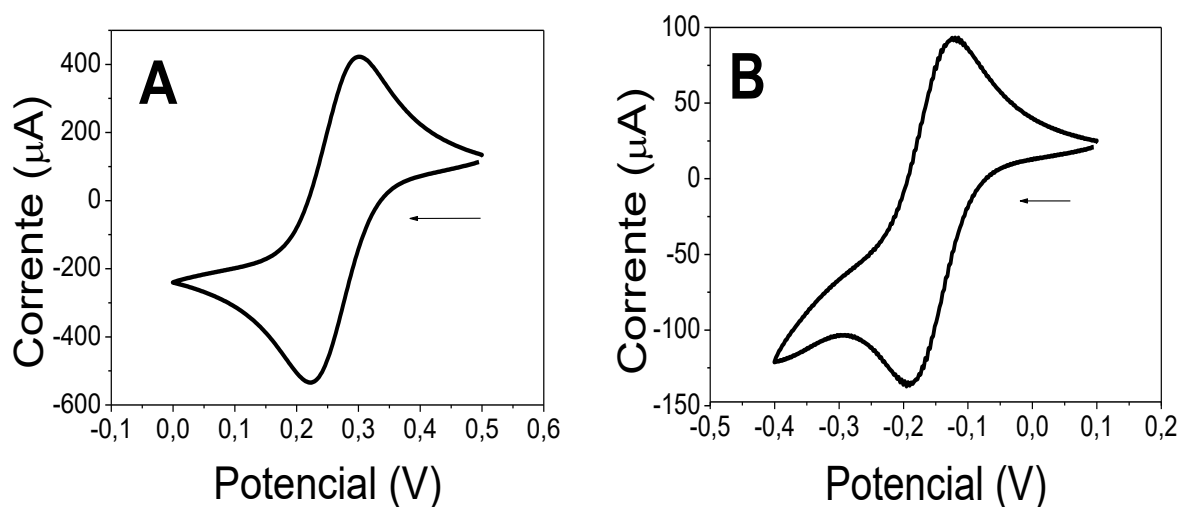
Inicialmente adicionou-se a um micro tubo uma proporção de 80% de soro humano, 8% de tampão 20xSSC e 12 % de extrato de RNA viral, tendo-se um volume total de 30 µL, os eletrodos foram deixados imersos na solução de hibridização por 6 horas em câmara úmida a 42 °C, sendo esta metodologia adaptada de MARQUES et al. (1998). As concentrações de RNA extraído foram variadas de 84,0 a 5620,0 pmol L⁻¹, através de diluição seriada. A detecção ocorreu como descrito na seção 3.7.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Limpeza dos eletrodos de Carbono Grafite

Para iniciar as análises, primeiramente foram otimizados os métodos de limpeza dos eletrodos de grafite para obtenção de um padrão Figura 8 e 9. Assim, limpos, os eletrodos foram submetidos a um teste de qualidade e da solução do eletrólito suporte. Foram realizados experimentos utilizando como técnica eletroquímica a voltametria cíclica (VC) e soluções contendo sondas aniônicas, catiônicas e o próprio eletrólito suporte.

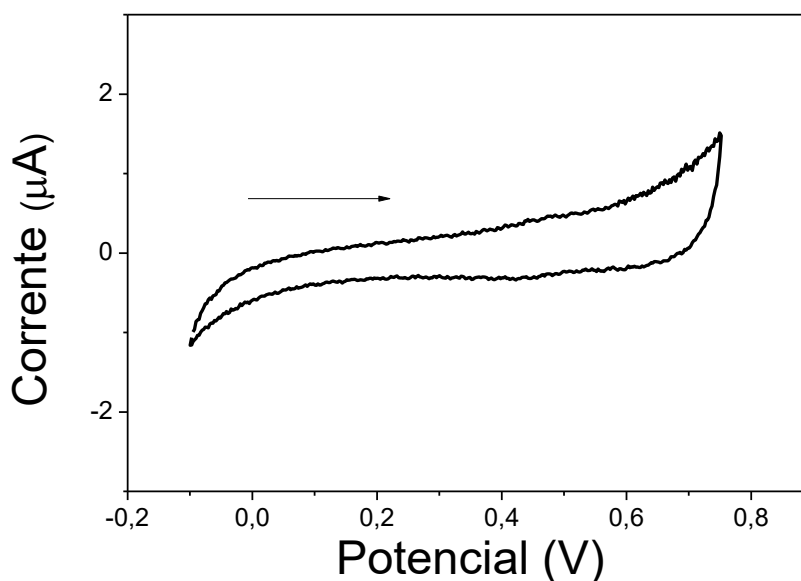
Figura 8 - Voltamogramas cíclicos obtidos sobre os eletrodos de grafite após limpeza mecânica em solução de cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo (A) ferricianeto de potássio $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (B) cloreto de hexaaminorutênio II $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a 100 mV s^{-1}



Fonte: Próprio autor

Nas sondas redox de ferricianeto de potássio (aniônica) e de cloreto de hexaaminorutênio II (catiônica) foi obtida uma diferença entre os picos de oxidação e redução menor que 80 mV, sendo essa diferença um indicativo de qualidade da superfície eletrodica, mostrando baixa resistência a transferência de carga e uma limpeza adequada da superfície do eletrodo.

Figura 9 - Voltamogramas cíclicos obtidos sobre os eletrodos de grafite após limpeza mecânica em solução aquosa de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ a 50 mV s⁻¹



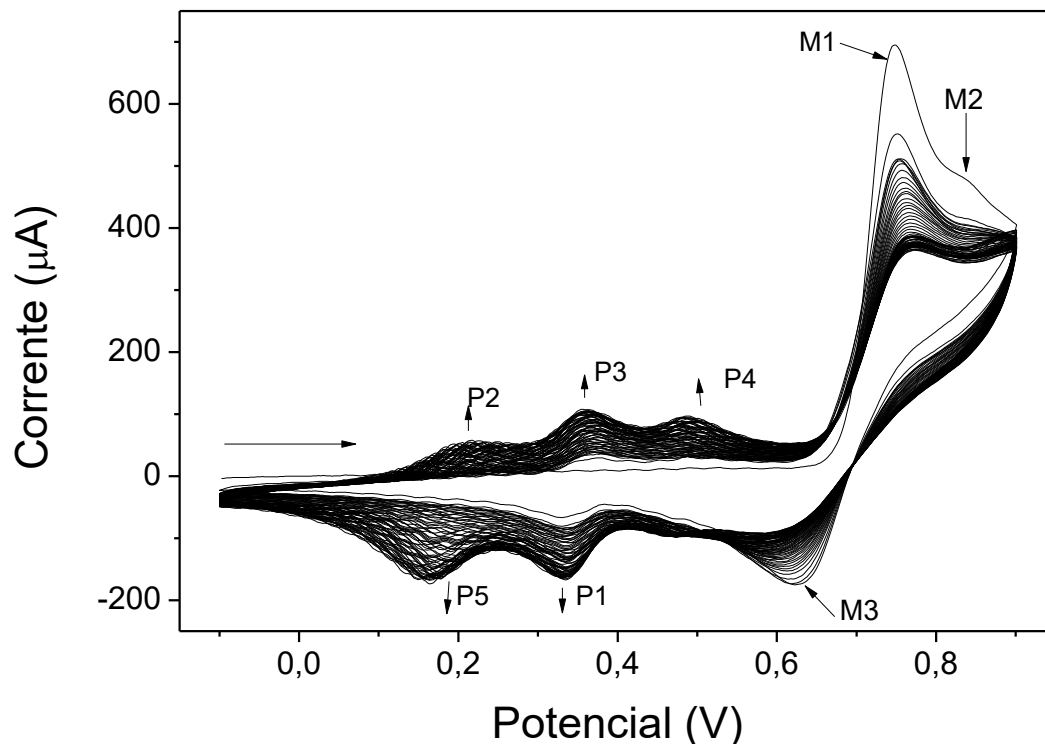
Fonte: Próprio autor

No eletrólito suporte, solução aquosa de ácido sulfúrico, não se observou nenhum pico de oxidação ou redução de material contaminante na superfície do eletrodo ou na solução, na faixa de potencial desejada para a polimerização. Estes dois parâmetros foram usados como padrões de qualidade de limpeza para garantir a reprodutibilidade dos demais eletrodos.

4.2 Estudo das propriedades eletroquímicas do AAHB

Para início dos estudos das propriedades eletroquímicas do AAHB através do uso da técnica de voltametria cíclica (Figura 10), foram aplicados 100 ciclos de potencial à uma velocidade de 50 mV s⁻¹ sobre o eletrodo de grafite para realizar a oxidação do monômero na tentativa de promover a polimerização do mesmo.

Figura 10 - Voltamogramas cíclicos obtidos sobre os eletrodos de grafite em solução aquosa $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AAHB contendo ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, 100 ciclos, 50 mV s^{-1} . As setas indicam aumento ou diminuição de corrente no decorrer das varreduras.



Fonte: Próprio autor

O primeiro ciclo de potencial, apresenta duas ondas de oxidação do AAHB M1 (+0,75 V) e M2 (+0,85 V), porém ocorre na varredura reversa apenas um processo catódico correspondente M3 (+0,64 V). O pico M1 corresponde à oxidação do AAHB para o monocatión-radical AAHB^+ , já o pico M2 é provavelmente devido à oxidação do AAHB^+ a dication (BARBERO et al., 1989). Uma vez que o aparecimento de dois processos de oxidação está bem descrito para o 2-aminofenol, consideramos os mesmos processos para efeitos de comparação deste novo material eletropolimerizado. Desta forma, foi atribuído ao primeiro pico a oxidação do grupo $-\text{NH}_2$ (M1). O segundo processo de oxidação (M2), caracteriza um comportamento voltamétrico singular do 2-aminofenol, devido à presença de grupos $-\text{OH}$ que são doadores de elétrons (GONÇALVES et al., 2000).

Com o aumento do número de ciclos, há uma diminuição gradual de corrente desses dois picos (M1 e M2). Indicando que a superfície do eletrodo está sendo modificada com um material derivado do AAHB, originados da reação entre os cátions-radicais eletroquimicamente formados, tornando a superfície mais resistiva e

dificultando a chegada de mais material monomérico na superfície do eletrodo de trabalho (FRANCO, 2007). O pico M2 diminui a partir do segundo ciclo, o que corrobora com o descrito anteriormente.

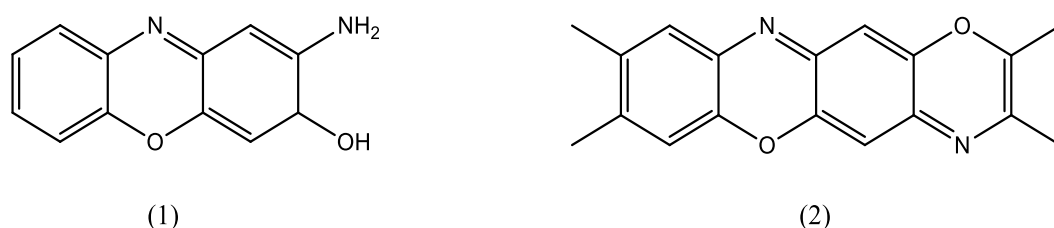
Pode-se observar no primeiro ciclo também uma onda de redução P1(+0,33 V). A partir da segunda varredura inicia-se o surgimento de três novos picos de oxidação em potenciais menos anódicos: P2 (+0,2 V), P3 (+0,35 V) e P4 (+0,5 V) que apresentam um aumento na corrente a cada ciclo completado. Após alguns ciclos nota-se também o surgimento de uma nova onda de redução P5 (+0,15 V). O fato de haver picos em potenciais menos anódicos é uma forte evidência de formação de um filme polimérico (FRANCO, 2007). Isso porque picos nesses potenciais significam que estruturas que antes não existiam em solução, estão sendo formadas e que possuem necessidade de menor energia para serem oxidadas ou reduzidas (potenciais menos anódicos e catódicos, respectivamente). Uma explicação disso é a formação de dímeros ou trímeros que, neste caso, possuem maior conjugação de duplas ligações, aumentando a ressonância da molécula, sendo mais fáceis de serem estabilizadas ao remover elétrons de sua estrutura, quando comparada ao monômero.

Observa-se então que as ondas de oxidação do polímero P2 e P3, são complementares as ondas de redução P5 e P1, respectivamente, sendo considerados pares redox reversíveis. Esse perfil é semelhante ao perfil de eletropolimerização do 2-aminofenol (FRANCO, 2007). A onda anódica em maior potencial, (P4) se apresenta irreversível e, até o momento, sem estrutura identificada no processo da polimerização.

A estrutura e o mecanismo de eletropolimerização dos poli-aminofenóis depositados em eletrodos de grafite não é totalmente conhecida, mas estes polímeros já foram estudados em outros materiais (SALAVAGIONE et al., 2004, 2005). A literatura sugere que a cadeia principal de poli-2-aminofenol contém fenoxazina (GONÇALVES et al., 2000; SALAVAGIONE et al., 2005). Como outros cátions-radicais de aminas aromáticas (GAO et al., 1989), o cátion-radical 2-aminofenol pode dimerizar por acoplamento C-C, C-N ou N-N. Em soluções mais ácidas, o acoplamento N-C de cátions-radicais produz o dímero cíclico 3-aminofenoxazona (Figura 11), (JACKOWSKA et al., 1993) e também já foram propostas o surgimento de unidades de fenoxazina (TUCCERI et al., 1997).

Devido a semelhança estrutural do monômero AAHB com o 2-aminofenol e do perfil eletroquímico dos respectivos polímeros, pode-se sugerir então, que o processo de polimerização do AAHB seja semelhante ao do 2-aminofenol.

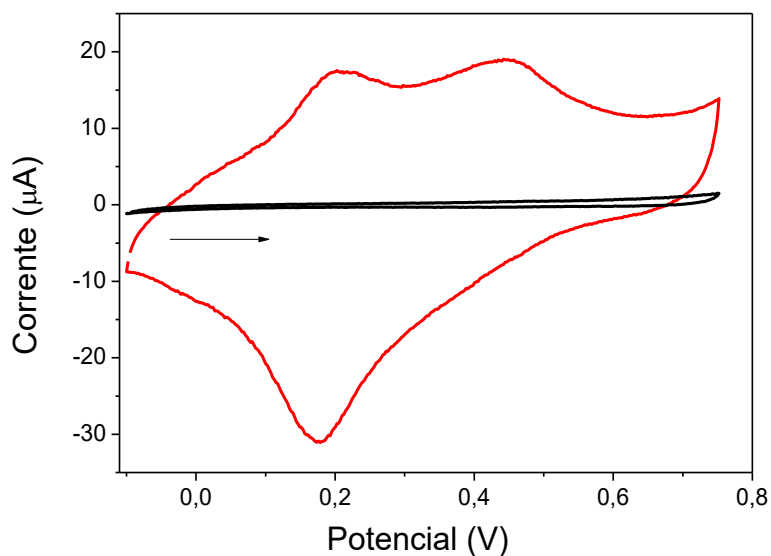
Figura 11 - Estrutura molecular da (1) 3-aminofenoxazona e (2) unidades de fenoxazina.



Fonte: Próprio autor

Para visualizar o comportamento eletroquímico do filme formado na superfície do PG em solução de polimerização apresenta-se a Figura 12, a seguir.

Figura 12 - Voltamogramas cíclicos obtidos sobre os eletrodos de grafite em solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ a 50 mV s⁻¹. Experimentos realizados (-----) após limpeza e (---) após modificação pela aplicação de 100 ciclos de potencial em solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ contendo 2,5 x 10⁻³ mol L⁻¹ de AAHB a 50 mV s⁻¹



Fonte: Próprio autor

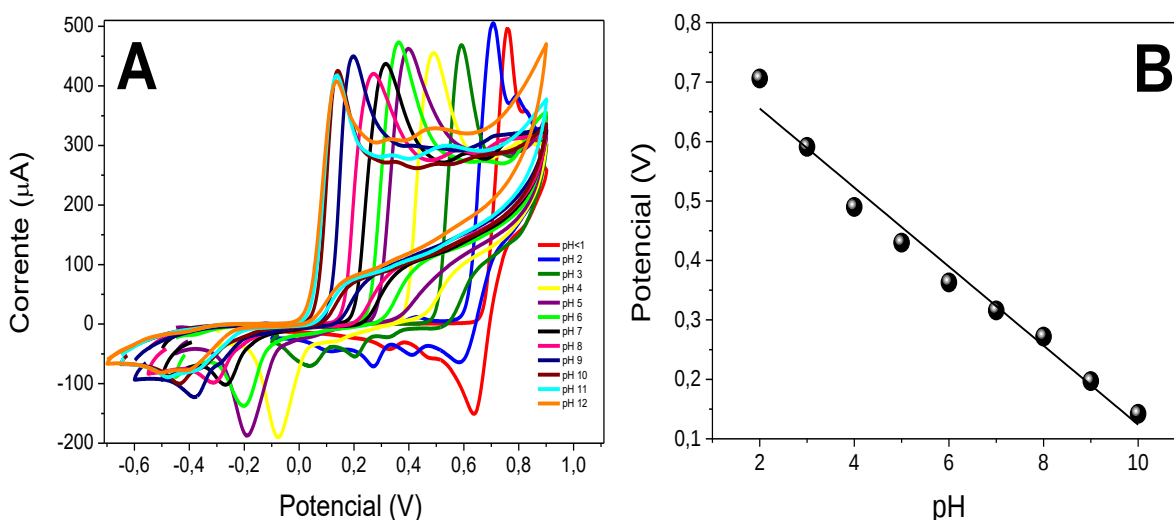
Embora na Figura 10, durante a polimerização nota-se a presença de cinco picos atribuídos a formação do polímero (P1, P2, P3, P4 e P5), após o termino da polimerização são observados apenas três deles (P2, P5 e P4) em ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ indicando que, o par redox P2/P5 representam efetivamente ao polímero,

e que o par P1/P3 correspondem a produtos relacionados aos oligômeros de menor número de unidades monoméricas (2 ou 3, etc) de fenoxazina que não são aderidos ao eletrodo, ou que estão em constante crescimento gerando filme polimérico. Já para o P4, ainda não se conseguiu explicar qual é sua procedência, e deverá ser analisado com maior profundidade, visto que o material sintetizado nesta dissertação é inédito na literatura. Entretanto, estudos mostrados para o poli(2-aminofenol) (GONÇALVES et al., 2000), ajudam a discernir que o terceiro pico irreversível (P4) pode ser consequência da presença do grupo funcional carboxilato no AAHB, afetando o comportamento eletroquímico do material obtido.

Uma vez observado que era possível realizar a eletropolimerização do AAHB, em meio ácido, um novo estudo foi realizado alterando-se o pH do meio reacional para valores de pH mais básicos, a fim de avaliar a influência da protonação da molécula no processo de polimerização, assim como o efeito causado nas propriedades eletroquímicas do filme.

O efeito do pH no comportamento eletroquímico do AAHB foi analisado em solução tampão BR por voltametria cíclica (Figura 13). Os valores de pH foram ajustados entre 2 e 12, para garantir que todos os grupos funcionais pudessem ser desprotonados.

Figura 13 - (A) Voltamogramas cíclicos obtidos do primeiro ciclo de varredura a 50 mV s^{-1} da eletropolimerização do de 3-4-AAHB $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ sobre os eletrodos de grafite em diversas soluções de tampão BR com diferentes pH. (B) Relação entre o potencial de pico versus o pH obtido dos Voltamogramas da Figura (A).



Fonte: Próprio autor

Na Figura 13 A e B, pode-se notar o deslocamento do potencial para valores menos positivos à medida que o pH aumenta, apresentando linearidade entre os valores de pH 2 a 10, característica específica das reações envolvendo prótons durante a reação de transferência de elétrons. Esta relação linear entre os valores de E_p (V) e pH, é representada pela equação 1.

$$E_p = 0.788 - 0.066\text{pH} \quad (1)$$

Comparando o valor experimental com o valor teórico da equação de Nernst (Equação 2), onde H^+ é o número de prótons e n é o número de elétrons, a inclinação de 0,066 V por unidade de pH pode ser relacionada a uma reação redox envolvendo o mesmo número de prótons e elétrons.

