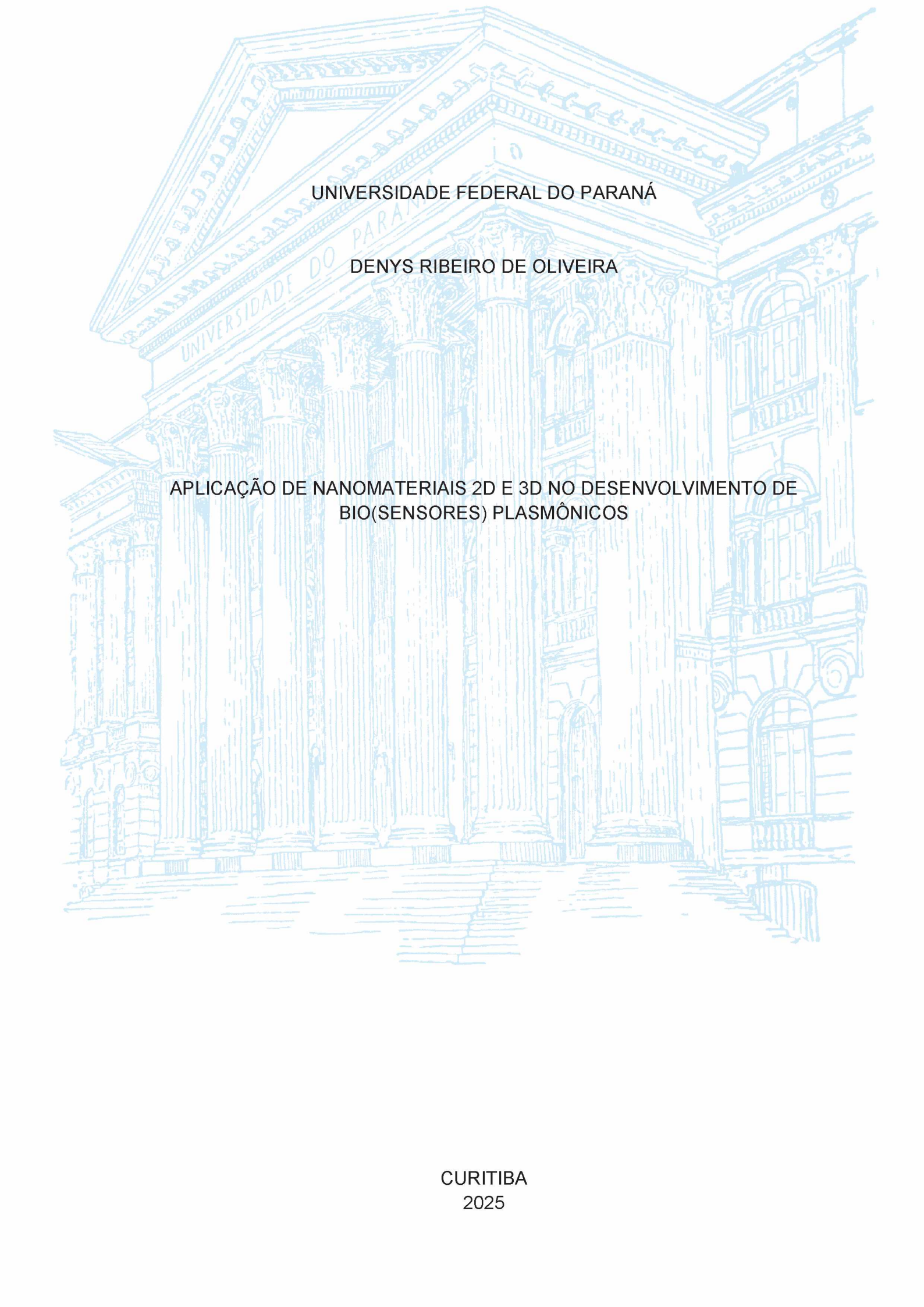




UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DENYS RIBEIRO DE OLIVEIRA

APLICAÇÃO DE NANOMATERIAIS 2D E 3D NO DESENVOLVIMENTO DE
BIO(SENSORES) PLASMÔNICOS

CURITIBA
2025

DENYS RIBEIRO DE OLIVEIRA

APLICAÇÃO DE NANOMATERIAIS 2D E 3D NO DESENVOLVIMENTO DE
BIO(SENSORES) PLASMÔNICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Química (PPGQ), Setor de Ciências Exatas,
Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial à obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Dênio Emanuel Pires Souto

Coorientador: Prof. Dr. Aldo José Gorgatti Zarbin

CURITIBA
2025

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Oliveira, Denys Ribeiro de

Aplicação de nanomateriais 2D e 3D no desenvolvimento de bio(sensores) plasmônicos / Denys Ribeiro de Oliveira. – Curitiba, 2025.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciência Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Dênio Emanuel Pires Souto

Coorientador: Aldo José Gorgatti Zabin

1. Ressonância plasmônica de superfície. 2. Dendrímeros. 3. Dissulfeto de Molibdênio. 4. Dengue. 5. Leishamania infantum. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Souto, Dênio Emanuel Pires. IV. Zabin, Aldo José Gorgatti. V. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **DENYS RIBEIRO DE OLIVEIRA**, intitulada: <!--
StartFragment -->APLICAÇÃO DE NANOMATERIAIS 2D E 3D NO DESENVOLVIMENTO DE BIO(SENSORES) PLASMÔNICOS<!--EndFragment -->, sob orientação do Prof. Dr. DÊNIO EMANUEL PIRES SOUTO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 21 de Março de 2025.

Assinatura Eletrônica

24/03/2025 10:07:48.0

DÊNIO EMANUEL PIRES SOUTO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

24/03/2025 20:18:49.0

MARCELA MOHALLEM OLIVEIRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

24/03/2025 11:20:00.0

HERBERT WINNISCHOFER
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

24/03/2025 11:41:53.0

KAREN WOHNATH
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

Assinatura Eletrônica

24/03/2025 12:53:55.0

FREDERICO LUIS FELIPE SOARES
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico esta tese aos meus amados avós, Olesia, Marcelino e Conceição (in memoriam), e a todos aqueles que acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às minhas amadas irmãs Ana Paula e Josiane, pelo apoio e ajuda incondicionais, à minha mãe Aparecida, aos meus queridos sobrinhos Danyel, Higor, Davi, Samuel e Rebeca, e à minha grande amiga Teresinha, por todo o suporte e carinho, sem os quais este trabalho não teria sido possível

Ao professor Aldo José Gorgatti Zarbin, por abrir as portas do seu laboratório, como ele mesmo diz, sua segunda casa, e por todo o apoio ao longo dessa jornada, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dênio Emanuel Pires Souto, pelas valiosas orientações, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Grupo de Química de Materiais (GQM-UFPR), com quem convivi no laboratório, Amanda, Ana Paula, Anderson Carlos, Ariane, Carla, Eduarda, José, Mari, Maria Caroline, Maria Karolina, Patrícia, Thiago, Victor Hugo, Wagner, pela amizade, trabalho intenso, pelas novas experiências pessoais e profissionais e, principalmente, pelo companheirismo. Agradeço também aos ex-membros do GQM pela amizade.

Aos amigos do Grupo de Cinética e Catálise (GCC), em especial Wiliam, André, Patrícia, Gabriel e Mayara.

Aos professores Hebert Winnishofer, Marcela Mohallem de Oliveira e Karen Wohnrath, por aceitarem o convite para participar da banca examinadora de defesa do doutorado e agradecer desde já pela contribuição ao trabalho.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES, INCT-Nanovida. À Universidade Federal do Paraná - UFPR, ao Departamento de Química da UFPR, e ao Programa de Pós Graduação em Química da UFPR, bem como a todos os funcionários envolvidos, por contribuírem na minha formação e pela dedicação e trabalho árduo. À CAPES pela bolsa de doutorado cedida.

"Se eu fosse eu" parece representar o nosso maior perigo de viver, parece a entrada nova no desconhecido. No entanto, tenho a intuição de que, passadas as primeiras chamadas loucuras da festa que seria, teríamos enfim a experiência do mundo. Bem sei, experimentaríamos enfim em pleno a dor do mundo. E a nossa dor, aquela que aprendemos a não sentir. Mas também seríamos, por vezes, tomados de um êxtase de alegria pura e legítima que mal posso adivinhar. Não, acho que já estou de algum modo adivinhando porque me senti sorrindo e também senti uma espécie de pudor que se tem diante do que é grande demais."

Clarice Lispector

RESUMO

A Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) é uma técnica óptica altamente sensível amplamente utilizada em biossensores. A detecção pode ser realizada em várias configurações, como acoplamento de prisma, sendo a configuração de Kretschmann a mais comumente usada. Nessa configuração, um prisma é empregado para direcionar a luz e acoplá-la a um filme metálico, geralmente ouro, ocorrendo a excitação de plasmons de superfície na interface entre o metal e o meio dielétrico. A sensibilidade e a especificidade do biossensor SPR dependem da estrutura, morfologia e composição do filme metálico. Como o ouro puro exibe baixa adsorção de biomoléculas, a introdução de materiais avançados e otimização de superfície podem melhorar significativamente a imobilização de biorreceptores, permitindo a detecção precisa de moléculas em baixas concentrações. Nesse sentido, monocamadas automontadas (SAMs) de alcanotóis, quando combinadas com sistemas multivalentes como dendrímeros e nanopartículas metálicas, criam condições ideais para imobilização eficaz de biomoléculas. Outra abordagem inovadora envolve o uso de dissulfeto de molibdênio (MoS_2) em sensores SPR, explorando as propriedades de seus nanoflocos bidimensionais como uma plataforma eficiente para imobilização de proteínas via fisissorção. Essa interação ocorre por meio de forças hidrofóbicas entre a proteína e a superfície basal do MoS_2 , eliminando a necessidade de reticuladores e etapas adicionais de biofuncionalização frequentemente exigidas por métodos convencionais. Nos estudos conduzidos, dois sistemas de biossensores SPR foram desenvolvidos. Na primeira etapa, um sensor foi funcionalizado com nanocompósitos de nanopartículas de prata estabilizadas por dendrímeros de poli(amidoamina) (AgDENS), permitindo a imobilização de diferentes biomoléculas e o desenvolvimento de um imunossensor para detectar anticorpos contra *Leishmania infantum* em soro canino. Na segunda etapa, um biossensor foi projetado para a detecção do vírus da dengue, usando a imobilização da proteína EDIII-DENV-1 em um sensor modificado com MoS_2 . Os resultados demonstraram alta seletividade e eficácia na detecção de anticorpos contra a dengue, distinguindo com sucesso entre 10 amostras de soro humano positivas e 10 negativas.

Palavras-Chaves: Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) Dendrímeros, Dissulfeto de Molibdênio; Dengue; *Leishmania infantum*

ABSTRACT

Surface Plasmon Resonance (SPR) is a highly sensitive optical technique widely used in biosensors. Detection can be performed in various configurations, such as prism coupling, with the Kretschmann configuration being the most commonly used. In this configuration, a prism is employed to direct light and couple it to a metallic film, usually gold, occurring the excitation of surface plasmons at the interface between the metal and the dielectric medium. The sensitivity and specificity of the SPR biosensor depend on the structure, morphology, and composition of the metallic film. Since bare gold exhibits low adsorption of biomolecules, the introduction of advanced materials and surface optimization can significantly improve the immobilization of bioreceptors, allowing precise detection of molecules at low concentrations. In this regard, self-assembled monolayers (SAMs) of alkanethiols, when combined with multivalent systems like dendrimers and metallic nanoparticles, create ideal conditions for effective biomolecule immobilization. Another innovative approach involves the use of molybdenum disulfide (MoS_2) in SPR sensor, exploiting the properties of its two-dimensional nanoflakes as an efficient platform for protein immobilization via physisorption. This interaction occurs through hydrophobic forces between the protein and the basal surface of MoS_2 , eliminating the need for crosslinkers and additional biofunctionalization steps often required by conventional methods. In the study conducted, two SPR biosensor systems were developed. In the first step, a sensor was functionalized with nanocomposites of silver nanoparticles stabilized by poly(amidoamine) dendrimers (AgDENs), allowing the immobilization of different biomolecules and the development of an immunosensor to detect antibodies against *Leishmania infantum* in canine serum. In the second step, a biosensor was designed for the detection of dengue virus, using the immobilization of the EDIII-DENV-1 protein on a sensor modified with MoS_2 . The results demonstrated high selectivity and effectiveness in detecting antibodies against dengue, successfully distinguishing between 10 positive human serum samples and 10 negative ones.

Keywords: Surface Plasmon Resonance (SPR); Dendrimers; Molybdenum Disulfide; Dengue; *Leishmania infantum*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DIFERENTES COMPONENTES DE UM BIOSENSOR.....	23
FIGURA 2 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO FENÔMENO DE RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE (SPR). A LUZ PROVENIENTE DA FONTE É REFLETIDA EM UM PRISMA E INCIDE SOBRE UMA FINA CAMADA METÁLICA (AMARELO). EM UM ÂNGULO ESPECÍFICO, DENOMINADO ÂNGULO DE RESSONÂNCIA, OCORRE A EXCITAÇÃO DOS PLASMONS DE SUPERFÍCIE, RESULTANDO EM UMA ABSORÇÃO CARACTERÍSTICA DA LUZ REFLETIDA, FORMANDO UMA BANDA ESCURA NO ESPECTRO REFLETIDO. ESSE PRINCÍPIO É AMPLAMENTE UTILIZADO NA DETECÇÃO DE INTERAÇÕES BIOMOLECULARES EM BIOSSENSORES SPR.	28
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE CISTEAMINA.....	30
FIGURA 4– REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA MOLECULA DE DENDRÍMERO PAMAM DE GERAÇÃO 3 (G3) COM NÚCLEO DIAMINO E 32 GRUPOS AMINO-TERMINAIS. CADA PARTE DA MOLÉCULA REPRESENTADA POR UMA COR É REFERENTE A CADA GERAÇÃO: ZERO (G0), UM (G1), DOIS (G2) E TRÊS (G3)	31
FIGURA 5– ESTRUTURAS POLÍTIPOS DE MoS ₂ , VISTA SUPERIOR E LATERAL LEVEMENTE INCLINADA IDEALIZADAS DE UMA MONOLAMELA DE 2H-MoS ₂	35
FIGURA 6 – (a) IMAGENS DAS SOLUÇÕES OBTIDAS AO FINAL DA SÍNTESE PARA AS DIFERENTES PROPORÇÕES ESTUDADAS SÃO APRESENTADAS. AS BARRAS DE CORES REPRESENTAM AS RESPECTIVAS COLORAÇÕES NOS ESPECTROS CORRESPONDENTES. A BARRA E A CURVA VERMELHAS REPRESENTAM OS AgDENs (1:1), A BARRA E A CURVA ROSAS REPRESENTAM OS AgDENs (10:1) E A BARRA E A CURVA VERDES REPRESENTAM OS AgDENs (20:1). (b) ESPECTRO UV-VIS DOS AgDENs (1:1); (c) ESPECTRO UV-VIS DOS AgDENs (10:1); (d) ESPECTRO UV-VIS DOS AgDENs (20:1).....	46
FIGURA 7 – ESPECTROS UV-Vis DO PAMAM-G3 E DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS POR DENDRÍMEROS (AgDENs) EM DIFERENTES PROPORÇÕES (ANTES E APÓS A REDUÇÃO): (a) PROPORÇÃO 1:1, (b) PROPORÇÃO 10:1, E (c) PROPORÇÃO 20:1.....	48
FIGURA 8 – ESPECTROS DE UV-Vis DO PAMAM G3 (0,05 mmol L ⁻¹) ANTES E APÓS A EXPOSIÇÃO A RADIAÇÃO UV (8W, λ = 256 nm).....	49
FIGURA 9 – ESPECTROS DE UV-VIS DAS NANOPARTICULAS DE PRATA ESTABILIZADAS POR DENDRIMEROS, APÓS A REDUÇÃO E EM DIFERENTES DIAS APÓS A REDUÇÃO, NAS PROPORÇÕES (a) 1:1, (b) 10:1E (b) 20:1.....	50
FIGURA 10 - (a) E (b) IMAGENS DE MET DAS AgDEN (1:1), (c) HISTOGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE AgDEN (1:1), (c) E (e) IMAGENS DE MET DAS AgDEN (10:1), (f) HISTOGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE AgDEN (10:1), (g) E (h) IMAGENS DE MET DAS AgDEN (20:1), (i) HISTOGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE AgDEN (20:1).....	52
FIGURA 11 – PADRÕES DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DAS NANOPARTÍCULAS ESTABILIZADAS POR DENDRÍMERO NAS PROPORÇÕES 1:1, 10:1 E 20:1.....	53

FIGURA 12 – ESPECTROS DE TRANSFORMADA DE FOURIER NO INFRAVERMELHO, MODO DE REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR): (a) PAMAM-G3 E AgDENs ANTES DA REDUÇÃO, E (b) PAMAM-G3 E AgDENs APÓS A REDUÇÃO.....	55
FIGURA 13 – (a) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ELETRODO DE OURO MODIFICADO COM AgDEN (1:1) UTILIZANDO A VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s^{-1} EM UM INTERVALO DE POTENCIAL DE -0,1 V A +0,25 V (TAMPÃO PBS pH 7, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), (b) RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES DAS CORRENTES ANODÍCAS E CATÓDICAS E O NÚMERO DE CICLOS VOLTAMÉTRICOS.	56
FIGURA 14 –(a) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ELETRODO DE OURO MODIFICADO COM AgDEN(10:1) UTILIZANDO A VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s^{-1} EM UM INTERVALO DE POTENCIAL DE -0,1 V A +0,25 V (TAMPÃO PBS pH 7, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), (b) RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES DAS CORRENTES ANODÍCAS E CATÓDICAS E O NÚMERO DE CICLOS VOLTAMÉTRICOS.	57
FIGURA 15 –(a) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ELETRODO DE OURO MODIFICADO COM AgDEN(10:1) UTILIZANDO A VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s^{-1} EM UM INTERVALO DE POTENCIAL DE -0,1 V A +0,25 V (TAMPÃO PBS pH 7, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), (b) RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES DAS CORRENTES ANODÍCAS E CATÓDICAS E O NÚMERO DE CICLOS VOLTAMÉTRICOS.	58
FIGURA 16 — (a) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ELETRODO DE OURO MODIFICADO COM CIS-SAM e AgDEN (1:1) UTILIZANDO A VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s^{-1} EM UM INTERVALO DE POTENCIAL DE -0,1 V A +0,25 V (TAMPÃO PBS pH 7, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), (b) RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADE DAS CORRENTES ANODÍCAS E CATÓDICAS E O NÚMERO DE CICLOS VOLTAMÉTRICOS.....	60
FIGURA 17 — (a) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ELETRODO DE OURO MODIFICADO COM CIS-SAM e AgDEN (10:1) UTILIZANDO A VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s^{-1} EM UM INTERVALO DE POTENCIAL DE -0,1 V A +0,25 V (TAMPÃO PBS pH 7, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), (b) RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADE DAS CORRENTES ANODÍCAS E CATÓDICAS E O NÚMERO DE CICLOS VOLTAMÉTRICOS.....	61
FIGURA 18 — (a) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ELETRODO DE OURO MODIFICADO COM CIS-SAM e AgDEN (20:1) UTILIZANDO A VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s^{-1} EM UM INTERVALO DE POTENCIAL DE -0,1 V A +0,25 V (TAMPÃO PBS pH 7, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), (b) RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADE DAS CORRENTES ANODÍCAS E CATÓDICAS E O NÚMERO DE CICLOS VOLTAMÉTRICOS.....	62
FIGURA 19 – SENSORGRAMAS OBTIDOS EM TEMPO REAL MOSTRAM A INTERAÇÃO ENTRE DIFERENTES MATERIAIS E O SENSOR SPR, APRESENTANDO SUAS FASES TÍPICAS: A LINHA DE BASE OBTIDA COM H_2O , A FASE DE LIGAÇÃO DOS DIFERENTES MATERIAIS, A FASE ESTACIONÁRIA E A FASE DE LAVAGEM. A CURVA EM PRETO CORRESPONDE AO PAMAM-G3, A CURVA EM VERMELHO CORRESPONDE AO NANOCOMPÓSITO NA PROPORÇÃO 1:1, A CURVA EM AZUL PARA UMA PROPORÇÃO 10:1 E A CURVA EM VERDE PARA UMA PROPORÇÃO 20:1. A CURVA EM ROXO CORRESPONDE ÀS NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS COM CITRATO (AgCIT).	63
FIGURA 20 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS DIFERENTES ETAPAS DA MODIFICAÇÃO DO SENSOR SPR.	65
Figura 21 – CURVAS DE SPR (SENSORGRAMA) E CURVAS DE REFLETÂNCIA DE SPR ILUSTRANDO A COMPARAÇÃO DAS AgDENs DIRETAMENTE IMOBILIZADA SOBRE A SUPERFÍCIE DE Au E IMOBILIZADA SOBRE A SUPERFÍCIE DE Au MODIFICADA COM CIS-SAM, (a) e (b) PAMAM-G3, (c) e (d) AgDEN (1:1), (e) e (f) AgDEN (10:1), (g) e (h) AgDEN (20:1).....	66

FIGURA 22 – OS SENSORGRAMAS MOSTRANDO A INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA CHIP E OS AGDENS, APRESENTANDO SUAS FASES TÍPICAS: A LINHA DE BASE OBTIDA COM TAMPÃO PBS EM pH 7,1, A FASE DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA CHIP, A FASE ESTACIONÁRIA E A FASE DE LAVAGEM COM TAMPÃO PBS EM pH 7,1. ANÁLISES OBTIDAS EM TEMPO REAL PARA OS SEGUINTE PROCESSO DE LIGAÇÃO: (a) PROTEÍNA CHIP E O AgDEN (1:1), (b) PROTEÍNA CHIP E O AgDEN (10:1), (c) PROTEÍNA CHIP E O AgDEN (20:1).....68

FIGURA 23 – CURVAS DE REFLECTÂNCIA SPR OBTIDAS EM TEMPO REAL. A FIGURA MOSTRA A DIFERENÇA ENTRE AS CURVAS DE REFLECTÂNCIA ANTES E DEPOIS DA IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA Hsc70 SOBRE SUPERFÍCIE DE OURO PREVIAMENTE FUNCIONALIZADA COM: (a) AgDEN (1:1), (b) AgDEN (10:1) E (c) AgDEN (20:1).....70

FIGURA 24 – CURVAS DE REFLECTÂNCIA SPR OBTIDAS EM TEMPO REAL. A FIGURA MOSTRA A DIFERENÇA ENTRE AS CURVAS DE REFLECTÂNCIA ANTES E DEPOIS DA IMOBILIZAÇÃO DO CALB: (a) AgDEN (1:1), (b) AgDEN (10:1) E (c) AgDEN (20:1).....71

FIGURA 25 – (a) SENSORGRAMA ILUSTRANDO A ATIVAÇÃO DOS GRUPOS AMINO-TERMINAIS DO DENDRÍMERO PELA ADIÇÃO DE 1% (m/v) DE GLUTARALDEÍDO EM PBS (pH 7,4) E A IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA C1 RECOMBINANTE DE *LEISHMANIA INFANTUM* ($200 \mu\text{g mL}^{-1} = 4,90 \mu\text{mol L}^{-1}$) DISSOLVIDA EM TAMPÃO PBS EM pH 7,4) SOBRE AgDEN PREVIAMENTE ATIVADO (10:1). (b) ANÁLISE DE SPR OBTIDA EM TEMPO REAL MOSTRANDO AS ETAPAS DE ASSOCIAÇÃO E DISSOCIAÇÃO PARA A ADIÇÃO DE SOROS CANINOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA A LEISHMANIOSE VISCERAL, AMBOS DILUÍDOS 40 VEZES EM TAMPÃO PBS A PH 7. (c) VALOR EFETIVO DE $\Delta\theta_{SPR}$ OBTIDO PARA AS RESPOSTAS COM SOROS CANINOS POSITIVOS E NEGATIVOS (N = 3).....73

FIGURA 26 - ESPECTROS RAMAN ($\lambda = 532 \text{ nm}$) REGISTRADOS NA FAIXA DE 25 A 3800 cm^{-1} PARA: (a) O SUBSTRATO DE Au NÃO MODIFICADO, (b) O SUBSTRATO DE Au MODIFICADO COM MoS_2 E (c) O SUBSTRATO DE Au MODIFICADO COM MoS_2 E EDIII-DENV-1 EM TAMPÃO PBS.....81

FIGURA 27 - ESPECTROS RAMAN ($\lambda = 532 \text{ nm}$) REGISTRADOS NA FAIXA DE 25 A 3800 cm^{-1} PARA O SUBSTRATO DE Au MODIFICADO COM MoS_2 E EDIII-DENV-1 EM TAMPÃO PBS.....82

FIGURA 28 - IMAGENS DE MEV EM DIFERENTES AMPLIAÇÕES DO MoS_2 NA PRESENÇA DE EDIII-DENV-1 (a-b). MICROGOTÍCULAS DO SOLUTO PODEM SER VISTAS COBRINDO AS PEQUENAS FLOCOS DE MoS_2 NAS IMAGENS DE MEV E NO ESPECTRO DE EDS (c-d).....83

FIGURA 29 - AS IMAGENS DE AFM REVELAM A MORFOLOGIA DO MoS_2 NA AUSÊNCIA (a) E NA PRESENÇA (b) DE EDIII-DENV-1 NO SUBSTRATO DE Au. OS RESPECTIVOS HISTOGRAMAS DE ESPESSURA (c-d) QUANTIFICAM A UNIFORMIDADE E DISTRIBUIÇÃO DO FILME, COM UMA REPRESENTAÇÃO 3D DAS AMOSTRAS. AS IMAGENS PÓS-IMOBILIZAÇÃO EXIBEM CLARAMENTE UM AUMENTO NA ESPESSURA DO FILME E NAS DIMENSÕES LATERAIS, INDICANDO UMA DEPOSIÇÃO BEM-SUCEDIDA.....84

FIGURA 30 - AS IMAGENS TOPOGRÁFICAS EM 3D (a-b) E AS IMAGENS 3D DE KPFM (c-d) DAS AMOSTRAS NA AUSÊNCIA (a,c) E NA PRESENÇA (b,d) DA PROTEÍNA EDIII-DENV-1 REVELAM UMA DIMINUIÇÃO NA FUNÇÃO DE TRABALHO DO FILME DE 5.26 eV PARA 5.16 eV APÓS A DEPOSIÇÃO DA PROTEÍNA.....85

FIGURA 31 - OS SENSORGRAMAS MOSTRAM A INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA CHIP E DIFERENTES CONDIÇÕES DE REVESTIMENTO DA SUPERFÍCIE DE OURO COM MoS_2 : A LINHA PRETA REPRESENTA A SUPERFÍCIE DE OURO SEM REVESTIMENTO; A LINHA VERMELHA INDICA A SUPERFÍCIE DE OURO REVESTIDA COM $100 \mu\text{L}^{-1}$ DE DISPERSÃO DE MoS_2 ; A LINHA AZUL MOSTRA A SUPERFÍCIE DE OURO REVESTIDA COM $200 \mu\text{L}^{-1}$ DE DISPERSÃO DE MoS_2 ; A

LINHA ROSA CORRESPONDE À SUPERFÍCIE DE OURO REVESTIDA COM $300 \mu\text{L}^{-1}$ DE DISPERSÃO DE MoS_2 ; A LINHA CINZA REPRESENTA A SUPERFÍCIE DE OURO REVESTIDA COM $400 \mu\text{L}^{-1}$ DE DISPERSÃO DE MoS_2 ; A LINHA VERDE MOSTRA A SUPERFÍCIE DE OURO REVESTIDA COM $500 \mu\text{L}^{-1}$ DE DISPERSÃO DE MoS_2 . (B) REPRESENTAÇÃO EM GRÁFICO DE BARRAS DOS VALORES EFETIVOS DE $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ OBTIDOS PARA DIFERENTES CONDIÇÕES DE REVESTIMENTO DA SUPERFÍCIE DE OURO COM MoS_287

FIGURA 32 -(a) SENSORGRAMAS OBTIDOS EM TEMPO REAL MOSTRAM A ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA EDIII-DENV-1 DISSOLVIDA EM TAMPÃO PBS pH 7. (b) REPRESENTAÇÃO EM GRÁFICO DE BARRAS DOS VALORES EFETIVOS DE $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ OBTIDOS APÓS A INJEÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EDIII-DENV-1 DISSOLVIDA EM TAMPÃO PBS pH 7.....88