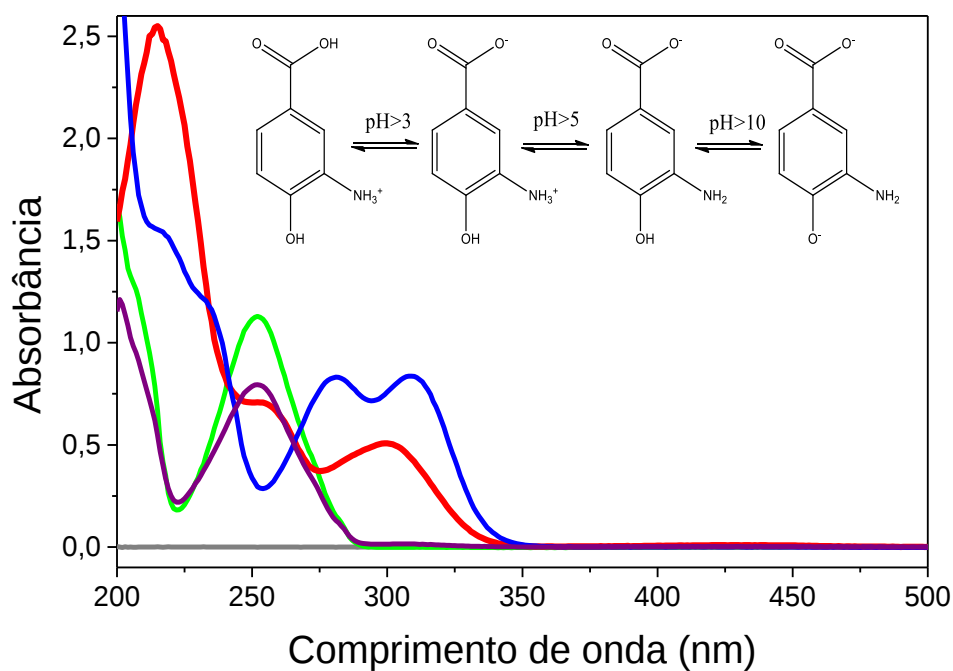
$$E_p = E^0 - 0.0592\left(\frac{H^+}{n}\right)\text{pH} \quad (2)$$

Para obter mais informações, as mudanças de absorbância nas soluções do monômero em diferentes valores de pH foram observadas por espectroscopia UV- visível.

4.3 Características espectrais do AAHB

Para melhor entendimento do processo de desprotonação e as mudanças físico-químicas provocadas por esses processos na molécula de monômero AAHB, foram realizados experimentos de absorção em soluções $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do monômero AAHB, com valores de pH 0,25; pH 3,5; pH 7 e pH 12 os que foram ajustados com solução diluída de NaOH. A Figura 14 mostra os espectros de absorbância obtidos:

Figura 14 - Absorbância do monômero AAHB $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em função do comprimento de onda (----) Branco, (---) pH 0,25, (---) pH 3,5, (---) pH 7 e (---) pH 12.



Fonte: Próprio autor

Os espectros foram interpretados baseados nos grupos funcionais presentes na molécula do monômero, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Comprimento de onda de máxima absorção de alguns grupos funcionais benzênicos absorventes (cromóforo).

CROMÓFORO	Banda 1 (nm)	Banda 2 (nm)
Benzeno	202	254
Ácido benzoico	230	273
Ânion benzoato	224	268
Fenol	210	270
Ânion fenóxido	235	287
Anilina	230	280
Cátion anilínio	203	254

Fonte: (PAVIA, D.L. ; LAMPMAN, G.M. ; KRIZ, 2010)

Como não são relatados na literatura os valores dos pK_as do AAHB, os valores de pH foram escolhidos baseados na comparação com o ácido 4- aminobenzóico (DIXON; JURS, 1993; CSIZMADIA et al., 1997).

No valor de pH 0,25, o átomo de nitrogênio e a carboxila estão protonados. No valor de pH 3,5 há a formação de um *zwitterion*, uma estrutura eletricamente neutra. No valor de pH 7, o grupo amino é formado e após o valor de pH 10 há a formação também do ânion fenóxido. Desta forma pode-se então avaliar as bandas do UV.

O benzeno apresenta tipicamente três bandas de absorção. Uma a 180 nm, que devido às limitações ópticas dos equipamentos normalmente ela não é registrada. Assim, a análise do benzeno recai sobre duas bandas de absorção, correspondentes a 203 e 254 nm.

A presença de auxocromos no benzeno, tais como –COOH, -OH e –NH₂ promove um deslocamento batocrômico (deslocamento para maiores comprimentos de onda, também chamado deslocamento para a região do vermelho) como pode ser visto na Tabela 1. A provável sinergia dos três grupos no efeito mesomérico no anel aromático pode ser a explicação dos valores experimentais para o monômero AAHB serem maiores do que os valores encontrados na Tabela 1 para as estruturas simples (ácido benzoico, anilina e fenol).

É provável que a banda em 215 nm (para valores de pH 0,25 e 3,5) e os “ombros” em 219 e 210 nm (para valores de pH 7 e pH 12, respectivamente) sejam relacionadas à chamada segunda banda primária do benzeno de 180 nm, deslocada no monômero devido ao aumento do efeito mesomérico. Porém, como mostrado na Tabela 1, o fenol apresenta uma banda exatamente a 210 nm (referente à primeira banda primária do benzeno). Desta forma, fica inviável a análise do monômero em relação às bandas primárias (PAVIA, D.L. ; LAMPMAN, G.M. ; KRIZ, 2010).

Porém a banda secundária (benzeno em 254 nm) apresenta comportamento esperado na presença dos auxocromos. Em valores de pH 0,25 e 3,5, há somente esta banda a 252 nm, devido ao fato do ácido carboxílico e ânion carboxilato não afetarem a ressonância do anel quando os outros grupos não são alterados, assim como tem pouca diferença entre o ácido benzoico e o ânion benzoato. Este valor está condizente com o valor de 254 nm referente ao cátion anilínio na Tabela 1. É interessante notar pela tabela que as posições das bandas do cátion anilínio e do benzeno são praticamente as mesmas. Isto se deve ao fato de que, ao protonar o átomo de nitrogênio, os pares de elétrons livres no grupo amino não estão mais

disponíveis para interação com os elétrons π do anel aromático. Desta forma, as posições das bandas correspondentes a este efeito isolado devem permanecer idênticas às do benzeno. Ao se elevar o pH (tanto a pH 7 quanto 12), ocorre a transição de cátion anilínio para grupo amino.

Neste momento, os pares de elétrons do nitrogênio tornam a estar disponíveis para aumentar o efeito mesomérico do anel aromático, promovendo deslocamentos batocrômicos. Em pH 7 é possível observar três bandas: 215, 255 e 300 nm. Neste valor de pH, ambos, grupos amino e carboxílico estão desprotonados. Enquanto que o grupo amino é eletricamente neutro, o grupo carboxílico está presente na forma de ânion carboxilato. Em comparação do ânion benzoato com o ácido benzoico, o fato do grupamento estar desprotonado promove um deslocamento hipsocrômico (deslocamento para menores comprimento de onda, também chamado de deslocamento para a região do azul). O grupo carboxílico é classificado como um substituinte desativador, por remover os elétrons do anel aromático. Na forma de carboxilato o efeito desativante é ainda maior. As formas de ressonância deste grupo são simétricas o que o torna mais estável (PAVIA, D.L. ; LAMPMAN, G.M. ; KRIZ, 2010). Ao mesmo tempo há a presença do grupo amino, retirador de elétrons por efeito indutivo, mas fortemente doador de elétrons por ressonância (assim como a hidroxila), o que explicaria também a manutenção, em valor de pH 3,5 mesmo estando presente o ânion carboxilato.

Provavelmente os dois efeitos ativadores fortes do grupo amino e da hidroxila promovem o deslocamento batocrômico observado e o espectro se assemelha ao do benzeno com três bandas, com seus respectivos deslocamentos batocrômicos: de 180 para 215 nm, de 202 para 252 nm e de 254 para 300 nm. Já em pH 12, além da presença do ânion carboxilato, há a presença do ânion fenóxido. Ao contrário do deslocamento hipsocrômico entre a anilina e o cátion anilínio devido à indisponibilidade do par de elétrons no nitrogênio, há um maior deslocamento batocrômico ao se passar do fenol para o ânion fenóxido devido agora à presença de um par de elétrons adicional (elétrons n) e o efeito mesomérico é aumentado. Isso é possível de se analisar na estrutura do monômero, pois há um deslocamento batocrômico entre os valores de pH 7 e 12 da banda de 255 para 281 nm e da banda de 300 para 308 nm (PAVIA, D.L. ; LAMPMAN, G.M. ; KRIZ, 2010).

Desta forma, pelos espectros de UV pode-se ter certeza das diferentes espécies do monômero em diferentes valores de pH e da influência que o pH tem sobre os processos de absorção da molécula.

4.4 Estudo da formação de filmes em soluções com diferentes valores de pH

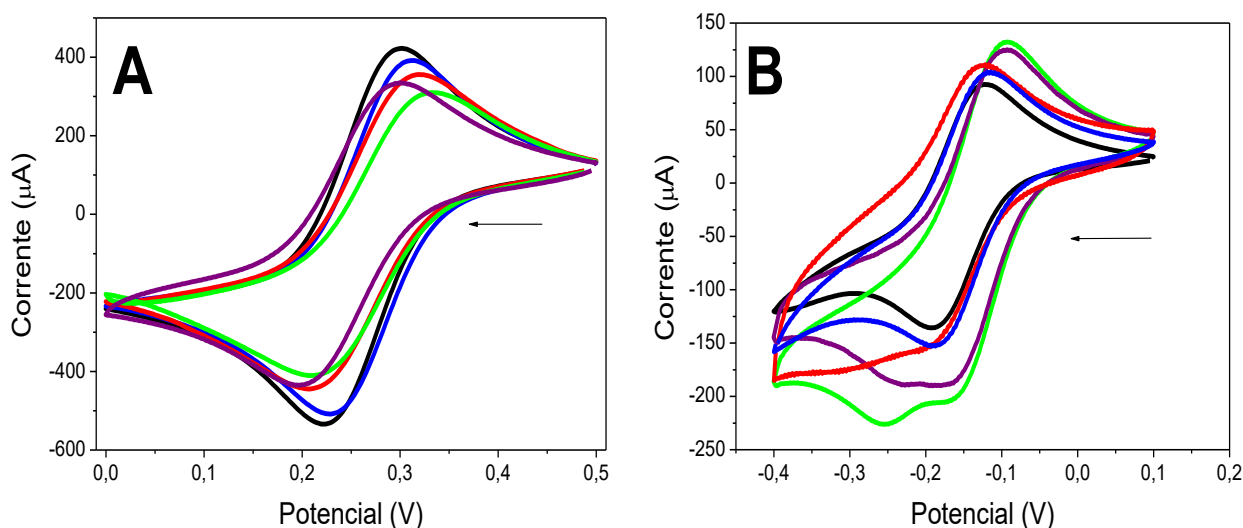
O estudo da eletro-oxidação do AAHB em diferentes valores de pH da solução do monômero fez-se necessário, uma vez que o pH é uma variável determinante das propriedades e características dos materiais eletropolimerizados.

Assim foram aplicados ciclos de potencial em eletrodos de grafite em soluções do monômero em valores de pH de 0,25; 3,5; 7 e 12 ajustados com uma solução concentrada de NaOH, sendo:

- a) pH 0,25 extremamente ácido e sem ajuste, ou seja, o pH de preparo da solução (ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹);
- b) pH 3,5 na tentativa de iniciar um processo de desprotonação do grupo funcional ácido carboxílico para carboxilato;
- c) pH 7 para desprotonação dos grupos funcionais para obter os grupos carboxilato e amino;
- d) pH 12 extremamente básico, garantindo desprotonação de todos grupos funcionas carboxilato, amino e fenóxido.

À medida que o valor de pH aumenta, ocorre um deslocamento no potencial de oxidação do monômero para potenciais de picos menores, tal como mostrado na Figura 13 A. Indicando uma maior facilidade em retirar elétrons das moléculas de AAHB. Essa facilidade de eletrooxidação, deve-se as alterações eletrônicas causadas pela desprotonação, o que acaba deixando os pares de elétrons mais disponíveis para a reação. Na forma de fenóxido a oxidação ocorre mais facilmente devido a um aumento na densidade eletrônica pela presença de um átomo de oxigênio carregado negativamente, levando ao aumento do efeito de ressonância no anel aromático. Isso corrobora com os resultados de absorbância obtidos, indicando que com a alteração dos valores de pH ocorre uma maior alteração nos grupos funcionais do AAHB, levando a modificação das suas propriedades eletrônicas.

Figura 15 - Voltamogramas cíclicos obtidos sobre os eletrodos de grafite após limpeza (-----) e; modificado após aplicação de 100 ciclos de potencial em solução aquosa de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AAHB a 50 mV s^{-1} , em pH de preparo (-----) pH 0,25, e em pH ajustados com NaOH para: (-----) pH 3,5, (-----) pH 7 e (-----) pH 12, em (A) solução aquosa de ferricianeto de potássio $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ contida em cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e (B) solução aquosa de cloreto de hexaaminorutênio II $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ contida em cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a uma $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$



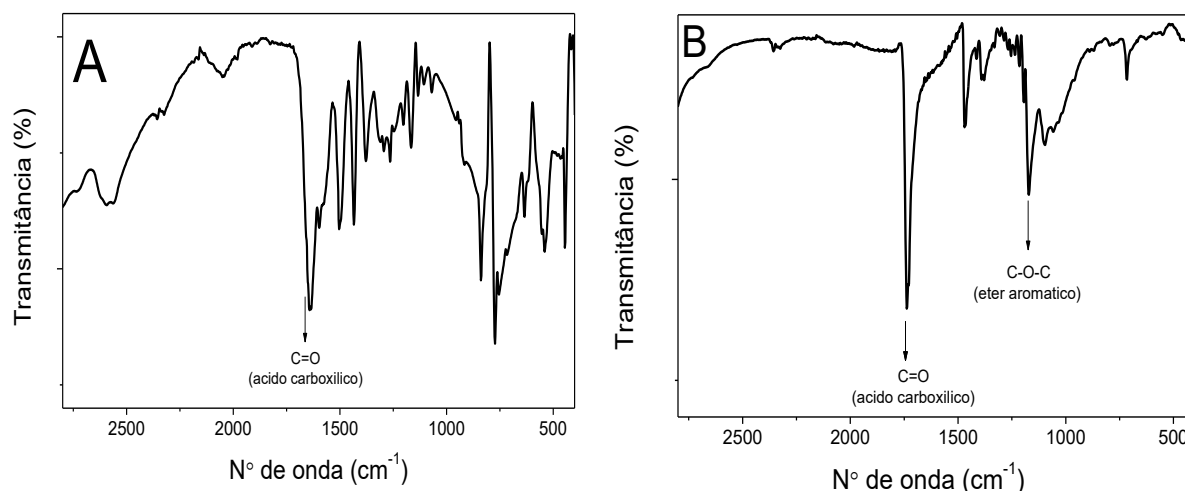
Fonte: Próprio autor

Embora não tenha sido observado grandes alterações nos perfis voltamétricos nas sondas redox, pode-se observar a existência de um filme com respostas eletroquímicas semelhantes na solução contendo o eletrólito suporte com o aumento de pH, porém com valores decrescentes de corrente. Mantendo assim o pH 0,25 o valor padrão para realização do processo de eletropolimerização, uma vez que apresentou maior modificação da superfície, maior reprodutibilidade e também devido a não necessidade de ajuste da solução, sendo este o valor de pH da solução original.

4.5 Espectroscopia de infravermelho do material formado

Para tentar elucidar os tipos de ligação que o monômero realiza para gerar o material imobilizado sobre o eletrodo, foram registrados espectros de infravermelho de amostras extraídas de eletrodos em banho de acetonitrila por ultrassom. O espectro do material obtido por eletropolimerização foi comparado com o do monômero (Figura 16). As considerações para o monômero e o material extraído da superfície do eletrodo foram analisadas de acordo com Pavia, D.L. et al (PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, 2010) e Silverstein (SILVERSTEIN et al., 2005).

Figura 16 - Espectros de infravermelho obtidos do (A) monômero e do (B) material extraído, resolução de 4 cm^{-1} , 64 varreduras.



Fonte: Próprio autor

No espectro de Infravermelho do monômero temos uma complexidade esperada de bandas. Isso porque várias absorções de $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ e $-\text{COOH}$ são similares. A região com bandas largas de média intensidade entre 2500 e 3250 cm^{-1} contém as contribuições de estiramento O-H de ligações de hidrogênio (fenol e ácido carboxílico), e estiramento C-H no anel aromático.

As bandas de média intensidade a 1597 , 1504 e 1435 cm^{-1} são típicas de estiramento C=C de aromático. A banda a 1597 pode ser relacionada também com a deformação angular tipo tesoura (*scissoring*) de N-H. A banda a 1375 cm^{-1} refere-se à deformação angular O-H no plano (fenol). A banda a 1265 cm^{-1} refere-se ao estiramento C-O (fenol). A banda forte a 1643 cm^{-1} refere-se ao estiramento simétrico C=O do ácido carboxílico. Bandas de média intensidade à aproximadamente 843 e 774 cm^{-1} podem ser referentes à deformação angular C-H fora do plano de anéis trissubstituídos nas posições 1,2,4. As bandas relacionadas ao grupo amino, como estiramento C-N normalmente em 1069 cm^{-1} , N-H *wagging* entre $700 - 900\text{ cm}^{-1}$ e deformação angular N-H já mencionada acima são muito pequenas mesmo na anilina, o que, neste espectro, pode ser indício que foram sobrepostas pelas contribuições da hidroxila e da carboxila ficando difícil a análise desse grupo isoladamente (FRANCO, 2007).

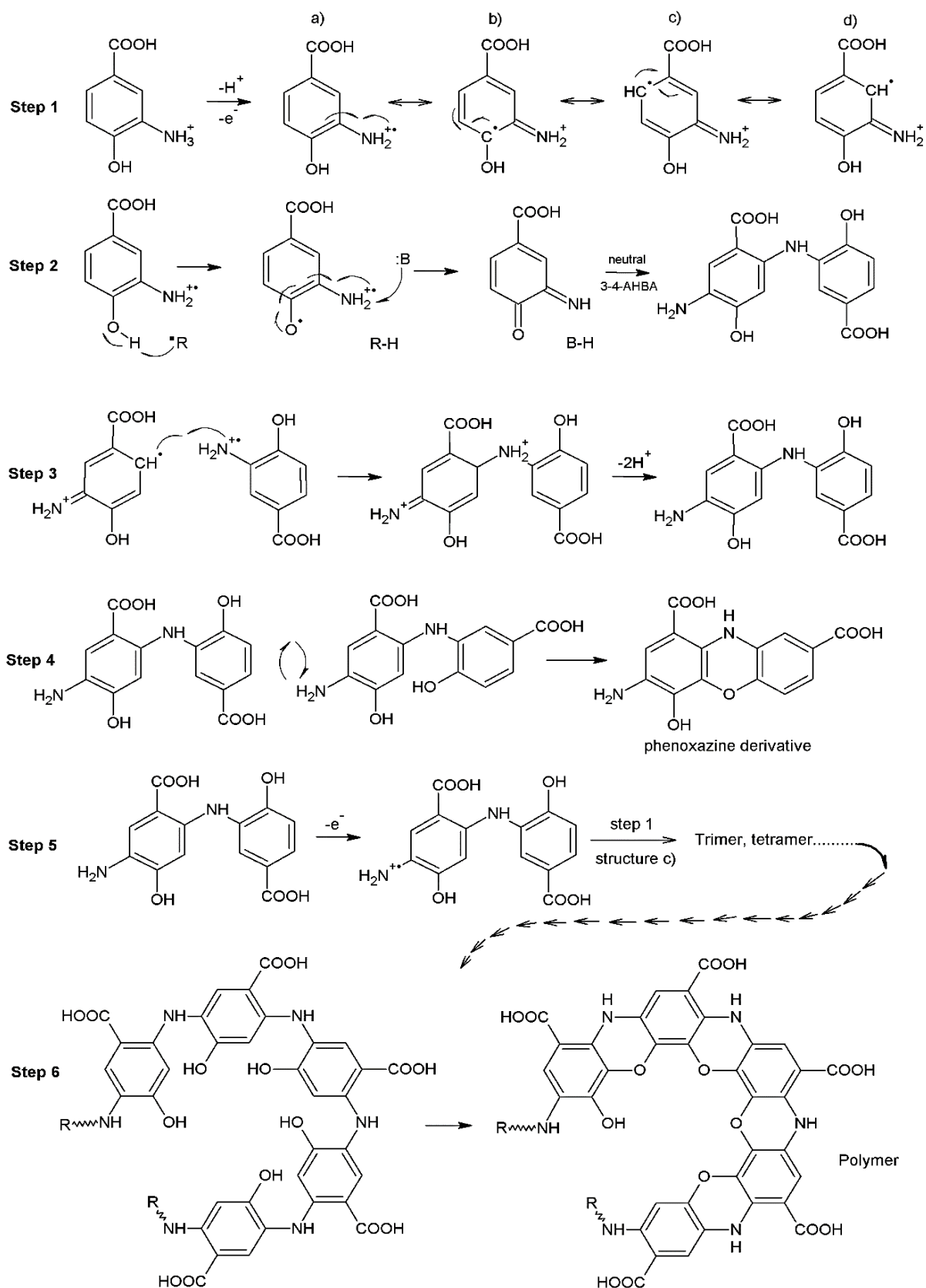
Em relação ao polímero pode-se ver as bandas à 1469 e 1385 cm^{-1} referentes aos estiramentos C=C do anel aromático, preservado na estrutura. Como neste caso, estamos analisando uma macroestrutura complexa (um polímero) algum deslocamento pode ocorrer e gerar as bandas observadas, é evidente o aparecimento do estiramento C=O do ácido carboxílico a 1736 cm^{-1} confirmando que este grupo permaneceu, e seu deslocamento corrobora com a indicação de formação de um novo material polimérico, sugerindo que esse grupo funcional fica livre para posterior uso na ligação covalente da biomolécula.

Além disso é evidente o aparecimento da banda de média intensidade a 1171 cm^{-1} . Esta banda pode estar relacionada ao estiramento simétrico C-O-C, normalmente encontrado entre 1085 – 1150 cm^{-1} , o que garante que o grupo hidroxila não mais exista na forma livre e sim como um éter aromático. Infelizmente as bandas de C-N de aminas primárias, secundárias e terciárias absorvem na mesma região, o que torna difícil prever se o mecanismo de reação ocorre pelo átomo de nitrogênio ou de oxigênio, embora demonstrado anteriormente por outros autores a participação dos grupos amino e hidroxila nos processos de polimerização do 2-aminofenol (BARBERO et al., 1989; ORTEGA, 2000).

4.6 Proposta de mecanismo de polimerização do AAHB

Com base nos dados eletroquímicos e espectroscópicos apresentados e reforçados pela literatura, propõe-se um mecanismo para a eletropolimerização do AAHB, conforme exibido na Figura 17.

Figura 17 - Proposta de mecanismo para eletropolimerização do AAHB.



Fonte: Próprio autor

O estudo voltamétrico em diferentes condições de pH, sugeriu que o mesmo número de elétrons e prótons estão envolvidos na eletrooxidação do monômero. A condição escolhida de formação do polímero para o desenvolvimento do biossensor foi em meio ácido, com um grupo $-NH_2$ protonado. A primeira etapa (*step 1*) do mecanismo proposto está de acordo com esses dados, assim como para o ácido 4-aminossalicílico (CRUZ, DA et al., 2017), a retirada de um elétron e a remoção de um próton gera o cátion radical.

Gonçalves e colaboradores (GONÇALVES et al., 2000) notaram uma mudança de cor na solução durante a eletropolimerização de 2AP e durante o armazenamento prolongado, e à atribuíram à formação de uma benzoquinona-monoamina intermediária. O mesmo foi observado durante a polimerização do AAHB com uma substância acastanhada envolvendo o eletrodo de trabalho, indicando que ocorre a formação do cátion radical.

A segunda etapa (*step 2*) é uma adaptação para o AAHB, e mostra a proposta da formação do dímero através de uma reação química entre o radical ou cátion radical e a estrutura (a) do *step 1*, seguida de uma desprotonação.

Na terceira etapa (*step 3*) se apresenta outra via plausível para a formação do mesmo dímero. O cátion radical formado no átomo de nitrogênio reage com o cátion radical da estrutura (c) do *step 1*, similar ao proposto para 2AP (THENMOZHI et al., 2014). É interessante notar que usando somente a estrutura (c) pode ser gerado o mesmo dímero previsto na segunda etapa (*step 2*). A reação na estrutura (b) é improvável devido à presença de $-OH$ e a estrutura (d) sofre de impedimento estérico entre dois grupos funcionais.

Rotando o dímero para uma conformação diferente na quarta etapa (*step 4*), existe a possibilidade de o grupo $-OH$ se ciclar e formar uma estrutura do tipo fenoxazina. Barbero e Kinimura (BARBERO et al., 1987; KUNIMURA et al., 1988) foram os primeiros a propor a formação desta estrutura como parte da polimerização 2AP, e trata-se de um sistema conjugado devido à sua conformação linear com orbitais p conectados a elétrons deslocalizados. A formação dessa estrutura durante a eletropolimerização do AAHB é importante, pois pode ser uma explicação alternativa para a substância acastanhada ao redor do eletrodo e ser responsável pelos picos redox P3 e P1 da Figura 10. Em primeiro lugar, o potencial redox é menos positivo devido ao aumento do efeito mesomérico quando comparado com a oxidação do monômero. Além disso, Gonçalves e colaboradores (GONÇALVES et al., 2000)

descreveram a fenoxazina como um dímero não polimerizado, o que explica sua ausência na análise da solução contendo apenas o eletrólito suporte. A formação do trímero está provavelmente ocorrendo pelo dímero aberto, tal como descrito na quinta etapa (*step 5*).

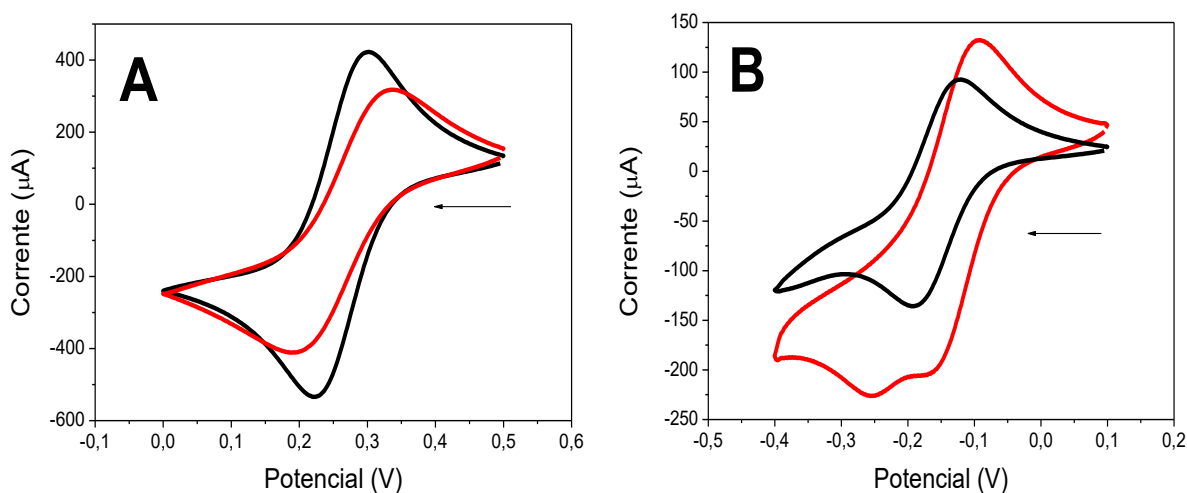
Após um conjunto de reações, a cadeia polimérica é mostrada na sexta etapa (*step 6*) na sua forma aberta não ciclizada (esquerda) e na forma ciclizada (direita). Ambas as estruturas apresentam grupos carboxílicos livres, mas somente na forma ciclizada, é possível explicar os trechos C-O-C observados no espectro infravermelho para o polímero. A linearidade para a cadeia polimérica, ao contrário do poli-(2AP), não é consistente para unidades longas, formando uma estrutura semelhante a um cilindro com um furo no centro, lembrando um ionóforo e oferecendo um polímero poroso. Com menor possibilidade de formar unidades semelhantes à fenoxazina, o polímero não garante uma boa condutibilidade, o que explica as diminuições de corrente nos experimentos realizados utilizando sondas aniônicas e catiônicas em meio de KCl e que será discutido no item 4.7.

Este comportamento do polímero não o limita para ser usado como suporte para desenvolvimento de um biossensor, uma vez que o uso de filmes não-condutores são uma excelente escolha, pois seu crescimento é autolimitado, diminuindo a camada de difusão entre o eletrodo e a biomolécula imobilizada, sendo permi-seletivo, evitando que os interferentes atinjam a superfície do eletrodo (YUQING et al., 2004) e, que adicionalmente, quanto ao poli-(AAHB), apresentará grupos carboxílicos livres, que permitirão realizar as ligações covalentes com as biomoléculas.

4.7 Estudo do comportamento de sondas redox sobre a superfície dos eletrodos de Grafite modificados com poli-AAHB

Até este ponto para a construção dos filmes poliméricos foram usados 100 ciclos de varredura de potencial, e para avaliar a resposta dos eletrodos modificados com poli-(AAHB) foram realizados testes em duas sondas redox: uma aniônica (ferricianeto de potássio) e outra catiônica (cloreto de hexaminorutênio II), ambas em cloreto de potássio, para verificar se houve algum tipo de modificação da superfície dos eletrodos de grafite, através da comparação com os voltamogramas do eletrodo limpo antes da modificação, conforme mostra a Figura 18.

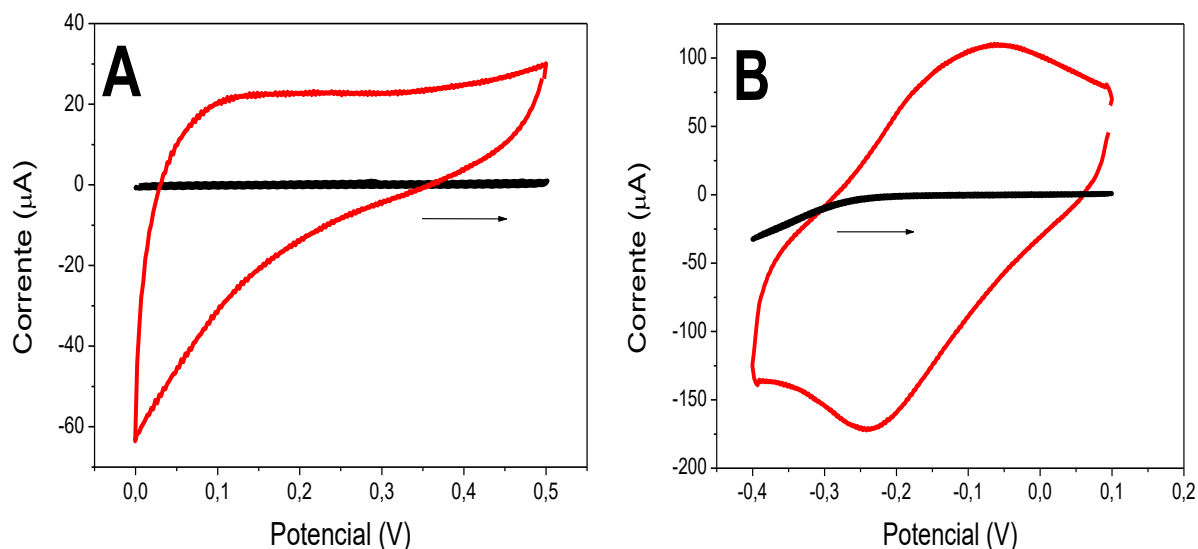
Figura 18 - Voltamogramas cíclicos obtidos sobre os eletrodos de grafite (-----) após limpeza e (-----) modificados após aplicação de 100 ciclos de potencial em solução aquosa de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AAHB a 50 mV s^{-1} , em: (A) solução aquosa de ferricianeto de potássio $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ contida em cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e (B) solução aquosa de cloreto de hexaaminorutênio II $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ contida em cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$



Fonte: Próprio autor

São visíveis as diferenças de corrente antes e após os 100 ciclos, tendo-se um decaimento de aproximadamente 100 µA (em ambas as direções) nos valores em ferricianeto e um aumento de cerca de 40 µA (em ambas as direções) nos valores em hexaaminorutênio (II). Isso sugere uma alteração na superfície do eletrodo que está dificultando a troca de elétrons do eletrodo com a solução de ferricianeto e facilitando a troca de elétrons com a solução de hexaaminorutênio. Porém, ao analisar as respostas de corrente dos eletrodos antes e após a aplicação dos 100 ciclos em solução contendo apenas cloreto de potássio, podemos verificar um grande aumento da resistência em ambas as sondas, conforme mostra a Figura 19.

Figura 19 - Voltamogramas cíclicos obtidos sobre os eletrodos de grafite (-----) após limpeza e (-----) modificados após aplicação de 100 ciclos de potencial em solução de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ contendo $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de AAHB a 50 mV s⁻¹, em solução de cloreto de potássio 0,5 mol L⁻¹ a $v = 100$ mV s⁻¹; Experimentos realizados na janela de potencial adequada ao (A) ferricianeto e (B) hexaaminorutênio II.

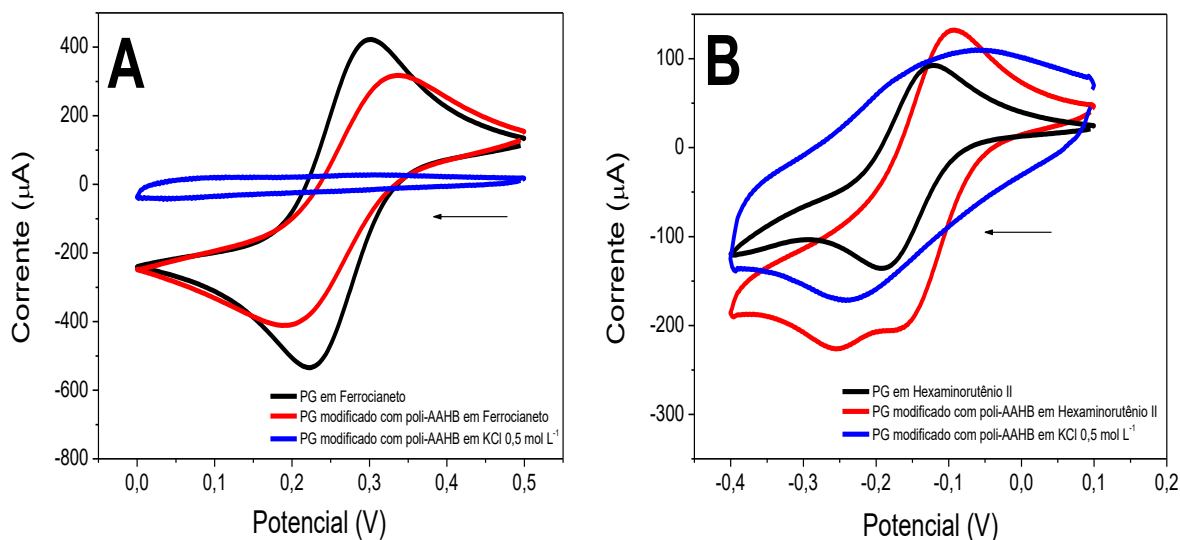


Fonte: Próprio autor

Isso indica que ocorre uma modificação da superfície do eletrodo de grafite com algum material derivado do monômero AAHB, que, agrega uma maior resistência à superfície do filme em meio de cloreto de potássio. Na Figura 19 B pode-se claramente notar a presença de um pico de redução (-0,25 V), que não é visto no eletrodo limpo, o qual também é observado na Figura 18B no mesmo valor de potencial, sendo atribuído à redução do material eletropolimerizado.

Com a finalidade de verificar a resposta referente às sondas aniônicas e catiônicas, e verificar a possibilidade de uso deste material na construção de sensores, as Figuras 20 A e B, indicam que a resposta em meio de eletrólito (KCl) por si só, já interfere no sinal de corrente da sonda redox, correspondente ao hexaaminorutênio. Desta forma, foi escolhido para os demais experimentos o uso da sonda de ferricianeto, na qual há maior variação de corrente entre o eletrólito de suporte e a sonda redox, mantendo a reversibilidade sem interação com o polímero derivado do AAHB, neste intervalo de potencial.

Figura 20 - Voltamogramas cíclicos obtidos sobre os eletrodos de grafite: (-----) Após limpeza e (---) modificados com o material derivado de AAHB em: solução de cloreto de potássio 0,5 mol L⁻¹ contendo: (A) ferricianeto de potássio a 5x10⁻³ mol L⁻¹ e (B) cloreto de hexaaminorutênio II a 5x10⁻³ mol L⁻¹; e (----) Em solução de eletrólito suporte de cloreto de potássio 0,5 mol L⁻¹. Medidas realizadas a 100 mV s⁻¹, nas respectivas janelas de potencial para cada sonda redox.



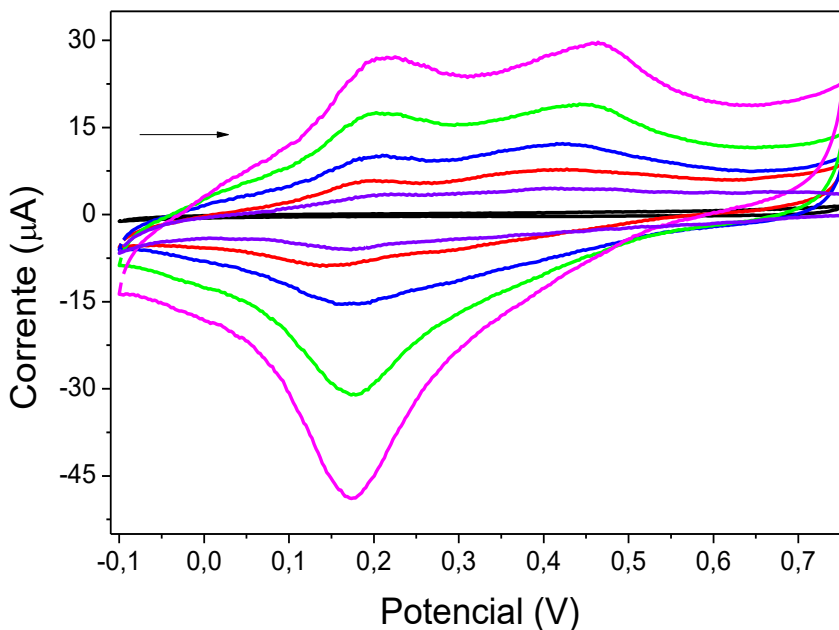
Fonte: Próprio autor

Sendo assim, nota-se que o material polimérico na superfície do eletrodo reduziu a transferência de elétrons do par redox de ambas sondas (catiônica e aniônica), sugerindo que o eletrodo está recoberto com um filme polimérico com características menos condutoras, porém que apesar disso permite às sondas redox uma transferência eletrônica adequada, provavelmente devido a sua porosidade. Sendo mais adequada para a sonda de ferricianeto, cuja molécula é de menor tamanho que a do hexaaminorutênio

4.8 Estudo do número de ciclos para modificação da superfície dos eletrodos de grafite

Assim que foi verificada a possibilidade de uso do PG modificado com poli-(AAHB) usando ferricianeto de potássio em eletrólito suporte de KCl, a seguinte etapa de otimização do sensor foi o estudo do número de ciclos necessários para a modificação da superfície de grafite lapiseira. Os resultados obtidos após crescimento dos filmes usando diferente número de ciclos de varredura de potencial em eletrólito suporte são mostrados na Figura 21.

Figura 21 - Voltamogramas cíclicos obtidos sobre os eletrodos de grafite (-----) após limpeza; (-----) modificado após aplicação de 10 ciclos; (-----) 25 ciclos; (-----) 50 ciclos; (-----) 100 ciclos e (-----) 150 ciclos de varredura de potencial em solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AAHB em solução ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



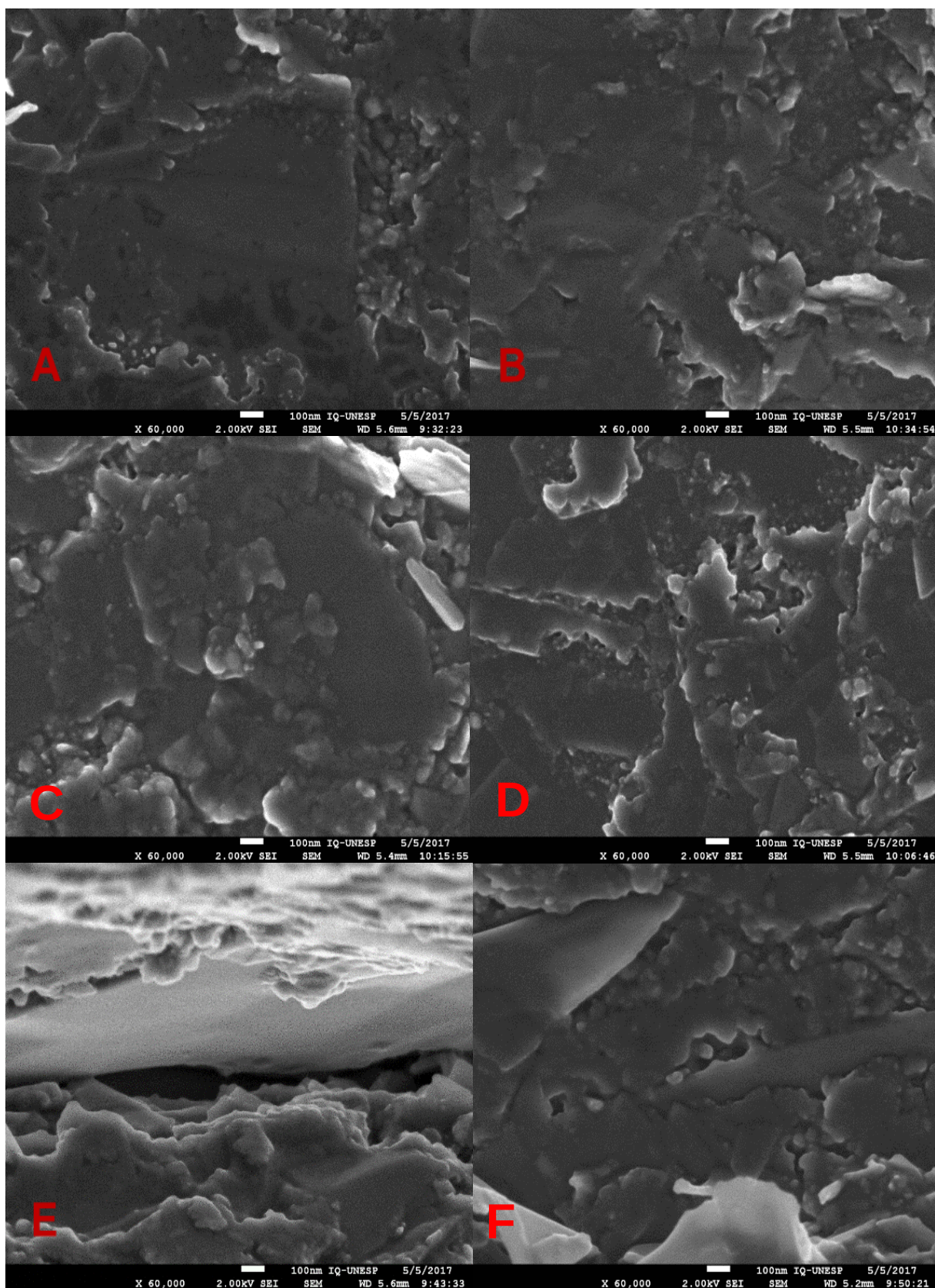
Fonte: Próprio autor

Pode ser observado que o nível de modificação da superfície dos eletrodos de grafite é crescente de acordo com o número de ciclos. Nota-se que com apenas 10 ciclos já é formado material sobre o eletrodo. Assim, para estabelecer o número de ciclos a ser usados na construção dos genossensores, foi realizada a caracterização morfológica dos filmes obtidos.