FIGURA 33 - OS SENSORGRAMAS MOSTRAM AS ETAPAS DA FABRICAÇÃO DO IMUNOSSENSOR. INICIALMENTE, A LINHA DE BASE FOI ESTABELECIDO COM PBS, O MESMO MEIO NO QUAL A PROTEÍNA FOI DILUÍDA. EM SEGUIDA, A IMOBILIZAÇÃO DIRETA DA PROTEÍNA EDIII-DENV-1 ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) NA SUPERFÍCIE BASAL DAS NANOFLOCOS DE MoS_2 FOI REALIZADA, SEGUIDA DE UMA LAVAGEM PARA REMOVER O EXCESSO E ESTABELECEER UMA NOVA LINHA DE BASE. POSTERIORMENTE, FOI REALIZADO O BLOQUEIO COM ETANOLAMINA PARA GARANTIR A LIGAÇÃO ESPECÍFICA DOS ANTICORPOS, SEGUIDO DE OUTRA ETAPA DE LAVAGEM PARA FORMAR UMA LINHA DE BASE. FINALMENTE, NA ETAPA DE DETECÇÃO, AMOSTRAS DILUÍDAS DE SORO HUMANO EM PBS NA PROPORÇÃO DE 1:50 FORAM INTRODUZIDAS. A CURVA VERMELHA REPRESENTA A RESPOSTA A UMA AMOSTRA POSITIVAS, ENQUANTO A CURVA VERDE REPRESENTA UMA AMOSTRA NEGATIVAS TODAS AS ETAPAS E REGIÕES ESTÃO CLARAMENTE IDENTIFICADAS NA FIGURA.....90

FIGURA 34 - (a) REPRESENTAÇÃO EM GRÁFICO DE BARRAS DOS VALORES DE $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ OBTIDOS APÓS A INJEÇÃO DE SORO POSITIVO. (b) REPRESENTAÇÃO EM GRÁFICO DE BARRAS DOS VALORES EFICAZES DE $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ OBTIDOS APÓS A INJEÇÃO DE SORO NEGATIVO. AS BARRAS MOSTRAM $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ PARA AMOSTRAS DE SORO HUMANO POSITIVAS E NEGATIVAS PARA INFECÇÃO POR DENGUE, DILUÍDAS NA PROPORÇÃO DE 1:50 EM TAMPÃO PBS A pH 7.....92

FIGURA 35 - (a) SENSORGRAMAS OBTIDOS EM TEMPO REAL MOSTRAM AS ETAPAS DE ASSOCIAÇÃO E DISSOCIAÇÃO PARA A ADIÇÃO DE SOROS CANINOS POSITIVOS DISSOLVIDOS EM TAMPÃO PBS pH 7 EM DIFERENTES DILUIÇÕES (v/v) (1:50, 1:100, 1:400, 1:800, 1:1600). (b) REPRESENTAÇÃO EM GRÁFICO DE BARRAS DOS VALORES DE $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ OBTIDOS APÓS A INJEÇÃO DE SORO POSITIVO.....93

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

SPR: Ressonância Plasmônica de Superfície
SAMs: Monocamadas Auto-organizadas (do inglês, self-assembled monolayers)
MoS₂: Dissulfeto de Molibdênio
EDIII-DENV-1: Domínio III da proteína E do vírus DENV-1
AgDENS: Nanopartículas de prata estabilizadas por dendrímero
CHIP: Proteína de interação Hsc70
Hsc70: Chaperona Hsc70
CALB: Lipase B de *Candida antarctica*
LC: Leishmaniose Cutânea
LMC: Leishmaniose Mucocutânea
LV: Leishmaniose Visceral
OMS: Organização Mundial da Saúde
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, Polymerase Chain Reaction)
ELISA: Ensaio Imunoenzimático (do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
DENV-1: Vírus da Dengue tipo 1
DENV-2: Vírus da Dengue tipo 2
DENV-3: Vírus da Dengue tipo 3
DENV-4: Vírus da Dengue tipo 4
IgM: Imunoglobulina M
IgG: Imunoglobulina G
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
RNA: Ácido Ribonucleico
pH: Potencial Hidrogeniônico
LDH: Lactato Desidrogenase
ITO: Óxido de Estanho Dopado com Índio
VC: Voltametria Cíclica
VPD: Voltametria de Pulso Diferencial
VCA: Voltametria de Corrente Alternada
VOQ: Voltametria de Onda Quadrada
VVL: Voltametria de Varredura Linear
PS: Plásmons de Superfície
LSPR: Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (do inglês, Localized Surface Plasmon Resonance)
FTIR-ATR: Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada
PAMAM: Dendrímeros de Poliamidoamina
DENS: Nanopartículas Metálicas Encapsuladas ou/e Estabilizadas por Dendrímeros
UV: Radiação Ultravioleta
UV-Vis: Espectroscopia no Ultravioleta-Visível
2D: Bidimensionais
DMTs: Dicalcogenetos de Metais de Transição
Poly C-DNA: DNA de Policitosina
E. coli: *Escherichia coli*
C1: Célula de referência
CIS-SAM: Monolayer Auto-montado de Cisteína

XRD: Difração de Raios-X
FTIR-ATR: Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflexão Total Interna
TEM: Microscopia Eletrônica de Transmissão
EDS: Espectroscopia de Dispersão de Energia
AFM: Microscopia de Força Atômica
KPFM: microscopia de força de Sonda Kelvin
 λ : Comprimento de Onda
AgCIT: Nanopartículas de Prata Protegidas por Citrato
 $\Delta\theta$ SPR: Variação no Ângulo de Ressonância Plasmônica de Superfície
LbL: Camada por Camada (*Layer-by-Layer*)
-SH: Grupo Tiol
-NH₂: Grupo Funcional Amino-Terminal
GLU: Glutaraldeído
 α : Alfa (símbolo de uma variável ou coeficiente)
 β : Beta (símbolo de uma variável ou coeficiente)
Ser105: Resíduo de Serina na posição 105
Asp187: Resíduo de Aspartato na posição 187
His224: Resíduo de Histidina na posição 224
 μ : Micrômetro ou Prefixo para "micro" (10^{-6})
 μ g: Micrograma
6xHis: Marcador de 6 Histidinas
BL21(λ DE3): Cepa de *E. coli* usada como hospedeira
Ni-NTA: Cromatografia de Afinidade com Ni-Nitrilotriacético
CPD: Diferença de Potencial de Contato
 Φ_{tip} : Função de Trabalho da Ponta
 $\Phi_{substrato}$: Função de Trabalho do Substrato
 $\Phi_{amostra}$: Função de Trabalho da Amostra

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 ESTADO DA ARTE	18
2.1 LEISHMANIOSE	18
2.2 DENGUE	20
2.3 BIOSSENSORES	22
2.4 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOSSENSORES.....	24
2.5 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOSSENSORES BASEADOS NO BIORECEPTOR....	25
2.5.1 Biossensores baseados em enzimas	25
2.5.2 classificação baseada em Transdutores: Biossensores Eletroquímicos	25
2.5.3 Biossensores ópticos.....	26
2.6 BIOSSENSORES BASEADOS NA SPR.....	26
2.6.1 Classificação dos sensores baseadas na SPR	27
2.6.2 Acoplamento por prisma.....	27
2.7 MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS (SAM)	29
2.8 DENDRÍMEROS	30
2.9 ESTABILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS UTILIZANDO DENDRÍMEROS	32
2.10 DISSULFETO DE MOLIBDÊNIO	34
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 EXPLORANDO A VERSATILIDADE DAS PLATAFORMAS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS POR DENDRÍMEROS: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA APLICAÇÕES DE BIOSSENSORES ⁷³	40
4.1 MOTIVAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DESTE ESTUDO.....	40
4.2 EXPERIMENTAL.....	41
4.3 REAGENTES	41
4.4 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS POR DENDRÍMERO.....	42

4.5 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS POR CITRATO	42
4.5.1 Modificação do eletrodo de ouro usando as nanopartículas de prata estabilizadas por dendrímero PAMAM-G3 para caracterizações eletroquímicas.....	42
4.5.2 Modificação do eletrodo de ouro com cisteamina e as nanopartículas de prata estabilizadas por dendrímero PAMAM-G3 para caracterizações eletroquímicas.....	43
4.5.3 Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-VIS)	43
4.5.4 Difração de raios X (DRX)	43
4.5.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	43
4.5.6 Ressonância de plasmons de superfície (SPR)	44
4.5.7 Voltametria cíclica (VC).....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
5.1 ESPECTROSCOPIA UV-VIS	45
5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	50
5.3 DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X (DRX).....	53
5.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER MODO DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR)	54
5.5 CARACTERIZAÇÕES ELETROQUÍMICAS	55
5.5.1 Modificação do eletrodo de ouro	55
5.5.2 Modificação do eletrodo de ouro com cisteamina e com as nanopartículas de prata estabilizadas por dendrímero PAMAM-G3.....	59
5.6 USO DA TÉCNICA DE SPR PARA MONITORAMENTO <i>IN SITU</i> DA INTERAÇÃO DE PAMAM-G3 E DOS NANOMATERIAIS COM SUPERFÍCIES DE OURO	63
5.7 IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA CHIP NAS PLATAFORMAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES	67
5.8 IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA H _{sc} 70 E DA ENZIMA CALB L	69
5.9 APLICAÇÃO DA PLATAFORMA PROPOSTA PARA CONSTRUÇÃO DE UM IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	72
6 CONCLUSÃO.....	74
7 MoS ₂ BIDIMENSIONAL COMO UMA PLATAFORMA AVANÇADA DE DETECÇÃO POR SPR PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA DENGUE.....	76
7.1 MOTIVAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DESTE ESTUDO.....	76

7.2 MATERIAIS E REAGENTES.....	77
7.3 SÍNTESE DA PROTEÍNA.....	77
7.4 AMOSTRAS DE SORO HUMANO.....	77
7.5 SÍNTESE E EXFOLIAÇÃO DE MoS_2	78
7.6 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS.....	78
7.7 CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR SPR.....	79
7.8 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS.....	79
7.9 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
7.9.1 CARACTERIZAÇÃO DO SENSOR SPR MODIFICADO COM MoS_2 NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE EDIII-DENV-1.....	80
7.10 OTIMIZAÇÃO DAS CAMADAS DE DETECÇÃO SPR.....	86
7.11 AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA ENVELOPE DOMÍNIO III DENV-1 (EDIII-DENV-1) NA SUPERFÍCIE DE OURO REVESTIDA COM MoS_2	87
7.12 MONITORAMENTO EM TEMPO REAL DA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR SPR PARA DIAGNÓSTICO DA DENGUE.....	89
7.13 IMUNOENSAIO SPR PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA A DENGUE EM SORO HUMANO UTILIZANDO UMA SUPERFÍCIE DE OURO REVESTIDA COM MoS_2	91
8 CONCLUSÕES.....	94
9 REFERÊNCIAS.....	95

1 INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por vetores continuam sendo uma ameaça global, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, onde fatores climáticos e socioeconômicos favorecem a proliferação de vetores, como mosquitos e carrapatos¹⁻⁴. Estima-se que cerca de 80% da população mundial esteja exposta a essas infecções, que correspondem a mais de 17% das doenças infecciosas e são responsáveis por mais de 700 mil mortes anualmente¹⁻⁴. Diante desse cenário, os biossensores emergem como uma ferramenta inovadora, oferecendo diagnósticos rápidos e precisos para mitigar os impactos dessas doenças.

Os recentes avanços no campo da nanotecnologia ampliaram as possibilidades de construção de biossensores miniaturizados, portáteis, de baixo custo e descartáveis, atendendo às mais altas demandas no âmbito da saúde.^{5,6} Nesse sentido, tais biossensores são desenvolvidos com base em elementos de reconhecimento biológico que interagem com o composto-alvo, enquanto o transdutor converte a resposta biológica em um sinal mensurável⁷. Entre os diversos tipos de biossensores, os baseados em Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR, do inglês, Surface Plasmon Resonance) se destacam por sua elevada sensibilidade e capacidade de detecção. Nessa abordagem, o transdutor é um componente essencial, responsável por converter essas interações biológicas em sinais ópticos mensuráveis.

A eficiência do transdutor está intrinsecamente ligada à escolha dos materiais e à metodologia de fabricação empregada⁸. Materiais adequados promovem uma interação ideal com os elementos de reconhecimento biológico e potencializam a conversão do sinal, garantindo que alterações sutis sejam detectadas com confiabilidade⁹. Nesse contexto, a ampla variedade de materiais disponíveis para a fabricação de biossensores expande consideravelmente as possibilidades de otimização dos transdutores, resultando em aprimoramentos significativos em suas características e desempenho.

Entre esses materiais, destacam-se as monocamadas auto-organizadas (SAMs, do inglês self-assembled monolayers) de alcanotíóis. Quando combinadas com sistemas multivalentes, como dendrímeros e nanopartículas metálicas, essas monocamadas criam condições ideais para a imobilização de biomoléculas.

Os dendrímeros, por sua vez, são macromoléculas monodispersas com uma estrutura tridimensional (3D) altamente ramificada, o que os torna particularmente adequados para a estabilização de nanopartículas metálicas¹⁰. A utilização conjunta de dendrímeros e nanopartículas de prata pode proporcionar amplificação do sinal do sistema de transdução, resultando em uma sensibilidade aprimorada dos biossensores¹¹⁻¹³.

Um material promissor que vem sendo explorado recentemente na modificação de sensores SPR é o dissulfeto de molibdênio (MoS_2). O MoS_2 apresenta propriedades excepcionais, como a presença de grupos de enxofre livres e uma superfície basal quimicamente estável, que favorecem a imobilização de

proteínas por fisorção por meio de interações hidrofóbicas entre as biomoléculas e sua superfície.¹⁴⁻²⁰

Na primeira parte do trabalho, demonstrou-se a funcionalização de um sensor de SPR com nanocompósitos formados por dendrímeros de poli(amidoamina) e nanopartículas de prata (AgDENS). Os nanocompósitos obtidos foram caracterizados por diversas técnicas. Os AgDENS foram posteriormente combinados com cisteamina, e sua versatilidade na ancoragem de biomoléculas foi avaliada em tempo real por SPR, utilizando as proteínas CHIP, Hsc70 e CALB L. Como aplicação específica, desenvolveu-se um imunossensor utilizando a proteína C1 ancorada na plataforma AgDENS para detectar, de forma seletiva, anticorpos contra *Leishmania infantum* em amostras de soro canino.

Na segunda parte deste trabalho, investigou-se a imobilização da proteína do domínio III do envelope do vírus da dengue tipo 1 (EDIII-DENV-1) sobre um sensor SPR modificado com MoS₂, utilizando a tecnologia de ressonância de plasmon de superfície para monitorar esse processo em tempo real. Os resultados obtidos por SPR demonstraram uma imobilização eficaz do EDIII-DENV-1. O biossensor apresentou grande potencial para o diagnóstico preciso de infecções por dengue, com alta seletividade na detecção de anticorpos.

2 ESTADO DA ARTE

As doenças transmitidas por vetores representam uma das mais sérias ameaças à saúde pública global, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, como o Brasil ^{1,3,4,21}. O país se destaca negativamente nesse cenário, sendo responsável pelo maior número de casos e óbitos relacionados a essas doenças ²². De acordo com relatório recente da Organização Mundial da Saúde (OMS), o Brasil concentrou, em 2024, aproximadamente 82% dos casos suspeitos de dengue registrados globalmente, o que evidencia a gravidade do quadro e a necessidade urgente de estratégias eficazes de controle e prevenção ²².

Os principais vetores dessas doenças são organismos hematófagos, como mosquitos, carrapatos e pulgas, que transmitem vírus, bactérias e parasitas aos seres humanos por meio de suas picadas ^{1,3,4,21}. A crescente intervenção humana nos ecossistemas naturais, por meio do desmatamento, urbanização desordenada e queima de combustíveis fósseis, tem promovido alterações climáticas significativas, o que favorece a expansão geográfica desses vetores e aumenta a incidência de doenças transmitidas ^{1,3,4,21}.

Dentre as enfermidades de maior relevância estão a dengue e a leishmaniose, destacando-se pela alta prevalência e impacto socioeconômico ^{1,3,4,21}. O *Aedes aegypti* é o principal vetor da dengue, enquanto a leishmaniose compreende três formas clínicas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas por flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*.

Em 2023, mosquitos do gênero *Aedes* estavam estabelecidos em 13 países europeus, em contraste com os oito países registrados em 2013, indicando a formação de populações autossustentáveis fora de zonas endêmicas tradicionais ²³. Em maio de 2024, o Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças relatou o surgimento de novas populações invasoras: *Aedes aegypti* foi identificado na Espanha, enquanto *Aedes albopictus* foi encontrado na França e na Alemanha ²³. Outras ocorrências foram notificadas na Holanda, Portugal, Eslováquia, indicando uma expansão contínua em zonas temperadas ²³.

Esse cenário reforça a necessidade de ferramentas analíticas capazes de fornecer diagnóstico precoce e preciso. Assim os biossensores, surgem como alternativas promissoras frente às limitações dos métodos de diagnósticos convencionais.

2.1 LEISHMANIOSE

A leishmaniose compreende três formas clínicas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, encontradas em partes dos trópicos, subtropicais e sul da Europa. A transmissão da leishmaniose para humanos é vetorial e pode ser antroponótica (de humano para humano) ou zoonótica (transmitida entre animais e humanos.) ^{24–26}. A forma zoonótica é a mais comum, esses parasitas são transmitidos aos humanos pela picada de uma fêmea infectada de flebotomíneos

dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* ²⁴⁻²⁶. Esses vetores são altamente adaptáveis e podem ser encontrados em diversos ecossistemas²⁴⁻²⁶.

Atualmente, cerca de 21 espécies de *Leishmania* são conhecidas e dependendo do parasita *Leishmania*, as manifestações clínicas humanas podem variar entre: leishmaniose cutânea (LC), que causa úlceras na pele, leishmaniose mucocutânea (LMC), que causa úlceras na pele e mucosas principalmente no nariz e na boca e *leishmaniose visceral* (LV), esta última, apresenta taxa de letalidade de >95% se não for tratada ²⁵⁻²⁷. A leishmaniose é considerada uma doença gravemente negligenciada, e é a segunda infecção parasitária transmitida por vetores mais comum no mundo ²⁴⁻²⁶.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas de leishmaniose e estão em risco de infecção ^{28,29}. A doença está diretamente associada à pobreza, mas também é influenciada por fatores ambientais e climáticos ^{28,29}. Anualmente, estima-se a ocorrência de aproximadamente 30.000 novos casos de leishmaniose visceral (LV) e mais de 1 milhão de novos casos de leishmaniose cutânea (LC) ^{28,29}.

Os cães são considerados o principal e/ou primário reservatório doméstico para infecção humana em cenários onde ocorre leishmaniose zoonótica ^{24,30}. Uma proporção significativa de cães infectados permanece clinicamente saudável graças a uma resposta imune celular adequada, mas esses animais infectados, podem atuar como portadores de *Leishmania spp.* e são capazes de transmitir parasitas aos vetores flebotomíneos ^{24,30}. Os gatos são há muito tempo considerados hospedeiros menos suscetíveis para *L. infantum*, no entanto, eles são agora reconhecidos como hospedeiros competentes ³⁰.

Compreender a relação entre clima e transmissão de doenças é essencial para desenvolver ferramentas eficazes de apoio à decisão, que são fundamentais para a formulação de políticas públicas e a vigilância em saúde ²⁷. Nesse contexto, o diagnóstico rápido e preciso da leishmaniose desempenha um papel crucial no manejo adequado da doença, contribuindo para a redução de casos ³¹. Os métodos convencionais de diagnóstico incluem técnicas parasitológicas, moleculares e imunológicas. ³¹.

Os métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) são altamente sensíveis e específicos para a detecção da infecção ³¹. Além disso, testes imunológicos como o teste de aglutinação direta (DAT do inglês, *Direct Agglutination Test*), o ensaio imunoenzimático (ELISA do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e o teste imunocromatográfico são amplamente utilizados para o diagnóstico da leishmaniose ³¹.

Os métodos parasitológicos são amplamente utilizados no diagnóstico da leishmaniose ^{2,31,32}. Esse exame é microscópico, e se baseia na visualização de formas amastigotas de *Leishmania* em tecidos infectados. Para a LC a amostra é obtida por meio de biópsia, punch ou raspagem de mucosa ou lesões cutâneas ^{31,32}. Aspirados de medula óssea, baço ou linfonodos são usados para diagnóstico de LV ^{31,32}. Embora essa técnica seja altamente específica para o diagnóstico da

leishmaniose, não permite a discriminação entre as diferentes espécies de *Leishmania* além disso, as amostras, extraídas de forma difícil e dolorosa, podem apresentar variações quanto à quantidade de parasitas presentes, o que dificulta a detecção em casos com baixa carga parasitária.^{31,32}

2.2 DENGUE

A dengue é a doença arboviral mais comum em humanos, pode ser transmitida por vários vetores, mas os principais vetores são o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus*. Nas últimas quatro décadas, tanto a incidência quanto a gravidade dos casos aumentaram, impulsionadas pela expansão geográfica dos vetores^{2,25,33}. Adaptado a ambientes urbanos o *Aedes aegypti* se também transmite outras doenças graves, como chikungunya, Zika e febre amarela^{2,25,33}.

O mosquito *Aedes aegypti* se prolifera facilmente em regiões tropicais e subtropicais, principalmente durante a estação chuvosa, quando a água parada em recipientes artificiais favorece sua reprodução³⁴. A expansão dos vetores do mosquito e o consequente aumento de casos em áreas não endêmicas representam uma preocupação crescente³⁴. Na Europa, o *Aedes. Albopictus* foi relatado pela primeira vez na Albânia (1979) e depois na Itália (1990), França (1999), Bélgica (2000), Espanha (2003) e posteriormente em outros países europeus³⁴. Desde 2010, um número crescente de casos de dengue foram relatados em países europeus, incluindo França, Croácia, Espanha e Itália³⁴.

Segundo a OMS, estima-se que 4 bilhões de pessoas correm risco de infecção por arbovírus em todo o mundo, e estima-se que esse número aumente para 5 bilhões até 2050³⁵. Os casos de dengue aproximadamente dobraram a cada ano desde 2021, com mais de 12,3 milhões de casos até o final de agosto de 2024, quase o dobro dos 6,5 milhões de casos relatados em todo o ano de 2023³⁵. O Brasil lidera o número de casos de dengue no mundo, com 2,9 milhões registrados em 2023³⁶.

A infecção por dengue pode ser assintomática ou sintomática, dependendo do indivíduo infectado^{2,25,33,37}. Os sintomas clínicos comuns em um indivíduo infectado por dengue incluem dor de cabeça, febre, náusea, vômito, fadiga, artralgia, dor muscular³⁷. A infecção grave por dengue pode evoluir para febre hemorrágica da dengue, que é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular e irregularidades hemostáticas, bem como síndrome do choque da dengue ou choque hipovolêmico^{2,25,33,37}.

Quando o vírus da dengue infecta o hospedeiro, o sistema imunológico desencadeia uma resposta inata para limitar a replicação viral^{2,25,33,38}. Inicialmente, durante uma infecção primária, os anticorpos IgM são produzidos entre três e cinco dias após o início dos sintomas, sendo quase sempre detectáveis mesmo após os sintomas cessar^{2,25,33,38}. Posteriormente, os anticorpos IgG surgem, substituindo os níveis decrescentes de IgM ao longo de dois a três meses e permanecendo detectáveis por toda a vida, oferecendo proteção contra reinfecções pelo mesmo sorotipo^{2,25,33,38}.

Os quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) pertencem ao gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*. A infecção por um desses sorotipos confere imunidade de longo prazo ao mesmo sorotipo, mas apenas uma imunidade temporária contra os outros três ^{2,25,33}. O vírus é constituído por três proteínas estruturais distintas sendo, o capsídeo, membrana e o envelope, além de sete proteínas não estruturais, identificadas como NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 ³⁹. Dentre essas, a proteína NS1 se destaca por ser a única liberada de maneira consistente na corrente sanguínea pela célula hospedeira infectada, configurando-se como um importante marcador para o diagnóstico precoce da dengue ³⁹.

Três vacinas contra a dengue estão licenciadas atualmente, a Dengvaxia®, Qdenga, e a Butantan-DV. A Dengvaxia® é recomendada apenas para indivíduos previamente infectados, devido ao risco potencial de formas mais graves em pessoas sem exposição anterior ao vírus ³⁷. A Qdenga, por sua vez, foi aprovada para uso em indivíduos a partir de 4 anos de idade, independentemente de infecções anteriores, em países como Brasil, Argentina, Indonésia e Tailândia ³⁷. A vacina Butantan-DV demonstrou eficácia de 79,6% na prevenção de casos de dengue sintomática uma proteção de 89% contra dengue grave, além de eficácia e segurança prolongadas por até cinco anos, é a primeira vacina do mundo em dose única contra a dengue ^{40,41}. Outras vacinas candidatas também estão em fases iniciais de estudos pré-clínicos e clínicos ³⁷.

Mesmo diante dos avanços nas vacinas contra a dengue, um diagnóstico preciso é essencial para o tratamento eficaz ³⁴. Existem diferentes técnicas, aplicadas no diagnóstico da dengue, como PCR, ELISA, isolamento viral e detecção de IgM, entre outras ³³. Entretanto, cada um possui suas particularidades e limitações. O ELISA e o PCR, por exemplo, apresentam alta sensibilidade, porém requer infraestrutura laboratorial e pessoal treinado, o que pode limitar sua aplicação em regiões com poucos recursos ³⁴.

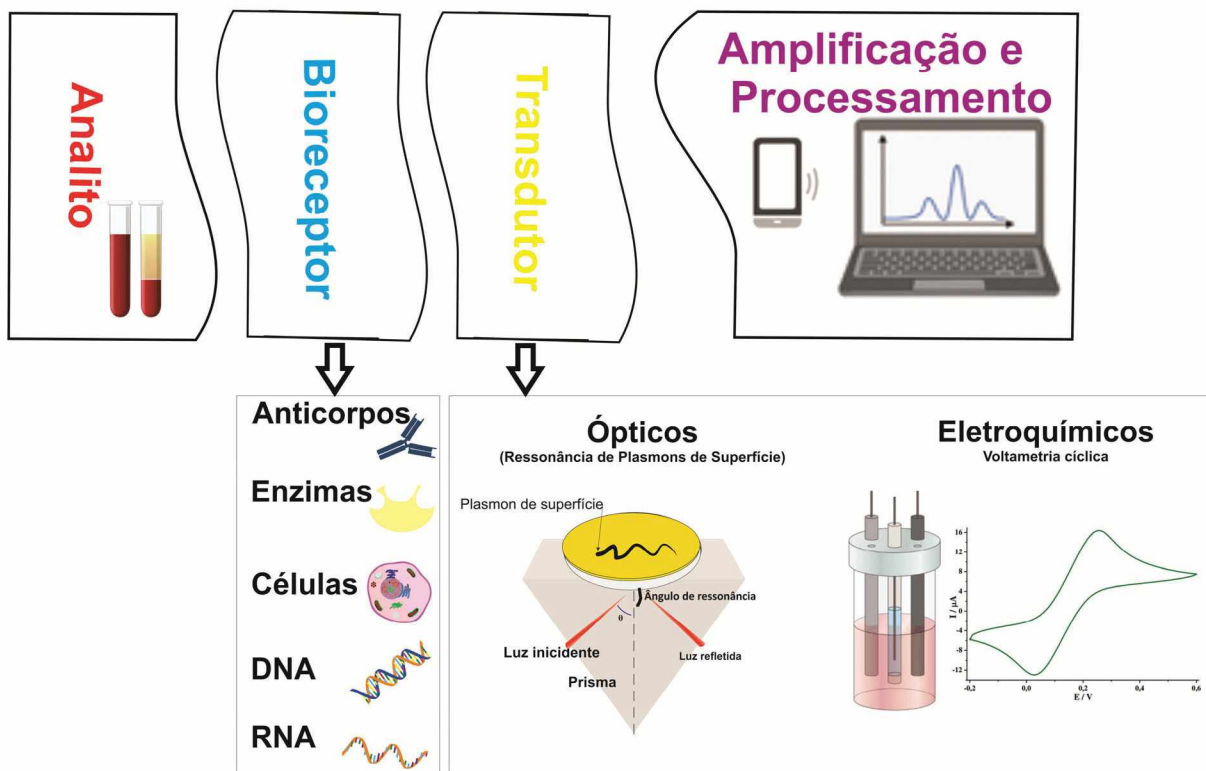
Para contornar as limitações das metodologias convencionais, diversos biossensores têm sido desenvolvidos para a detecção do vírus da dengue, destacando-se pela simplicidade operacional e pela eliminação da necessidade de equipamentos laboratoriais complexos ³³. Esses dispositivos oferecem vantagens técnicas relevantes, como a detecção em etapa única, permitindo análises rápidas, geralmente com plataformas descartáveis ³³. São capazes de fornecer resultados em poucos minutos, favorecendo a identificação precoce e precisa da infecção ³³. A proteína não estrutural NS1 tem se consolidado como o principal alvo, devido à sua alta especificidade e à presença detectável logo nos estágios iniciais da infecção ^{33,39}. Os biossensores desenvolvidos exploram diferentes tipos de transdutores, incluindo abordagens ópticas, como a ressonância plasmônica de superfície (SPR) e a fluorescência, além de técnicas eletroquímicas, como detecção amperométrica e impedimétrica ³³.