4.9 Caracterização morfológica dos filmes imobilizados nos eletrodos de grafite através de Microscopia eletrônica de varredura

Para obter uma ideia visual da modificação e estrutura morfológica do material sobre a superfície eletrodica, foram registradas micrografias eletrônicas de varredura (Figura 22) nos eletrodos de grafite de lapiseira limpos antes da modificação e após aplicação de 10, 25, 50, 100 e 150 ciclos de potencial em solução de $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AAHB preparada em ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} .

Figura 22 - Micrografias eletrônicas de varredura de eletrodos de grafite de lapiseira com ampliação de 60.000 vezes: (A) eletrodo limpo e (B) modificado com 10 ciclos, (C) 25 ciclos, (D) 50 ciclos, (E) 100 ciclos e (F) 150 ciclos

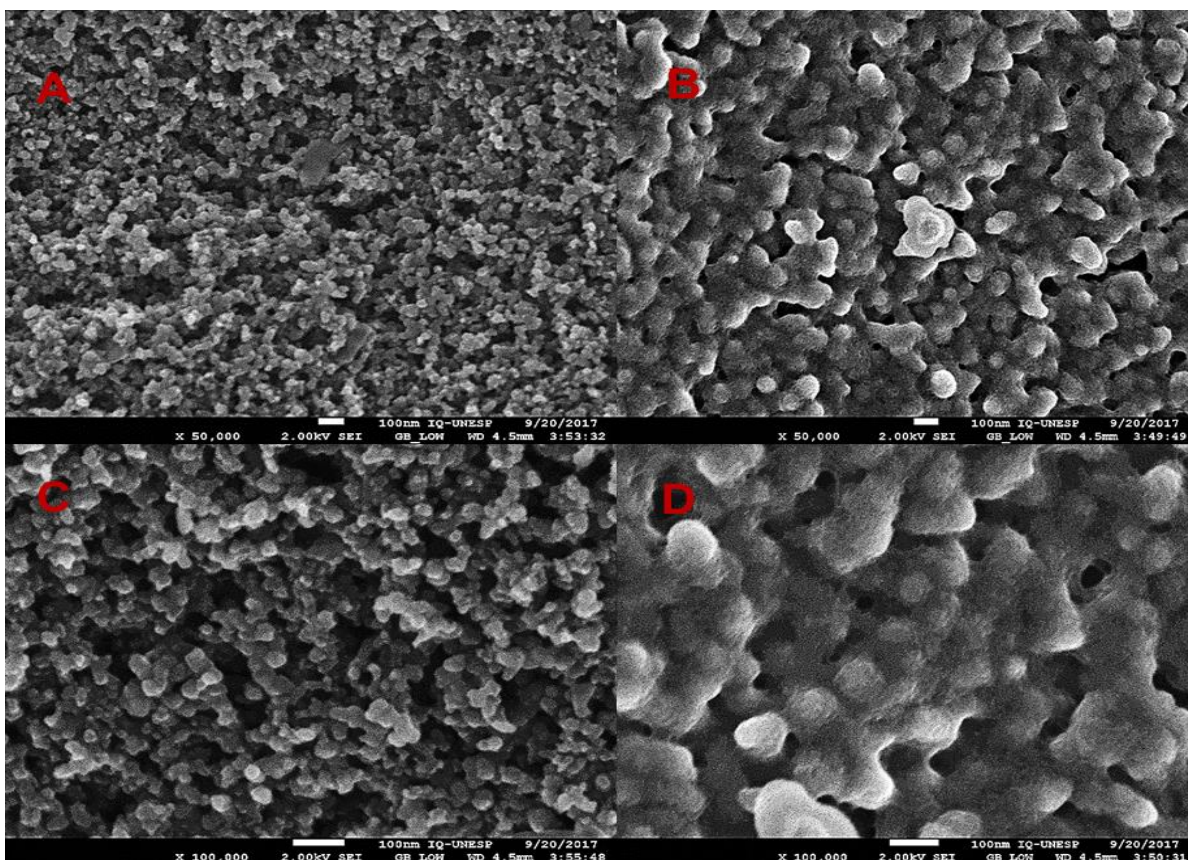


Fonte: Próprio autor

Pode-se observar que o eletrodo de grafite de lapiseira, após passar pelo tratamento manual (lixa d'água e as etapas de sonicação), apesar de não apresentar a rugosidade característica de eletrodos de grafite impressos comerciais, apresenta aspecto irregular, devido à sobreposição de várias camadas de grafite, principalmente após o tratamento mecânico em sua superfície. Porém, ao mesmo tempo, observa-se que o processo de polimerização através de voltametria cíclica com 10, 25 e 50 ciclos não apresentou diferenças visuais significativas. Os aspectos morfológicos de ambas as imagens B, C e D são similares entre si e entre o eletrodo de carbono grafite sem modificação. Já para as imagens em E e F, observa-se indícios de uma morfologia diferente das demais, com uma superfície apresentando uma modificação irregular com o surgimento de pontos amorfos. Porém mesmo assim, não foi possível analisar de forma precisa o recobrimento causado pelo polímero, utilizando esta técnica nos eletrodos de grafite de lapiseira.

Numa tentativa de avaliar qual é a morfologia do material depositado de poli-(AAHB), filmes foram eletrodepositados na superfície de eletrodos comerciais impressos de grafite usando 100 ciclos de varreduras de potencial, e as imagens obtidas são mostradas na Figura 23.

Figura 23 - Micrografias eletrônicas de varredura de eletrodos de grafite com diferentes ampliações: (A) eletrodo limpo e (B) modificado com 100 ciclos em ampliação de 50.000 e (C) eletrodo limpo e (D) modificado com 100 ciclos em ampliação de 100.000 vezes.



Fonte: Próprio autor

Pode-se observar que o eletrodo de grafite impresso, apresenta aspecto irregular, devido às camadas de spray da tinta de grafite. Porém, ao mesmo tempo, observa-se que o processo de polimerização através de voltametria cíclica com 100 ciclos (imagem B) apresentou diferenças visuais significativas, é notável uma morfologia diferente, com uma superfície apresentando uma modificação irregular de alto recobrimento sobre a superfície do eletrodo modificado.

Como o objetivo deste trabalho é a modificação do eletrodo com um filme polimérico fino, com a finalidade de diminuir ao máximo possível a barreira difusional e ao mesmo tempo promover uma alta transferência eletrônica, foi escolhido 10 ciclos para a preparação dos filmes e posterior realização dos testes para imobilização dos oligonucleotídeos.

4.10 Estudo da estabilidade do material sobre o eletrodo

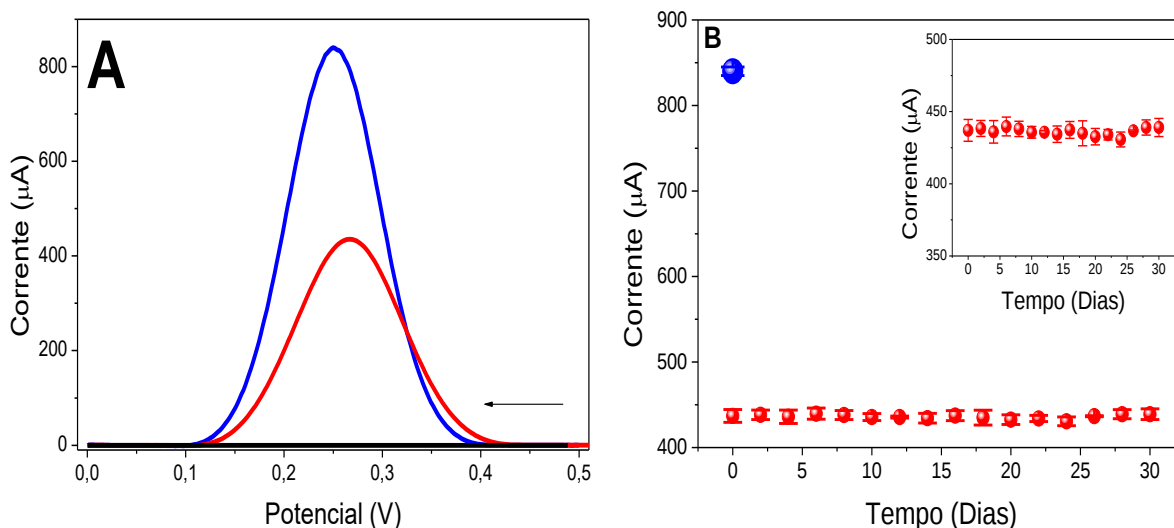
Utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ) em solução de cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo ferricianeto de potássio $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ pode-se verificar com um maior grau de discriminação a diferença das correntes quando comparados o eletrodo limpo e modificado (Figura 24) com 10 ciclos de varredura de potencial, que permitiu obter uma resposta eletroquímica adequada. Vale ressaltar que a técnica de voltametria de onda quadrada, foi utilizada por que apresenta ganhos expressivos nos valores de corrente, pois a sonda redox utilizada apresenta comportamento reversível (SOUZA, DE et al., 2003).

Todos os voltamogramas de VOQ foram corrigidos pela linha de base, utilizando a ferramenta inclusa no software NOVA 2.1.2. Assim, os experimentos mencionados acima foram definidos como padrões para os sistemas, e a semelhança entre as respostas foi avaliada antes da construção do genossensor.

O estudo da estabilidade eletroquímica foi realizado para avaliar se ocorria perda de resposta relativa ao polímero. Foi realizado um estudo em triplicata avaliando a estabilidade do polímero com tempo de armazenagem. Os eletrodos modificados foram armazenados à temperatura de $-8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período de 30 dias. O perfil de corrente por tempo foi avaliado na Figura 24B.

A tendência mostra a queda na resposta de corrente de três eletrodos após a modificação com os 10 ciclos, como já descrito anteriormente. Foi observado com o passar do tempo, que o material não sofre grandes alterações, após o armazenamento, o que mostra um material com propriedades similares às iniciais. Dessa maneira, este estudo garante que ao realizar os experimentos de estabilidade dos sensores construídos sobre essa matriz polimérica, as possíveis perdas de resposta não seriam relacionadas com perda da camada polimérica.

Figura 24 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos sobre os eletrodos de grafite (-----) em solução aquosa de cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, (-----) eletrodo limpo e (-----) eletrodo modificado com 10 ciclos de varreduras de potencial os dois últimos em solução de cloreto de potássio $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ contendo ferricianeto a $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Experimentos realizados usando os seguintes parâmetros voltamétricos: $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = -50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. (B) Corrente versus tempo de armazenagem para o eletrodo modificado (•) e o eletrodo limpo (•).

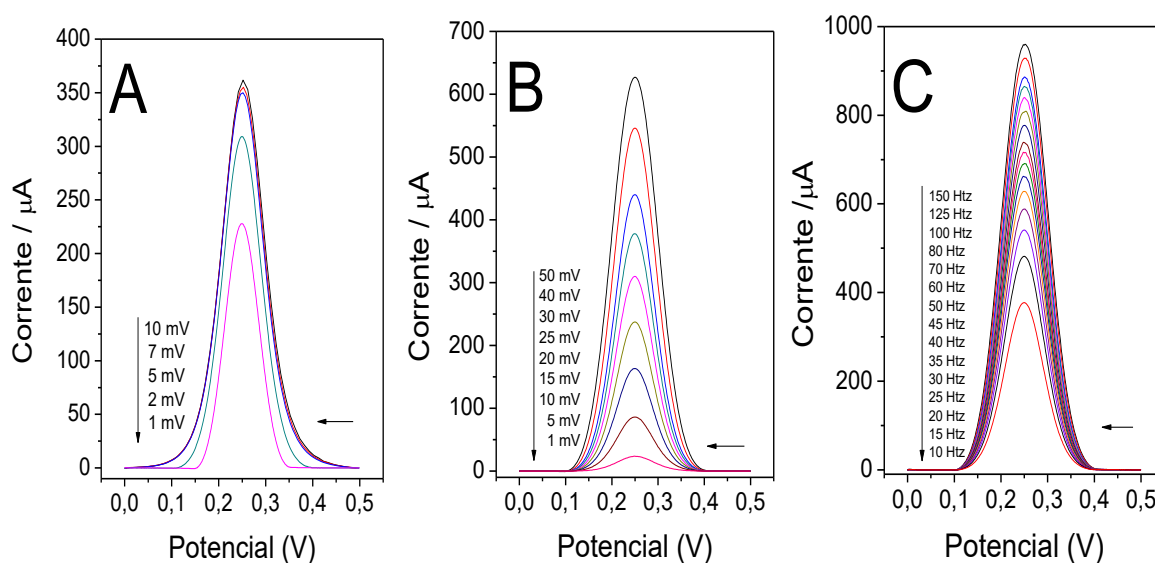


Fonte: Próprio autor

4.11 Otimização de parâmetros (eletro)analíticos da resposta do sensor

Foram realizados experimentos de otimização de alguns parâmetros referentes a técnica de voltametria de onda quadrada e também, a imobilização dos oligonucleotídeos. A Figura 25 mostra os voltamogramas de onda quadrada, nos quais os parâmetros de incremento de potencial (ΔE_s), amplitude de pulso e frequências, foram otimizados, a frequência de aplicação dos pulsos é a responsável pela magnitude do sinal analítico, ou seja, a sensibilidade; a amplitude do pulso de potencial aplicado influencia diretamente no perfil do pico, que tende a ficar mais largo para altos valores de amplitude, e por esta razão são parâmetros relevantes e precisam ser otimizados e avaliados.

Figura 25 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos sobre os eletrodos de grafite em solução de cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo ferricianeto de potássio $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, variando em (A) o incremento de potencial (ΔE_s), em (B) a amplitude de pulso e em (C) a frequências.



Fonte: Próprio autor

Assim sendo, a Tabela 2, mostra os valores dos experimentos de otimização dos parâmetros de voltametria de onda quadrada e as condições escolhidas para realização do trabalho, os quais foram selecionados com base na sensibilidade e seletividade das medidas.

Tabela 2 - Parâmetros eletroquímicos de VOQ estudados e escolhidos para a realização das medidas eletroanalíticas

Parâmetros	Intervalo estudado	Condição escolhida
Frequência (f), s^{-1}	10-150	80
Amplitude de pulso, mV	[1-50]	- 50
Incremento de potencial (ΔE_s), mV	1-10	2

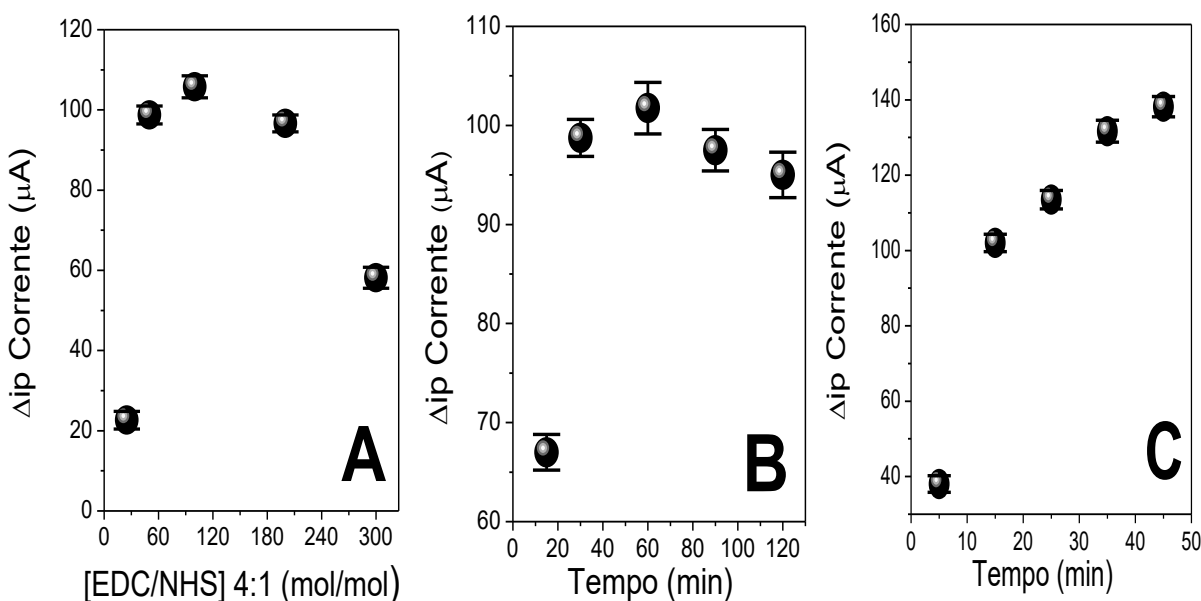
Fonte: Próprio autor

Uma vez otimizados estes parâmetros de voltametria de onda quadrada, seguiu-se para a otimização dos parâmetros para ativação e imobilização dos oligonucleotídeos sobre o eletrodo de grafite modificado com o filme poli(AAHB).

Foi utilizada a proporção 4:1 (molar) de EDC/NHS (FERNANDES, 2015), das diferentes concentrações testadas, conforme mostra a Figura 26A, a concentração de $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de EDC e $1,25 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de NHS foi a ideal para o sistema proposto.

Com a finalidade de realizar o processo de preparo do sensor no menor tempo possível, também foi otimizado o tempo de ativação do filme polimérico em solução de EDC/NHS. Da Figura 26B, pode-se observar que a partir de 30 minutos não há grandes ganhos na ativação, sendo este tempo fixado como padrão para o sistema. Finalmente, o tempo de imobilização do ssDNA aminada, foi fixado em 45 minutos, mesmo que a corrente não tenha atingindo um patamar (Figura 26C), pois em tempos superiores a solução secava, não sendo viável para o sistema.

Figura 26 – Diferença de corrente de pico entre eletrodo de grafite modificado com poli(AAHB) em solução de cloreto de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de ferricianeto de potássio $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, e após a variação dos seguintes parâmetros: (A) variação da concentração e (B) tempo de ativação em EDC/NHS e (C) tempo de imobilização da sequência de ssDNA aminada.



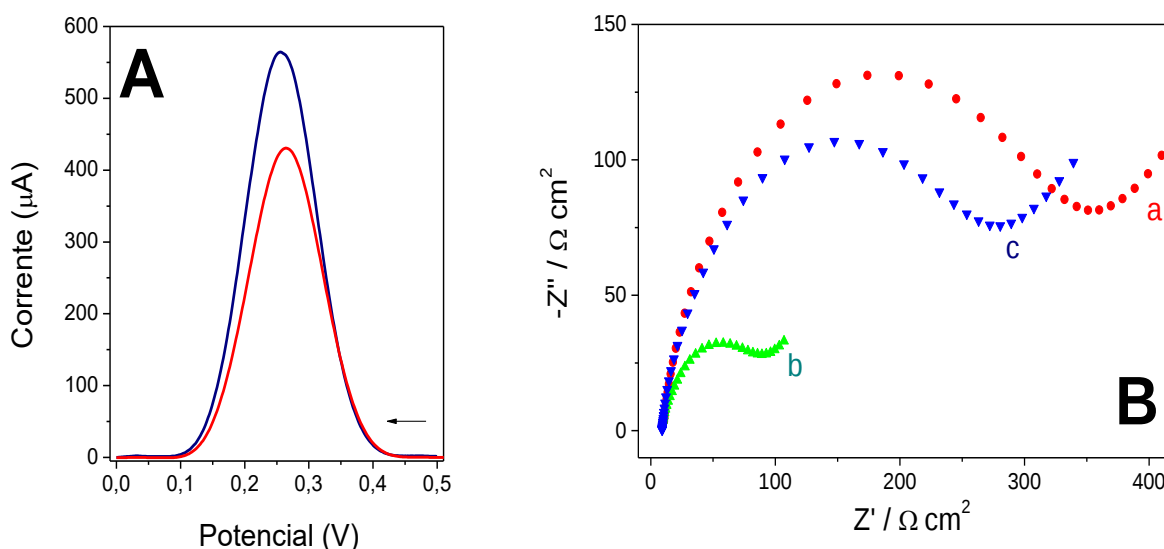
Fonte: Próprio autor

Uma vez otimizados estes parâmetros, seguiu-se para a obtenção dos parâmetros analíticos conforme descrito na seção 3.7.

4.12 Avaliação das características analíticas do genossensor proposto

Após a modificação da superfície do eletrodo de grafite de lapiseira com a eletropolimerização do ácido 3-amino-4-hidroxibenzóico, foram realizadas as imobilizações, hibridizações e as detecções através de Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) em solução de ferricianeto de potássio em meio de KCl, na região de +0,5 e 0,0 V. Duas medidas foram realizadas, com o eletrodo contendo o polímero (PG/PAAHB) ativado por EDC/NHS + ssDNA imobilizado ($6,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), doravante chamado de PG/PAAHB-ssDNA e após hibridização contendo o polímero (PG/PAAHB) ativado por EDC/NHS + ssDNA imobilizado + ssDNA complementar ($6,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), doravante chamado de PG/PAAHB-dsDNA, com o objetivo de se analisar a eficiência da imobilização e hibridização dos oligonucleotídeos. O voltamograma obtido é mostrado na Figura 27A. Adicionalmente, foram realizadas as correspondentes medidas em espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), e o diagrama de Nyquist obtido é mostrado na Figura 27B, o qual mostra as diferenças nas medidas antes e após o processo de hibridização.

Figura 27 – (A) VOQ em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo ferricianeto de potássio a $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para o PG/PAAHB-ssDNA (---) e para o PG/PAAHB-dsDNA (---). Medidas realizadas a $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $\alpha = -50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. (B) Diagramas de Nyquist obtidos para (a) PG/PAAHB, (b) PG/PAAHB + ativação em EDC/NHS e (c) PG/PAAHB-ssDNA em solução aquosa de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo ferricianeto de potássio $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.



Fonte: Próprio autor

O perfil da curva (a) da Figura 27B, pode ser explicado com base no filme polimérico se encontrar com grupos carboxílicos desprotonados (carregados negativamente), o qual causa repulsão da sonda redox de ferricianeto também negativamente carregada mostrando um alto valor para a R_{ct} . Após o processo de ativação do filme polimérico com o EDC/NHS, a superfície do eletrodo se torna neutra (linha b), causando assim uma redução expressiva no valor de R_{ct} , pois permite a chegada e difusão da sonda redox na superfície eletrodica. Finalmente, o valor da R_{ct} volta a se elevar (linha c), quando se ligam as sequências de ssDNA aminadas, que tal como esperado diminui a condutividade da superfície eletrodica.

A diferença entre os picos (Δi_p) do PG/PAAHB-ssDNA e PG/PAAHB-dsDNA foi utilizada para análise do processo de detecção como já relatado na seção 3.7. Assim, foi construída a curva analítica para o genossensor proposto para as diferentes concentrações da sequência de oligonucleotídeo complementar (cDNA) (o qual foi adquirido da Invitrogen®) à imobilizada no eletrodo. A Δi_p foi obtido a partir da subtração da corrente de pico do PG/PAAHB-ssDNA menos a corrente de pico do PG/PAAHB-dsDNA, e estes valores de Δi_p foram plotados versus a concentração do cDNA para graficar a curva analítica mostrada na Figura 28. Para esse experimento, os eletrodos com a ssDNA já imobilizada foram imersos em diferentes concentrações de cDNA e mantidas durante 45 minutos, a temperatura ambiente.

Com a equação que ajustou os dados da curva analítica e usando as equações (3) e (4) foram calculados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram as seguintes:

$$LD = \frac{3 \cdot s^*}{\hat{\beta}_1}$$

equação 3

$$LQ = \frac{10 \cdot s^*}{\hat{\beta}_1}$$

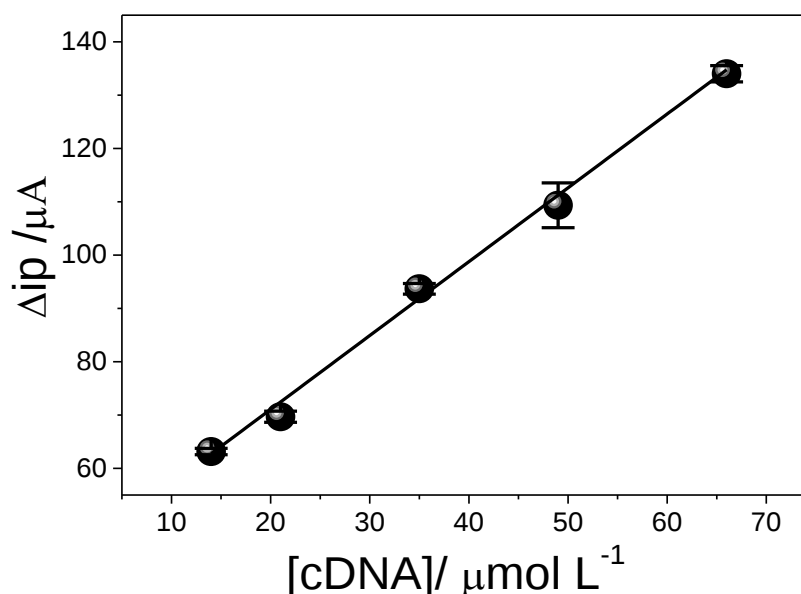
equação 4

Em que:

- $\hat{\beta}_1$ é a inclinação da curva analítica,
- s^* é o desvio padrão de análises feitas no branco.

A resposta do genossensor, para a curva realizada por VOQ (Figura 28), foi linearmente proporcional na faixa de concentração de $1,4 \times 10^{-5}$ a $6,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de Cdna, com $r^2=0,996$.

Figura 28 - Curva de analítica para alvo complementar cDNA de oligonucleotídeo específico do Zika vírus, a diferentes concentrações, sob as condições previamente otimizadas.



Fonte: Próprio autor

A reta da figura anterior e representada pela equação da reta:

$$\Delta i_p (\mu\text{A}) = 43,34 + 1,38x[\text{cDNA}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad \text{equação 5}$$

Sendo o limite de detecção foi de $2,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e o limite de quantificação foi de $7,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, conforme mostra a Tabela 3:

Tabela 3 - Variáveis de desempenho do sensor proposto obtidos a partir da curva analítica da Figura 28.

Parâmetros	Deteção
Faixa linear, $\mu\text{mol L}^{-1}$	14 - 66
LD, $\mu\text{mol L}^{-1}$	2,3
LQ, $\mu\text{mol L}^{-1}$	7,6
r^2	0,996

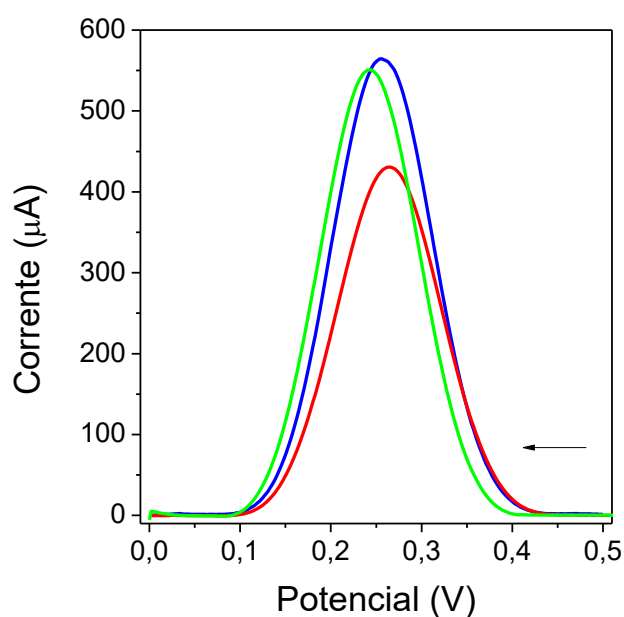
Fonte: Próprio autor.

Estabelecidos os limites de detecção e quantificação do sistema, a seguir foram realizados os testes de seletividade do sensor.

4.13 Seletividade do sensor

Com o intuito de verificar a especificidade da sequência imobilizada na superfície do sensor, foi realizado o estudo da seletividade, utilizando uma sequência não complementar. Assim, após a incubação foram comparadas as respostas obtidas com as mesmas concentrações de oligonucleotídeos complementares e não complementares (Figura 29).

Figura 29 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos em KCl 0,5 mol L⁻¹ contendo ferricianeto de potássio a 5x10⁻³ mol L⁻¹ para (---) PG/PAAHB-ssDNA (---) PG/PAAHB-dsDNA e (---) PG/PAAHB-não complementar. Medidas realizadas em $f = 80. s^{-1}$, $a = -50 mV$ e $\Delta E_s = 2 mV$.



Fonte: Próprio autor

Nota-se, que a diferença de correntes entre as sequências complementar e não complementar é evidente, uma vez que se trata de concentrações iguais. A pequena queda na corrente da sequência não complementar, pode indicar alguma pequena retenção inespecífica.

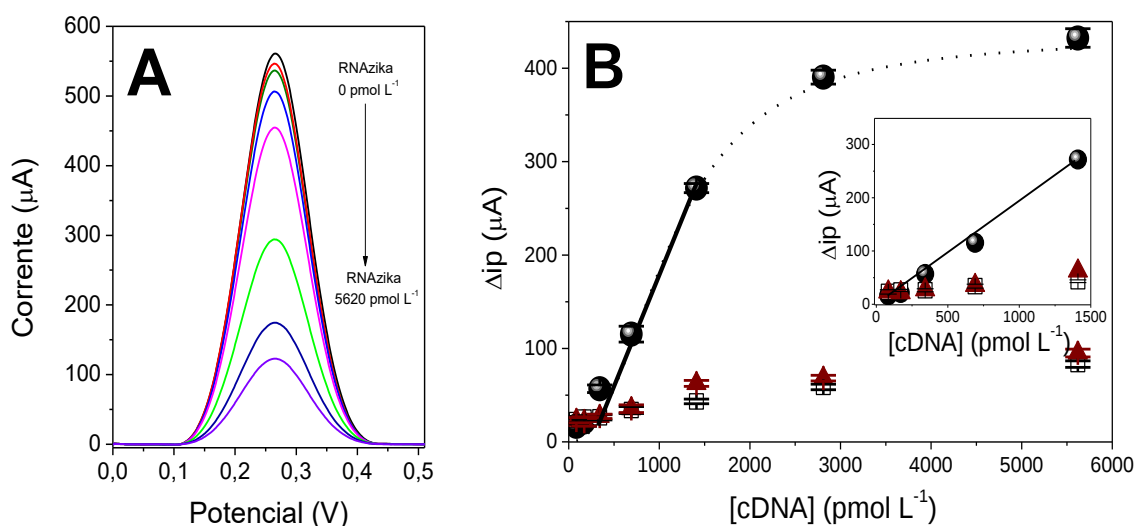
Em busca de verificar as respostas do sistema desenvolvido, em amostras não sintéticas, foram realizados testes com soro humano enriquecido com RNA total extraído de culturas do Zika vírus. Estas amostras foram obtidas em parceria com a

rede “ZIKSENSOR: Rede para desenvolvimento de dispositivos sensores *point-of-care*, de baixo custo e fácil *scale up* para diagnóstico em tempo real do Zika vírus”, coordenado pela Profa.Dra. Rosa Dutra da UFPE - PE. Os experimentos foram realizados nas instalações da UFPE – Recife devido à falta de condições para manipulações de amostras contendo vírus e dificuldades encontradas no transporte dos materiais biológicos até o IQ-Araraquara.

4.14 Curva analítica de soro humano enriquecido com RNA total extraído do Zika vírus

Conforme descrito na seção 3.9, foram realizadas medições para diferentes concentrações de RNA total extraído de culturas do Zika vírus, e a seguir foi construída a curva analítica conforme mostrado na Figura 30.

Figura 30 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo ferricianeto de potássio $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para PG/PAAHB-ssDNA (-----) e PG/PAAHB-RNAzika 84 pmol L^{-1} (---), 171 pmol L^{-1} (---), 342 pmol L^{-1} (---), 691 pmol L^{-1} (---), 141 pmol L^{-1} (---), 2810 pmol L^{-1} (---), 5620 pmol L^{-1} (---). Medidas realizadas em $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = -50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. (B) curva analítica em soro humano enriquecido com (•) RNA-alvo complementar Zika vírus total, (□) RNA total do vírus da Dengue tipo 2 e (▲) RNA total do vírus da Dengue tipo 3 em diferentes concentrações. Inserção: Ampliação na faixa de concentração menor.



Fonte: Próprio autor

Foram calculados o limite de quantificação como menor concentração mensurável e o limite de detecção ($LD = LQ/3,3$). A resposta do genossensor para a

curva realizada foi linearmente proporcional na faixa de concentração de 84,0 a 1410 pmol L⁻¹ de RNA total do Zika vírus, com $r^2=0,997$, apresentando um processo de saturação em concentrações acima desses valores.

Foi obtida a equação da reta:

$$\Delta ip (\mu A) = -7,14 + 0,195x[cDNA] (\text{pmol L}^{-1}) \quad \text{equação 6}$$

Sendo o limite de detecção de 25,4 pmol L⁻¹ e o limite de quantificação de 84,0 x pmol L⁻¹, conforme mostra a Tabela 4:

Tabela 4- Variáveis de desempenho do sensor proposto para amostras de soro humano enriquecido com RNA total do Zika vírus obtidos da Figura 30.

Parâmetros	Detecção
Faixa linear, pmol L ⁻¹	84 – 1410,0
LD, pmol L ⁻¹	25,4
LQ, pmol L ⁻¹	84,0
r^2	0,997

Fonte: Próprio autor

Os resultados obtidos em amostras de soro humano enriquecido com RNA total extraído de culturas do Zika vírus apresentaram ganhos excelentes nos limites de detecção e quantificação, devido a grande diferença no tamanho da sequência sintética de oligonucleotídeo complementar e a sequência RNA total do zika vírus, o que leva a um maior acúmulo de cargas negativas do esqueleto de fosfato do RNA viral, tornando o sistema mais sensível a menores concentrações.

A reprodutibilidade também foi avaliada. Após um conjunto de análises (n = 9 medidas), o desvio padrão foi de 3,1%, comprovando a reprodutibilidade do sistema. Houve pouca diferença, comparado com o sistema contendo RNA total extraído do vírus da Zika, corrente observada para o sistema contendo o RNA total extraído do vírus da Dengue tipo 2 e culturas do vírus da Dengue do tipo 3 indicando a especificidade do sistema.

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

O poli (3-amino-4-hidroxibenzoico) foi formado sobre eletrodos de grafite de lapiseira com sucesso e apresentou semelhanças com o poli(2-aminofenol), o que pôde ser confirmado pelas caracterizações eletroquímicas. O estudo de estabilidade eletroquímica foi comprovado pela baixa perda de atividade em 30 dias de armazenamento.

A análise morfológica da superfície de eletrodos de grafite de lapiseira corrobora os estudos eletroquímicos sobre a modificação das superfícies apresentando um material de característica amorfa e com recobrimento homogêneo.

Foi possível modificar a superfície de eletrodos de carbono grafite com derivados de ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico em solução com valor de pH 0,25 e 3,5. Porém, em valores de pH muito elevados (12, neste caso), mesmo sendo possível de se observar a formação de um cátion-radical, não há confirmação eletroquímica de modificação da superfície.

A incorporação de sequência ssDNA aminada específica do Zika vírus e sua hibridização com o ssDNA alvo complementar (cDNA) foi possível, apresentando ótima respostas podendo ser detectadas através de voltametria de onda quadrada. Já a resposta do sensor para o material genético extraído do Zika vírus mostrou uma maior sensibilidade, devido a que há uma maior repulsão eletrostática de íons ferricianeto, causada pela presença de um maior número de íons fosfatos provenientes dos esqueletos de fosfato presentes na sequência alvo complementar, sendo o limite de detecção $25,4 \text{ pmol L}^{-1}$. O genossensor mostrou ser seletivo contra um alvo não-complementar e em amostras de soro humano enriquecidas com material genético extraído do Dengue vírus tipo 2 e tipo 3.

Capítulo II

**Imunoensaios e métodos de análise rápida,
visando a detecção do Vírus da Zika**

1. INTRODUÇÃO

Na biologia molecular uma das estratégias mas bem sucedidas para análise qualitativa e quantitativa de diferentes analitos é a realização de imunoensaios do tipo ELISA e Fluxo Lateral (Lateral Flow Assays - LFA), os quais baseiam-se no sistema de reconhecimento altamente específico antígeno/anticorpo (YETISEN et al., 2013). Os quais serão descritos a seguir.

1.1 ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent assay*

Conhecido como ELISA, o imunoensaio baseado na ligação antígeno/anticorpo, é vastamente empregado em diversas áreas, como diagnóstico de doenças, detecção de alergias provocadas por alimentação, entre outras. Além de apresentar alta sensibilidade, especificidade e boa reprodutibilidade (CARINELLI et al., 2016). A quantificação do analito pode ser realizada pela marcação enzimática de uma das espécies do par imunológico (antígeno ou anticorpo). Uma vez formado o imunocomplexo na fase sólida e realizada a lavagem do excesso de reagentes, o marcador enzimático fixado na fase sólida pode ser quantificado através da adição dos substratos específicos, a enzima mais utilizada é a peroxidase de raiz forte (HRP), seguida pela fosfatase alcalina (ALP) (SADASIVAM; MANICKAM, 1996).

No caso da HRP, a enzima catalisa a reação redox entre a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e o H_2O_2 . O TMB é oxidado pela HRP na presença de H_2O_2 que é reduzido a H_2O , gerando uma solução de cor azul. A reação é interrompida adicionando ácido sulfúrico e assim a solução muda para cor amarela, desta forma a cor produzida é diretamente proporcional à concentração de HRP anexada aos anticorpos e a medida de absorbância pode ser feita com um espectrofotômetro a 450 nm. Existem diferentes formatos do teste ELISA, sendo os mais comuns:

- **Formato sanduíche**, onde o antígeno é colocado entre dois anticorpos diferentes, um deles imobilizado no suporte sólido enquanto o outro está marcado. O antígeno deve conter pelo menos dois epítomos, portanto, esta técnica é limitada a antígenos multivalentes. O sinal é proporcional à concentração do antígeno na amostra (ALEGRET et al., 2004).

- **Formato competitivo**, depende da competição do antígeno com um “indicador”, que se trata do mesmo antígeno marcado com uma enzima, para o

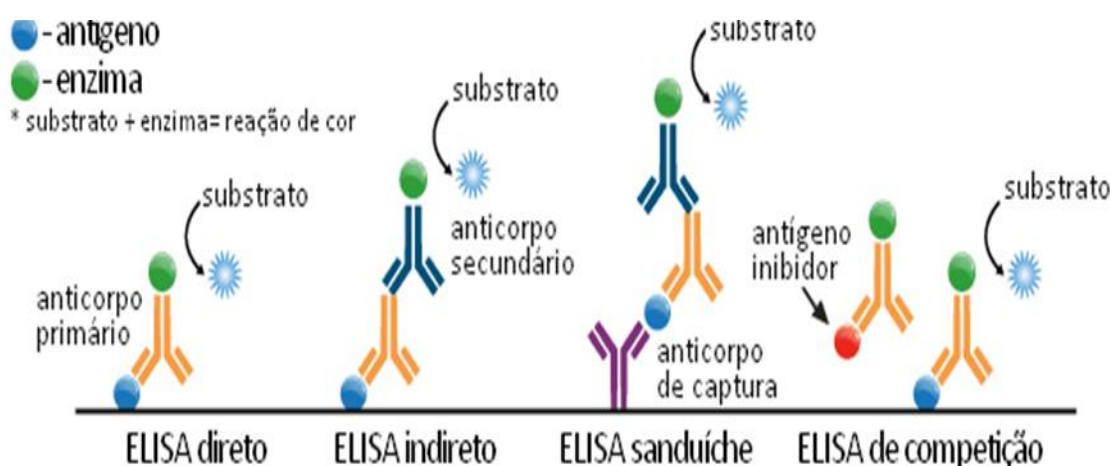
anticorpo imobilizado na superfície. Esta técnica é útil para a quantificação de pequenas moléculas como haptenos. O sinal é inversamente proporcional à concentração do antígeno na amostra (ALEGRET et al., 2004).

- **Formato direto**: o anticorpo específico contra o antígeno é marcado.

- **Formato indireto**: um anticorpo secundário marcado, geralmente policlonal, interage com o anticorpo específico não marcado. Embora isso envolva mais um passo na incubação, a amplificação do sinal e o aumento da sensibilidade são geralmente obtidos com este formato (ALEGRET et al., 2004).