2.3 BIOSSENSORES

Os biossensores são dispositivos analíticos que integram elementos biologicamente ativos a um transdutor físico, projetados para estabelecer uma ligação específica com os analitos-alvo e gerar um sinal mensurável. Esses elementos biologicamente ativos, também conhecidos como bioreceptores, interagem com o composto-alvo, enquanto o transdutor converte essa resposta em um sinal mensurável, que é então detectado, registrado e transmitido ^{8,42,43}.

Os biossensores variam em tamanho e forma e utilizam diferentes tipos de transdutores físicos. Eles podem detectar baixas concentrações de patógenos e produtos químicos tóxicos, tornando-se ferramentas versáteis para pesquisa biológica, monitoramento ambiental e diagnóstico clínico. ^{8,42,43}. Um biossensor típico é composto de: (a) analito, (b) bioreceptor, (c) transdutor, (d) componentes eletrônicos ^{8,42,43}, conforme pode ser observado na Figura 1.

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DIFERENTES COMPONENTES DE UM BIOSENSOR.



FONTE: O autor (2025).

Comparados aos métodos analíticos convencionais, os biossensores oferecem vantagens como rapidez, alta seletividade, baixo custo, capacidade de detecção *in situ* e propriedades não destrutivas^{8,42,43}. Eles são amplamente empregados em áreas que envolvem pesquisa biológica fundamental, segurança alimentar, monitoramento ambiental, diagnóstico de doenças, triagem de drogas, testes forenses, monitoramento de qualidade da água, entre outras aplicações^{8,42,43}. Os principais componentes de um biossensor são descritos detalhadamente a seguir:

- **Analito:** Substâncias presentes em uma amostra que são alvo de detecção e/ou quantificação, abrangendo uma ampla variedade de moléculas, como proteínas específicas, biomarcadores de câncer, ácidos nucleicos, vírus, bactérias, toxinas e outras^{8,44}.
- **Bioreceptor:** Os biorreceptores são biomoléculas ou elementos biológicos que se ligam de forma específica às substâncias-alvo (analitos) em amostras complexas, esse componente é o que confere a especificidade do biossensor. Essa ligação entre os biorreceptores e os analitos resulta em mudanças nos

sinais físicos ou químicos ^{8,45}. Esses sinais são convertidos em dados reconhecíveis, dessa forma, os biorreceptores são essenciais para o funcionamento de biossensores, sendo importantes na determinação de parâmetros como especificidade, precisão e desempenho, além das possíveis aplicações^{8,45}. Os biorreceptores mais comumente utilizados incluem moléculas de ácido nucleico (DNA ou RNA), proteínas, anticorpos, enzimas, organismos, tecidos e componentes biomiméticos, como polímeros impressos molecularmente ^{8,17,45}.

- Transdutor: Parte do biossensor responsável por converter o evento de biorreconhecimento em um sinal mensurável, que reflete a quantidade e/ou a presença do analito alvo ⁸. Com base no princípio operacional, os transdutores podem ser classificados em eletroquímicos, ópticos, térmicos, eletrônicos e gravimétricos ⁸.

A eficiência de um biossensor também depende diretamente da forma como os biorreceptores são fixados à superfície do transdutor, etapa conhecida como imobilização. A escolha da técnica de imobilização depende das características das biomoléculas, do substrato e da aplicação. O material de suporte é essencial para a eficiência da imobilização e deve ser selecionado conforme as exigências do estudo. Além disso, é fundamental que as biomoléculas preservem sua estrutura e atividade biológica após a imobilização ⁴⁶. Existem dois métodos principais de imobilização amplamente utilizados: físico (reversível) e químico (irreversível) ⁸. A imobilização física envolve a fixação das biomoléculas na superfície do transdutor sem a formação de ligações químicas, como ocorre na (a) adsorção física e (b) no aprisionamento físico (eletropolimerização, técnica sol-gel e microencapsulação). Já a imobilização química envolve a formação de ligações químicas fortes, como ligações covalentes, entre as biomoléculas e a superfície do transdutor ⁸.

2.4 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOSSENSORES

A classificação dos biossensores é ampla e interdisciplinar, envolvendo diferentes critérios ⁸. Como já mencionado, os bioreceptores são elementos centrais na construção de biossensores, sendo responsáveis por assegurar a especificidade ao analito-alvo ^{47,48}. Uma das abordagens utilizadas na classificação dos biossensores é baseada no tipo de bioreceptor empregado em sua construção ^{8,47}. A segunda classificação é feita com base no transdutor e são categorizados como biossensores eletroquímicos, biossensores ópticos entre outros ⁸.

2.5 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOSENSORES BASEADOS NO BIORECEPTOR

2.5.1 Biossensores baseados em enzimas

As enzimas, reconhecidas por sua alta eficiência catalítica, ampla diversidade e especificidade em relação aos substratos, são fundamentais para acelerar reações químicas sob diferentes condições de temperatura e pH ⁴⁹. Essas propriedades as tornam altamente versáteis em aplicações relacionadas a biossensores. Entre as enzimas mais utilizadas no desenvolvimento desses dispositivos, destacam-se as lipases, lactases, glicose oxidase e lactato desidrogenase (LDH), entre outras ⁴⁹. Clark e Lyons ⁵⁰, em seu trabalho pioneiro, desenvolveram o primeiro biossensor eletroquímico para detecção de glicose, imobilizando a enzima glicose oxidase.

Esse avanço marcou o início da inovação na área de biossensores enzimáticos ^{51,52}. Desde então, esses dispositivos têm evoluído de forma significativa, sendo amplamente desenvolvidos, comercializados e aplicados ^{51,52}. A fabricação de biossensores enzimáticos envolve a imobilização de enzimas na superfície do transdutor, onde o sinal gerado resulta da interação do analito com o substrato e das reações catalíticas subsequentes ⁵³.

O reconhecimento do analito em biossensores enzimáticos pode ocorrer de três maneiras principais: o analito é metabolizado pela enzima, e sua concentração é medida por meio da transformação catalítica; o analito atua como inibidor ou ativador da enzima, influenciando a formação do produto enzimático; ou alterações nas características estruturais ou funcionais da enzima são monitoradas diretamente ⁸.

2.5.2 classificação baseada em Transdutores: Biossensores Eletroquímicos

Os biossensores eletroquímicos combinam um mecanismo de recepção de analito e um transdutor eletroquímico, onde a interação entre o analito alvo e o transdutor gera um sinal eletroquímico em formato de corrente, potencial, resistência ou impedância ^{54,55}. Os transdutores em biossensores eletroquímicos abrangem uma ampla variedade de eletrodos, incluindo eletrodos de carbono vítreo, ouro, platina, óxidos metálicos, eletrodos de diamante dopado com boro, eletrodos serigrafados, eletrodos de pasta de carbono, entre outros ⁵⁶. Esses eletrodos servem como plataformas para modificações específicas, projetadas para otimizar propriedades analíticas cruciais, como sensibilidade, seletividade, estabilidade e reprodutibilidade ^{54,56}.

Os biossensores eletroquímicos utilizam uma ampla variedade de técnicas de detecção baseadas em diferentes mecanismos de sinal. Entre os métodos mais comuns estão a voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD), voltametria de corrente alternada (VCA), polarografia, voltametria de onda quadrada (VOQ) e voltametria de varredura linear (VVL) ⁵⁴⁻⁵⁶. Cada uma dessas técnicas

apresenta vantagens específicas, dependendo da aplicação e das características do sistema analítico ⁵⁴⁻⁵⁶.

Os biossensores eletroquímicos têm ganhado grande destaque devido às suas capacidades de fornecer respostas rápidas, precisas e sensíveis de forma econômica ⁵⁴⁻⁵⁶. As plataformas eletroquímicas são amplamente aplicadas na detecção de diversos biomarcadores e no diagnóstico de doenças, como infecções e cânceres ⁵⁴⁻⁵⁶. Essas características tornam os biossensores eletroquímicos ferramentas altamente versáteis, adaptáveis a uma ampla gama de aplicações, desde diagnósticos clínicos até monitoramento ambiental e alimentar ⁵⁴⁻⁵⁶.

2.5.3 Biossensores ópticos

Os biossensores ópticos se caracterizam por utilizarem transdutores baseados em princípios ópticos para realizar as medições ⁵⁷. Nesse tipo de biossensor, o transdutor é integrado ao elemento de biorreconhecimento, permitindo que a mudança nas propriedades ópticas, seja detectada e relacionada à concentração do analito ⁵⁷. Essa abordagem oferece alta sensibilidade e precisão na detecção, sendo capaz de fornecer resultados rápidos e confiáveis em diversas aplicações, como diagnóstico médico, monitoramento ambiental e segurança alimentar ⁵⁷. O processo de transdução em biossensores ópticos provoca uma alteração na absorção, transmissão, reflexão, refração, fase, amplitude, frequência ou polarização da luz, em resposta a variações físicas ou químicas induzidas pelos elementos de biorreconhecimento ^{8,57}. Esses biossensores podem ser projetados a partir de diversos princípios ópticos, como ressonância plasmônica de superfície (SPR), fluorescência de onda evanescente, interferometria de guia de onda óptica, quimioluminescência, fluorescência, índice de refração e espalhamento Raman de superfície aprimorada, entre outros ⁸.

2.6 BIOSSENSORES BASEADOS NA SPR

A SPR é um fenômeno óptico que ocorre na superfície de filmes metálicos, sendo amplamente explorada em biossensores ópticos, particularmente devido à sua capacidade de monitorar processos interfaciais e de superfície com alta precisão em tempo real e sem a necessidade de marcadores ⁵⁸⁻⁶³. Alterando parâmetros como o índice de refração do meio, é possível correlacionar a constante de propagação dos plásmons de superfície (PS) às propriedades dielétricas do ambiente ^{58,59}. Os PS desempenham um papel crucial em diversas áreas, como química, física, ciência dos materiais e biologia ^{58,64,65}. A SPR tem sido aplicado em vários aspectos, como na bioquímica, monitoramento ambiental, análise de alimentos e diagnóstico clínico ⁵⁹.

2.6.1 Classificação dos sensores baseadas na SPR

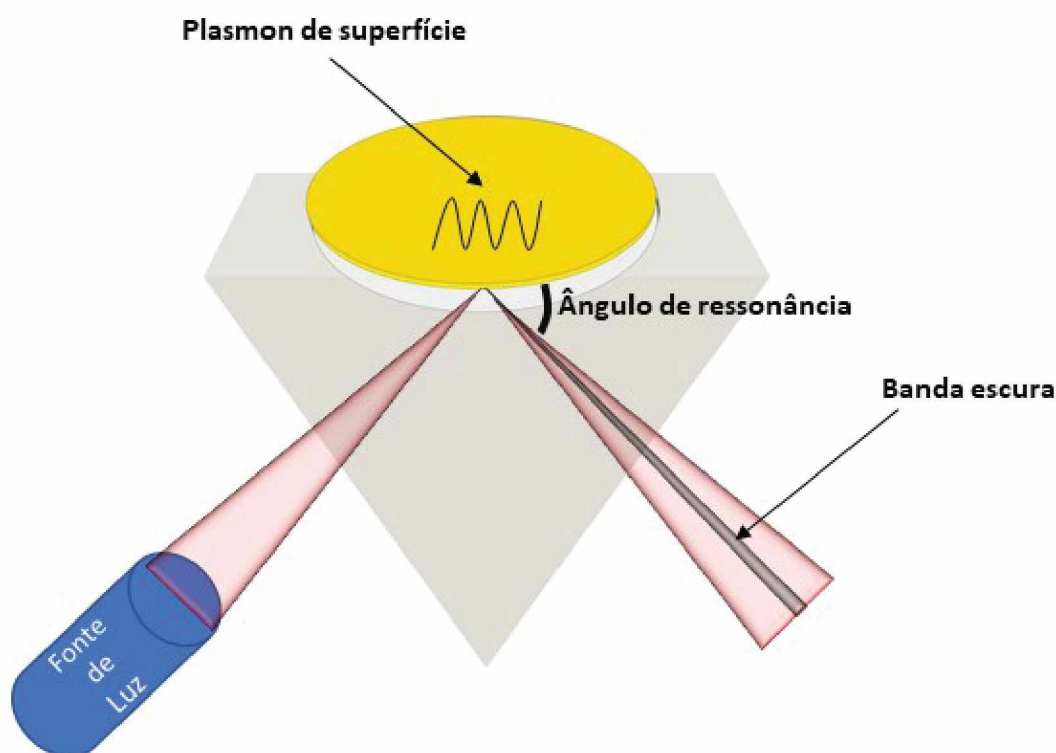
Os sensores de SPR podem ser divididos em duas categorias principais: SPR de propagação e SPR localizada (LSPR, do inglês, *Localized Surface Plasmon Resonance*), ambos baseados nas oscilações de PS ^{58,66}. A LSPR é utilizada com nanopartículas metálicas, onde os plásmons de superfície não propagantes são excitados ⁵⁸. A ressonância pode ser ajustada por meio do tamanho, forma e composição das nanopartículas, e a excitação ocorre através de oscilações harmônicas coletivas de elétrons, gerando uma resposta dipolar ⁵⁸. Já os plásmons propagantes são excitados em filmes metálicos contínuos usando acopladores de ondas eletromagnéticas, como prismas, grades de difração e guias de onda, e o efeito SPR ocorre ao longo da interface metal-dielétrica ⁵⁸.

2.6.2 Acoplamento por prisma

A primeira introdução do método de acoplamento por ATIR para excitação de plasmons de superfície foi feita por Otto em 1968 ⁶⁷. A configuração inicial utilizava um prisma em um arranjo de vidro-ar-filme, mas a necessidade de manter uma lacuna de ar de subcomprimento de onda entre a base do prisma e a superfície metálica tornava essa configuração ineficaz ⁵⁸. No mesmo ano, Kretschmann e Raether ⁶⁸ propuseram uma atualização dessa configuração, utilizando um arranjo de vidro-filme-ar, que se tornou a configuração mais popular para a excitação de PS, sendo amplamente utilizada em pesquisas atuais e em instrumentação comercial SPR ⁵⁸.

Embora essas configurações apresentem diferenças sutis, o princípio de funcionamento por trás delas é essencialmente o mesmo ^{58,69,70}. Para que a excitação dos plásmons de superfície ocorra, a luz incidente precisa ser p-polarizada, ou seja, que o vetor do campo elétrico da onda eletromagnética esteja orientado no plano de incidência ^{58,71,72}. Nesse estado de polarização, a onda plasmônica de superfície, possui apenas um componente do campo elétrico, que é perpendicular à superfície ^{58,71,72}. Quando a luz p-polarizada incide em um prisma com alto índice de refração, ela é totalmente refletida em um ângulo específico em relação à base do prisma ^{58,71,72}. Mesmo sendo refletida, parte da radiação, na forma de uma onda ou campo evanescente, penetra na interface entre o prisma e o metal ^{58,71,72}. Em um determinado ângulo de incidência, quando a constante de propagação da onda plasmônica de superfície se iguala à constante de propagação da onda evanescente, parte da radiação se acopla aos elétrons livres que oscilam no filme metálico e ocorre uma transferência ressonante de energia entre a luz incidente e a onda dos plásmons de superfície (ressonância dos plásmons de superfície) ^{58,71,72}. A Figura 2 ilustra o esquema de um sensor SPR.

FIGURA 2 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO FENÔMENO DE RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE (SPR). A LUZ PROVENIENTE DA FONTE É REFLETIDA EM UM PRISMA E INCIDE SOBRE UMA FINA CAMADA METÁLICA (AMARELO). EM UM ÂNGULO ESPECÍFICO, DENOMINADO ÂNGULO DE RESSONÂNCIA, OCORRE A EXCITAÇÃO DOS PLASMONS DE SUPERFÍCIE, RESULTANDO EM UMA ABSORÇÃO CARACTERÍSTICA DA LUZ REFLETIDA, FORMANDO UMA BANDA ESCURA NO ESPECTRO REFLETIDO. ESSE PRINCÍPIO É AMPLAMENTE UTILIZADO NA DETECÇÃO DE INTERAÇÕES BIOMOLECULARES EM BIOSSENSORES SPR.



FONTE: O autor (2025).

A sensibilidade dos sensores SPR está intimamente relacionada ao estado da superfície do sensor, incluindo sua estrutura, morfologia e composição ⁶⁰. A otimização da estrutura da superfície do sensor SPR e a introdução de novos materiais podem aumentar a sensibilidade e melhorar a capacidade de detecção de biomoléculas de baixa abundância ^{58,60,73}.

Entre os métodos de funcionalização, as monocamadas auto-organizadas (SAMs) se destacam por minimizar a adsorção não específica e proporcionar uma imobilização estável e orientada ^{10,74,75}. A automontagem de moléculas, é a técnica mais difundida em biossensores ópticos ^{10,74,75}. A fim de se obter uma alta eficiência em biossensores, a combinação de monocamadas auto-organizadas de alcanotióis com dendrímeros, e também com os nanocompósitos híbridos se apresenta como uma estratégia promissora.

2.7 MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS (SAM)

O termo "auto-organizadas" refere-se a um processo intrínseco de automontagem, no qual componentes simples, como átomos, moléculas, biomoléculas ou estruturas biológicas básicas, reorganizam-se espontaneamente para formar estruturas secundárias mais complexas, geralmente sem a necessidade de intervenção externa direta ^{76,77}.

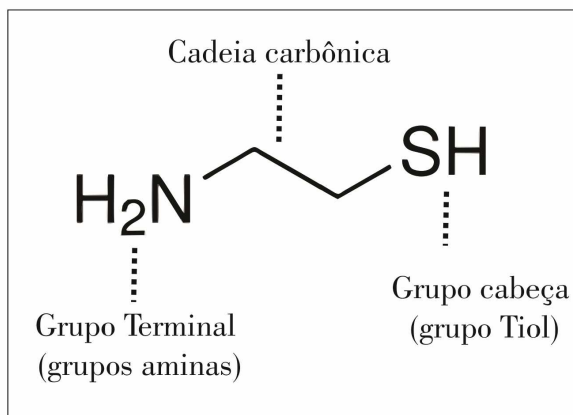
A formação de monocamadas pode ser realizada de maneira simples, utilizando diferentes abordagens, como a imersão do substrato em uma solução contendo as moléculas adsorventes, onde ocorre a interação espontânea entre as moléculas e a superfície do substrato ^{76,77}. Outra estratégia envolve a deposição das moléculas adsorventes na forma de vapor sobre o substrato sólido ^{76,77}. Ambas as técnicas oferecem flexibilidade, sendo escolhidas com base nas propriedades desejadas para a monocamada e nas características do substrato ^{76,77}. Entre as SAMs, as mais populares devido às suas simplicidades e aplicações promissoras em vários campos da nanotecnologia, são as de tióis e ditiol ⁷⁶.

Assim, o emprego de SAMs (do inglês *Self-Assembled Monolayers*) formadas pela adsorção de tióis consiste em um dos métodos mais convenientes, flexíveis e simples, o qual se adequa às propriedades interfaciais de metais, óxidos e semicondutores ⁷⁵. Suas características, como a elevada estabilidade, estrutura de superfície uniforme e relativa facilidade de variar os grupos funcionais terminais da SAMs, permite que essas moléculas controlem a acessibilidade, bem como, a orientação de biomoléculas ligadas ^{10,78}.

Dentre os compostos utilizados na formação de SAMs, destaca-se a cisteamina, um tiol de cadeia curta amplamente empregado na imobilização de biomoléculas devido à presença simultânea dos grupos –SH (tiol) e –NH₂ (amina). O grupo tiol possui forte afinidade com superfícies metálicas, especialmente ouro, promovendo a ancoragem estável da molécula. Já a extremidade com grupo amina permanece exposta e funcional, atuando como sítio ativo para a imobilização covalente de biomoléculas por meio de agentes de acoplamento, como glutaraldeído ^{10,78}.

A molécula de cisteamina apresenta uma arquitetura funcional composta por três domínios principais: (1) o grupo cabeça, constituído por um grupamento tiol (–SH), responsável pela forte interação covalente com superfícies metálicas, como o ouro; essa afinidade se deve à elevada capacidade do enxofre em doar pares de elétrons para orbitais vazios do metal, formando ligações covalentes coordenadas altamente estáveis, especialmente com metais nobres como ouro (Au), prata (Ag) e cobre (Cu); (2) a cadeia curta, que contribui para a organização supramolecular e estabilidade da monocamada automontada (SAM) por meio de interações intermoleculares; e (3) o grupo terminal amina primária (–NH₂), quimicamente reativo, permitindo a posterior funcionalização da superfície com biomoléculas ⁷⁷, conforme pode ser observado na Figura 3.

FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE CISTEAMINA, EVIDENCIANDO SEUS TRÊS DOMÍNIOS FUNCIONAIS: O GRUPO TIOL ($-SH$), RESPONSÁVEL PELA ANCORAGEM À SUPERFÍCIE METÁLICA; A CADEIA CARBÔNICA, E O GRUPO TERMINAL AMINA ($-NH_2$), UTILIZADO NA POSTERIOR FUNCIONALIZAÇÃO.



FONTE: O autor (2025).

Cada parte da molécula apresenta uma função específica e determinante para a estabilidade ⁷⁷. SAMs têm sido amplamente empregadas na construção de biossensores, especialmente devido à sua homogeneidade, simplicidade de preparação e ainda podendo variar tanto os grupos funcionais como o comprimento das cadeias, sendo extremamente versátil para imobilização de biomoléculas ⁷⁸.

A integração de SAMs com dendrímeros tem se destacado como uma abordagem promissora, unindo a organização e versatilidade funcional das SAMs à estrutura tridimensional altamente ramificada e multivalente dos dendrímeros. Essa combinação estratégica não só potencializa a eficiência de imobilização, como também oferece maior controle sobre a densidade e a orientação das biomoléculas, resultando em sistemas mais eficazes e robustos para aplicações em biossensores.

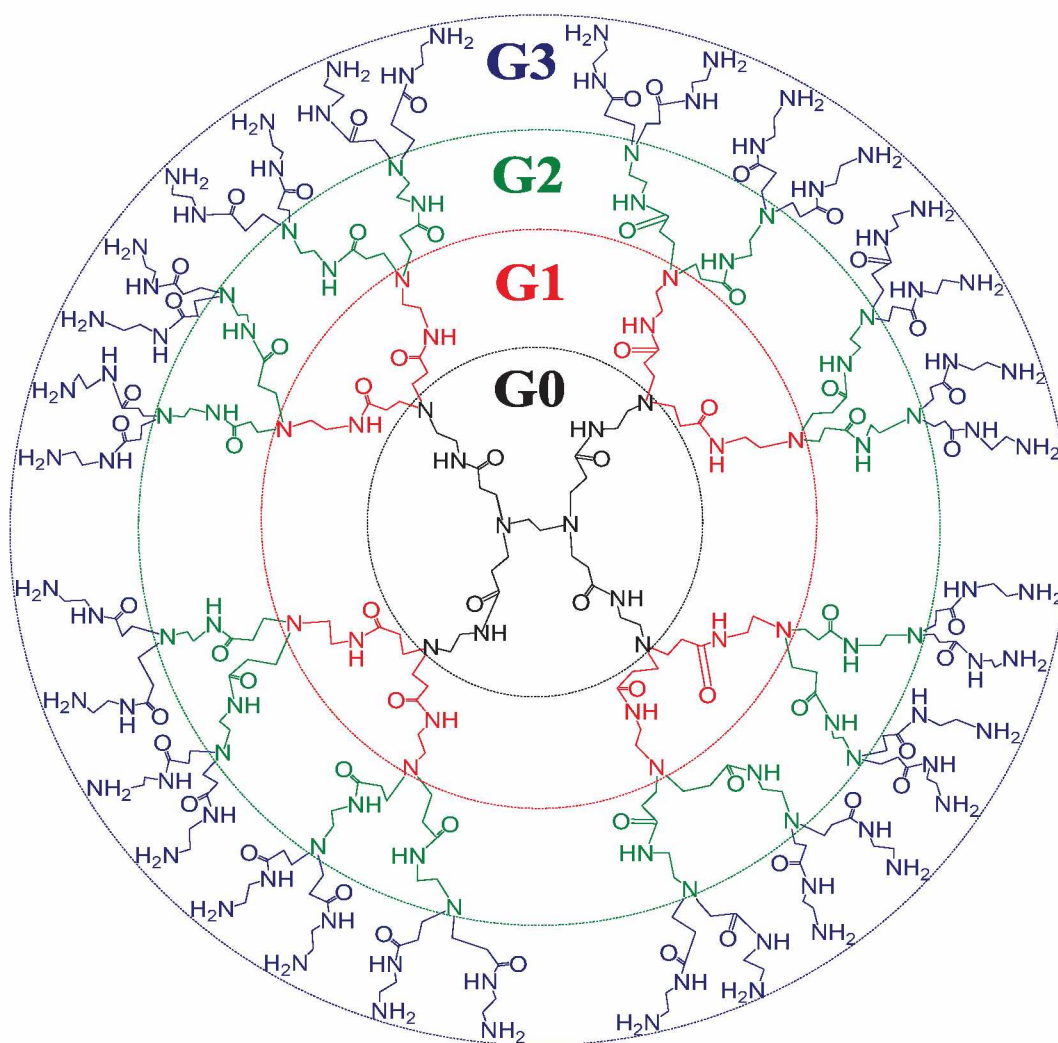
2.8 DENDRÍMEROS

Dendrímeros são macromoléculas monodispersas que possuem uma arquitetura tridimensional altamente ramificada e são muito bem definidos em termos de tamanho e número de grupos terminais ^{10,79-81}. São sintetizados por meio da rota divergente ou convergente ^{10,79-81}.

A arquitetura dos dendrímeros é composta por um núcleo central, a partir do qual surgem ramificações que formam as camadas internas, constituídas por unidades repetitivas ⁸². Essas unidades seguem uma progressão geométrica, resultando em uma estrutura organizada em níveis radialmente concêntricos, conhecidos como gerações ⁸². Na superfície do dendrímero, localizam-se os grupos funcionais terminais, cujo número cresce exponencialmente com o aumento da geração ⁸². Além disso, diversas características dos dendrímeros podem ser controladas, incluindo tamanho, forma, flexibilidade, polaridade, topologia, solubilidade e o tipo e a quantidade de grupos terminais ⁸².

Atualmente é relatada na literatura uma grande variedade de dendrímeros sintetizados, com diferentes estruturas de núcleo, grupos terminais, geração e grau de pureza, e têm sido produzidos em escala industrial e estão disponíveis comercialmente, fator de suma importância para disseminação dessas moléculas em estudos envolvendo biossensores, o que conseqüentemente culminou em um melhor entendimento em relação a essas nanoestruturas ^{10,81}. Os dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) foram os primeiros a serem sintetizados, e são extensivamente estudados, devido às suas excelentes e peculiares propriedades estruturais ^{80,83}. Na Figura 4 é demonstrado a geometria esférica dos dendrímeros PAMAM-G3, essas moléculas possuem um núcleo de etilenodiamina e ramificações de amida repetitivas e grupos de amina primária terminal ⁸⁴.

FIGURA 4– REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA MOLECULA DE DENDRÍMERO PAMAM DE GERAÇÃO 3 (G3) COM NÚCLEO DIAMINO E 32 GRUPOS AMINO-TERMINAIS. CADA PARTE DA MOLÉCULA REPRESENTADA POR UMA COR É REFERENTE A CADA GERAÇÃO: ZERO (G0), UM (G1), DOIS (G2) E TRÊS (G3).



FONTE: O autor (2025).

A TABELA 1 mostra as principais características físicas dos dendrímeros, seu diâmetro aumenta quase que linearmente com a geração, enquanto o número de grupos funcionais na periferia aumenta exponencialmente ⁸⁵. Com o aumento da geração do dendrímero, conseqüentemente há um aumento entre a distância entre os grupos funcionais terminais do dendrímero e, aumentando assim a sua flexibilidade ⁸⁵.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DOS DENDRÍMEROS PAMAM DE DIFERENTES GERAÇÕES

Geração	Número de grupos de superfície	Número de aminas terciárias	Massa molecular	Diâmetro (nm)
0	4	2	537	0,15
1	8	6	1430	2,2
2	16	14	3256	2,9
3	32	30	6909	3,6
4	64	62	14215	4,5

FONTE: O autor (2025).