A Figura 31 ilustra os diferentes formatos do teste ELISA, anteriormente exemplificados:

Figura 31 – Diferentes abordagens e formatos de teste ELISA



Fonte: <https://www.biomedicinapadiao.com.br/2010/05/elisa.html>

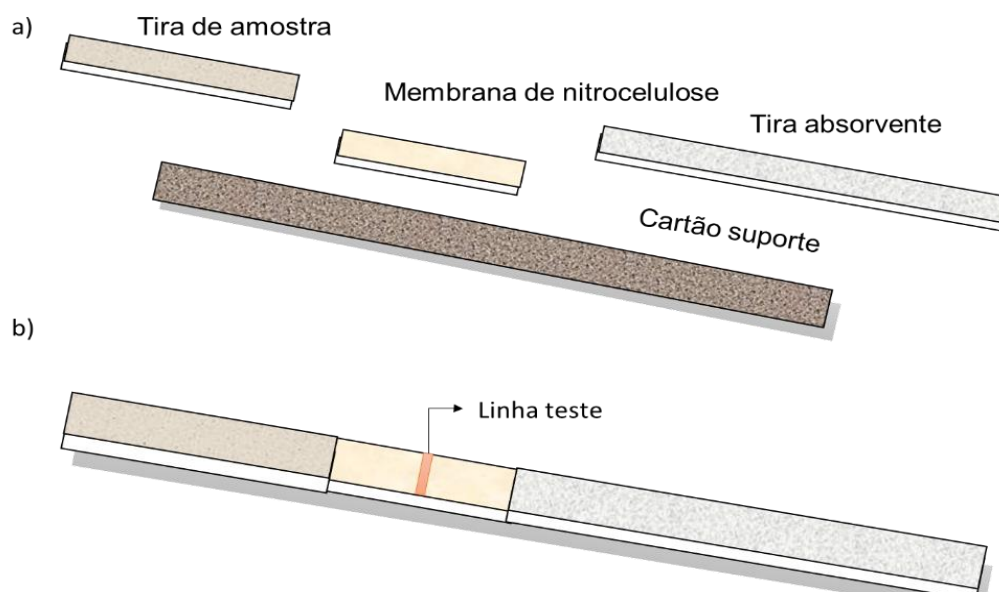
1.2 Ensaio de fluxo lateral

Os LFA são sistemas de análise, para uso em qualquer local; sem necessidade de estar dentro de um laboratório (LEE et al., 2015). Essa possibilidade permitiu que os LFA se tornassem populares, principalmente, em análises clínicas e diagnósticos médicos, devido à velocidade na entrega de resultados, alta sensibilidade, estabilidade, baixo custo e facilidade de uso (WANG et al., 2015).

O dispositivo LFA consiste basicamente em: (i) uma faixa tendo uma ranhura para inserir a amostra; (ii) um compartimento conjugado onde estão as moléculas responsáveis pelo reconhecimento biológico; (iii) membrana de nitrocelulose (pela qual a amostra flui) que contém as linhas de captura (com anticorpos apropriados) e

(iv) uma câmara de faixa absorvente no final (SAJID et al., 2015). A Figura 32, ilustra esquematicamente os constituintes de um tira para teste de fluxo lateral.

Figura 32 - (a) Componentes da tira de fluxo lateral e (b) visão geral de uma tira de fluxo lateral montada e contendo a linha de teste.



Fonte: Próprio autor

Os LFA são divididos em três zonas: zona amostra/conjugada, zona teste e zona reservatório. Na primeira zona correspondente à tira de amostra, pode ser constituída de materiais como, nitrocelulose, nylon ou fibra de vidro e é responsável por receber a amostra e também a solução tampão de análise, e outros componentes. Em seguida, vem a membrana da zona de teste, geralmente constituída por nitrocelulose ou nylon, e é a zona onde um marcador específico ao analito é imobilizado em uma faixa estreita, chamada linha de teste, na membrana. Deste modo, se o analito estiver presente na amostra, o marcador presente na linha se unirá ao analito formando uma linha visível que indica a presença da molécula de interesse, oferecendo um sinal positivo. Assim a intensidade da cor que aparecer na linha de teste será proporcional à concentração do analito presente.

A terceira e última zona é a do reservatório, que é composta por celulose e possui a função de absorver toda solução tampão adicionada para análise e os demais componentes que não reagiram; sendo de extrema importância para impedir que os

reagentes e solventes voltem à tira e ocasionem erros no experimento (BAUMERT; TRAN, 2015).

1.3 Polímeros biomiméticos

Embora os métodos de imunoensaios mencionados acima sejam muito eficazes, algumas dificuldades são encontradas, como pouca robustez devido ao uso de moléculas biológicas - anticorpos e enzimas que são susceptíveis a condições onde ocorre variações bruscas de pH, temperatura, e têm elevado custo (MAHONY et al., 2005). Surge então o interesse em conseguir novos materiais que consigam minimizar ou resolver esses problemas, neste sentido o uso de polímeros impressos molecularmente (MIP) mostram-se altamente promissores como substitutos de biomoléculas, como material de reconhecimento molecular.

Os polímeros impressos realizam o reconhecimento seletivo formando cavidades que são estrutural e funcionalmente complementares ao analito; são também chamados de polímeros biomiméticos, porque simulam o sistema de reconhecimento biológico de afinidade anticorpo/antígeno (TARLEY et al., 2005). Embora a ideia de reconhecimento molecular seja baseada em sistemas biológicos, os MIPs possuem várias vantagens como: baixo custo e fácil preparação; resistência mecânica e térmica; podem ser preparados em várias formas e armazenados por anos sem perda de eficiência.

Recentemente, tem sido relatados na literatura sistemas híbridos formados por MIP recobrimo nanopartículas magnéticas (MMIP), os quais dentre suas principais vantagens é possuir uma alta razão entre a área de superfície e o volume, o que torna as cavidades impressas mais acessíveis ao analito; melhorando a cinética de ligação (POMA et al., 2010). Além disso, após a reação de reconhecimento do MIP magnético com o analito, as partículas podem ser capturadas aplicando um campo magnético; permitindo que uma quantidade maior de analito possa ser extraída da amostra, portanto, havendo um aumento na sensibilidade do ensaio, e o material podendo ser facilmente removido da solução (KUKUSAMUDE et al., 2012).

2. OBJETIVOS

Aplicar o MIP para biotina, sintetizado anteriormente neste grupo de pesquisa (PUPIN, 2017), na construção de um sistema em fluxo lateral, imobilizando-o em fitas de nitrocelulose por oclusão; e utilizando de um MIP-magnético também para biotina em testes de magneto-ELISA, visando analisar o processo de imobilização e hibridação de sequências de oligonucleotídeos biotinilados específicos do Zika vírus.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Magneto ELISA

O kit de substrato para ELISA (tetrametil benzidina – TMB e H_2O_2) foi obtido da Thermo Scientific®, e a biotina-HRP da Fisher Scientific®. Solução $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 (Sigma-Aldrich) e AntiDig-HRP (fragmentos Anti-Digoxigenin POD Fab) foram adquiridos da Roche Diagnostics S.L.

As soluções tampão usadas foram, TRIS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,4 contendo NaCl $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ e 0,05% de Tween® 20 (v/v em tampão TRIS); e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2HPO_4 a pH 7,4 contendo $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl, 0,05% de Tween® 20 e 0,5% de BSA (m/v em tampão PBS).

A sequência de oligonucleotídeo biotinilada (seq1) utilizada foi a:

5'BIO–CACAAGGAGTATGACACGCCCT 3'

A sequência marcada com digoxigenina (seq2) foi:

5'DIG- CACTTGGAAATGTCGCCTGAAAATGGATAAACTTAGATTGA
AGGGCGTGTCATACTCCTTGTG 3'.

Sendo todos esses reagentes adquiridos pela Sigma-Aldrich® e todas soluções preparadas utilizando água Mili-Q.

A Biotina-HRP e os oligonucleotídeos de DNA marcados, nos ensaios magneto ELISA, foram quantificados utilizando espectrofotômetro TECAN Sunrise Infinite M200pro provido com o software Magellan v 4.0, para aquisição dos dados.

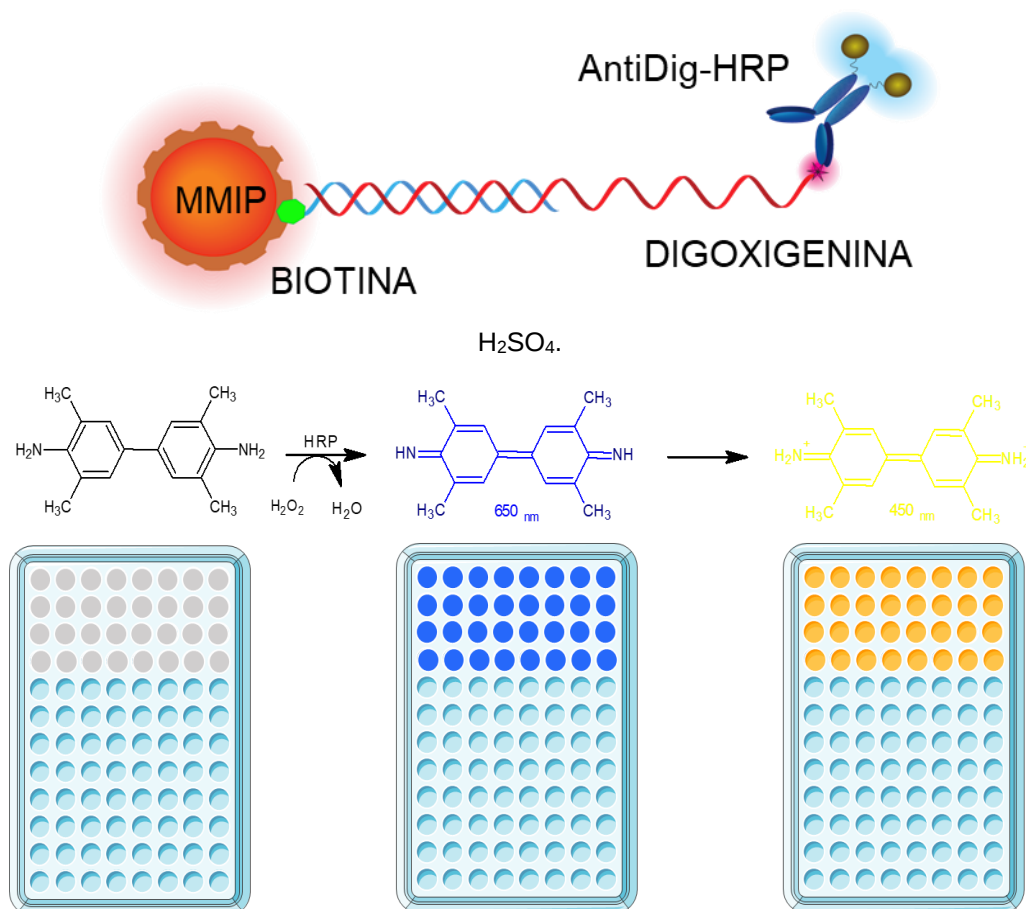
Para desaglomerar as partículas de MIP utilizou-se um sonificador de ponta (SONOPLUS BANDELIN Ultrasonic Homogenizer mini20 com extensão de sonda MS 2.5).

O imunoensaio magnético, foi realizado em uma placa de 96 poços e com quantificação do analito por espectrofotometria na região do visível. O protocolo experimental seguido para realizar os imunoensaios usando os polímeros impressos é descrito a seguir: (i) Adicionou-se $100 \mu\text{L}$ de suspensão de MMIP/MNIP ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ em solução tampão TRIS) por poço; (ii) Após remover o sobrenadante, os poços foram lavados uma vez com solução tampão TRIS; (iii) Os polímeros foram então, incubados com $100 \mu\text{L}$ de solução de oligonucleotídeos biotinilados, previamente incubados para hibridação com sua sequência complementar, marcada

com digoxigenina, sob agitação a 36 °C por 60 minutos (intervalo de concentração entre 0,39 até 200,0 ng mL⁻¹) preparado em solução tampão TRIS e 50 µL de anticorpo (1,5 ng de antiDIG-HRP) durante 1 hora. (iv) O sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com solução tampão TRIS duas vezes; (v) Adicionou-se 100 µL de TMB/H₂O₂ (1:1 v/v) por poço com incubação durante 30 min na ausência de luz e sob agitação mecânica; (vi) A reação foi interrompida com a adição de 100 µL de H₂SO₄ 2,0 mol L⁻¹ e, (vi) Finalmente, a leitura óptica foi realizada medindo-se a absorbância em 450 nm (Figura 33).

Após cada passo de incubação ou lavagem, a placa de 96 poços foi posicionada sob uma placa contendo ímãs para realizar a separação magnética, até a deposição do MMIP no fundo da placa, seguido da separação do sobrenadante. Foi realizada uma adaptação da metodologia utilizada por (PUPIN, 2017).

Figura 33 – Esquema do magneto ELISA e da reação do H₂O₂ catalisada pela enzima HRP utilizando o TMB como um doador de hidrogênio, seguido pela protonação do grupo amino com a adição do



Fonte: Próprio autor.

Para avaliar a qualidade do material seletivo não magnético para aplicação nos sistemas de fluxo lateral foi analisada a retenção de Biotina-HRP utilizando o MIP/NIP não magnético, para isso foram realizadas as seguintes etapas:

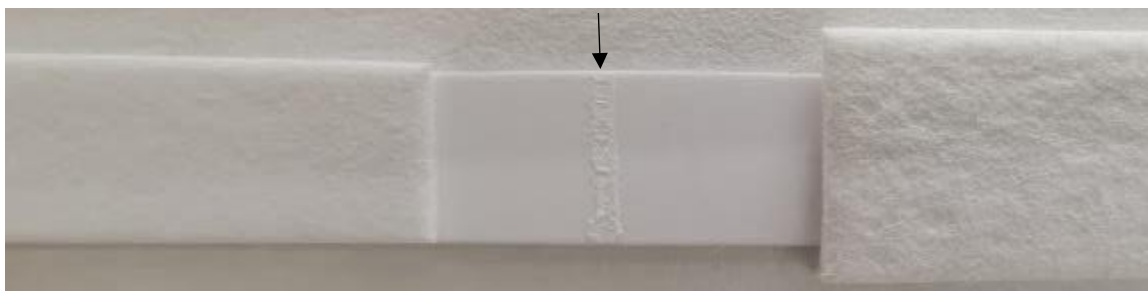
- i) Foram preparadas soluções de Biotina-HRP (100 a 2500 ng mL⁻¹), as mesmas foram colocadas em tubos contendo 5 mg mL⁻¹ de MIP/NIP não magnético. Após 30 minutos de interação os tubos foram levados a uma centrífuga a 10000 rpm e o sobrenadante foi retirado e colocado na placa de 96 poços.
- ii) Adicionou-se 100 µL de TMB/H₂O₂ (1:1 v/v) por poço com incubação durante 30 minutos na ausência de luz e sob agitação mecânica;
- iii) A reação foi interrompida com a adição de 100 µL de H₂SO₄ 2,0 mol L⁻¹ e a leitura óptica foi realizada medindo-se a absorbância em 450 nm.

3.2 Ensaio de fluxo lateral

O compartimento de tira de amostra (*sample pad*) de fibra de celulose foi fornecido pela Millipore. Cartões de suporte (*adhesive backing cards*) foram obtidos da Kenosha C.V. (*Netherlands*), as membranas de nitrocelulose (FF80HP) e as tiras adsorventes (*adsorbent pad*) foram adquiridos pela, GE Healthcare Europe. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com polietileno glicol 4000 (PEG 4000), fornecido pela Sigma-Aldrich®. Utilizou-se como substrato para as reações com HRP, TMB para membranas da Sigma-Aldrich®. Soluções tampão foram preparadas em água destilada: tampão TRIS (como descrito na seção 3.1).

Após realizar-se a montagem das tiras de LF, com o auxílio de uma ponteira (10 µL), levemente depositou-se 5 µL de MIP não magnético (5 mg/mL em tampão TRIS 0,1 mol L⁻¹ pH 7,5), sobre a membrana de nitrocelulose, indicada pela seta na Figura 34. Em seguida foram levadas a estufa a 39 °C, por 30 minutos para secagem do solvente, a membrana foi bloqueada adicionando 5 µL de PEG 4000 (0,2%) e levadas a estufa a 39 °C, por mais 120 minutos.

Figura 34 - Fita de ensaio Lateral Flow contendo linha do MIP já depositado.



Fonte: Próprio autor.

Após, foi adicionado 100 μL da amostra contendo a solução de oligonucleotídeos biotinilados, previamente encubados para hibridação com sua sequência complementar, marcada com digoxigenina, sob agitação a 36 °C por 60 minutos, igualmente, como controle negativo foi adicionado a amostra de oligonucleotídeos biotinilados com sua sequência não complementar, marcada com digoxigenina. Foram realizadas 3 lavagens, adicionando 100 μL de tampão TRIS a cada lavagem.

Então adicionou-se 100 μL de AntiDig-HRP (1,5 ng mL^{-1}) em cada tira. Realizo-se 8 lavagens conforme realizadas no passo anterior. E por fim adicionou-se 5 μL de TMB sobre a linha de MIP/NIP.

Os experimentos de LF utilizando biotina-HRP foram realizados da seguinte maneira:

- (i) 5 μL de uma solução de MIP (5 mg mL^{-1}) foram depositadas na nitrocelulose, sendo a mesma seca por 30 minutos em estufa a 39 °C, após foi adicionado 5 μL de uma solução PEG 4000 a 0,2% para bloqueio e foram novamente deixadas por 2 horas em estufa a 39 °C.
- (ii) Adicionou-se uma mistura contendo 100 μL de biotina-HRP (1500 ng mL^{-1})
- (iii) Foram adicionados 100 μL de solução tampão TRIS oito vezes para eluir a biotina em excesso que não interage com o MIP, por meio da membrana de nitrocelulose;
- (iv) O sistema foi deixado secar, por 30 min;
- (v) Foi adicionado 5 μL de TMB e a cor do sistema foi avaliada.

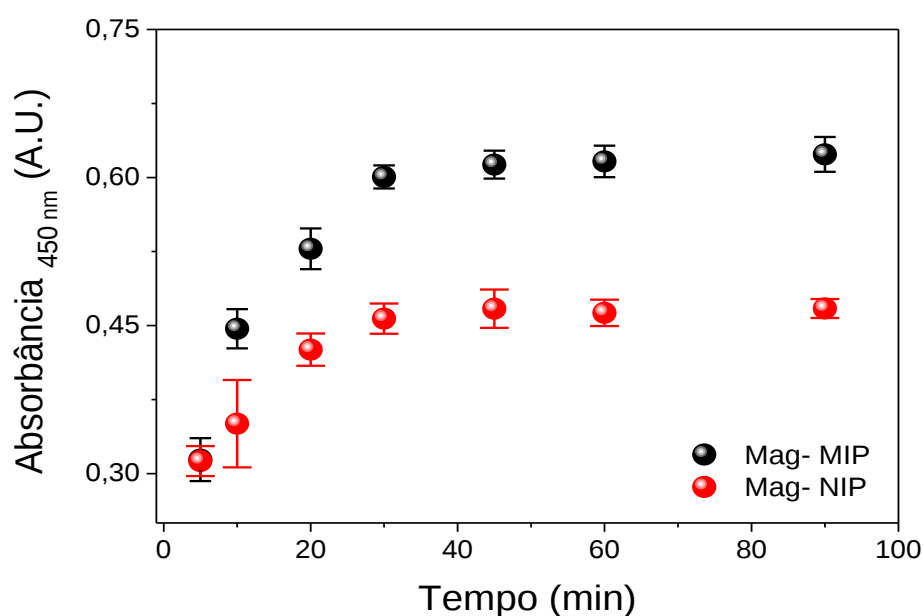
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Magneto ELISA

Os ensaios com os oligonucleotídeos específicos do genoma do vírus Zika, foram realizados utilizando ELISA magnético, como descrito na seção 3.1. A sequência 1 (seq1) marcada na extremidade 5' com biotina para ligação com o MMIP e a outra sequência (seq2) marcada na extremidade 5' com digoxigenina, para realizar a leitura óptica utilizando antiDIG-HRP. O ensaio magnético foi realizado em um passo de incubação e os resultados são comparados para o MMIP e MNIP.

Foram avaliados os tempos de incubação dos oligonucleotídeos com o Mag-MIP/NIP (Figura 35), o qual se observa um comportamento estacionário a partir de 30 minutos. Assim, o tempo de 30 minutos foi estabelecido como ideal, para interação das amostras de oligonucleotídeos com os MMIP/MNIP

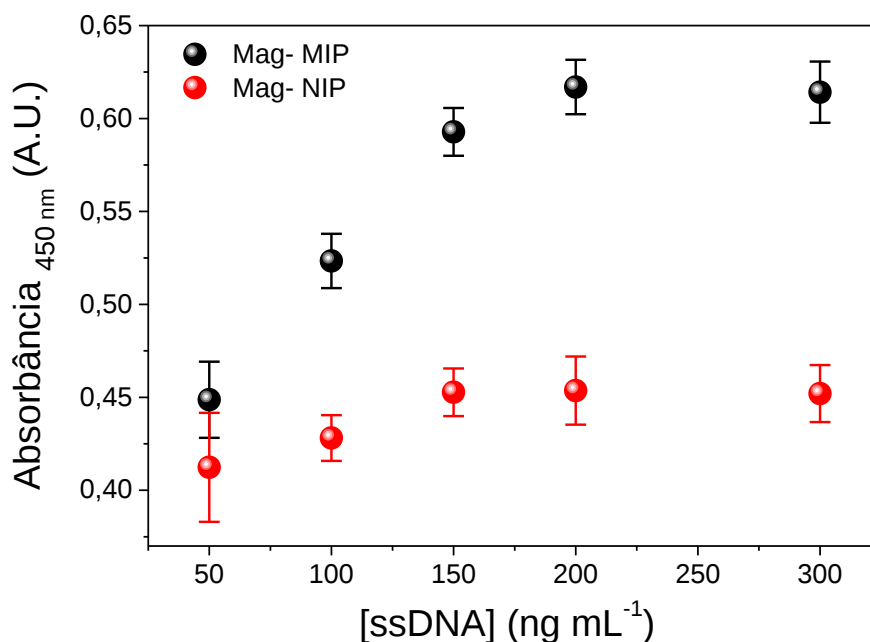
Figura 35 - Ensaio de tempo de ligação do oligonucleotídeo biotinilado com sua fita complementar marcada com digoxigenina nos polímeros magnéticos (5 mg mL^{-1} de MMIP e MNIP) por magneto-ELISA; no intervalo de tempo de 5 a 90 minutos e $1,5 \text{ ng}$ de antiDIG-HRP. Barras de erro ilustram o desvio padrão para as medidas ($n=3$).



Fonte: Próprio autor.

Dando sequência nas otimizações, foi avaliada também a concentração da sequência de oligonucleotídeos biotinilado (Figura 36), sendo encontrado um ponto de saturação na concentração de 150 ng mL^{-1} .

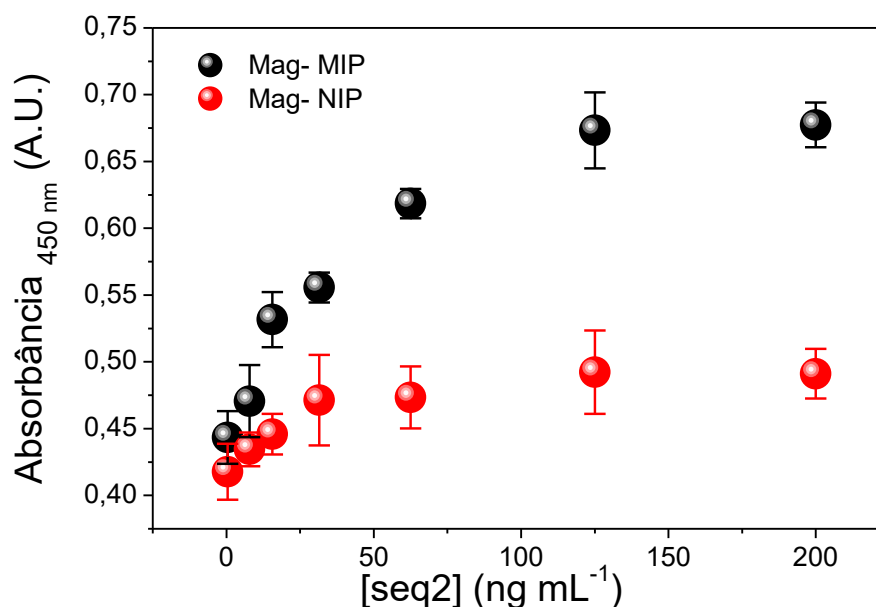
Figura 36 - Ensaio de concentração do oligonucleotídeo biotinilado para ligação no material, com sua fita complementar marcado com digoxigenina nos polímeros magnéticos (5 mg mL^{-1} de MMIP e MNIP) por magneto-ELISA; no intervalo de concentração de 50 à 300 ng mL^{-1} e $1,5 \text{ ng}$ de antiDIG-HRP. Barras de erro ilustram o desvio padrão para as medidas ($n=3$).



Fonte: Próprio autor

A variação da concentração da sequência de oligonucleotídeo alvo (marcada com digoxigenina) é mostrada na Figura 37, e gerou uma curva com crescimento linear entre $0,39 \text{ ng mL}^{-1}$ e $62,5 \text{ ng mL}^{-1}$, o que mostra que o MIP magnético foi capaz de se ligar em uma concentração maior de oligonucleotídeos biotinilados em comparação com o NIP magnético, apresentando diferença no sinal de absorbância para as concentrações; no entanto, o sinal de absorbância para o intervalo de concentração avaliado (de $0,39$ a 200 ng mL^{-1}) apresenta saturação ainda em concentrações baixas.

Figura 37 - Ensaio de oligonucleotídeo biotinilado com a variação da concentração da sua fita complementar marcado com digoxigenina nos polímeros magnéticos (5 mg mL^{-1} de MMIP e MNIP) por magneto-ELISA; no intervalo de concentração de $0,39$ a 200 ng mL^{-1} e $1,5 \text{ ng}$ de antiDIG-HRP. Barras de erro ilustram o desvio padrão para as medidas ($n=3$).



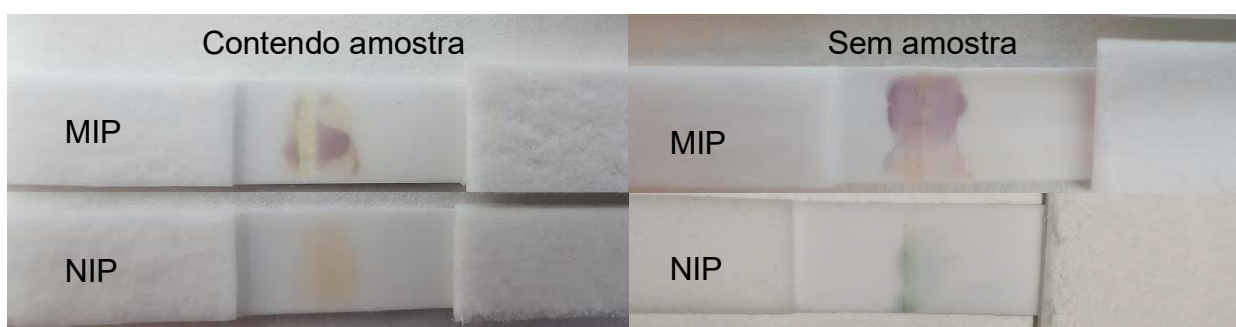
Fonte: Próprio autor.

Os resultados mostram que os MMIP possuem eficiência na captura das sequências de oligonucleotídeos biotinilados e perfeita aplicabilidade no imunoensaio do tipo ELISA, sendo possível detectar diferentes concentrações da sequência complementar marcada com digoxigenina. Entretanto, uma vez que com o MMIP não é possível ver a cor das reações com TMB claramente, pois já possuem uma cor amarronzada, e principalmente elas não fluem facilmente pelas membranas de celulose da tira de LF, os ensaios de fluxo lateral foram realizados utilizando os polímeros não magnéticos (PUPIN, 2017).

4.2 Ensaios de fluxo lateral

O MIP convencional (sem nanopartículas magnéticas) para biotina foi facilmente depositado na membrana, conforme descrito na seção 3.2. Inicialmente realizou-se testes utilizando a amostra (1500 ng mL^{-1}) de oligonucleotídeos.

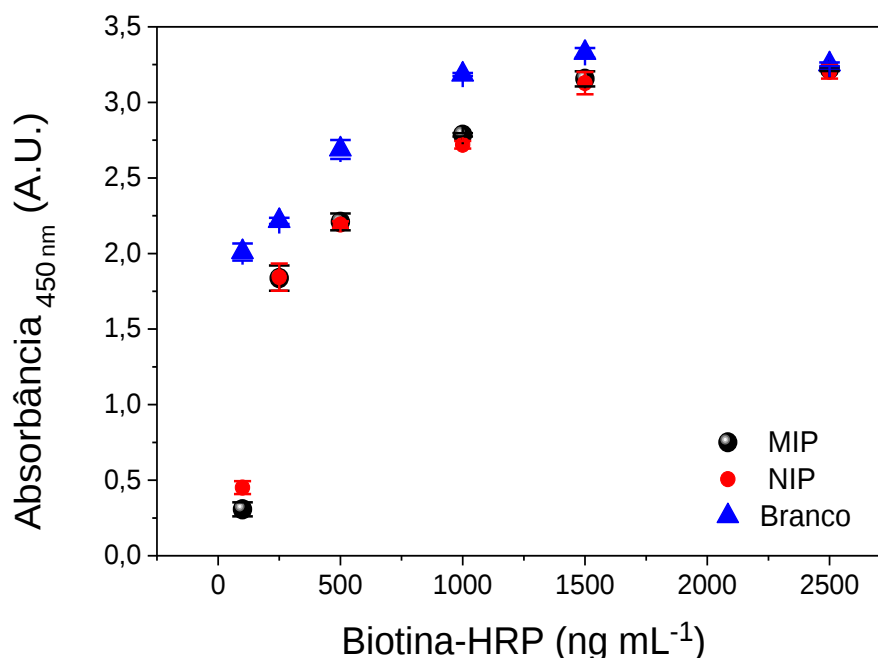
Figura 38 - Fita de ensaio de Lateral Flow contendo MIP/NIP a esquerda (Contendo amostra: Positivo) contendo a sequência de oligonucleotídeo biotinilado com a fita complementar marcada com digoxigenina e a direita (Sem amostra: Negativo) contendo a sequência de oligonucleotídeo biotinilado com a fita não complementar marcada com digoxigenina.



Fonte: Próprio autor.

Como pode-se notar pela Figura 38, o MIP não magnético não apresentou resultados satisfatórios nos testes em fluxo lateral iniciais, ou seja, não foi possível identificar diferenças significativas entre as tiras contendo amostras positivas ou negativas. Assim para avaliar primeiro a qualidade do material usado foi analisada a retenção de Biotina-HRP utilizando o MIP/NIP não magnético, conforme descrito na seção 3.1.

Figura 39 - Ensaio de retenção de biotina- HRP com a variação da concentração (5 mg mL^{-1} de MIP e NIP) por absorbância; no intervalo de concentração de 100 a 2500 ng mL^{-1} . Barras de erro ilustram o desvio padrão para as medidas ($n=3$).

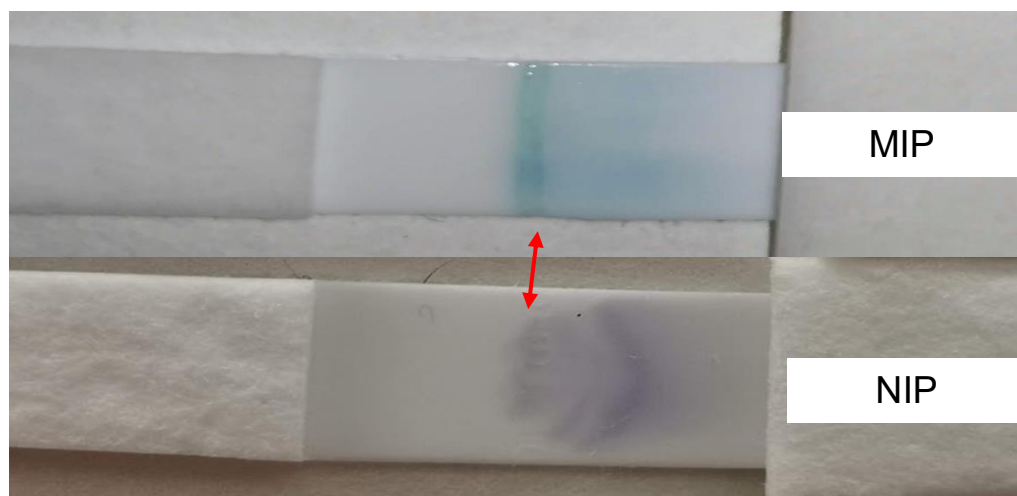


Fonte: Próprio autor.

Como mostra a Figura 39, as diferenças entre MIP e NIP não foram significativas para as concentrações utilizadas, exceto no ponto de menor concentração de biotina-HRP (100 ng mL^{-1}). Possivelmente, os grupos funcionais do NIP interagiram fortemente por ligação não específica com a biotina-HRP. O teste de retenção de biotina-HRP, não apresentou resultados satisfatórios, assim foi realizada uma nova síntese do material (MIP/NIP para biotina) sendo realizada por discentes do grupo de pesquisa da Professora Isabel Pividori, onde se realizou o estágio sanduíche.

Como descrito anteriormente foi analisada a capacidade de retenção de biotina-HRP no sistema de LF e identificou-se uma cor azul com intensidade mais forte (Figura 40) no MIP do que no NIP, indicando melhor retenção de biotina- HRP do MIP.

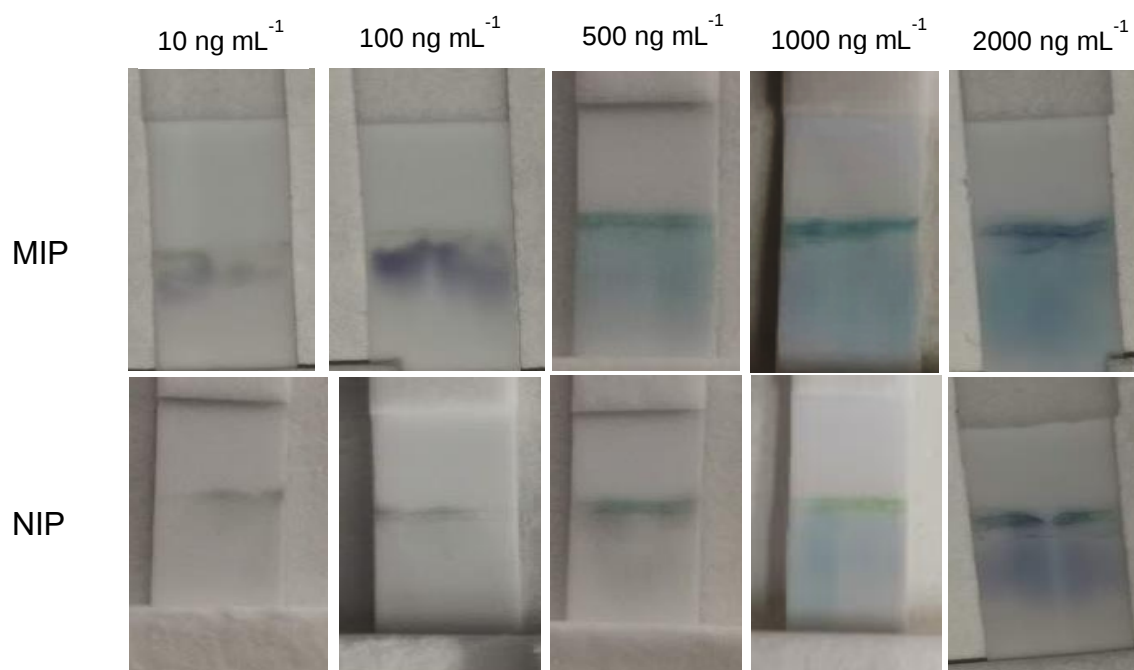
Figura 40 - Fitas de ensaio em Lateral Flow (MIP/NIP) contendo biotina-HRP (1500 ng mL^{-1}).



Fonte: Próprio autor.

Assim, foram realizados novamente os testes contendo os oligonucleotídeos biotinilados, conforme descrito na seção 3.2, variando a concentração da sequência biotinilada (seq 1), entre 10 ng mL^{-1} e 2000 ng mL^{-1} , conforme mostra a Figura 41.

Figura 41 - Fita de ensaio de *Lateral Flow* utilizando MIP/NIP contendo a sequência de oligonucleotídeo biotinilado (10 ng mL^{-1} e 2000 ng mL^{-1}) com fita complementar marcada com digoxigenina (2000 ng mL^{-1}).

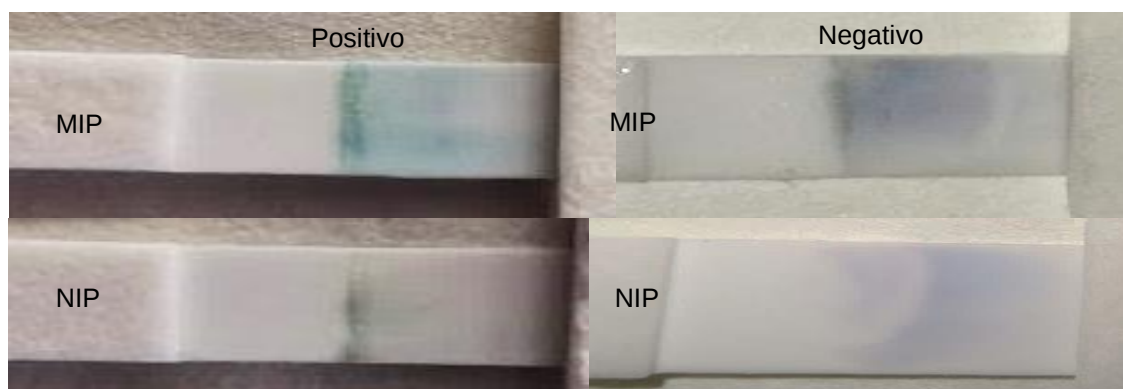


Fonte: Próprio autor.

A cor azul é notável na linha MIP para as concentrações a partir de 500 ng mL^{-1} e para linha NIP, nota-se uma leve coloração azul a partir de 1000 ng mL^{-1} , o que indica que o reconhecimento de MIP pelas sequências de oligonucleotídeos marcados com biotina, e sua sequência complementar marcada com digoxigenina, ocorreu com sucesso.

Assim foi realizado novamente (Figura 42) o teste contendo o controle positivo e o controle negativo, conforme descrito na seção 3.2., utilizando a amostra (500 ng mL^{-1}) de oligonucleotídeos.

Figura 42- Fita de ensaio em Lateral Flow contendo MIP/NIP a esquerda (Positivo) contendo a sequência de oligonucleotídeo biotinilado com a fita complementar marcada com digoxigenina e a direita (Negativo) contendo a sequência de oligonucleotídeo biotinilado com a fita não complementar marcada com digoxigenina.



Fonte: Próprio autor.

Neste ensaio, a cor azul na linha MIP pode ser visualizada com maior intensidade e de modo mais claro do que no primeiro ensaio, realizado. Indicando assim, a efetiva capacidade de retenção dos oligonucleotídeos biotinilados e diferenciação nos sistemas contendo a sequência complementar e não complementar. Portanto, uma vez que o dispositivo de fluxo lateral apresentou bons resultados na detecção de sequências de oligonucleotídeos específicos do genoma do vírus Zika, torna-se possível o desenvolvimento de sistemas para detectar esse tipo de organismo; sendo necessário otimizar as condições de análise (avaliando concentração de DNA e anticorpo, fluxo de solução tampão, concentração de TMB, etc.). Para assim, realizar-se além de uma detecção qualitativa, atingir também uma detecção quantitativa.

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

O polímero molecularmente impresso formado sobre nanopartículas magnéticas, apresentou uma boa compatibilidade para uso em ensaios do tipo magneto ELISA, o MMIP foi capaz de adsorver pequenas quantidades dos oligonucleotídeos biotinilados específicos do genoma do vírus Zika, apresentando diferenciação com o NIP.

Nos sistemas de fluxo lateral o MIP realizou um reconhecimento seletivo, além de serem realizados com muita rapidez; em ensaios com duração máxima de 45 minutos. Portanto, com as otimizações apropriadas, o MIP possui amplo potencial na aplicação de sistemas de fluxo lateral, para desenvolvimento de testes de diagnóstico para o vírus Zika.

6. CONCLUSÃO GERAL

Com base nos resultados, apresentados, o biossensor proposto é muito promissor, uma vez que utiliza oligonucleotídeos como uma interface reconhecível, evitando assim problemas encontrados com imunossensores para o vírus Zika. O sistema oferece as vantagens de baixo custo, um procedimento simples de modificação e excelente reprodutibilidade. O biossensor desenvolvido mostrou seletividade na identificação do material genético do vírus Zika e na diferenciação do vírus da dengue em soro humano enriquecido, os achados deste trabalho indicam a adequação desta plataforma para uso na imobilização de biomoléculas e no desenvolvimento de biossensores. Os imunoenaios do tipo ELISA e Fluxo Lateral, também apresentam grande potencial para desenvolvimento de um kit de diagnóstico, rápido, sensível e específico.

São, portanto, sistemas promissores para análises de amostras reais, particularmente produtos de PCR. Dispositivos que podem diferenciar a dengue do Zika são necessários devido às respostas cruzadas entre os vírus, que são um grande problema para imunossensores.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

A maioria das pesquisas realizadas na área de diagnóstico e terapêutica do vírus Zika, afirmaram que os efeitos adversos da infecção são piores que o esperado (VOGEL, 2016). Portanto, desenvolver um sistema de detecção para detecção, do vírus Zika, em estágios iniciais seria útil para um melhor diagnóstico. Apesar das conquistas significativas, permanece a necessidade de desenvolver novos sistemas de detecção portáteis para detectar seletivamente o vírus Zika em níveis muito baixos (nas concentrações de pmol L^{-1} / fmol L^{-1}). Assim considerando os avanços da pesquisa realizados neste trabalho e as etapas realizadas até então, algumas perspectivas de desenvolvimento e continuidade da pesquisa:

- Ensaios de aplicação e seletividade em diferentes fluidos corporais (por exemplo, sangue, urina, saliva)
- Otimizações nos tempos de detecção, visando um sistema mais rápido, sensível e seletivo.
- Otimização dos sistemas de fluxo lateral utilizando os polímeros molecularmente impressos, que demonstraram enorme potencial no desenvolvimento de ensaios biomiméticos.

REFERÊNCIAS

ALBRECHTSEN, S. **Testing Methods for Seed-Transmitted Viruses: Principles and Protocols**. Copenhagen, Denmark, 2006.

ALEGRET, S.; VALLE, M. DEL.; MERKOÇI, A.; UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA. SERVEI DE PUBLICACIONS. **Sensores electroquímicos : introducción a los quimiosensores y biosensores : curso teórico-práctico**. Universitat Autònoma de Barcelona, 2004.

ALVES, R. DA F.; SILVA, A. G. DA; FERREIRA, L. F.; FRANCO, D. L. Synthesis and characterization of a material derived from 4-mercaptobenzoic acid: A novel platform for oligonucleotide immobilization. **Talanta**, v. 165, n. December 2016, p. 69–75, 2017.