O PAMAM pode apresentar alto grau de ramificação, dependendo da geração, e possui propriedades físico-químicas distintas, como: capacidade de automontagem, estabilidade química, baixa toxicidade, alta solubilidade aquosa, reatividade, uniformidade estrutural, geometria globular ou elipsoidal, tamanho nanométrico e monodispersidade, alta densidade de grupos funcionais na superfície e elevada permeabilidade das cavidades internas ^{81,84,86,87}. Devido a estas propriedades, o PAMAM tem sido aplicado no encapsulamento e estabilização de nanopartículas metálicas.

A função hospedeira do dendrímero na síntese de nanopartículas metálicas é controlada pelos grupos funcionais internos no dendrímero que se coordenam a superfície das nanopartículas metálicas ^{84,86,87}. A combinação do PAMAM, com nanopartículas metálicas representa uma abordagem estratégica na construção de plataformas multivalentes para biossensores. Essa integração não apenas apresenta o potencial de amplificar o sinal gerado pelo evento de interação entre o analito e o elemento de reconhecimento biológico na superfície do biossensor, mas, em muitos casos, também permite que o próprio metal atue como marcador ou etiqueta, dispensando o uso de sondas.

2.9 ESTABILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS UTILIZANDO DENDRÍMEROS

Crooks et al. ⁸⁵ foram os primeiros a relatar a síntese, caracterização e aplicações de nanopartículas metálicas encapsuladas ou estabilizadas por dendrímeros ⁸⁸. A metodologia clássica envolve inicialmente a complexação dos íons metálicos com as aminas internas do dendrímero, tipicamente do tipo PAMAM,

seguida pela redução química com agentes redutores como borohidreto de sódio, ácido ascórbico ou citrato de sódio ⁸⁸. Essa abordagem possibilita o controle da nucleação e crescimento das nanopartículas no interior da estrutura tridimensional altamente ramificada dos dendrímeros.

Diversas rotas alternativas têm sido desenvolvidas para a síntese de DENs, envolvendo dendrímeros com diferentes núcleos, gerações e grupos funcionais de superfície, combinados com íons metálicos variados, tais como Pt^{2+} , Pd^{2+} , Au^{3+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Ru^{3+} , Mn^{2+} e Fe^{3+} ^{84,85,94–100,86–93}.

No dendrímero PAMAM, as aminas terciárias internas desempenham papel crucial na complexação dos íons metálicos, enquanto as aminas primárias terminais oferecem locais para funcionalização e imobilização de biomoléculas ^{84,85,88}. Contudo, a interação entre íons Ag^+ e dendrímeros PAMAM apresenta particularidades que dificultam a obtenção de nanopartículas de prata (AgDENs) estáveis ^{88,101}. Estudos indicam que a complexação dos íons prata com as aminas terciárias internas é relativamente fraca, o que resulta em agregação e precipitação rápida das partículas após a síntese ^{88,92,101}.

Além disso, o pH do meio desempenha papel fundamental na estabilidade e formação dos DENs, pois influencia o estado de protonação das aminas e, conseqüentemente, o ambiente de coordenação dos íons metálico ^{88,92,101}. Em pH abaixo de 2, as aminas primárias e terciárias estão protonadas, gerando repulsões eletrostáticas que afastam os ramos do dendrímero e modificam sua conformação ^{88,92,101}. A faixa de pH entre 3 e 7 tem sido apontada como ideal para a obtenção de DENs mais estáveis, balanceando a protonação dos grupos amina e a eficiência da complexação metálica ^{88,92,101}.

Outro fator importante na síntese de AgDENs é a concentração relativa dos íons metálicos ¹⁰². Em baixas concentrações, os íons tendem a se ligar preferencialmente às aminas superficiais do dendrímero, enquanto em concentrações maiores ocorre penetração dos íons no interior da estrutura, favorecendo a nucleação interna das nanopartículas e impactando sua morfologia e estabilidade ¹⁰².

A integração dos dendrímeros PAMAM com nanopartículas metálicas configura uma plataforma promissora para o desenvolvimento de biossensores, na qual as nanopartículas atuam como amplificadores do sinal gerado pela interação analito-receptor, enquanto os grupos amino-terminais dos dendrímeros possibilitam a imobilização covalente eficiente de biomoléculas.

Além dos nanocompósitos metal-dendrímero, materiais bidimensionais (2D) têm emergido como alternativas inovadoras para a modificação de transdutores em biossensores. Dentre eles, o dissulfeto de molibdênio (MoS_2) destaca-se pelas propriedades físico-químicas singulares que promovem a formação de filmes homogêneos sobre superfícies metálicas, possibilitando a imobilização direta dos materiais de reconhecimento sem necessidade de etapas intermediárias.

2.10 DISSULFETO DE MOLIBDÊNIO

Desde o isolamento do grafeno em 2004 ¹⁰³, o interesse por materiais bidimensionais (2D) aumentou consideravelmente, impulsionado pelas propriedades excepcionais desse material ^{104–108}. Esse interesse ultrapassou o âmbito acadêmico, envolvendo grandes empresas globais, especialmente com o avanço da comercialização de dispositivos e produtos à base de grafeno, como sensores, eletrônicos flexíveis e compósitos avançados ^{104–107}. Os materiais bidimensionais se destacam por sua estrutura única, que os diferencia dos materiais tridimensionais convencionais ¹⁰⁵. Nesses materiais, as cargas livres são restritas a uma dimensão, enquanto têm liberdade de movimento nas outras duas, resultando em propriedades físicas e químicas inovadoras ¹⁰⁵.

Esse "boom do grafeno" impulsionou a busca por outros materiais 2D com características potencialmente mais ajustáveis, como os dicalcogenetos de metais de transição (DMTs) ¹⁰⁹, o nitreto de boro hexagonal ¹¹⁰, MXenes ¹¹¹, entre outros ^{104,105,107,108}. Os DMTs têm a fórmula geral MX_2 , onde M representa um metal de transição, como Hf, Ti, Zr, Mo, V, Nb, Ta, W e Re, e X é um calcogênio, como Se, S ou Te ¹⁰⁴. A versatilidade dos metais de transição, combinada com as propriedades únicas dos calcogênios, resulta em uma ampla gama de propriedades que podem ser ajustadas com base na composição e estrutura ¹⁰⁴.

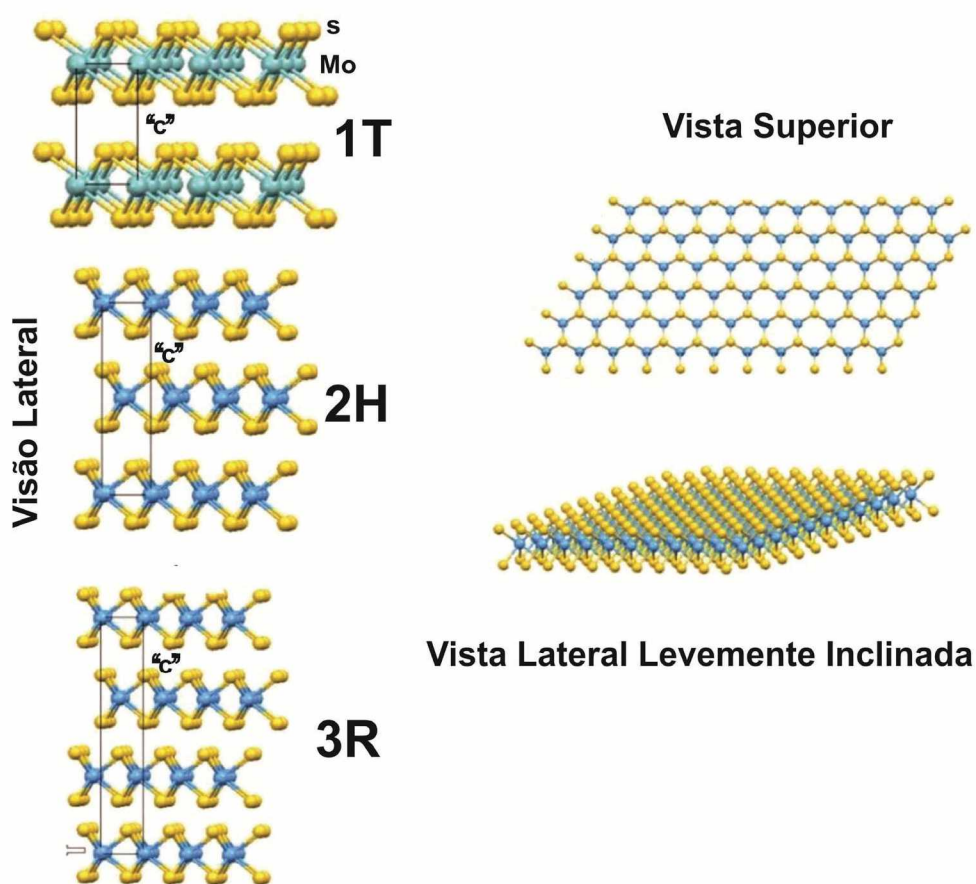
Cada folha DMTs consiste em uma estrutura de três camadas, na qual um átomo de metal M está situado entre duas camadas de átomos X ^{104,105}. Essa configuração permite a formação de fortes ligações covalentes entre os átomos M e X, enquanto a interação entre camadas adjacentes, compostas de X–M–X, é relativamente fraca, dominada pelas forças de van der Waals ^{104,105,112}. Essa característica facilita sua esfoliação, um processo no qual as camadas podem ser separadas para obter MoS_2 em formas mono ou poucas camadas ^{104,105}.

Entre os dicalcogenetos de metais de transição bidimensionais, o MoS_2 destaca-se como um dos materiais mais promissores e amplamente pesquisados ^{104,105,107,108,112}. É formado por camadas de átomos de molibdênio intercaladas entre duas camadas de átomos de enxofre (S–Mo–S), apresentando fortes ligações covalentes dentro das camadas e forças de van der Waals mais fracas entre as camadas. ^{16,17,113}. O MoS_2 possui uma configuração cristalina que exhibe polimorfismo, apresentando três formas distintas: 1T, 2H e 3R, que pertencem a diferentes grupos de simetria cristalográfica, D_{6d} , D_{6h} e C_{3i} (S_6), respectivamente, com base na configuração atômica e no arranjo de empilhamento de camadas ^{105,112,113}.

Todas as variedades polimórficas do dissulfeto de molibdênio têm estruturas lamelares conforme demonstrado na Figura 5. Nesta nomenclatura, o primeiro número indica o número de camadas presentes na estrutura, enquanto a letra (T, H e R) se refere à configuração cristalográfica específica ^{105,114}. A estrutura 1T representa uma fase metaestável do MoS_2 caracterizada por comportamento metálico e paramagnético ¹¹⁴. Em comparação com a fase 2H, a fase 1T do MoS_2 apresenta uma maior densidade de sítios ativos, locais específicos na superfície

onde ocorrem interações químicas, além de uma condutividade elétrica significativamente superior, o que contribui para seu desempenho aprimorado em aplicações catalíticas e eletrônicas ^{105,113,114}. Esses sítios ativos incluem bordas expostas das camadas, defeitos estruturais e, especialmente, vacâncias, que são posições na rede cristalina onde átomos de enxofre ou molibdênio estão ausentes. A configuração 2H é considerada a mais estável entre as três, tornando-a particularmente interessante para aplicações práticas ^{105,113,114}. A Figura 5 mostra duas vistas idealizadas de uma monolamela de 2H-MoS₂. Em todos os casos, as lamelas estão ligadas entre si por forças de van der Waals e empilhadas ao longo do eixo basal, o eixo "c" ¹¹⁵.

FIGURA 5– ESTRUTURAS POLÍTIPOS DE MoS₂, VISTA SUPERIOR E LATERAL LEVEMENTE INCLINADA IDEALIZADAS DE UMA MONOLAMELA DE 2H-MoS₂.



FONTE: Adaptada de Wypych ¹¹⁵.

Entre suas características vantajosas, destacam-se a grande área de superfície específica e um alto número de sítios ativos, juntamente com um espaçamento entre camadas de aproximadamente 0,615 nm, o que facilita a difusão de íons de vários tamanhos através de sua estrutura ^{16,17}.

Sua estabilidade estrutural e propriedades ampliam sua aplicação potencial em vários campos científicos e tecnológicos, incluindo eletrodos em supercapacitores ^{116,117}, baterias ^{118,119}, sensores ¹²⁰ e biossensores ^{17,121,122}. Suas propriedades são especialmente atraentes para o desenvolvimento de biossensores, incluindo dispositivos eletroquímicos ¹²³ e ópticos ⁶¹.

O mecanismo exato de interação entre biomoléculas e o MoS₂ ainda não está completamente elucidado. A literatura apresenta diversas abordagens para explicar essas interações interfaciais, que são governadas por forças não covalentes, incluindo interações eletrostáticas, forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas ^{60,124}.

Estudos indicam que o dissulfeto de molibdênio (MoS₂) possui alta afinidade por biomoléculas contendo grupos funcionais tiol. Ding *et al.* ¹¹² demonstraram que as vacâncias de enxofre (S) no MoS₂ desempenham um papel fundamental na conjugação de tiol no plano basal de suas camadas. Além disso, os autores afirmam que o controle dessas vacâncias pode ajustar efetivamente o grau de conjugação com os grupos tiol ^{60,112,124}. Entretanto no estudo de Xiao, M. *et al.* ¹²⁵, foram analisadas três proteínas com resíduos de cisteína expostos, e apenas uma delas foi adsorvida ao MoS₂ com orientação preferencial, sem alterações conformacionais significativas ou desnaturação. Os autores sugeriram que a interação não ocorre exclusivamente via ligações dissulfeto, pois, se assim fosse, todas as proteínas deveriam adotar a mesma orientação, a adsorção é predominantemente mediada por interações hidrofóbicas, com possível contribuição dos grupos tiol ¹²⁵.

Peng Zhang *et al.* ¹²⁶ investigaram a interação de 20 aminoácidos padrão com uma monocamada de MoS₂ ^{124,126}. Os autores demonstraram que diferentes grupos funcionais laterais dos aminoácidos contribuem para a variação na força de adsorção ao MoS₂ ^{124,126}. Aminoácidos de anel aromático ou de cadeia molecular mais longa apresentam maior afinidade pela monocamada de MoS₂ ^{124,126}. Essa forte afinidade por biomoléculas, observada tanto em aminoácidos quanto em ácidos nucleicos, é ainda mais evidenciada quando se considera o DNA de policitosina (Poly C), que pode ser adsorvido de forma estável em dicalcogenetos de metais de transição como MoS₂ e WS₂, por meio de forças de van der Waals ^{127,128}. Estudos indicam que o Poly C apresenta uma adsorção mais forte do que outros homopolímeros de DNA em MoS₂, o que torna o Poly C uma âncora versátil para funcionalização dessas superfícies, mesmo na presença de proteínas, ácidos nucleicos e surfactantes concorrentes ^{127,128}.

Além disso, o potencial do MoS₂ na funcionalização de superfícies foi demonstrado em um biossensor de ressonância plasmônica de superfície de fibra óptica. Nesse caso, os anticorpos monoclonais de *E. coli* foram imobilizados diretamente sobre as nanofolhas de MoS₂, utilizando interações hidrofóbicas entre os anticorpos e a superfície basal das nanofolhas de MoS₂ ¹⁸. Esse método simplificado, que faz uso das nanofolhas de MoS₂, permitiu a quantificação rápida e precisa de *E. coli* ¹⁸.

A combinação da Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) com materiais avançados, como o dissulfeto de molibdênio (MoS₂), tem o potencial de

transformar o campo dos biossensores ópticos. As propriedades excepcionais do MoS_2 , tornam-no um material promissor para a modificação de sensores SPR. A introdução de MoS_2 nas superfícies de ouro não apenas aprimora a sensibilidade dos biossensores, mas também permite a imobilização direta de biomoléculas, simplificando o processo de biofuncionalização

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolvimento de plataformas seletivas, robustas e multivalentes, empregando alcanotióis, dendrímeros, nanopartículas metálicas e dissulfeto de molibdênio (MoS_2) para o desenvolvimento de biossensores ópticos e eletroquímicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar as condições experimentais da síntese de nanopartículas de prata estabilizadas por dendrímeros;
- Caracterizar estrutural, morfológica e eletroquimicamente nanopartículas de prata estabilizadas por dendrímeros;
- Estudar a funcionalização de superfícies de ouro empregando monocamadas automontadas (SAMs) de tióis e sistemas multivalentes formados pelo princípio *layer-by-layer*, combinando dendrímeros comerciais do tipo poliamidoamina e nanopartículas de prata;
- Estudar a imobilização covalente diferentes biomoléculas;
- Desenvolver um imunossensor para detectar anticorpos contra *Leishmania infantum* em soro canino;
- Estudar a funcionalização de superfícies de ouro utilizando MoS_2 por meio da técnica de *spin coating*;
- Estudar a interação de proteínas sobre as plataformas previamente construídas, utilizando técnicas eletroquímicas;
- Investigar *in situ*, via SPR, a interação de proteínas sobre as plataformas previamente construídas;
- Utilizar biossensores para a detecção de anticorpos em amostras reais de soro humano e canino, via SPR e eletroquímica.

Uso de nanopartículas de prata
estabilizadas por dendrímero PAMAM-G3
para o desenvolvimento de biossensores
ópticos baseados em SPR

4 EXPLORANDO A VERSATILIDADE DAS PLATAFORMAS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS POR DENDRÍMEROS: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA APLICAÇÕES DE BIOSSENSORES ⁷³

4.1 MOTIVAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DESTE ESTUDO

A busca por plataformas altamente sensíveis e seletivas para biossensores tem impulsionado o desenvolvimento de novos materiais nanoestruturados capazes de aprimorar a detecção. A ressonância plasmônica de superfície (SPR) se destaca como uma técnica promissora por oferecer detecção em tempo real, sem necessidade de marcadores, porém, a funcionalização eficiente do

sensor é um desafio crucial para garantir o desempenho do biossensor.

Nesse contexto, a combinação de dendrímeros de poli(amidoamina) e nanopartículas de prata (AgDENs) surge como uma abordagem promissora para a construção de interfaces sensíveis e versáteis. Os dendrímeros oferecem uma estrutura bem definida com muitos grupos disponíveis que podem ser funcionalizados, enquanto as nanopartículas de prata contribuem para a amplificação da resposta plasmônica, potencializando o sinal de detecção.

Diante disso, este estudo busca explorar a funcionalização de sensores de SPR com nanocompósitos AgDENs para melhorar a imobilização de biomateriais e expandir as possibilidades de detecção. Para demonstrar a aplicabilidade da plataforma, diferentes proteínas foram imobilizadas, incluindo a proteína recombinante C1 do protozoário *Leishmania infantum*, viabilizando o desenvolvimento de um imunossensor para a detecção seletiva de anticorpos contra leishmaniose visceral em amostras de soro canino.

4.2 EXPERIMENTAL

A ligação dos AgDENs à superfície de ouro não modificada (Au/AgDENs) e sua ligação à superfície previamente modificada com um monocamada de cisteamina (Au/CIS/AgDENs) foram caracterizadas em tempo real. A biofuncionalização dos grupos amino terminais dos AgDENs foi realizada por meio de ligação covalente com proteínas de estruturas bem estabelecidas e funções importantes. Como sistema modelo, investigamos inicialmente a ligação da proteína CHIP aos grupos amino terminais das plataformas construídas (Au/AgDENs e Au/CIS/AgDENs) utilizando glutaraldeído como agente de ligação. Para caracterizar cada etapa envolvida na construção dos biossensores, análises morfológicas e estruturais foram realizadas por meio de espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis), difração de raios X (XRD), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e reflexão total atenuada (FTIR-ATR), e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Para demonstrar a versatilidade das plataformas propostas no ancoramento de diferentes biomoléculas, também exploramos a imobilização de Hsc70, a lipase livre de *Candida antarctica* (CALB L) e a proteína C1. Pelo que sabemos, a exploração de algumas dessas proteínas como materiais de bioreconhecimento, por meio de sua imobilização nos materiais propostos, não foi reportada na literatura.

4.3 REAGENTES

O nitrato de prata (AgNO_3 , 99,99%), o dendrímero PAMAM (núcleo de etilenodiamina, geração 3 em solução metanol), a cisteamina (CIS, 98%) e o glutaraldeído (GLU) (solução aquosa 25%, (v/v)) foram adquiridos da Aldrich Chemical (St. Louis, MO, EUA). O cloreto de potássio (KCl), o fosfato dissódico (Na_2HPO_4), o fosfato monopotássico (KH_2PO_4), o hidróxido de potássio (KOH) e o cloreto de potássio (KCl) foram adquiridos da LabSynth (Diadema, SP, Brasil). A solução PBS (pH 7.1, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada pela adição equimolar de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 e KCl, e o pH foi ajustado com KOH. A água deionizada foi utilizada para preparar a solução após purificação utilizando o sistema Milli-Q. As proteínas CHIP¹²⁹ e Hsc70¹³⁰ foram sintetizadas pelo grupo do Professor Carlos H.I. Ramos (Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil), e as diluições foram feitas utilizando o tampão PBS a pH 7. Para a proteína CHIP e Hsc70, as concentrações usadas foram 1 mg mL^{-1} e 50 mg mL^{-1} , respectivamente.

A enzima utilizada foi a lipase livre comercial de *Candida antarctica* (Lipozyme CALB Ls) da Novozymes Latin America (Araucária, PR, Brasil). A enzima foi utilizada sem purificação adicional, e a solução foi preparada diluindo $0,037 \text{ mL}$ da enzima em 25 mL de tampão PBS a pH 7,1. A proteína recombinante C1, que é uma proteína hipotética do protozoário *Leishmania infantum*, foi sintetizada pelo Laboratório de Leishmaniose da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brasil. Amostras de soro canino positivas para leishmaniose visceral

foram coletadas de cães naturalmente infectados com o antígeno de *Leishmania infantum* de regiões endêmicas de Belo Horizonte, Brasil. Para essas amostras, os diagnósticos foram realizados usando os métodos sorológicos IFAT e ELISA no Laboratório de Leishmaniose da UFMG. Para controles negativos, amostras de soro canino foram obtidas de cães saudáveis alojados em uma área não endêmica.

4.4 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS POR DENDRÍMERO

Os coloides de prata estabilizados por dendrímero (AgDENS) foram preparados de acordo com relatórios anteriores^{92,93,102}. Inicialmente, uma solução aquosa de AgNO_3 com concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 5,7 foi preparada e utilizada como solução estoque. Em seguida, a solução foi diluída para obter concentrações de Ag^+ de 0,05, 0,5 e 1 mmol L^{-1} . A solução diluída de AgNO_3 foi adicionada a uma solução de dendrímero PAMAM com núcleo de etilenodiamina, geração 3, em concentração fixa de $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ em uma cubeta de quartzo. As soluções foram agitadas por alguns minutos e, em seguida, irradiadas com luz ultravioleta de 8 W ($\lambda = 256 \text{ nm}$) por 1 hora em uma caixa escura. Os produtos foram separados por centrifugação durante 15 minutos a uma velocidade de 7500 rpm, e o processo foi repetido.

4.5 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS POR CITRATO

As nanopartículas de prata estabilizadas por citrato foram preparadas utilizando o método de Turkevich. A solução aquosa de AgNO_3 (1 mmol L^{-1}) foi aquecida até atingir uma temperatura de cerca de 105°C . Em seguida, a solução de citrato de sódio (1 mmol L^{-1}) a pH 9 foi injetada rapidamente na solução de AgNO_3 . O aquecimento foi continuado por mais 15 minutos e, em seguida, a solução foi resfriada em um banho de gelo. A mistura foi então submetida à centrifugação, resultando na separação do precipitado, que foi posteriormente lavado com água ultrapura. Esse processo de lavagem foi repetido sete vezes. Finalmente, o precipitado foi disperso novamente em água ultrapura para análise subsequente.

4.5.1 Modificação do eletrodo de ouro usando as nanopartículas de prata estabilizadas por dendrímero PAMAM-G3 para caracterizações eletroquímicas

Antes da modificação, os substratos de ouro passaram por uma etapa de limpeza rigorosa para garantir a remoção de impurezas e contaminantes. Inicialmente, os substratos foram tratados com solução piranha (mistura de ácido sulfúrico concentrado e peróxido de hidrogênio). Em seguida, os substratos foram submetidos à sonicação em acetona e posteriormente com isopropanol para eliminar resíduos remanescentes. Após a limpeza, a superfície de ouro foi seca sob fluxo de gás nitrogênio (N_2). Sob a superfície de Au limpa, $5 \mu\text{L}$ da solução de AgDENS foram

depositadas sobre a superfície limpa e não modificada, deixando reagir à temperatura ambiente, sob proteção contra luz, por 16 horas. Em seguida, o substrato foi lavado com água ultrapura e seco novamente com fluxo de N_2 .

4.5.2 Modificação do eletrodo de ouro com cisteamina e as nanopartículas de prata estabilizadas por dendrímero PAMAM-G3 para caracterizações eletroquímicas

A monocamada de cisteamina (CIS-SAM) foi formada pela adsorção direta da cisteamina sobre a superfície de ouro. Imediatamente após a limpeza, a superfície de ouro foi imersa em uma solução etanólica de CIS com concentração de 1 mmol L^{-1} , durante 4 horas. Após esse período, a superfície foi então lavada com etanol e água e seca sob fluxo de N_2 puro. A ativação dos grupos anino-terminais da CIS-SAM foi realizada pela adição de $5 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução aquosa de glutaraldeído (GLU, $1 \text{ \% g/v}$) durante 15 minutos, por fim, sobre a superfície ativada foi adicionado $5 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de AgDENS e incubado por 16 horas, em temperatura ambiente ao abrigo da luz.

4.5.3 Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-VIS)

A caracterização óptica da suspensão foi realizada por espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), utilizando um espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-2450, pertencente ao Grupo de Química de Materiais (GQM – UFPR). A amostra foi transferida para uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm , previamente limpa com etanol e água ultrapura, a fim de evitar interferências ópticas. As análises foram conduzidas no modo de absorbância, cobrindo a faixa espectral de 200 a 800 nm , com passo espectral de 1 nm .

4.5.4 Difração de raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X das amostras foram obtidos em um difratômetro da marca Shimadzu, modelo XRD-6000 (GQM – UFPR), utilizando radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). As análises foram realizadas na faixa de 2θ de 25° a 50° , com passo de varredura de $0,07^\circ$. As amostras foram preparadas por dropcasting sobre substratos de vidro previamente limpos. Após a deposição, os filmes foram secos em estufa a 100°C por 1 hora.

4.5.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram obtidas depositando-se uma gota da amostra, dispersa em água a uma concentração adequada para visualização, sobre grades de cobre revestidas com filme fino de carbono amorfo, que atua como suporte para a amostra. Após a deposição, as amostras foram secas em ambiente controlado à temperatura ambiente para

remoção do solvente. As imagens foram coletadas em um microscópio JEOL operando a 120 kV.

4.5.6 Ressonância de plasmons de superfície (SPR)

As medições de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) foram realizadas utilizando o instrumento Autolab Springle (Eco Chemie, Holanda) para analisar interações biomoleculares em tempo real. O sistema opera no modo de reflexão interna total atenuada (ATIR), empregando a configuração de Kretschmann. Neste arranjo, um feixe de luz p-polarizado é direcionado através de um prisma de vidro com alto índice de refração, em um ângulo específico que permite a reflexão interna total na interface vidro-metal. Essa configuração possibilita a excitação de plasmons de superfície (oscilações de elétrons livres na interface metal-dielétrica). O sensor SPR consistia de um disco de vidro com um índice de refração compatível com o do prisma, garantindo o acoplamento óptico ideal. Esse disco foi recoberto com um filme de ouro nanométrico (50 nm), formando a superfície sensível responsável pela detecção de variações no índice de refração induzidas por interações biomoleculares.

O instrumento possui uma célula de fluxo com capacidade de 300 μL , permitindo o controle preciso da injeção da amostra sobre a superfície sensível. Um laser de hélio-neônio (He-Ne) com comprimento de onda de emissão de 670 nm serve como fonte de radiação, proporcionando um feixe de luz estável e monocromático essencial para a excitação da ressonância. A intensidade da luz refletida é monitorada continuamente por um detector fotodiodo, capturando mudanças no ângulo SPR à medida que o índice de refração varia na interface metal-dielétrica. Os experimentos foram realizados a uma temperatura controlada de 23 ± 1 °C.

Os sensores SPR não modificados e modificados com MoS_2 , na ausência/presença da proteína, foram analisados por espectroscopia Raman. O equipamento WITec Alpha 300R, com laser de 532 nm, lentes objetivas de 50 $\times$ com potência de 0,5 mW, foi utilizado e o intervalo espectral analisado variou de 25 a 3800 cm^{-1} . Foram obtidos cinco espectros por amostra em diferentes pontos, com 30 acumulações de 2 segundos cada.

4.5.7 Voltametria cíclica (VC)

As medidas eletroquímicas dos eletrodos foram realizadas em um potenciostato Autolab (GQM – UFPR). A janela de potencial foi de -0,1 V a 0,25 V, com varredura de 10 mV s^{-1} . Um fio de Pt foi utilizado como contra-eletródo e um eletródo de Ag/AgCl como referência, uma solução de PBS foi utilizado como eletrólito de suporte.

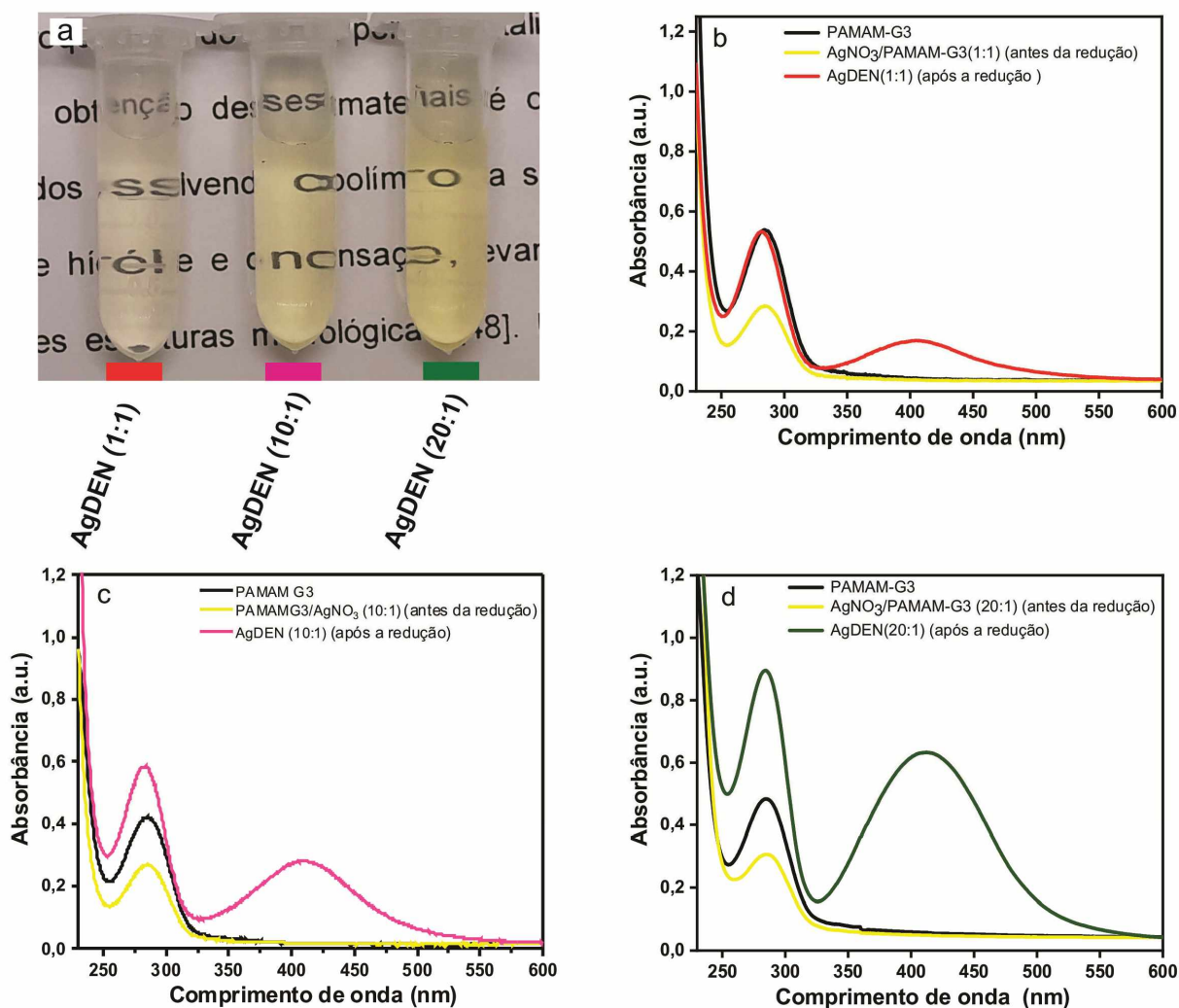
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ESPECTROSCOPIA UV-VIS

A primeira indicação da formação de nanopartículas de prata estabilizadas por dendrímeros (AgDENS) foi a mudança na cor das soluções. Inicialmente transparentes, as soluções tornaram-se amarelo-claro após a fotorredução, conforme mostrado na Figura 6a. Todo o processo de produção de AgNPs foi acompanhado por espectroscopia UV-Vis, pois as AgNPs exibem as bandas plasmônicas características na região visível do espectro eletromagnético ^{131,132}. As Figuras 6b, 6c e 6d evidenciam os resultados obtidos para as diferentes proporções de Ag⁺ no material (AgDENS). Para esses processos, inicialmente os espectros de absorção UV-Vis mostraram apenas a banda característica do dendrímero em 285 nm, atribuída à transição $\pi-\pi^*$ do grupo carbonila (C=O) ¹⁰⁰. Após a fotorredução, uma nova banda apareceu em 410 nm, atribuída à Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR) originada de oscilações coletivas de elétrons livres nos AgNPs ^{91,96-98,100,133-137}. As formas simétricas dessas bandas de plasmon sugerem ainda que elas são estruturas bem dispersas e esféricas ^{91,96,138,97,98,100,133-137}.

Uma análise comparativa da banda de 410 nm em diferentes sistemas revela um aumento notável em sua intensidade relativa. Esse aumento pode sugerir crescimento tanto no tamanho das nanopartículas quanto na quantidade de metal presente. O tamanho médio e a distribuição de tamanho, conforme observado pela microscopia eletrônica de transmissão (MET) na Figura 6, são semelhantes para ambos os sistemas. É possível correlacionar o aumento da intensidade com o uso de uma maior concentração de prata durante o processo de síntese. Esses resultados estão em linha com o observado por Endo et al. ¹³⁹. Adicionalmente, o aumento da razão de concentração de Ag⁺ na formação dos nanocompósitos não apresentou influência significativa na posição dessa banda, o que também foi relatado por Kéki et al ¹³⁹.

FIGURA 6 – (a) IMAGENS DAS SOLUÇÕES OBTIDAS AO FINAL DA SÍNTESE PARA AS DIFERENTES PROPORÇÕES ESTUDADAS SÃO APRESENTADAS. AS BARRAS DE CORES REPRESENTAM AS RESPECTIVAS COLORAÇÕES NOS ESPECTROS CORRESPONDENTES. A BARRA E A CURVA VERMELHAS REPRESENTAM OS AgDENs (1:1), A BARRA E A CURVA ROSAS REPRESENTAM OS AgDENs (10:1) E A BARRA E A CURVA VERDES REPRESENTAM OS AgDENs (20:1). (b) ESPECTRO UV-VIS DOS AgDENs (1:1); (c) ESPECTRO UV-VIS DOS AgDENs (10:1); (d) ESPECTRO UV-VIS DOS AgDENs (20:1).



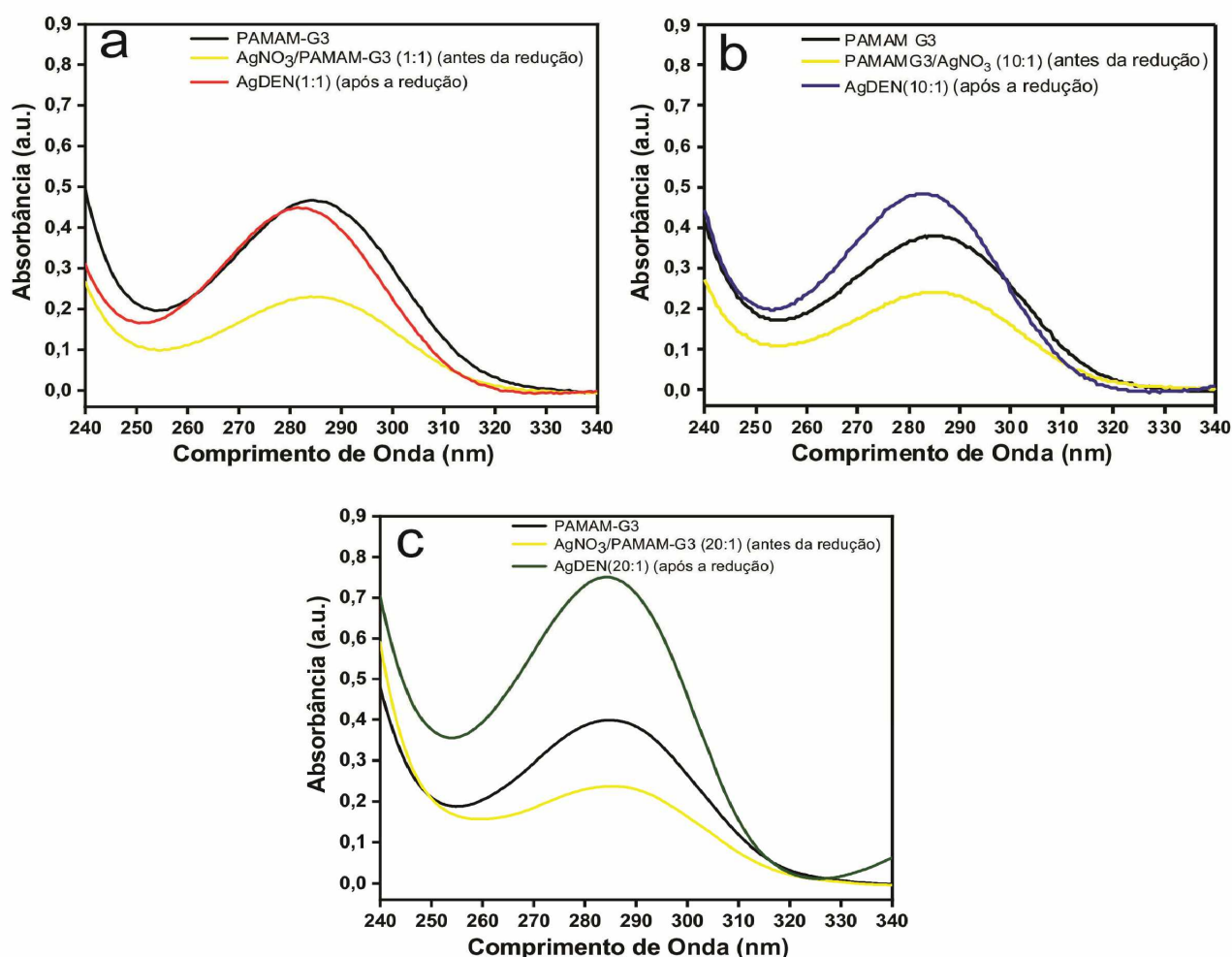
FONTE: O autor (2025).

Em relação à banda de 285 nm, ainda há algumas questões que requerem esclarecimentos, apesar da documentação substancial. Os artigos disponíveis mostram discrepâncias em alguns aspectos, e mais investigação é necessária para entender completamente o aparecimento e desaparecimento dessa banda, bem como sua intensidade e mudança^{91,96,140,141,97,98,100,133–137}. Esumi et al.⁹³ inicialmente atribuíram essa banda à formação de certos compostos carbonílicos, especificamente aldeídos, que são formados quando o dendrímero é exposto à

radiação UV ^{92,140}. Sabe-se que aldeídos alifáticos, como propionaldeído, isobutiraldeído e pivalaldeído, exibem bandas UV-Vis na região de 283-285 nm ^{140,142,143}. No entanto, Pande e Crooks ⁹⁶ demonstraram que essa banda surge exclusivamente de dendrímeros intactos ou quase intactos, em vez de fragmentos ⁹⁶. Os autores também sugerem que essa banda é condicionada pela protonação e desprotonação das aminas terciárias do dendrímero. Especificamente, de acordo com os autores, as aminas terciárias são protonadas em pH baixo, e a banda de 280-285 nm está ausente ^{96,144}. No entanto, quando esses grupos são desprotonados em pH mais alto, essa banda aparece ⁹⁶. Esses resultados contrastam com os relatados por Wang et al. ¹⁴⁵, em que os autores mostraram espectros de absorção UV-Vis de PAMAM-G2 em níveis de pH variando de 3 a 8. O dendrímero exibiu uma banda de absorção em 285 nm em pH 3. À medida que o pH aumentava, a intensidade de absorção diminuía. Quando atingiram pH 8, a banda de absorção de 285 nm quase desapareceu. Os autores não forneceram uma explicação para essa discrepância.

A influência da concentração de Ag^+ na formação de nanocompósitos foi avaliada; antes da redução, observamos que a adição de íons Ag^+ à solução de dendrímero resultou em uma diminuição na intensidade da banda de 285 nm (Figura 7), essa diminuição na intensidade da banda está associada à coordenação de íons Ag^+ com o dendrímero ¹⁴⁴. Após a redução, há um ligeiro deslocamento dessa banda em direção a comprimentos de onda mais curtos. Além disso, observamos uma proporcionalidade direta entre o aumento da intensidade dessa banda após a redução e a concentração de Ag^+ . Esse fenômeno também foi relatado por outros autores ao utilizar Au^{3+} em vez de Ag^+ ¹⁴⁰.

FIGURA 7 – ESPECTROS UV-Vis DO PAMAM-G3 E DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS POR DENDRÍMEROS (AgDENS) EM DIFERENTES PROPORÇÕES (ANTES E APÓS A REDUÇÃO): (a) PROPORÇÃO 1:1, (b) PROPORÇÃO 10:1, E (c) PROPORÇÃO 20:1.



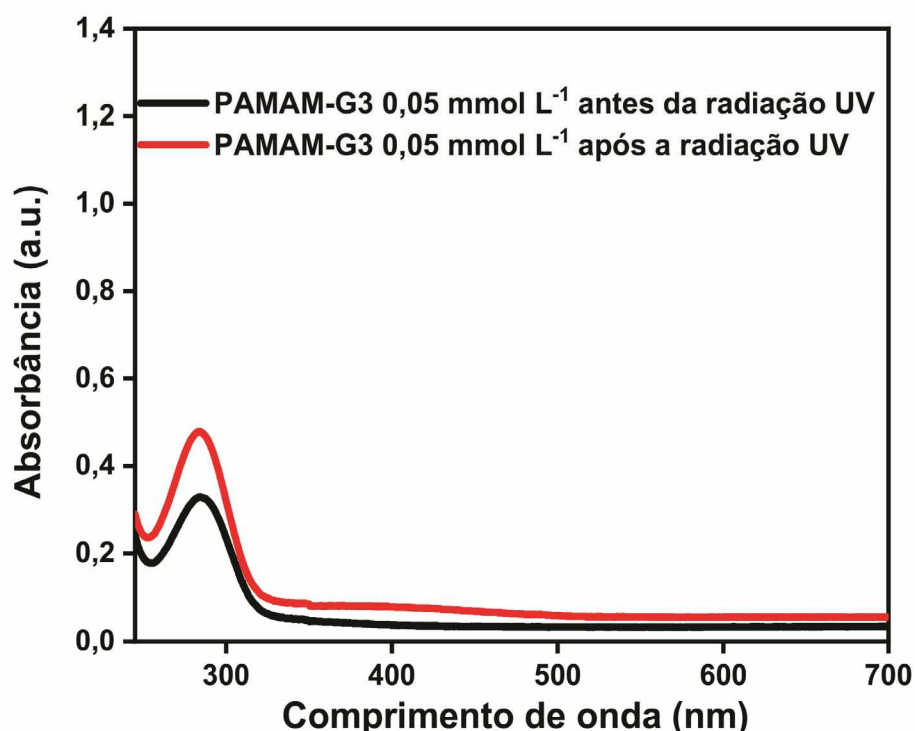
FONTE: O autor (2025).

Para investigar o impacto da radiação na estrutura dos dendrímeros, expusemos uma solução com a mesma concentração usada na síntese à radiação UV por 60 minutos. Registramos os espectros antes e depois da exposição (Figura 8). Os espectros dos dendrímeros após a exposição à radiação revelaram um aumento na intensidade da banda de 285 nm. Esse aumento na intensidade é provavelmente devido ao incremento da concentração na solução, resultante da evaporação da água durante o tempo de irradiação. A observação é que a banda permanece inalterada, indicando que a radiação UV não degrada a estrutura dos dendrímeros.

Ressonâncias de plasmon de superfície em nanopartículas metálicas têm atraído interesse significativo, tornando-as relevantes para uma ampla gama de aplicações, principalmente devido ao aumento significativo do campo eletromagnético próximo à superfície do metal ¹⁴⁶. Conforme anteriormente discutido, as ressonâncias plasmônicas são altamente sensíveis às variações no tamanho, morfologia e nas características do ambiente dielétrico circundante das

nanopartículas^{97,147,148}. Assim, atribuímos o aumento da intensidade nessa banda a 280 nm, principalmente à mudança no ambiente dielétrico local das nanopartículas de prata após a formação do nanocompósito⁹⁷. As observações relatadas acima, com base nos espectros de absorção UV-Vis, em relação ao tamanho e à distribuição de tamanho, foram confirmadas pelas técnicas de e MET e DRX, veja Figuras 10 e 11, respectivamente.

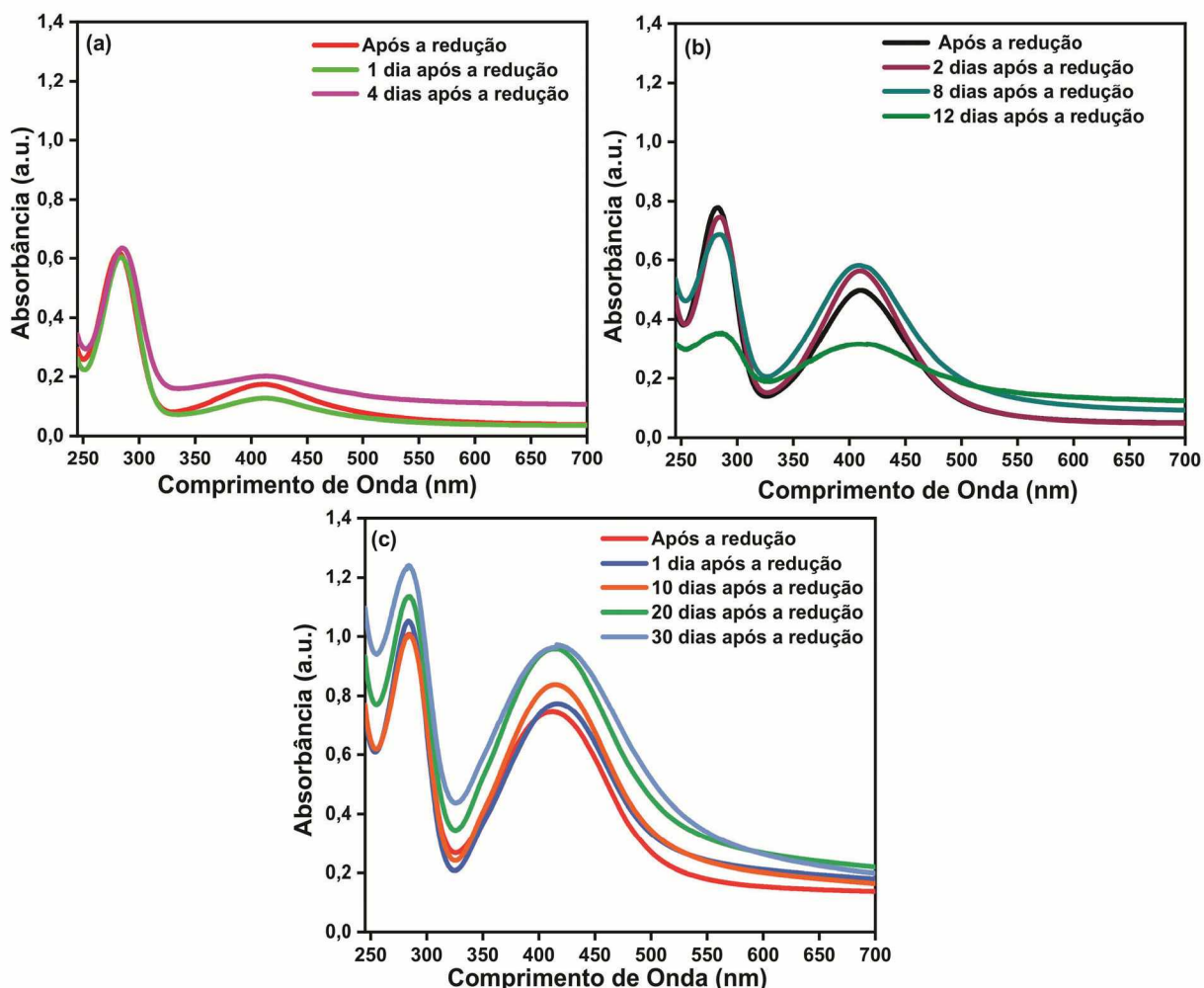
FIGURA 8 – ESPECTROS DE UV-Vis DO PAMAM G3 (0,05 mmol L⁻¹) ANTES E APÓS A EXPOSIÇÃO A RADIAÇÃO UV (8W, λ = 256 nm).



FONTE: O autor (2025).

O máximo em absorbância e também a largura à meia altura da banda plasmon dependem de diversos de fatores, entre eles podemos destacar o tamanho médio, a distribuição de tamanhos e o formato de nanopartículas¹⁴⁹. A análise das soluções de AgDENS em diferentes dias após a síntese (Figura 9), mostra um alargamento gradual na banda em 410nm, ao longo dos dias, para ambos os sistemas estudados. Para a proporção (20:1), é observado ainda o deslocamento dessa banda plasmon para regiões de menor energia. Esse alargamento e deslocamento pode ser explicado como um aumento gradual no diâmetro das nanopartículas inicialmente sintetizadas, consistindo em uma maior aglomeração/agregação⁹⁵.

FIGURA 9 – ESPECTROS DE UV-VIS DAS NANOPARTICULAS DE PRATA ESTABILIZADAS POR DENDRIMEROS, APÓS A REDUÇÃO E EM DIFERENTES DIAS APÓS A REDUÇÃO, NAS PROPORÇÕES (a) 1:1, (b) 10:1E (b) 20:1.



FONTE: O autor (2025).

5.2 MICROSCOPIA ELETRONICA DE TRANSMISSÃO (MET)

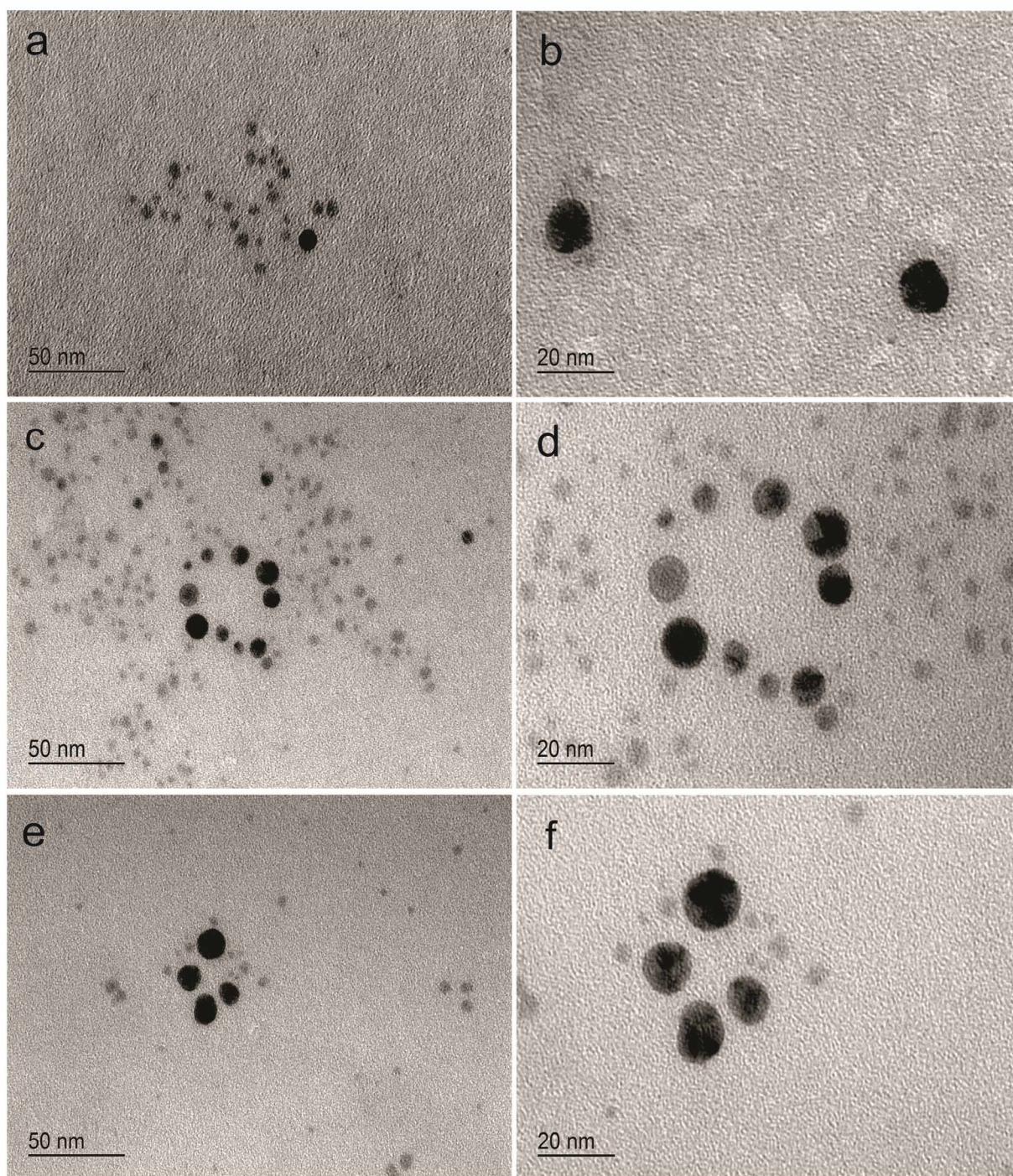
A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma técnica poderosa, possibilita a distinção da morfologia e do tamanho de diferentes tipos de nanopartículas, sintetizadas por variados métodos ¹⁵⁰. As imagens obtidas por MET das AgDENS são mostradas na Figura 10, o software ImageJ foi usado para medir o diâmetro das AgDENS. Para o sistema (1:1) o tamanho das nanopartículas variou de aproximadamente 4 a 17 nm (média: 8 nm), já para o sistema (10:1) o tamanho das nanopartículas variou de 4 a 10 nm (média; 5 nm), e finalmente para o sistema (20:1) o tamanho das nanopartículas variou de 4 a 16 nm (média; 7 nm).

Uma comparação das imagens confirma que o uso de baixas concentrações de Ag⁺ leva a formação de aglomerados de nanopartículas maiores, este resultado corrobora com os relatos anteriormente por LI et al. ¹⁰². A localização das

nanopartículas na estrutura dos nanocompósitos formados é um ponto discordante na literatura, alguns autores afirmam que as Nps são estabilizadas no interior das macromoléculas, especificamente nos grupos amins terciárias, enquanto outros afirmam que as Nps se coordenam as amins primarias do dendrímeros, a parte mais reativa da macromolécula.

Levando em consideração que o diâmetro ideal da esfera de dendrímero PAMAM-G3 é de 3,6 nm ⁸⁸, no entanto, a análise das imagens mostra que os tamanhos médios das AgDENSs chegam a ser mais de 2 vezes maior que o diâmetro hidrodinâmico do dendrímero, não é esperado que o núcleo do dendrímero seja maior que seu diâmetro hidrodinâmico ¹⁵¹. O que sustenta a ideia que as AgNps se estabilizam tanto nos grupos mais reativos do dendrímero (aminas terminais), quanto nos grupos internos, conforme mostrado por FTIR-ATR (Figura 12). Também é pertinente mencionar que o presente estudo foi realizado com o dendrímero de geração 3, e estes possuem uma menor densidade de grupos terminais em comparação com os dendrímeros de gerações mais altas, consequentemente possuem uma forma mais aberta, o que permite a complexação de íons metálicos tanto na sua periferia quanto internamente ¹⁰².

FIGURA 10 - (a) E (b) IMAGENS DE MET DAS AgDEN (1:1), (c) E (d) IMAGENS DE MET DAS AgDEN (10:1), (e) E (f) IMAGENS DE MET DAS AgDEN (20:1).