AOKI, H.; BÜHLMANN, P.; UMEZAWA, Y. Electrochemical Detection of a One-Base Mismatch in an Oligonucleotide Using Ion-Channel Sensors with Self-Assembled PNA Monolayers. **Electroanalysis**, v. 12, n. 16, p. 1272–1276, 2000.

BARBERO, C.; SILBER, J. J.; SERENO, L. Formation of a novel electroactive film by electropolymerization of ortho-aminophenol: Study of its chemical structure and formation mechanism. Electropolymerization of analogous compounds. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 263, n. 2, p. 333–352, 1989.

BARBERO, C.; ZERBINO, J.; SERENO, L.; POSADAS, D. Optical properties of electropolymerized orthoaminophenol. **Electrochimica Acta**, v. 32, n. 4, p. 693–697, 1987.

BAUMERT, J. L.; TRAN, D. H. Lateral flow devices for detecting allergens in food. **Handbook of Food Allergen Detection and Control**. p.219–228, 2015.

BOGOCH, I. I.; BRADY, O. J.; KRAEMER, M. U. G.; et al. Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. **The Lancet**, v. 387, n. 10016, p. 335–336, 2016.

CALVET, G.; AGUIAR, R. S.; MELO, A. S. O.; et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 653–660, 2016.

CAMPOS, G.; BANDEIRA, A.; SARDI, S. Zika Virus Outbreak, Bahia Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1881, 2015.

CARINELLI, S.; XUFRÉ, C.; ALEGRET, S.; MARTÍ, M.; PIVIDORI, M. I. CD4 quantification based on magneto ELISA for AIDS diagnosis in low resource settings. **Talanta**, v. 160, p. 36–45, 2016.

CHA, J.; HAN, J. I.; CHOI, Y.; et al. DNA hybridization electrochemical sensor using conducting polymer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, n. 10, p. 1241–1247, 2003.

CHEN, C.; DING, G.; ZHOU, D.; LU, X. Synthesis of poly (aniline-co-3-amino-4-hydroxybenzoic acid) and its enhanced redox activity under highly basic conditions. **Electrochimica Acta**, v. 97, p. 112–119, 2013.

CHONG, Y. C. AND E. AND Y. L. AND S. A Fast, Sensitive and Label Free Electrochemical DNA Sensor. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 34, n. 1, p. 204, 2006.

CLARK, L. C.; LYONS, C. ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, n. 1, p. 29–45, 1962.

COOK, S.; HOLMES, E. C. A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: Flaviviridae) and the evolution of vector transmission. **Archives of Virology**, v. 151, n. 2, p. 309–325, 2006.

CRUZ, F. S. DA; PAULA, F. DE S.; FRANCO, D. L.; SANTOS, W. T. P. DOS; FERREIRA, L. F. Electrochemical detection of uric acid using graphite screen-printed electrodes modified with Prussian blue/poly(4-aminosalicylic acid)/Uricase. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 806, p. 172–179, 2017.

CSIZMADIA, F.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A.; PANDERI, I.; DARVAS, F. Prediction of Distribution Coefficient from Structure. 1. Estimation Method. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 7, p. 865–871, 1997.

CUGOLA, F. R.; FERNANDES, I. R.; RUSSO, F. B.; et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 267–271, 2016.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DIXON, S. L.; JURIS, P. C. Estimation of pKa for organic oxyacids using calculated atomic charges. **Journal of Computational Chemistry**, v. 14, n. 12, p. 1460–1467, 1993.

DRIGGERS, R. W.; HO, C.-Y.; KORHONEN, E. M.; et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 22, p. 2142–2151, 2016.

DU, X.; ZHOU, J. Application of biosensors to detection of epidemic diseases in animals. **Research in Veterinary Science**, v. 118, p. 444–448, 2018.

DUFFY, M. R.; CHEN, T.-H.; HANCOCK, W. T.; et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.

Facts about Microcephaly | CDC. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/microcephaly.html>. Acesso em: 17/9/2018.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika Virus in the Americas - Yet Another Arbovirus Threat. **NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE**, v. 374, n. 7, p. 601–604, 2016.

FAYE, O.; FAYE, O.; DUPRESSOIR, A.; et al. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 43, n. 1, p. 96–101, 2008.

FERNANDES, F. C. . **SUPERFÍCIES CAPACITIVAS E IMPEDIMÉTRICAS COMO PLATAFORMA ELETROQUÍMICA PARA DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES CLINICAMENTE RELEVANTES**. 2015.

FILIPPE, A. R.; MARTINS, C. M. V; ROCHA, H. Laboratory infection with Zika virus after vaccination against yellow fever. **Archiv für die gesamte Virusforschung**, v. 43, n. 4, p. 315–319, 1973.

FRANCO, D. L. Eletropolimerização de aminofenóis para desenvolvimento de biossensores eletroquímicos aplicados à detecção de gene específico para câncer de próstata. , 2007.

FRANCO, D. L.; AFONSO, A. S.; L.F, F.; et al. Electrodes modified with polyaminophenols: Immobilization of purines and pyrimidines. **Polymer Engineering & Science**, v. 48, n. 10, p. 2043–2050, 2008.

GAO, P.; GOSZTOLA, D.; WEAVER, M. J. Surface-enhanced Raman spectroscopy as a probe of electroorganic reaction pathways. 2. Ring-coupling mechanisms during aniline oxidation. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 93, n. 9, p. 3753–3760, 1989.

GONÇALVES, D.; FARIA, R. C.; YONASHIRO, M.; BULHÕES, L. O. S. Electrochemical oxidation of o-aminophenol in aqueous acidic medium: formation of film and soluble products. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 487, n. 2, p. 90–99, 2000.

GORTON, L. (LO). **Biosensors and modern biospecific analytical techniques**. Elsevier, 2005.

GRABAREK, Z.; GERGELY, J. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. **Analytical Biochemistry**, v. 185, n. 1, p. 131–135, 1990.

GUPTA, S.; MURTHY, C. N.; PRABHA, C. R. Recent advances in carbon nanotube based electrochemical biosensors. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 687–703, 2018.

HANLEY, K. A.; MONATH, T. P.; WEAVER, S. C.; et al. Fever versus fever: The role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 292–311, 2013.

HAYES, E. B. Zika Virus Outside Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1347–1350, 2009.

HEALY, D. A.; HAYES, C. J.; LEONARD, P.; MCKENNA, L.; O'KENNEDY, R. Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 125–131, 2007.

HENRY, R. Zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 1090, 2014.

HOFER, U. Viral pathogenesis: Tracing the steps of Zika virus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 401, 2016.

INOCÊNCIO, J. E. M. [UNESP]. Imobilização de peroxidase em filme de titânio. **Aleph**, p. 58 f. : il., 2008.

INTERGROWTH-21st. Disponível em:
<http://intergrowth21.ndog.ox.ac.uk/en/ManualEntry>. Acesso em: 10/1/2019.

JACKOWSKA, K.; BUKOWSKA, J.; KUDELSKI, A. Electro-oxidation of o-aminophenol studied by cyclic voltammetry and surface enhanced Raman scattering (SERS). **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 350, n. 1, p. 177–187, 1993.

KAFKA, J.; PÄNKE, O.; ABENDROTH, B.; LISDAT, F. A label-free DNA sensor based on impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 25, p. 7467–7474, 2008.

KAUSHIK, A.; TIWARI, S.; JAYANT, R. D.; et al. Electrochemical Biosensors for Early Stage Zika Diagnostics. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 4, p. 308–317, 2017.

KAWAGUCHI, H.; SASAKI, K.; UEMATSU, K.; et al. 3-Amino-4-hydroxybenzoic acid production from sweet sorghum juice by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 410–417, 2015.

KEMENY, D. M.; CHALLACOMBE, S. J. **ELISA and other solid phase immunoassays : theoretical and practical aspects**. Wiley, 1988.

KUKUSAMUDE, C.; BURAKHAM, R.; CHAILAPAKUL, O.; SRIJARANAI, S. High performance liquid chromatography for the simultaneous analysis of penicillin residues in beef and milk using ion-paired extraction and binary water–acetonitrile mixture. **Talanta**, v. 92, p. 38–44, 2012.

KUNIMURA, S.; OHSAKA, T.; OYAMA, N. Preparation of thin polymeric films on electrode surfaces by electropolymerization of o-aminophenol. **Macromolecules**, v. 21, n. 4, p. 894–900, 1988.

KUNO, G.; CHANG, G.-J. J.; TSUCHIYA, K. R.; KARABATSOS, N.; CROPP, C. B. Phylogeny of the Genus Flavivirus. **Journal of Virology**, v. 72, n. 1, p. 73 LP-83, 1998.

LANCIOTTI, R. S.; KOSOY, O. L.; LAVEN, J. J.; et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.

LAZEAR, H. M.; DIAMOND, M. S. Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. (T. C. Pierson, Ed.) **Journal of Virology**, v. 90, n. 10, p. 4864–4875, 2016.

LEE, J.-H.; SEO, H. S.; KWON, J.-H.; et al. Multiplex diagnosis of viral infectious diseases (AIDS, hepatitis C, and hepatitis A) based on point of care lateral flow assay using engineered proteinticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 69, p. 213–225, 2015.

LI, C.; XU, D.; YE, Q.; et al. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 1, p. 120–126, 2016.

LI, L.-L.; CAI, H.; LEE, T. M.-H.; BARFORD, J.; HSING, I.-M. Electrochemical Detection of PCR Amplicons Using Electroconductive Polymer Modified Electrode and Multiple Nanoparticle Labels. **Electroanalysis**, v. 16, n. 1-2, p. 81–87, 2004.

LIM, J. M.; KIM, J. H.; RYU, M. Y.; et al. An electrochemical peptide sensor for detection of dengue fever biomarker NS1. **Analytica Chimica Acta**, v. 1026, p. 109–116, 2018.

LIU, A.; WANG, K.; WENG, S.; et al. Development of electrochemical DNA biosensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 101–111, 2012.

LOAIZA, Ó. A.; CAMPUZANO, S.; PEDRERO, M.; PINGARRÓN, J. M. DNA sensor based on an Escherichia coli lac Z gene probe immobilization at self-assembled monolayers-modified gold electrodes. **Talanta**, v. 73, n. 5, p. 838–844, 2007.

LUCARELLI, F.; KICELA, A.; PALCHETTI, I.; MARRAZZA, G.; MASCINI, M. Electrochemical DNA biosensor for analysis of wastewater samples. **Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)**, v. 58, n. 1, p. 113–118, 2002.

LUKKARI, J.; KLEEMOLA, K.; MERETOJA, M.; OLLONQVIST, T.; KANKARE, J. Electrochemical Post-Self-Assembly Transformation of 4-Aminothiophenol Monolayers on Gold Electrodes. **Langmuir**, v. 14, n. 7, p. 1705–1715, 1998.

LUNA, E. J. A. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. **Rev. Bras. Epidemiol**, v. 5, n. 3, p. 229–243, 2002.

MAHONY, J. O.; NOLAN, K.; SMYTH, M. R.; MIZAIKOFF, B. Molecularly imprinted polymers—potential and challenges in analytical chemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 534, n. 1, p. 31–39, 2005.

MARQUES, E. T. A.; WEISS, J. B.; STRAND, M. Molecular characterization of a fucosyltransferase encoded by Schistosoma mansoni. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 93, n. 2, p. 237–250, 1998.

MEANEY-DELMAN, D.; ODUYEBO, T.; POLEN, K. N. D.; et al. Prolonged Detection of Zika Virus RNA in Pregnant Women. **Obstetrics and Gynecology**, v. 128, n. 4, p. 724–730, 2016.

MÉNDEZ, N.; OVIEDO-PASTRANA, M.; MATTAR, S.; CAICEDO-CASTRO, I.; ARRIETA, G. Zika virus disease, microcephaly and Guillain-Barré syndrome in Colombia: epidemiological situation during 21 months of the Zika virus outbreak, 2015–2017. **Archives of Public Health**, v. 75, n. 1, p. 65, 2017.

MERIC, B.; KERMAN, K.; OZKAN, D.; et al. Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue. **Talanta**, v. 56, n. 5, p. 837–846, 2002.

MESSINA, J. P.; KRAEMER, M. U.; BRADY, O. J.; et al. Mapping global environmental suitability for Zika virus. **eLife**, v. 5, 2016.

MILLAN, K. M.; MIKKELSEN, S. R. Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators. **Analytical chemistry**, v. 65, n. 17, p. 2317–23, 1993.

MINASYAN, S. H.; TAVADYAN, L. A.; ANTONYAN, A. P.; et al. Differential pulse voltammetric studies of ethidium bromide binding to DNA. **Bioelectrochemistry**, v. 68, n. 1, p. 48–55, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia e/ou alterações Do Sistema Nervoso Central (Snc). , 2016.

MLAKAR, J.; KORVA, M.; TUL, N.; et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–958, 2016.

MOORE, K. Embriologia Básica. , 2013.

MOTA, M. T. DE O.; TERZIAN, A. C.; SILVA, M. L. C. R.; ESTOFOLETE, C.; NOGUEIRA, M. L. Mosquito-transmitted viruses – the great Brazilian challenge. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 38–50, 2016.

MUSSO, D.; ROCHE, C.; ROBIN, E.; et al. Potential sexual transmission of zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015.

OEHLER, E.; WATRIN, L.; LARRE, P.; et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 9, 2014.

OLIVEIRA, M. D. L.; CORREIA, M. T. S.; DINIZ, F. B. A novel approach to classify serum glycoproteins from patients infected by dengue using electrochemical impedance spectroscopy analysis. **Synthetic Metals**, v. 159, n. 21, p. 2162–2164, 2009.

OLIVEIRA, R. M. L.; VIEIRA, S. N.; ALVES, H. C.; et al. Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: a new matrix for oligonucleotide hybridization. **Journal of Materials Science**, v. 45, n. 2, p. 475, 2009.

OMS. Doença do vírus Zika. **Organização Mundial de Saúde**, v. 2013, n. January, p. 1–5, 2016.

OMS | Microcefalia. **WHO**, 2016.

ORTEGA, J. M. Conducting potential range for poly(o-aminophenol). **Thin Solid Films**, v. 371, n. 1, p. 28–35, 2000.

PALCHETTI, I.; MASCINI, M. Nucleic acid biosensors for environmental pollution monitoring. **Analyst**, v. 133, n. 7, p. 846–854, 2008.

PAVIA, D.L. ; LAMPMAN, G.M. ; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry**. 4th ed. Thomson Learning, 2010.

PENG, H.; SOELLER, C.; CANNELL, M. B.; et al. Electrochemical detection of DNA hybridization amplified by nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 9, p. 1727–1736, 2006.

POMA, A.; TURNER, A. P. F.; PILETSKY, S. A. Advances in the manufacture of MIP nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 12, p. 629–637, 2010.

PUPIN, R. R. Polímeros biomiméticos nanomagnéticos com acesso restrito (RAMIP magnéticos) obtidos por síntese semicovalente e não covalente visando aplicação em imunossensores e imunoensaios Dissertação apresentada ao Instituto de Química , Univ. , 2017.

QI, H.; LI, X.; CHEN, P.; ZHANG, C. Electrochemical detection of DNA hybridization based on polypyrrole/ss-DNA/multi-wall carbon nanotubes paste electrode. **Talanta**, v. 72, n. 3, p. 1030–1035, 2007.

RAGAVAN, K. V; KUMAR, S.; SWARAJ, S.; NEETHIRAJAN, S. Advances in biosensors and optical assays for diagnosis and detection of malaria. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 105, p. 188–210, 2018.

REN, W.; ZHOU, L. Y.; ZHANG, Y.; LI, N. B.; LUO, H. Q. A reusable and label-free supersandwich biosensor for sensitive DNA detection by immobilizing target-triggered DNA concatamers on ternary self-assembled monolayer. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 223, p. 24–29, 2016.

RUBIN, E. J.; GREENE, M. F.; BADEN, L. R. Zika Virus and Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 984–985, 2016.

SADASIVAM, S.; MANICKAM, A. **Biochemical methods**. New Age International, 1996.

SAID, M. I.; RAGEH, A. H.; ABDEL-AAL, F. A. M. Fabrication of novel electrochemical sensors based on modification with different polymorphs of MnO₂ nanoparticles. Application to furosemide analysis in pharmaceutical and urine samples. **RSC Advances**, v. 8, n. 33, p. 18698–18713, 2018.

SAJID, M.; KAWDE, A.-N.; DAUD, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, n. 6, p. 689–705, 2015.

SALAVAGIONE, H. J.; ARIAS-PARDILLA, J.; PÉREZ, J. M.; et al. Study of redox mechanism of poly(o-aminophenol) using in situ techniques: evidence of two redox processes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 576, n. 1, p. 139–145, 2005.

SALAVAGIONE, H. J.; ARIAS, J.; GARCÉS, P.; et al. Spectroelectrochemical study of the oxidation of aminophenols on platinum electrode in acid medium. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 565, n. 2, p. 375–383, 2004.

SHAN, C.; XIE, X.; BARRETT, A. D. T.; et al. Zika Virus: Diagnosis, Therapeutics, and Vaccine. **ACS Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 170–172, 2016.

SILVVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7^a ed. New York, 2005.

SIMPSON, D. I. H. Zika virus infection in man. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 4, p. 335–337, 1964.

SINGHAL, C.; PUNDIR, C. S.; NARANG, J. A genosensor for detection of consensus DNA sequence of Dengue virus using ZnO/Pt-Pd nanocomposites. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 97, p. 75–82, 2017.

SONG, J.; MAUK, M. G.; HACKETT, B. A.; et al. Instrument-Free Point-of-Care Molecular Detection of Zika Virus. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 14, p. 7289–7294, 2016.

SOUZA, D. DE; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. **VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA. PRIMEIRA PARTE: ASPECTOS TEÓRICOS**. 2003.

SUZUKI, H.; OHNISHI, Y.; FURUSHO, Y.; SAKUDA, S.; HORINOUCI, S. Novel benzene ring biosynthesis from C3 and C4 primary metabolites by two enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 48, p. 36944–36951, 2006.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP (Molecularly Imprinted Polymers) em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1076–1086, 2005.

TEIXEIRA, M. G.; CONCEIÇÃO N. COSTA, M. DA; OLIVEIRA, W. K. DE; NUNES, M. L.; RODRIGUES, L. C. The Epidemic of Zika Virus–Related Microcephaly in Brazil: Detection, Control, Etiology, and Future Scenarios. **American Journal of Public Health**, v. 106, n. 4, p. 601–605, 2016.

THENMOZHI, G.; AROCKIASAMY, P.; SANTHI, R. J. Isomers of Poly Aminophenol: Chemical Synthesis, Characterization, and Its Corrosion Protection Aspect on Mild Steel in 1 M HCl. **International Journal of Electrochemistry**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

TUCCERI, R. I.; BARBERO, C.; SILBER, J. J.; SERENO, L.; POSADAS, D. Spectroelectrochemical study of poly-o-aminophenol. **Electrochimica Acta**, v. 42, n. 6, p. 919–927, 1997.

VICTORA, C. G.; SCHULER-FACCINI, L.; MATIJASEVICH, A.; et al. Microcephaly in Brazil: how to interpret reported numbers? **The Lancet**, v. 387, n. 10019, p. 621–624, 2016.

VISCHER, E.; CHARGAFF, E. The separation and quantitative estimation of purines and pyrimidines in minute amounts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 176, n. 2, p. 703–714, 1948.

VOGEL, G. Experts fear Zikas effects may be even worse than thought. **Science**, v. 352, n. 6292, p. 1375–1376, 2016.

WANG, D.-B.; TIAN, B.; ZHANG, Z.-P.; et al. Detection of Bacillus anthracis spores by super-paramagnetic lateral-flow immunoassays based on “Road Closure.” **Biosensors and Bioelectronics**, v. 67, p. 608–614, 2015.

WANG, J. Electrochemical nucleic acid biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 469, n. 1, p. 63–71, 2002.

WANG, J.; KAWDE, A.-N.; SAHLIN, E. Renewable pencil electrodes for highly sensitive stripping potentiometric measurements of DNA and RNA. **Analyst**, v. 125, n. 1, p. 5–7, 2000.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, v. 171, p. 737, 1953.

WU, J.; ZOU, Y.; LI, X.; et al. A biosensor monitoring DNA hybridization based on polyaniline intercalated graphite oxide nanocomposite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 104, n. 1, p. 43–49, 2005.

XU, C.; CAI, H.; HE, P.; FANG, Y. Ferrocenecarboxaldehyde labeled DNA probe for the study on DNA damage and protection. **Fresenius' journal of analytical chemistry**, v. 367, n. 6, p. 593–5, 2000.

XU, C.; HE, P.; FANG, Y. Electrochemical labeled DNA probe for the detection of sequence-specific DNA. **Analytica Chimica Acta**, v. 411, n. 1, p. 31–36, 2000.

YETISEN, A. K.; AKRAM, M. S.; LOWE, C. R. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 12, p. 2210–2251, 2013.

YUQING, M.; JIANRONG, C.; XIAOHUA, W. Using electropolymerized non-conducting polymers to develop enzyme amperometric biosensors. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 227–231, 2004.

ZANLUCA, C.; MELO, V. C. A. DE; MOSIMANN, A. L. P.; et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 569–572, 2015.

Zika Virus | CDC. .Disponível em: <https://www.cdc.gov/zika/index.html>. Acesso em: 14/9/2018.