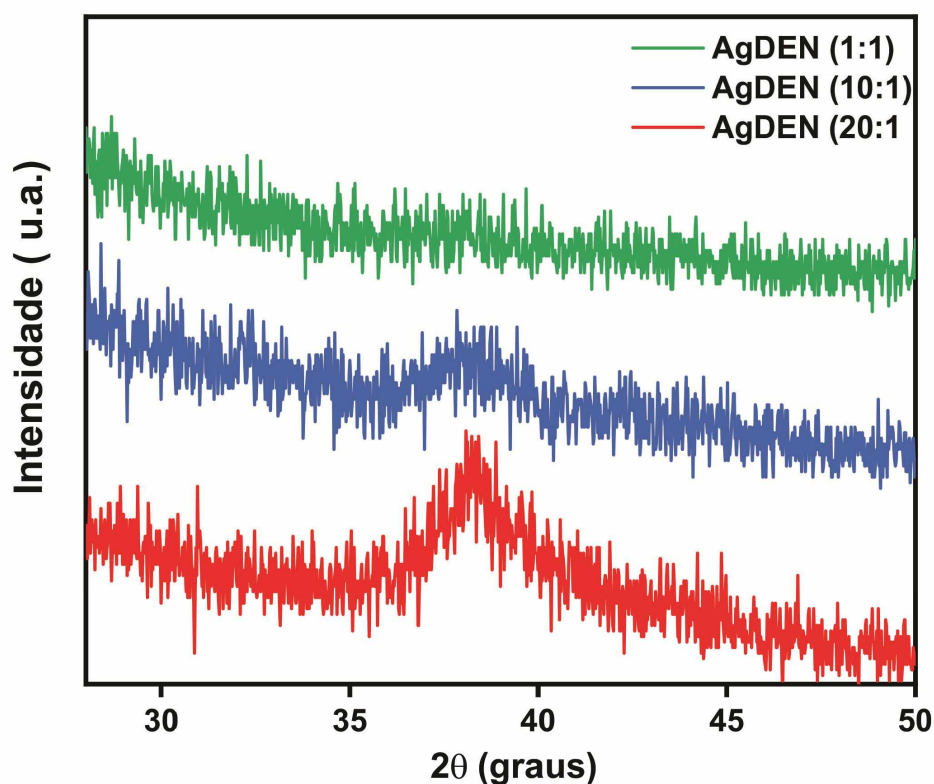


FONTE: O autor (2025).

5.3 DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X (DRX)

A natureza cristalina das nanopartículas foi confirmada pela análise de DRX, como mostrado na Figura 11. O difratograma de DRX para ambos os sistemas exibiu picos em $2\theta = 38,14^\circ$, que representa o plano (111) da prata cúbica de face centrada. No entanto, os picos de difração são largos, o que indica tratar-se de estruturas bastante pequenas, confirmando a observação anterior. À medida que a concentração de prata diminuiu, não foi possível observar o pico utilizando o mesmo volume na preparação das amostras. A equação de Debye-Scherrer foi usada para se obter o tamanho médio do cristalito, dado por $d = k\lambda/\beta \cos \theta$, em que, d é o tamanho médio dos domínios ordenados (cristalinos), que podem ser menores ou iguais ao tamanho do grão, K é um fator de forma adimensional, com um valor próximo à unidade. O fator de forma tem um valor típico de cerca de 0,95, mas varia com a forma real do cristalito; λ é o comprimento de onda dos raios X, β é a largura a meia altura do pico de intensidade máxima (FWHM) e θ é o ângulo de Bragg¹⁵². O tamanho médio das AgNps foi estimado para o sistema 20:1, e é de aproximadamente 3,5 nm.

FIGURA 11 – PADRÕES DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DAS NANOPARTÍCULAS ESTABILIZADAS POR DENDRÍMERO NAS PROPORÇÕES 1:1, 10:1 E 20:1.



FONTE: O autor (2025).

5.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER MODO DE REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR)

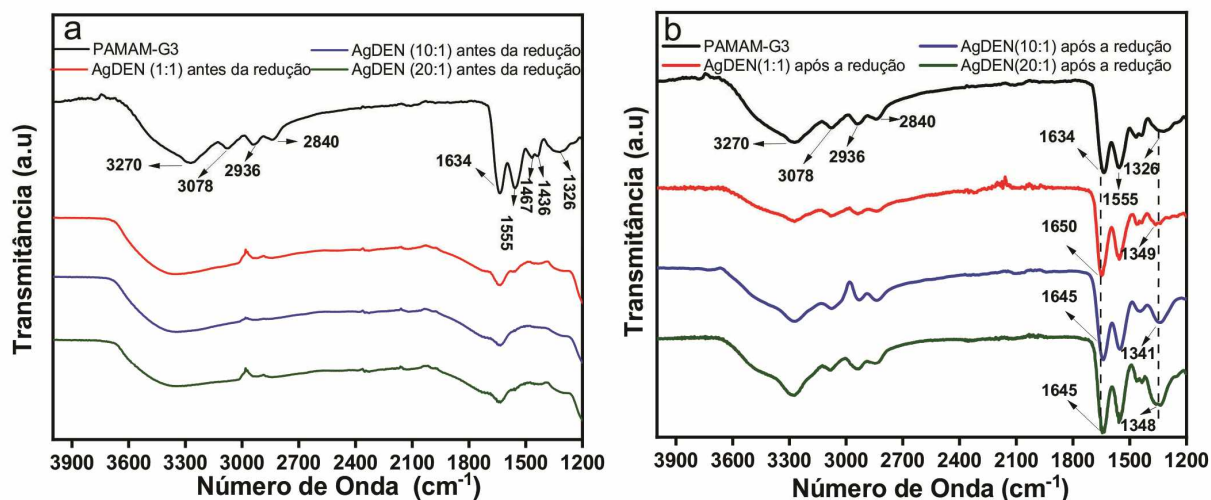
A análise FTIR-ATR foi realizada para entender e monitorar a coordenação de íons metálicos com PAMAM-G3. Além disso, a presença de vários grupos funcionais na superfície das nanopartículas sintetizadas foi confirmada^{87,153}. Os espectros de PAMAM-G3, AgDENs antes e depois da fotorredução são ilustrados nas Figuras 12a e 12b. O espectro do PAMAM-G3 revela bandas características, amplamente descritas na literatura^{86,100,151,153–159}. As bandas em 3270 cm^{-1} e 3078 cm^{-1} estão associadas ao estiramento simétrico e assimétrico de N-H em aminas primárias, enquanto as bandas em 2936 cm^{-1} e 2840 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de estiramento assimétrico e simétrico de CH_2 , respectivamente^{86,100,151,153–159}.

A banda de absorção em 1634 cm^{-1} é atribuída às vibrações de estiramento C=O (amida I), enquanto a banda centrada em 1555 cm^{-1} é atribuída às vibrações de estiramento C-N / vibração N-H (amida II)^{100,159–161}. Esta última banda corresponde à amida dos ramos do dendrímeros, servindo como a principal característica da conformação do ramo¹⁵⁹. Vibrações de estiramento de C-N pode ser observado em 1325 cm^{-1} e 1467 cm^{-1} ⁸⁶, e finalmente, o modo de deformação angular do CH_2 pode ser observado em 1436 cm^{-1} ¹⁵¹.

A análise dos espectros antes da redução mostra que as bandas originalmente presentes no PAMAM-G3 exibem uma redução significativa na intensidade e desaparecem do espectro (Figura 12a). Os dendrímeros PAMAM têm uma alta disponibilidade de grupos funcionais que podem participar de reações com íons Ag^+ ¹⁴⁰. Portanto, essa observação foi atribuída à coordenação de íons Ag^+ com os grupos disponíveis dentro da estrutura do dendrímero. A literatura relata que inicialmente os íons Ag^+ coordenam-se com as aminas primárias externas presentes na estrutura do dendrímero e, após a redução, penetram no interior da macromolécula^{102,162}.

Os espectros FTIR-ATR de soluções de nanopartículas de prata estabilizadas por dendrímero (Figura 12b) são ligeiramente diferentes quando comparados a soluções de dendrímero puro. Para ambos os sistemas estudados, houve uma mudança nas bandas atribuídas à amida I e estiramento C-N após a redução. Nenhuma mudança significativa foi observada nas bandas restantes após a redução. Essas alterações sugerem o envolvimento do grupo amida na interação com nanopartículas de prata, conforme relatado por outros autores^{86,87,151,163–165}.

FIGURA 12 – ESPECTROS DE TRANSFORMADA DE FOURIER NO INFRAVERMELHO, MODO DE REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR): (a) PAMAM-G3 E AgDENs ANTES DA REDUÇÃO, E (b) PAMAM-G3 E AgDENs APÓS A REDUÇÃO.



FONTE: O autor (2025).

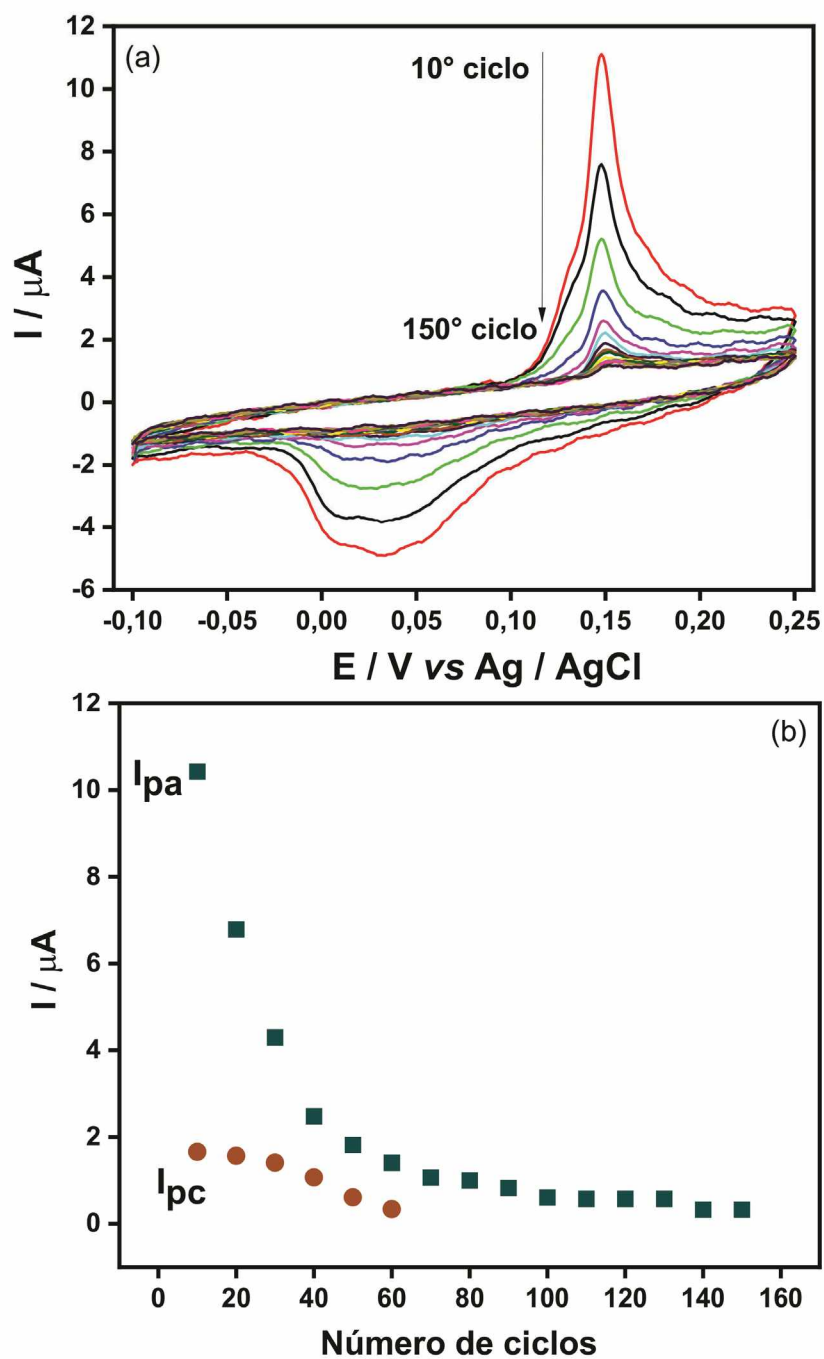
5.5 CARACTERIZAÇÕES ELETROQUÍMICAS

5.5.1 Modificação do eletrodo de ouro

Depois de estabelecer a estrutura das nanopartículas, a voltametria cíclica foi realizada em tampão PBS pH 7,1 para investigar o comportamento eletroquímico das AgDENs sobre a superfície de ouro, visando uma futura aplicação eletroanalítica. A modificação do eletrodo de ouro foi realizada de acordo com o procedimento descrito na seção 4.1.2. O eletrodo modificado foi submetido a 150 ciclos consecutivos a velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} , em um intervalo de potencial entre -0.1 V a $+0.25 \text{ V}$, a fim de se observar a sua estabilidade eletroquímica (Figuras 13, 14 e 15). Em ambos os sistemas, observa-se um único par de picos redox, indicando um processo eletroquímico característico e bem definido. O pico de oxidação, localizado em $0,15 \text{ V}$, é atribuído à formação de cloreto de prata (AgCl) a partir da prata metálica, enquanto o pico de redução, observado em $0,04 \text{ V}$, corresponde à redução do AgCl de volta à forma metálica^{97,166,167}.

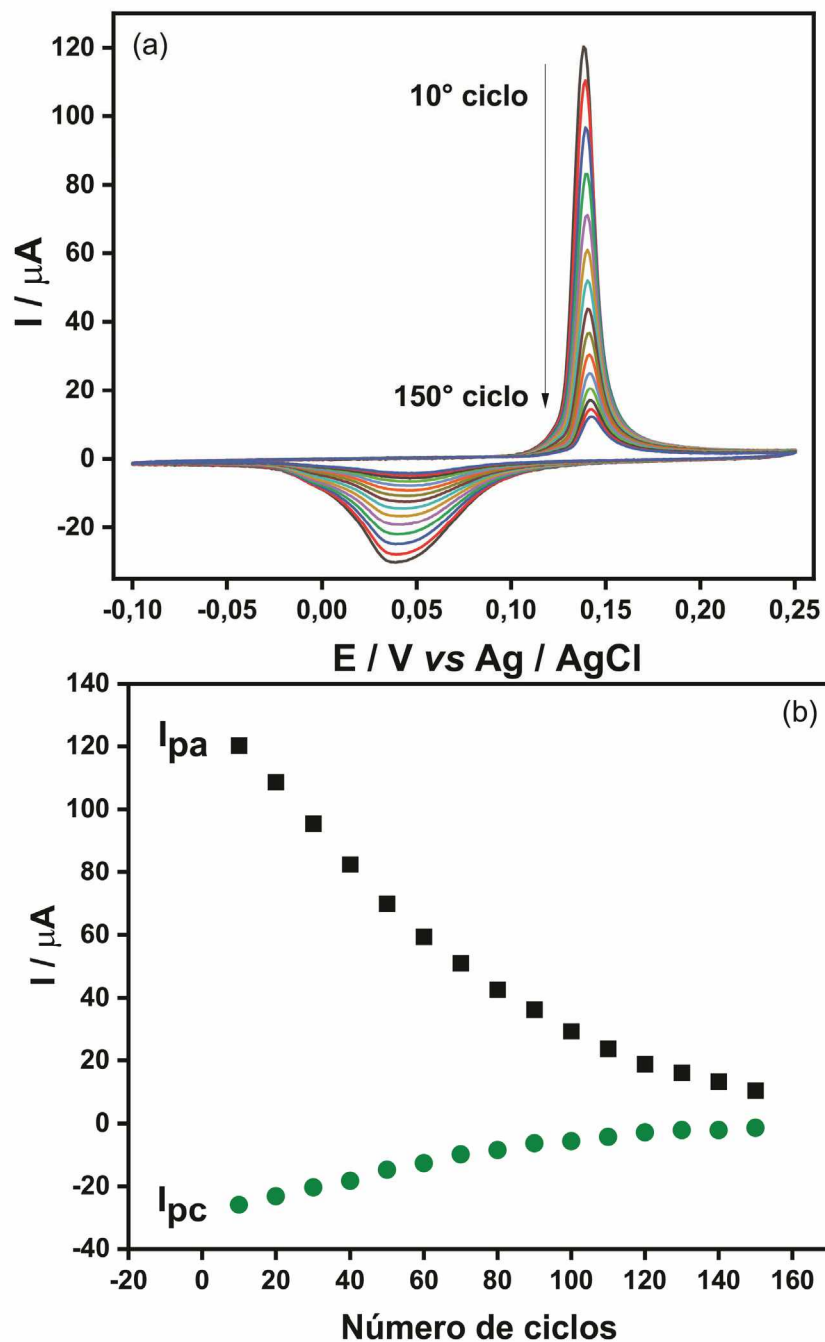
Para ambos os sistemas é observado uma gradativa diminuição das correntes do par redox ao longo dos ciclos, demonstrando que há uma certa instabilidade do filme formado, fator fundamentalmente importante, uma vez que pode comprometer o sucesso da aplicação do material na construção de biossensores eletroquímicos¹⁶⁸.

FIGURA 13 – (a) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ELETRODO DE OURO MODIFICADO COM AgDEN (1:1) UTILIZANDO A VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s^{-1} EM UM INTERVALO DE POTENCIAL DE $-0,1 \text{ V}$ A $+0,25 \text{ V}$ (TAMPÃO PBS pH 7, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), (b) RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES DAS CORRENTES ANODÍCAS E CATÓDICAS E O NÚMERO DE CICLOS VOLTAMÉTRICOS.



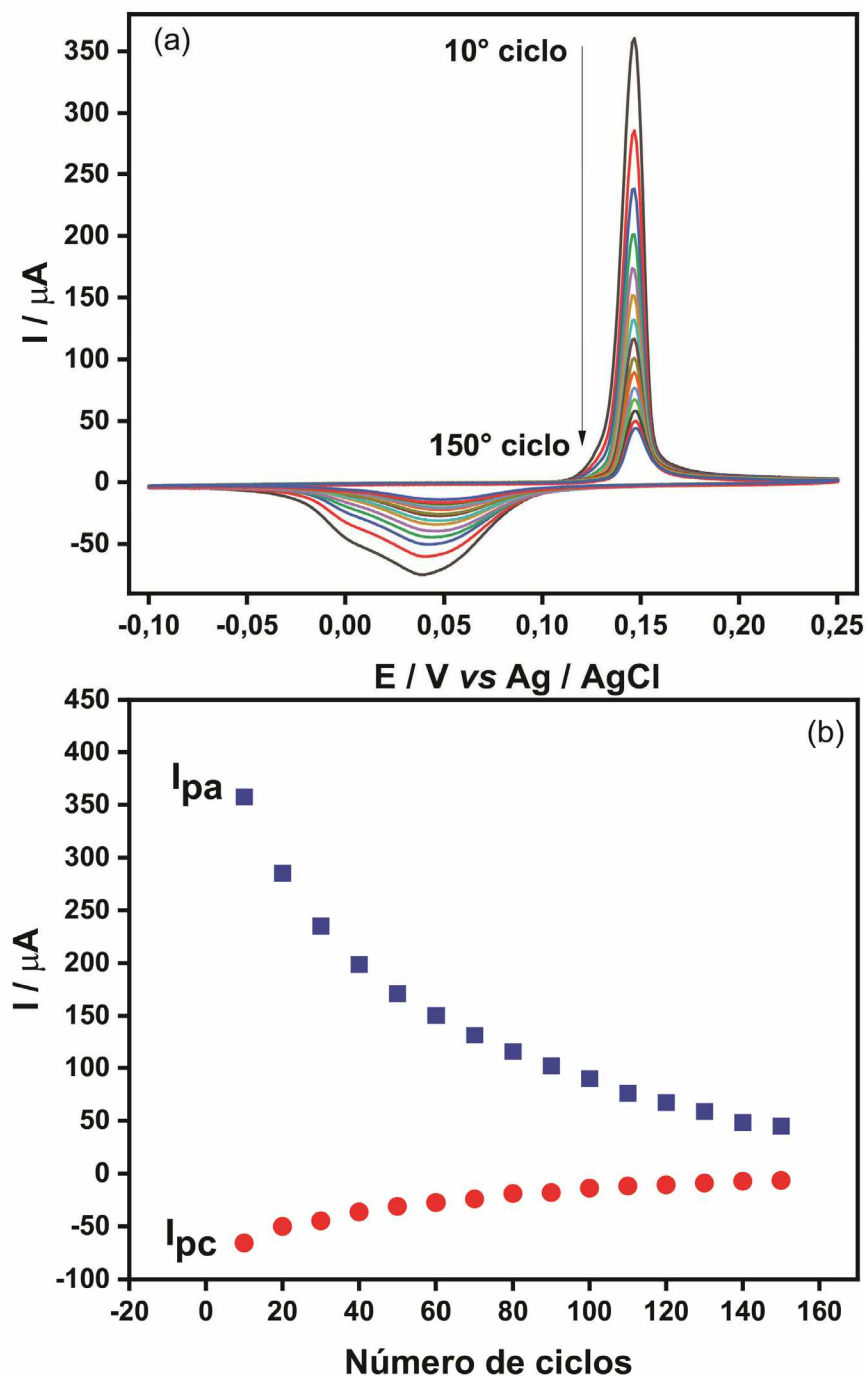
FONTE: O autor (2025).

FIGURA 14 –(a) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ELETRODO DE OURO MODIFICADO COM AgDEN(10:1) UTILIZANDO A VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s^{-1} EM UM INTERVALO DE POTENCIAL DE -0,1 V A +0,25 V (TAMPÃO PBS pH 7, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), (b) RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES DAS CORRENTES ANODÍCAS E CATÓDICAS E O NÚMERO DE CICLOS VOLTAMÉTRICOS.



FONTE: O autor (2025).

FIGURA 15 –(a) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ELETRODO DE OURO MODIFICADO COM AgDEN(20:1) UTILIZANDO A VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s^{-1} EM UM INTERVALO DE POTENCIAL DE -0,1 V A +0,25 V (TAMPÃO PBS pH 7, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), (b) RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES DAS CORRENTES ANODÍCAS E CATÓDICAS E O NÚMERO DE CICLOS VOLTAMÉTRICOS.



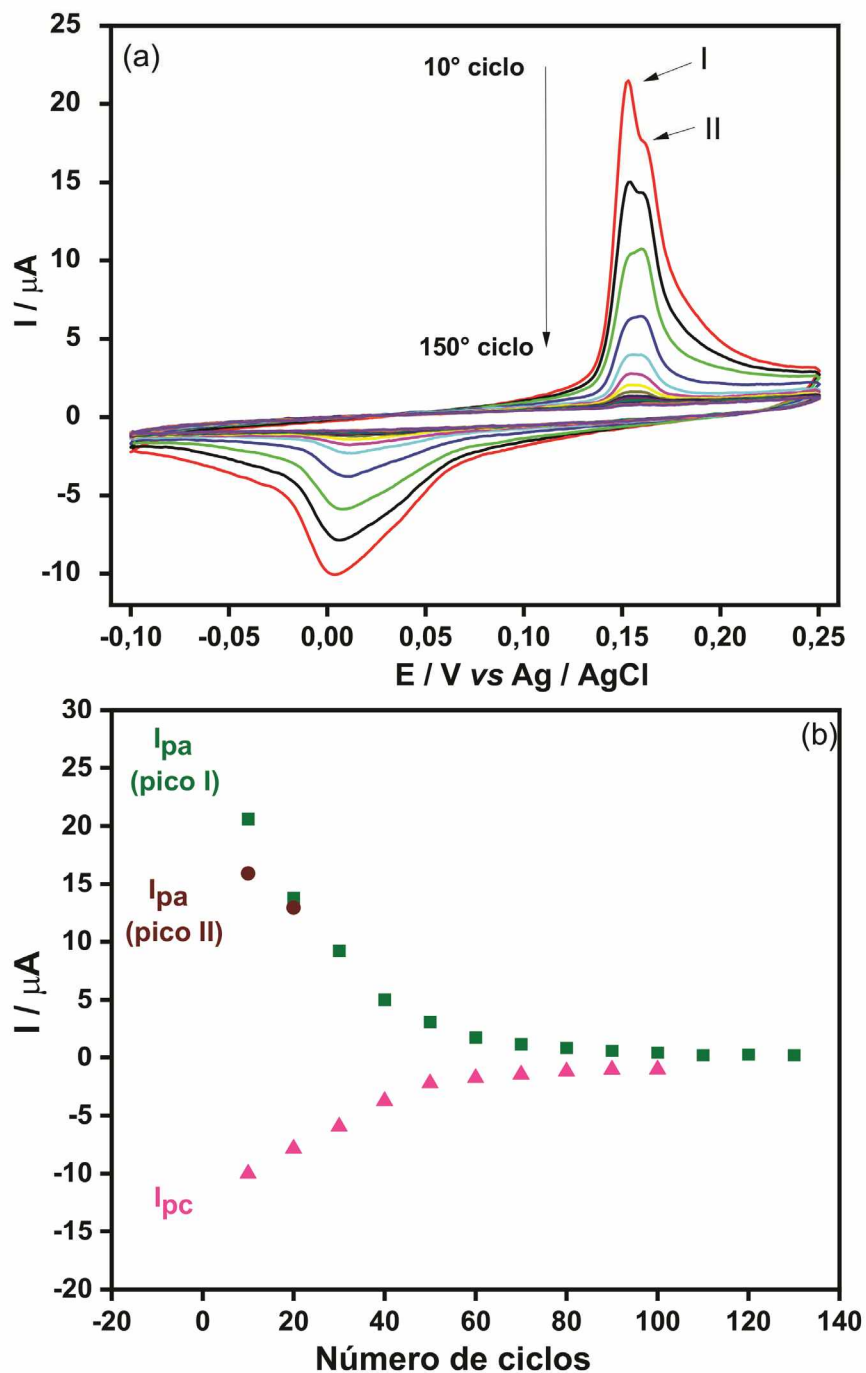
FONTE: O autor (2025).

A análise dos voltamogramas revelou que, apesar da presença de um par redox bem definido associado ao sistema Ag/AgCl, as correntes de pico diminuem gradativamente ao longo dos 150 ciclos, indicando uma perda progressiva da atividade eletroquímica. Esse comportamento sugere que o filme de nanopartículas de prata estabilizadas por dendrímeros (AgDENS) sofre degradação ao longo dos ciclos de varredura, possivelmente em decorrência de processos de lixiviação. Tal limitação é particularmente relevante no desenvolvimento de sensores eletroquímicos, nos quais a estabilidade ao longo dos ciclos é fundamental para assegurar respostas analíticas reprodutíveis e confiáveis. Portanto, torna-se evidente a necessidade de estratégias que promovam maior adesão e integridade do filme, a fim de viabilizar aplicações práticas.

5.5.2 Modificação do eletrodo de ouro com cisteamina e com as nanopartículas de prata estabilizadas por dendrímero PAMAM-G3

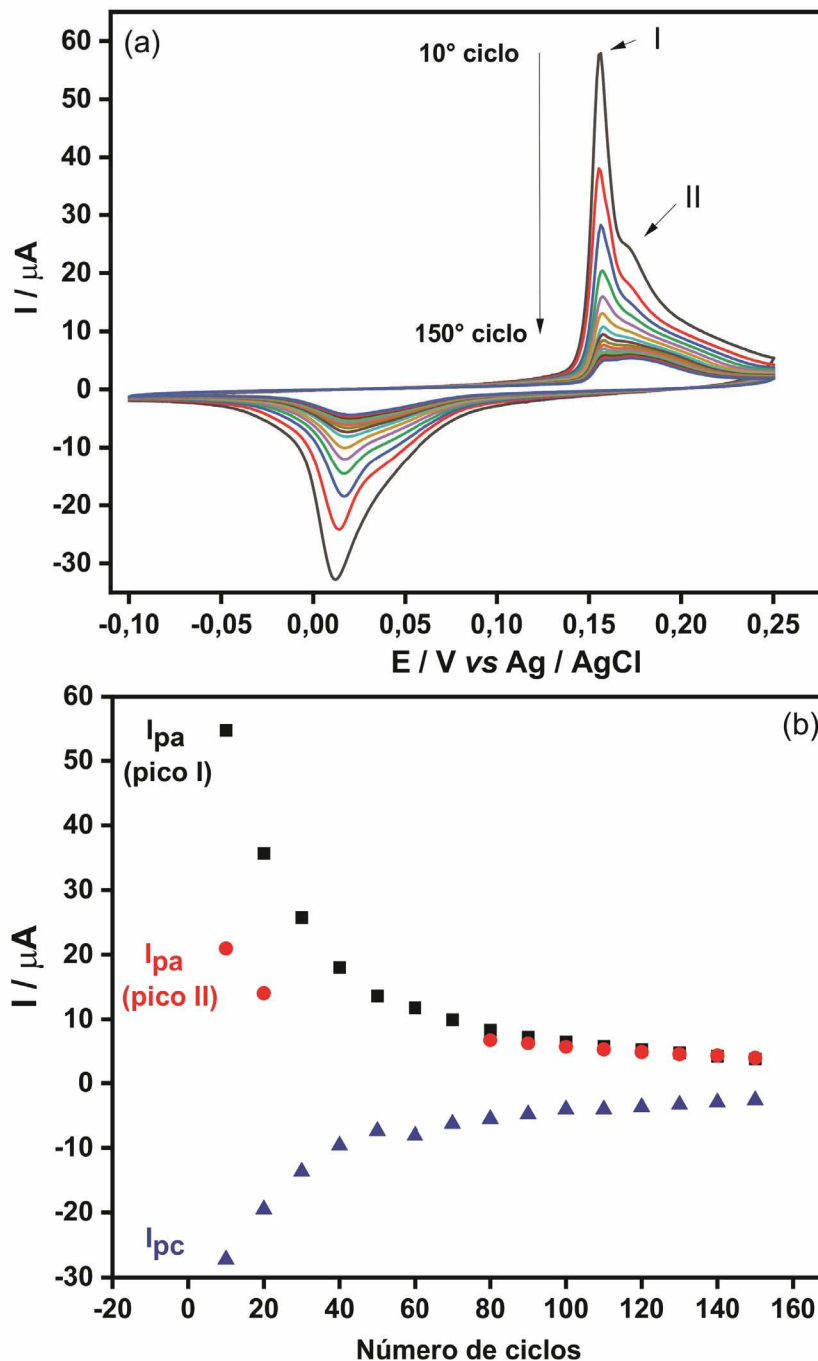
Com o objetivo de aprimorar a estabilidade do filme, foi explorado o método LbL sobre a superfície de ouro, conforme o procedimento descrito na seção 4.5.2. A análise dos resultados (Figuras 16, 17 e 18) revela que, para ambos os sistemas, há dois processos de oxidação centrados em 0,15 V e 0,17 V (pico I e pico II, respectivamente), além de um único processo de redução a 0,01 V. O pico em 0,15V é atribuído às nanopartículas de prata que estão mais internamente estabilizadas na estrutura do PAMAM-G3, enquanto o pico em 0,17 V pode ser relacionado às nanopartículas de prata localizadas na parte externa da estrutura do dendrímero. Isso corrobora a ideia de que a prata se liga às aminas primárias e terciárias do PAMAM-G3. A análise das correntes de oxidação e redução em função do número de ciclos para os sistemas mostra que, após aproximadamente o 70º ciclo voltamétrico, observa-se estabilidade nas correntes de oxidação e redução para ambos os sistemas estudados (Figuras 16b, 17b e 18b).

FIGURA 16 – (a) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ELETRODO DE OURO MODIFICADO COM CIS-SAM e AgDEN (1:1) UTILIZANDO A VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s^{-1} EM UM INTERVALO DE POTENCIAL DE $-0,1 \text{ V}$ A $+0,25 \text{ V}$ (TAMPÃO PBS pH 7, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), (b) RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADE DAS CORRENTES ANODÍCAS E CATÓDICAS E O NÚMERO DE CICLOS VOLTAMÉTRICOS.



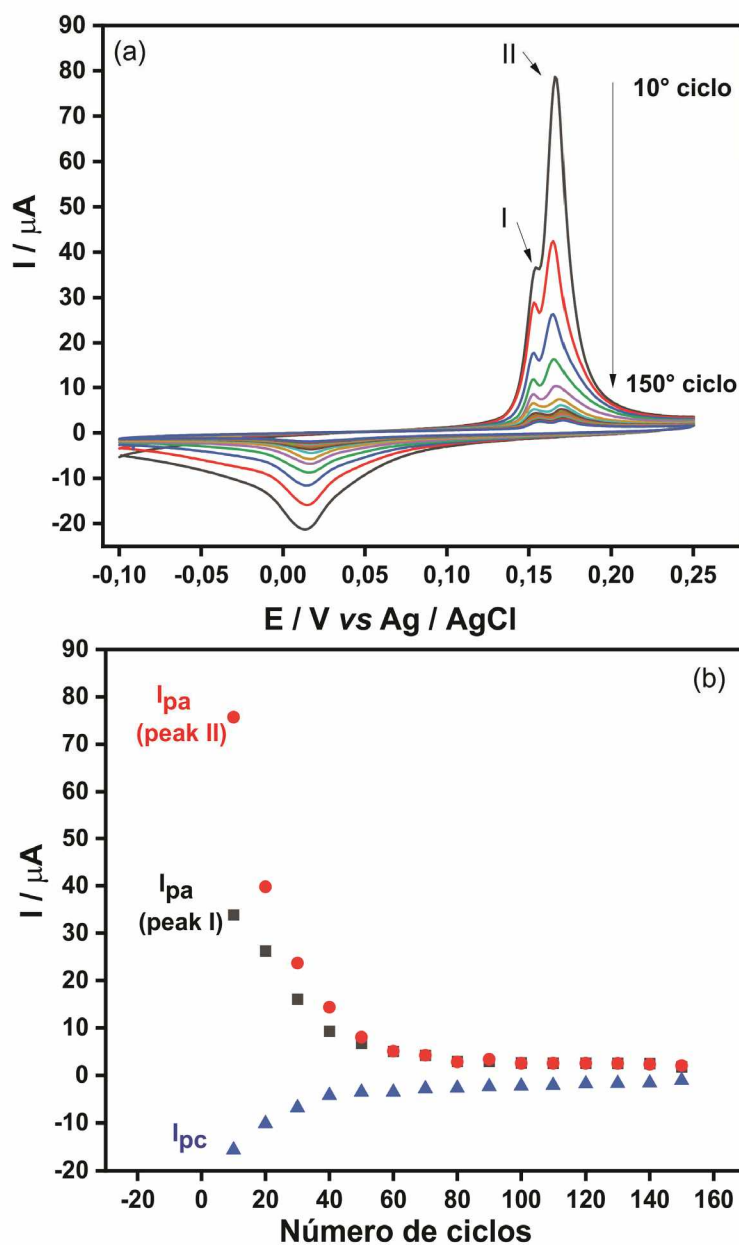
FONTE: O autor (2025).

FIGURA 17 – (a) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ELETRODO DE OURO MODIFICADO COM CIS-SAM e AgDEN (10:1) UTILIZANDO A VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s^{-1} EM UM INTERVALO DE POTENCIAL DE $-0,1 \text{ V}$ A $+0,25 \text{ V}$ (TAMPÃO PBS pH 7, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), (b) RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADE DAS CORRENTES ANODÍCAS E CATÓDICAS E O NÚMERO DE CICLOS VOLTAMÉTRICOS.



FONTE: O autor (2025).

FIGURA 18 — (a) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DO ELETRODO DE OURO MODIFICADO COM CIS-SAM e AgDEN (20:1) UTILIZANDO A VELOCIDADE DE VARREDURA DE 10 mV s^{-1} EM UM INTERVALO DE POTENCIAL DE $-0,1 \text{ V}$ A $+0,25 \text{ V}$ (TAMPÃO PBS pH 7, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), (b) RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADE DAS CORRENTES ANODÍCAS E CATÓDICAS E O NÚMERO DE CICLOS VOLTAMÉTRICOS.



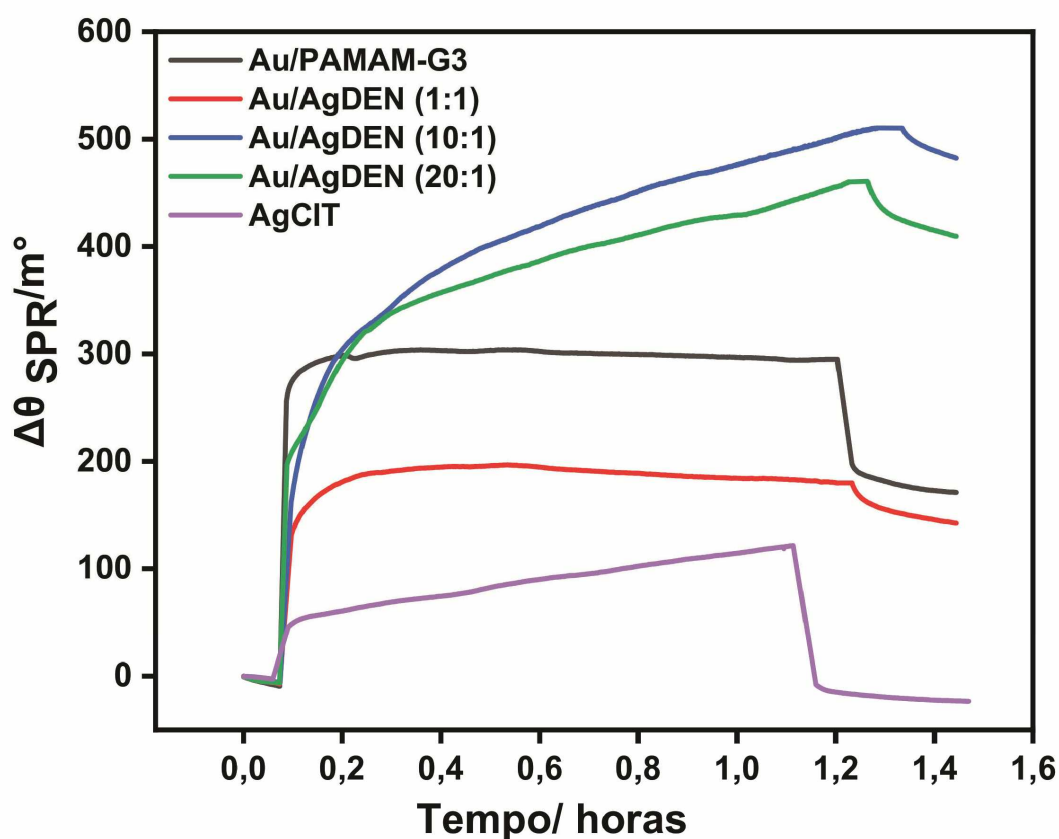
FONTE: O autor (2025).

As plataformas formadas pelo método LbL apresentam limitações significativas para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos. Apesar de uma estabilização observada nas correntes de oxidação e redução após aproximadamente 70 ciclos voltamétricos, a baixa intensidade da corrente redox gerada compromete a sensibilidade do sistema. Isso dificulta substancialmente a detecção de analitos em baixas concentrações, particularmente em amostras complexas e reais.

5.6 USO DA TÉCNICA DE SPR PARA MONITORAMENTO *IN SITU* DA INTERAÇÃO DE PAMAM-G3 E DOS NANOMATERIAIS COM SUPERFÍCIES DE OURO

Sensorgramas ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$ vs tempo) foram obtidos (Figura 19) para os processos de interação envolvendo diferentes razões molares de AgDENS (1:1, 10:1 e 20:1), dendrímero PAMAM-G3 (DEN) e nanopartículas de prata estabilizadas por citrato (AgCIT). A inclusão do sistema AgCIT foi fundamental para servir como controle comparativo, permitindo avaliar de forma precisa o papel do dendrímero na afinidade e na cinética de ligação do nanocompósito com a superfície do sensor SPR.

FIGURA 19 – SENSORGRAMAS OBTIDOS EM TEMPO REAL MOSTRAM A INTERAÇÃO ENTRE DIFERENTES MATERIAIS E O CHIP SENSOR SPR, APRESENTANDO SUAS FASES TÍPICAS: A LINHA DE BASE OBTIDA COM H₂O, A FASE DE LIGAÇÃO DOS DIFERENTES MATERIAIS, A FASE ESTACIONÁRIA E A FASE DE LAVAGEM. A CURVA EM PRETO CORRESPONDE AO PAMAM-G3, A CURVA EM VERMELHO CORRESPONDE AO NANOCOMPÓSITO NA PROPORÇÃO 1:1, A CURVA EM AZUL PARA UMA PROPORÇÃO 10:1 E A CURVA EM VERDE PARA UMA PROPORÇÃO 20:1. A CURVA EM ROXO CORRESPONDE ÀS NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS COM CITRATO (AgCIT).



FONTE: O autor (2025).

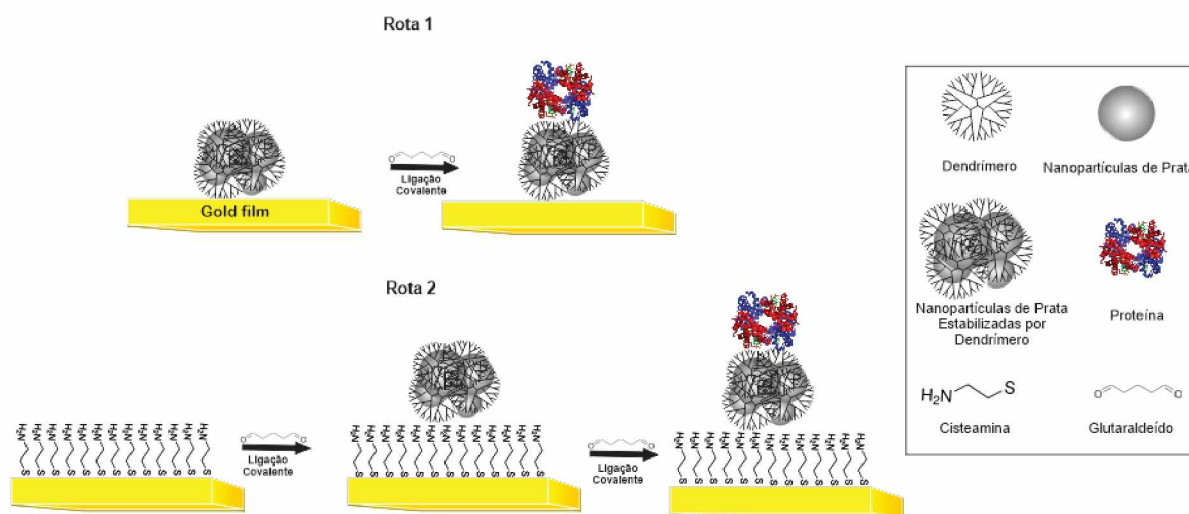
Para o dendrímero PAMAM-G3 e para as AgDENSs, mesmo após a etapa de lavagem, observa-se apenas uma leve diminuição nas variações do ângulo de ressonância ($\Delta\theta_{SPR}$). Por outro lado, observa-se que para as nanopartículas de prata protegidas por citrato (AgCIT), há uma diminuição significativa em $\Delta\theta_{SPR}/m^\circ$, caindo abaixo da linha de base pré-estabelecida. Isso demonstra que não houve interação significativa entre a superfície de Au e AgCIT. A maior estabilidade observada para PAMAM-G3 e AgDENSs pode ser explicada por dois fatores, como demonstrado por Tokuhisa et al.¹⁶⁹. Primeiro, a grande área de superfície de PAMAM-G3 e seu exterior denso resultam em uma forte interação de van der Waals com a superfície de Au¹⁶⁹. Segundo, o grande número de grupos amina em PAMAM-G3 adsorve quimicamente na superfície de Au e, analogamente à química de metais coordenados a ligantes polidentados, estabiliza a interação amina/Au¹⁶⁹.

Para obter maior estabilidade química e mecânica para a ligação do biorreceptor no sensor, um sistema camada sobre camada LbL, também foi explorado. O uso de monocamadas automontadas (SAMs) é uma das estratégias mais amplamente empregadas na construção de biossensores SPR, como mencionado anteriormente. Cisteamina (CIS), um alcanotiol de cadeia curta de baixo custo, foi usado para modificar o sensor SPR. Sua estrutura contém um grupo tiol (-SH) em uma extremidade, que forma ligações ouro-tiol, e um grupo funcional amino-terminal (-NH₂) na outra¹⁷⁰.

A estratégia adotada para imobilizar AgDENSs no sensor SPR modificado com CIS-SAM, e a imobilização de diferentes biomoléculas nas plataformas construídas, envolveu o uso de glutaraldeído como agente de reticulação. O glutaraldeído (GLU) é um reagente bifuncional comumente usado para imobilizar biomoléculas em superfícies metálicas. Ele possui grupos aldeído altamente reativos, permitindo que ele interaja com diferentes proteínas por meio de grupos ϵ -amino e N-terminal de lisina, embora possa ocasionalmente reagir com outros grupos, como tiol, fenol e imidazol¹⁷¹⁻¹⁷³.

Para melhor compreensão, os processos de imobilização e ativação são representados esquematicamente na Figura 20. A imobilização de AgDENSs no sensor SPR não modificado (Rota 1, Figura 20) e no sensor modificado com CIS-SAM (Rota 2, Figura 20) foi avaliada em tempo real.

FIGURA 20 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS DIFERENTES ETAPAS DA MODIFICAÇÃO DO SENSOR SPR.

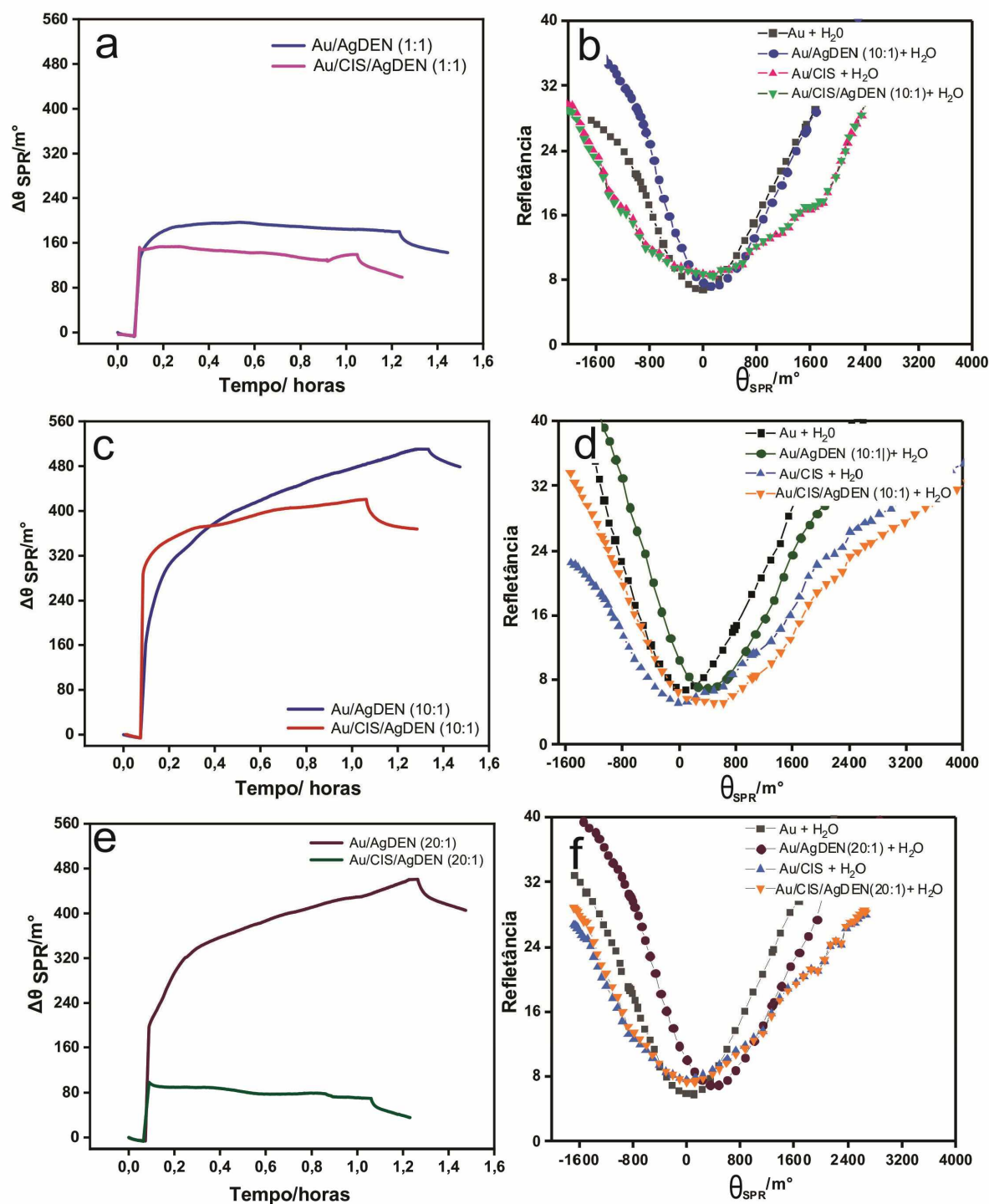


FONTE: O autor (2025).

Para comparar o processo de ligação para as diferentes rotas, foram incluídos Sensorgramas ($\Delta\theta_{SPR}$ vs. tempo) e curvas de refletância SPR (Figura 21), ilustrando a interação de AgDENS diretamente na superfície do ouro (Au/AgDENS) e sua interação na superfície do ouro previamente modificada com CIS-SAM (Au/CIS/AgDENS). Os experimentos de SPR revelaram que as mudanças mais significativas na $\Delta\theta_{SPR}$ ocorreram quando AgDENS foram imobilizados diretamente na superfície de Au.

Foi observado que o processo de interação entre AgDENS e CIS-SAM foi menos favorecido. Isso é evidente ao observar a largura a meia altura da curva de refletância, o uso de CIS-SAM levou a um aumento nessa largura. Além disso, com exceção do sistema 10:1, houve um aumento no valor mínimo da curva de refletância SPR (aumento na porcentagem de luz refletida), para os outros sistemas estudados. Este efeito é provavelmente causado pelo aumento da distância entre AgNPs e a superfície planar de Au após a formação da camada intermediária CIS-SAM. Esses resultados sugerem um efeito plasmônico ligeiramente mais pronunciado para a ligação direta de AgDENS à superfície de Au.

FIGURA 21 – CURVAS DE SPR (SENSORGRAMA) E CURVAS DE REFLETÂNCIA DE SPR ILUSTRANDO A COMPARAÇÃO DAS AgDENs DIRETAMENTE IMOBILIZADA SOBRE A SUPERFÍCIE DE Au E IMOBILIZADA SOBRE A SUPERFÍCIE DE Au MODIFICADA COM CIS-SAM, (a) e (b) PAMAM-G3, (c) e (d) AgDEN (1:1), (e) e (f) AgDEN (10:1), (g) e (h) AgDEN (20:1).



FONTE: O autor (2025).

5.7 IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA CHIP NAS PLATAFORMAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES

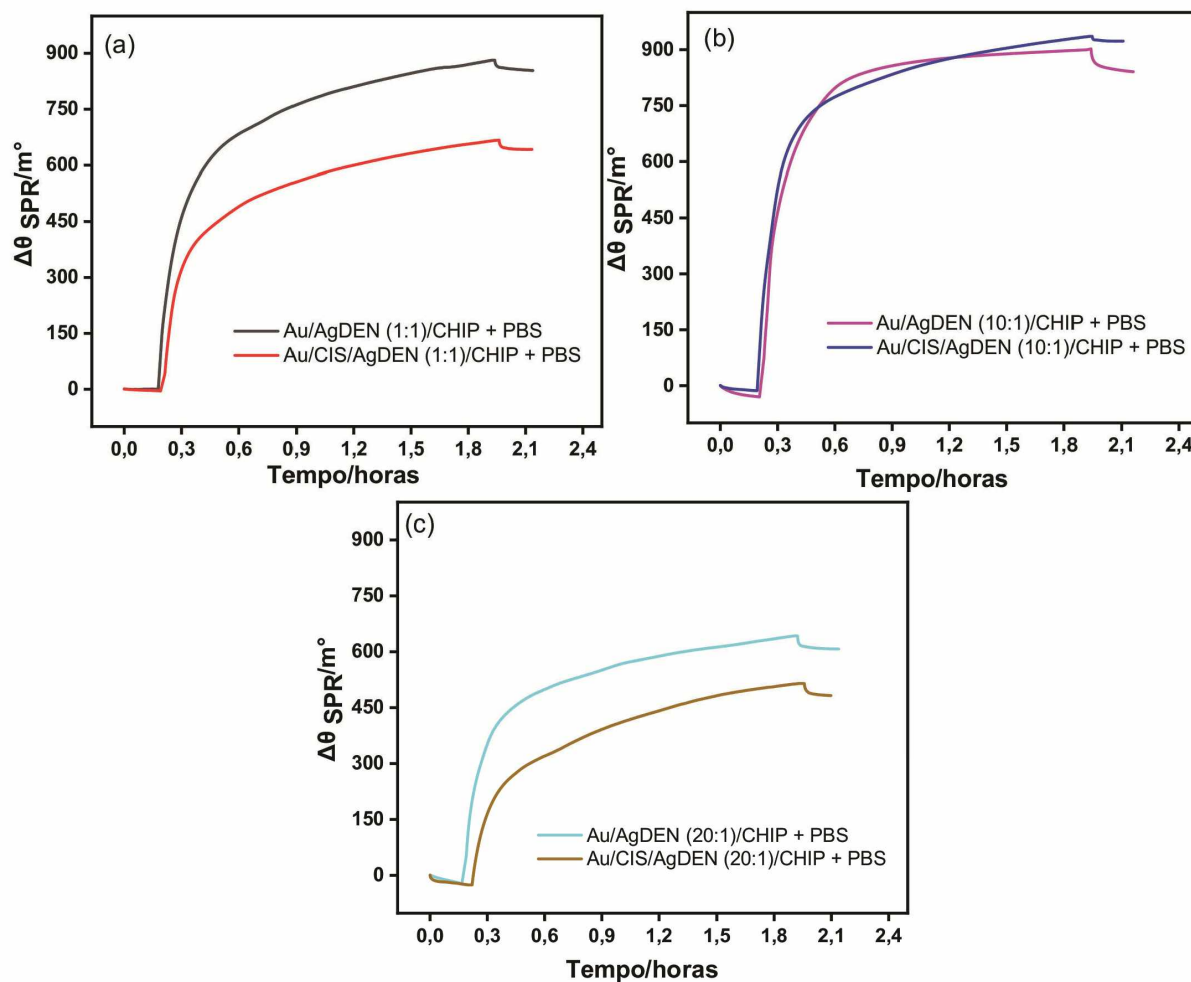
No projeto de biossensores, a imobilização de biomoléculas, também conhecidas como biorreceptores, é uma etapa fundamental. Esta fase é crucial para conferir e determinar a seletividade e sensibilidade do biossensor. A eficiência das plataformas desenvolvidas em termos de capacidade de ancoragem para diferentes biomoléculas foi avaliada por meio de testes usando proteínas com propriedades físico-químicas distintas, cada uma com funções biológicas importantes e conhecidas, como as proteínas CHIP, Hsc70 e CALB L. Por meio de uma análise precisa dos processos de ligação envolvendo cada proteína nas plataformas propostas, foi possível inferir a versatilidade e eficiência do material proposto (AgDENs) na construção de biossensores.

Inicialmente, examinamos a ligação da proteína CHIP no chip sensor SPR previamente funcionalizado e não funcionalizado com CIS-SAM, como uma prova de conceito (Figura 22).

A proteína CHIP é composta principalmente por dois domínios: um é o domínio TPR amino-terminal, responsável pela ligação com Hsp70 para cumprir seu papel como chaperona molecular; o outro é o domínio U-box carboxil-terminal, que desempenha principalmente um papel na atividade da ubiquitina ligase E3¹⁷⁴. Esses domínios conferem ao CHIP um papel crucial no equilíbrio do conteúdo proteico¹⁷⁴. Adicionalmente, a CHIP é um participante essencial em vários processos celulares fundamentais relacionados à patogênese de doenças neurológicas, incluindo hemorragia intracerebral, acidente vascular cerebral isquêmico, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e outras condições^{175,176}. Entender o papel da proteína CHIP no desenvolvimento dessas doenças pode ser crucial para o desenvolvimento de novas terapias potenciais e biomarcadores para diagnóstico¹⁷⁷.

O processo de imobilização da CHIP foi monitorado por SPR (Figura 22). A ligação covalente dessa proteína sobre as plataformas Au/AgDENs e Au/CIS/AgDENs foi avaliada, e os resultados indicam que a imobilização da CHIP em ambas as plataformas resultou em uma mudança significativa na resposta $\Delta\theta_{SPR}/m^\circ$. Mesmo após lavagens sucessivas com tampão PBS a pH 7,1, apenas uma ligeira diminuição em $\Delta\theta_{SPR}/m^\circ$ é observada, demonstrando que a CHIP foi efetivamente imobilizada nas diferentes plataformas. Comparando as mudanças no ângulo de ressonância (θ_{SPR}), observa-se que para AgDEN (1:1) e AgDEN (20:1), houve uma maior variação no ângulo de ressonância ($\Delta\theta_{SPR}$) quando AgDENs foram ligados diretamente na superfície do ouro. Isso reflete a sensibilidade da plataforma proposta. Para AgDEN (10:1), nenhuma alteração significativa foi observada com e sem o uso de CIS-SAM. Isso confirma que a aplicação direta de AgDENs no sensor SPR é mais vantajosa, considerando a economia de tempo e reagente para a fabricação do biossensor.

FIGURA 22 –OS SENSORGRAMAS MOSTRANDO A INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA CHIP E OS AGDENS, APRESENTANDO SUAS FASES TÍPICAS: A LINHA DE BASE OBTIDA COM TAMPÃO PBS EM pH 7,1, A FASE DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA CHIP, A FASE ESTACIONÁRIA E A FASE DE LAVAGEM COM TAMPÃO PBS EM pH 7,1. ANÁLISES OBTIDAS EM TEMPO REAL PARA OS SEGUINTE PROCESSO DE LIGAÇÃO: (a) PROTEÍNA CHIP E O AgDEN (1:1), (b) PROTEÍNA CHIP E O AgDEN (10:1), (c) PROTEÍNA CHIP E O AgDEN (20:1).



FONTE: O autor (2025).

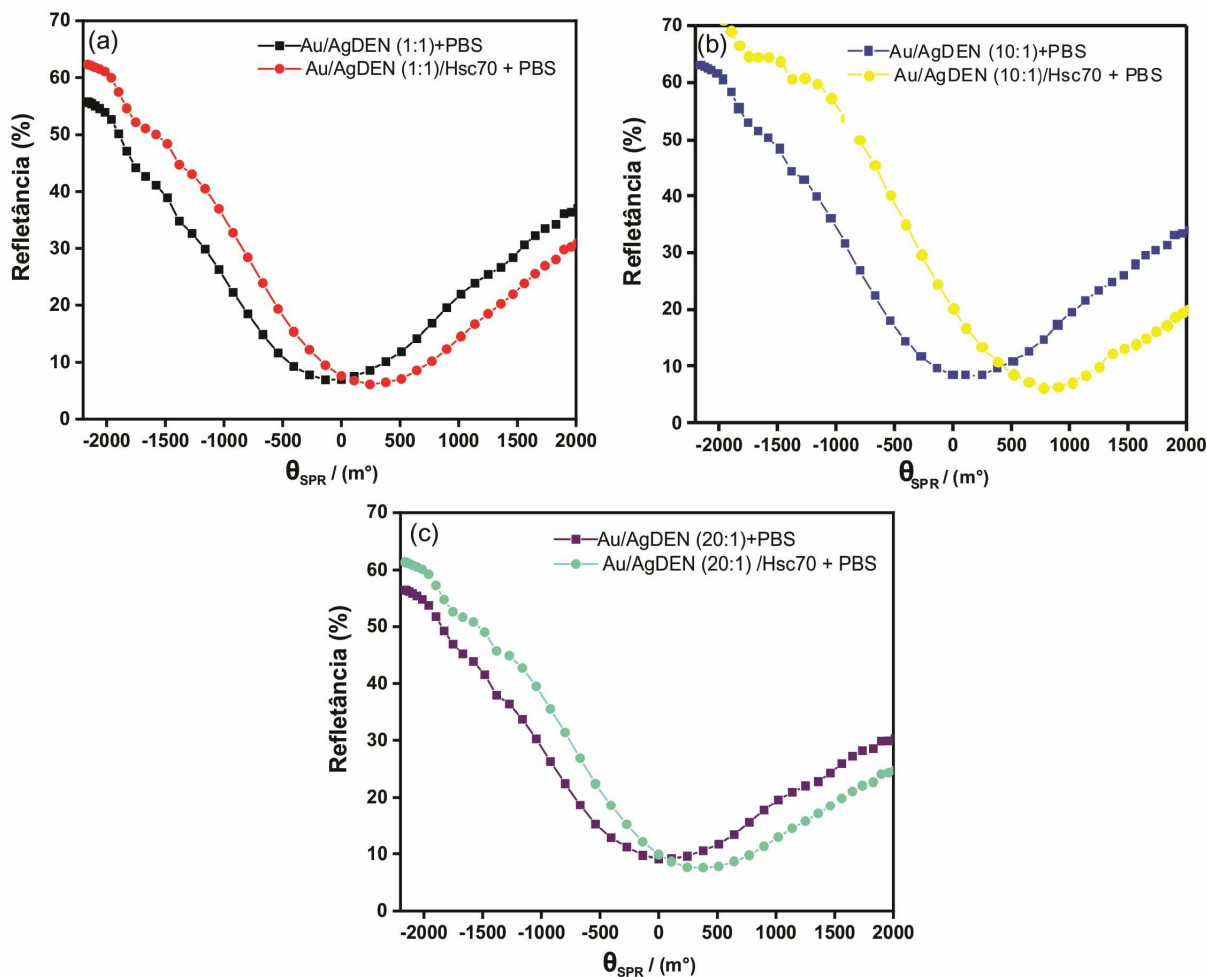
5.8 IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA Hsc 70 E DA ENZIMA CALB L

Hsc70 é um membro constituinte da família de proteínas de choque térmico de 70 kDa, amplamente presente no sistema nervoso central adulto ¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Ela desempenha papéis cruciais que incluem uma variedade de processos fisiológicos, como metabolismo de ATP e auxilia no dobramento e formação de domínios estruturais funcionais de proteínas clientes, endocitose e é um componente-chave da autofagia mediada por chaperonas, entre elas a HsC70, que pode remover componentes celulares danificados em células estressadas anoxicamente e restringir a neuroinflamação após acidente vascular cerebral ¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. A Hsc70 também participa de várias doenças não transmissíveis e algumas doenças infecciosas causadas por patógenos ⁹¹. Em geral, a presença de proteínas de choque térmico no sangue tem sido considerada um biomarcador de dano, estresse ou inflamação. Altos níveis celulares ou circulantes de Hsp70 foram relatados como prognósticos em vários tipos de câncer ¹⁸¹.

Por sua vez, as reações catalisadas por enzimas surgiram como uma alternativa mais sustentável em comparação às reações catalisadas por reagentes químicos devido ao seu baixo consumo de energia e custos operacionais reduzidos ¹⁸². Uma técnica eficaz para melhorar o desempenho catalítico enzimático e a reutilização é a imobilização de enzimas em suportes sólidos ¹⁸³. Em particular, a lipase B de *Candida antarctica* (CALB L) é amplamente reconhecida em vários estudos científicos e aplicações industriais como um biocatalisador eficiente ¹⁸³. CALB L é uma lipase típica e um membro da família de dobras α/β -hidrolase. Ela é incorporada em uma tríade catalítica conservada consistindo de serina (Ser105), aspartato (Asp187) e histidina (His224), que forma um sítio de ligação de substrato para reações biocatalíticas ^{182,184}.

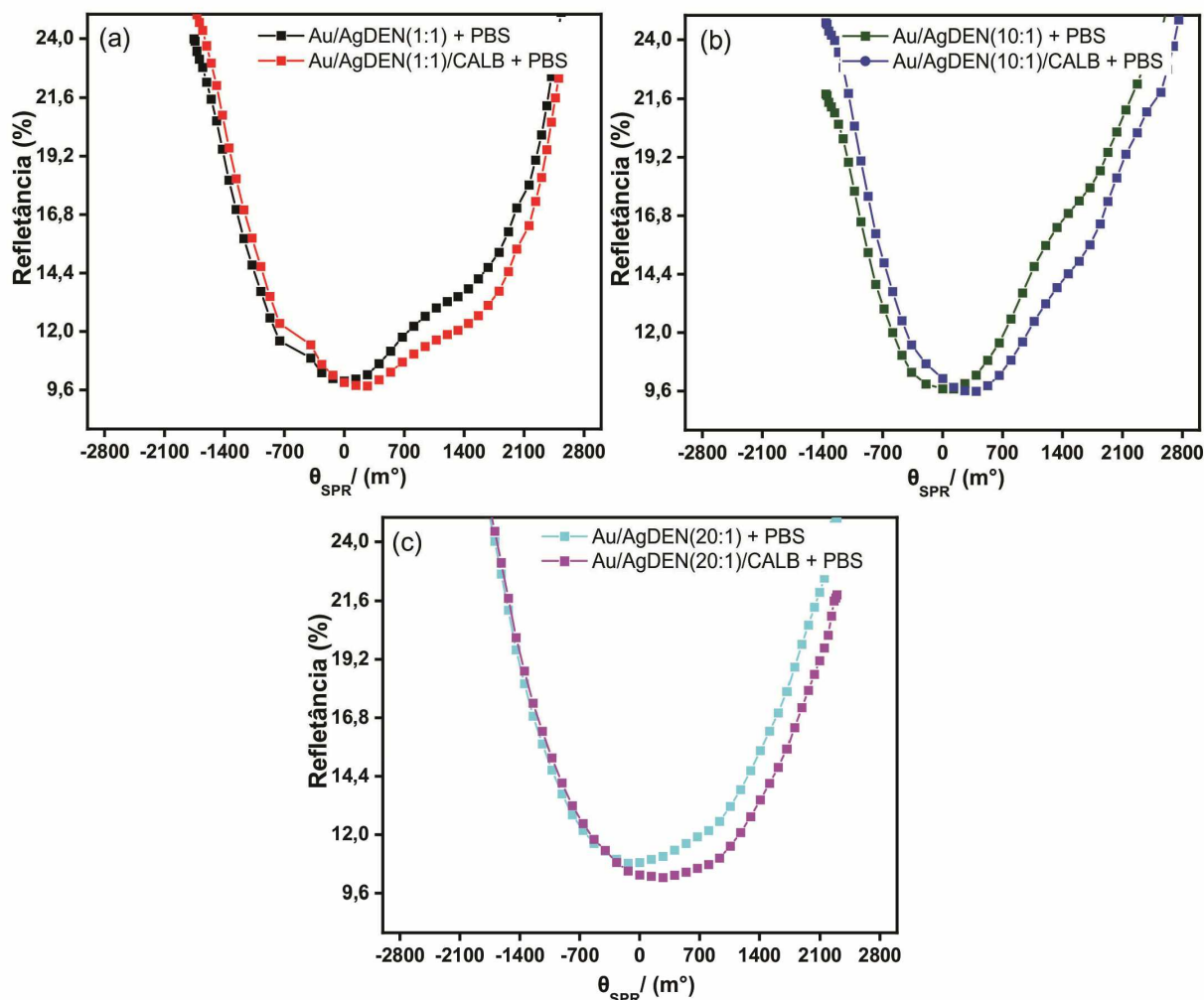
De forma a caracterizar a versatilidade da plataforma desenvolvida, o processo de imobilização covalente de Hsc70 e CALB L sobre Au/AgDENs foi monitorado em tempo real por SPR, e as curvas de reflectância obtidas são mostradas na Figuras 23 e 24, respectivamente. Conforme mostrado nas Figuras 23 e 24, a ligação entre as proteínas e a superfície de detecção (AgDENs) resultou em uma mudança óbvia no ângulo de ressonância SPR. Ambas as biomoléculas estudadas exibiram comportamento semelhante. Foi observado que o uso do sistema AgDEN (10:1) causou uma mudança maior no ângulo de ressonância SPR em comparação com outras proporções, refletindo a sensibilidade do biossensor SPR ¹⁸⁵. Foi também que o valor mínimo de reflectância diminuiu após a imobilização de biomoléculas em ambos os sistemas, indicando acoplamento máximo da luz incidente com a onda plasmônica de superfície ¹⁸⁵.

FIGURA 23 – CURVAS DE REFLECTÂNCIA SPR OBTIDAS EM TEMPO REAL. A FIGURA MOSTRA A DIFERENÇA ENTRE AS CURVAS DE REFLECTÂNCIA ANTES E DEPOIS DA IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA Hsc70 SOBRE SUPERFÍCIE DE OURO PREVIAMENTE FUNCIONALIZADA COM: (a) AgDEN (1:1), (b) AgDEN (10:1) E (c) AgDEN (20:1).



FONTE: O autor (2025).

FIGURA 24 – CURVAS DE REFLECTÂNCIA SPR OBTIDAS EM TEMPO REAL. A FIGURA MOSTRA A DIFERENÇA ENTRE AS CURVAS DE REFLECTÂNCIA ANTES E DEPOIS DA IMOBILIZAÇÃO DO CALB: (a) AgDEN (1:1), (b) AgDEN (10:1) E (c) AgDEN (20:1).



FONTE: O autor (2025).

O estudo destacou a aplicação sensível da técnica SPR para investigar interações em tempo real de nanocompósitos com CIS-SAM e com o sensor, bem como a interação de diferentes proteínas com nanocompósitos preparados. A análise comparativa revela melhor estabilidade dos AgDENs, atribuída à interação de van der Waals e adsorção química. A comparação entre o uso do *sistema* LbL sugere uma preferência pela imobilização direta de AgDENs no sensor SPR. Testes com diferentes biomoléculas, como CHIP, Hsc70 e CALB L, demonstram a versatilidade e eficiência do material proposto em biossensores SPR.

5.9 APLICAÇÃO DA PLATAFORMA PROPOSTA PARA CONSTRUÇÃO DE UM IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *LEISHMANIA INFANTUM*

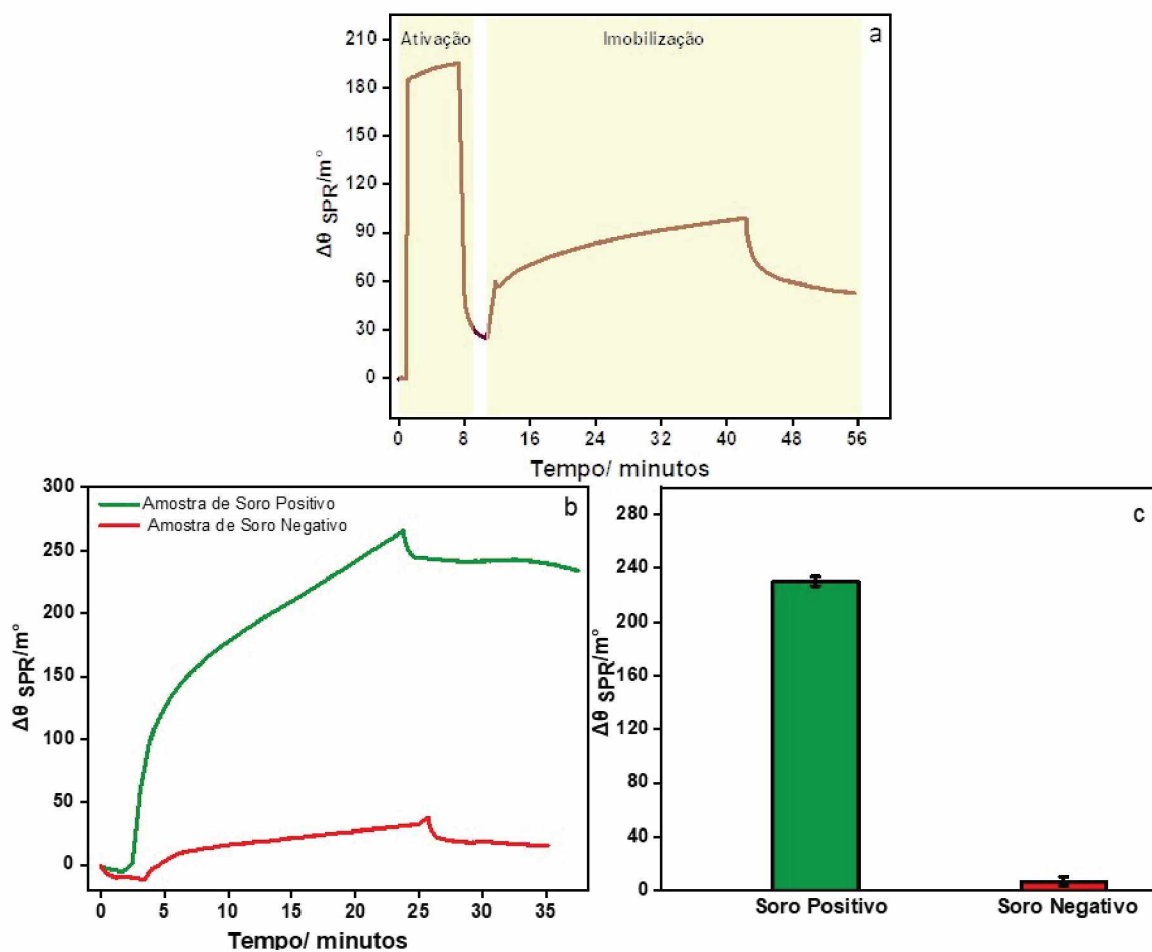
O uso de nanopartículas de prata estabilizadas por dendrímero como plataformas para construção de um imunossensor foi explorado usando a proteína recombinante (proteína C1) do protozoário *Leishmania infantum*. A Figura 25a mostra a análise de SPR obtida durante a ativação dos grupos amino-terminais do dendrímero pela adição de 1% (m/v) de glutaraldeído e durante a imobilização da proteína C1 ($200 \mu\text{g mL}^{-1} = 4,9 \mu\text{mol L}^{-1}$) em Au/AgDEN (10:1), observa-se uma variação significativa no valor de θ_{SPR} após as etapas de ativação e imobilização.

A variação no valor do ângulo de ressonância ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$) observado após a adição de glutaraldeído indica a interação do agente reticulante com os grupos amino-terminais presentes nos dendrímeros, gerando grupos reativos na superfície. Esses grupos atuam como sítios de ancoragem para a imobilização covalente da proteína C1, o que é confirmado por um novo incremento em $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ após a introdução da proteína. A estabilidade na $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ mesmo após sucessivas lavagens com tampão PBS evidencia a imobilização eficiente da proteína C1 por meio de ligações covalentes mediada pelo glutaraldeído. Essa imobilização eficiente da biomolécula na interface funcionalizada é fundamental para a construção de biossensores estáveis, garantindo desempenho consistente durante a etapa de detecção.

O biossensor SPR proposto baseado na proteína C1/AgDEN foi aplicado para detectar anticorpos contra *Leishmania infantum* em amostras de soro canino de grupos positivo e negativo para Leishmaniose Visceral. A Figura 25b mostra a etapa de associação obtida pela adição de soros caninos positivos e negativos, seguida pela etapa de dissociação. Como pode ser visto, há um valor efetivo de $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ muito maior quando a amostra positiva é adicionada (Figura 25c), o que demonstra excelente seletividade do imunossensor SPR proposto.

A clara distinção entre os sinais gerados por soros positivos e negativos reflete a alta especificidade da interação biomolecular promovida pela proteína C1 imobilizada. Essa especificidade, aliada à eficiência da superfície funcionalizada com AgDENS, garante um reconhecimento seletivo mesmo em matrizes complexas como o soro. Dessa forma, o biossensor apresenta desempenho analítico promissor, reunindo sensibilidade, seletividade e estabilidade, características essenciais para aplicações diagnósticas em contextos clínicos e de vigilância epidemiológica.

FIGURA 25 – (a) SENSORGRAMA ILUSTRANDO A ATIVAÇÃO DOS GRUPOS AMINO-TERMINAIS DO DENDRÍMERO PELA ADIÇÃO DE 1% (m/v) DE GLUTARALDEÍDO EM PBS (pH 7,4) E A IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA C1 RECOMBINANTE DE *LEISHMANIA INFANTUM* ($200 \mu\text{g mL}^{-1} = 4,90 \mu\text{mol L}^{-1}$) DISSOLVIDA EM TAMPÃO PBS EM pH 7,4) SOBRE AgDEN PREVIAMENTE ATIVADO (10:1). (b) ANÁLISE DE SPR OBTIDA EM TEMPO REAL MOSTRANDO AS ETAPAS DE ASSOCIAÇÃO E DISSOCIAÇÃO PARA A ADIÇÃO DE SOROS CANINOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA A LEISHMANIOSE VISCERAL, AMBOS DILUÍDOS 40 VEZES EM TAMPÃO PBS A PH 7. (c) VALOR EFETIVO DE $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ OBTIDO PARA AS RESPOSTAS COM SOROS CANINOS POSITIVOS E NEGATIVOS (N = 3).



FONTE: O autor (2025).

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, destacamos o imenso potencial das nanopartículas de prata estabilizadas por dendrímero para a proposta de biossensores de SPR. A caracterização estrutural e morfológica revelou que os AgNPs são estabilizados tanto na periferia quanto internamente no PAMAM-G3. A análise FTIR-ATR antes da redução mostrou que a prata se liga a todos os grupos presentes no dendrímero e, após a redução, houve uma mudança nas bandas atribuídas ao estiramento da amida I e CN, essas mudanças sugerem o envolvimento do grupo amida na interação com as nanopartículas de prata. A análise UV-VIS revelou bandas características tanto do dendrímero quanto das nanopartículas de prata, e foi demonstrado que a intensidade da banda a 410 nm depende da concentração de prata usada na síntese. Além disso, foi confirmado que a radiação não altera a estrutura do dendrímero. A partir de imagens TEM de AgDENS, foi observado que as nanopartículas exibem predominantemente uma forma esférica, com diâmetros variando de 3,7 a 17,7 nm. O uso de AgDENS provou ser uma estratégia altamente atrativa para o desenvolvimento de biossensores SPR, principalmente devido à sua alta área de superfície e excelente estabilidade química. O filme formado exibiu capacidade de ancoragem excepcional para diferentes biomoléculas estudadas. Houve um aumento significativo na sensibilidade da plataforma proposta, provavelmente devido à interação entre nanopartículas de prata (AgNPs) e a onda plasmônica de superfície na superfície planar de ouro. Para demonstrar uma aplicação específica, a plataforma proposta foi explorada com sucesso na construção de um imunossensor para a detecção de anticorpos contra *Leishmania infantum*, obtendo excelente seletividade para discriminar amostras de soro canino dos grupos positivo e negativo para Leishmaniose Visceral. Esses resultados abrem novas possibilidades para aumentar a eficiência dos biossensores para uma variedade de aplicações analíticas e de detecção de biomoléculas.

Explorando filmes bidimensionais de MoS_2 em biossensores de SPR para diagnóstico sorológico da dengue

7 MoS₂ BIDIMENSIONAL COMO UMA PLATAFORMA AVANÇADA DE DETECÇÃO POR SPR PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA DENGUE.

7.1 MOTIVAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DESTE ESTUDO

O dissulfeto de molibdênio (MoS₂) surge como uma alternativa inovadora e simplificada para o desenvolvimento de biossensores SPR. Esse material bidimensional, com alta área superficial e forte afinidade por biomoléculas, permite a formação de um filme estável sobre a superfície de ouro do sensor SPR, viabilizando a imobilização direta de proteínas por meio de interações hidrofóbicas. Esse processo elimina a necessidade de reagentes complexos, tornando a biofuncionalização mais eficiente.

Este estudo apresenta uma abordagem direta para a imobilização do domínio III da proteína do envelope do vírus da dengue tipo 1 (EDIII-DENV-1) em um filme fino de MoS₂, explorando interações hidrofóbicas com a superfície basal das nanofolhas desse material. A modificação do sensor SPR com MoS₂ cria um ambiente favorável à imobilização de biomoléculas, simplificando o processo e dispensando etapas complexas ou reagentes adicionais frequentemente utilizados em métodos convencionais. Essa estratégia otimiza o controle sobre a interação proteína-superfície, tornando a funcionalização mais reprodutível e eficiente.

O biossensor SPR baseado no filme fino de MoS₂ demonstrou excelente desempenho, diferenciando com precisão 10 amostras de soro humano positivo para dengue de 10 amostras negativas. Esses resultados destacam a plataforma como uma solução promissora para diagnósticos rápidos, precisos e confiáveis.

7.2 MATERIAIS E REAGENTES

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, solução de $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ a 20% adquirida da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil), H_2SO_4 98% da Anidrol (Diadema, SP, Brasil), acetonitrila grau de gradiente para cromatografia líquida 99,9% LiChrosolv da Merck (Darmstadt, Alemanha) e tolueno 99% adquirido da Neon (Suzano, SP, Brasil) foram utilizados sem purificações adicionais. A IgM monoclonal humanizada anti-vírus da dengue E (pan-específica) na concentração de 1,5 mg/mL foi adquirida da BIONC. Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura. A solução tampão PBS ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,1) foi preparada pela adição equimolar de KH_2PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, Na_2HPO_4 adquirido da Synth (Diadema, SP, Brasil) e KCl da Dinâmica (Indaiatuba, SP, Brasil), e o pH foi ajustado com KOH da Dinâmica (Indaiatuba, SP, Brasil). A água deionizada utilizada na preparação das soluções foi previamente purificada em um sistema Milli-Q.

7.3 SÍNTESE DA PROTEÍNA

Um gene sintético otimizado para códons, codificando o Domínio III da Proteína do Envelope do Vírus da dengue tipo 1 (EDIII-DENV-1), foi clonado no vetor pET28a, permitindo a expressão da proteína EDIII do vírus da dengue sorotipo 1 (EDIII-DENV-1) com um marcador 6-histidina (6xHis) na extremidade N-terminal, utilizando *Escherichia coli* BL21(λ DE3) como hospedeira. A proteína EDIII-DENV-1 foi purificada por cromatografia de afinidade em Ni-NTA, com breves modificações conforme descrito anteriormente ¹⁸⁶.

A proteína CHIP foi sintetizada pelo grupo do Professor Carlos H.I. Ramos (Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil) ¹²⁹, e diluições foram feitas utilizando tampão PBS a pH 7,1. A concentração utilizada para a proteína CHIP foi de 1 mg mL^{-1} .

7.4 AMOSTRAS DE SORO HUMANO

As amostras de soro humano foram coletadas na Universidade Federal do Paraná, em Matinhos. Os casos positivos de dengue foram confirmados pela detecção sorológica do anticorpo IgM via ensaio ELISA (Abbott e Euroimmun). As amostras negativas foram obtidas de indivíduos que relataram não ter tido infecção prévia pelo vírus da dengue. O Comitê de Ética em Pesquisa da UFPR (CONEP, CAAE 66856122.5.0000.0102) aprovou este estudo. O consentimento informado foi obtido de todos os participantes. Todos os métodos foram realizados de acordo com as diretrizes e regulamentações pertinentes.

7.5 SÍNTESE E EXFOLIAÇÃO DE MoS₂

O MoS₂ foi sintetizado quimicamente de acordo com um método descrito pelo Grupo de Química de Materiais da UFPR ¹⁸⁷. Em um balão de fundo redondo de 50 mL⁻¹, foram adicionados 10 mL⁻¹ de molibdato de amônio (1,0 mmol L⁻¹) e 0,5 mL⁻¹ de H₂SO₄ (1,0 mol L⁻¹), e o sistema foi agitado a 1500 rpm por 2 horas. Em seguida, foram adicionados 10 mL⁻¹ de (NH₄)₂S (0,1 mol L⁻¹), e a agitação foi aumentada para 2500 rpm por 3 horas. O sistema foi centrifugado por 20 minutos a 4000 rpm, e o sobrenadante foi substituído por água ultrapura para lavar o sólido (esse procedimento foi repetido 3 vezes).

O sólido foi transferido para um cadinho de porcelana dentro de um tubo de quartzo, posicionado em um forno tubular (EDG). O sistema foi purgado com Ar por 30 minutos a 300 mL⁻¹ min⁻¹. Após esse período, o fluxo de gás foi reduzido para 75 mL⁻¹ min⁻¹, e a temperatura do forno foi elevada até 800 °C, sendo mantida por 1 hora antes de ser desligado e resfriado até a temperatura ambiente.

Para a exfoliação, 1,4 mg de MoS₂ foram adicionados a um balão de fundo redondo de 50 mL⁻¹ contendo 6 mL⁻¹ de acetonitrila e sonicados por 6 horas em banho de gelo. Posteriormente, a dispersão foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi separado do precipitado e utilizado na modificação do sensor SPR.

7.6 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

As medidas de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) foram realizadas utilizando o equipamento Autolab Springle (Eco Chemie, Dinamarca) para monitorar interações biomoleculares em tempo real. O sistema opera no modo de reflexão interna total atenuada (ATIR), empregando a configuração de Kretschmann.

Os sensores SPR modificados e não modificados com MoS₂, na ausência e presença da proteína, foram analisados por espectroscopia Raman. Para isso, utilizou-se um equipamento WITec Alpha 300R com laser de 532 nm, lente objetiva 50× e potência de 0,5 mW. Foram coletados cinco espectros por amostra em diferentes pontos, com 30 acumulações de 2 segundos cada.

A espessura dos filmes foi medida por Microscopia de Força Atômica (AFM) no modo dinâmico (SPM 9700 da Shimadzu). A espectroscopia de força Kelvin Probe (KPFM) foi realizada utilizando uma sonda de Si revestida com Pt/Ir da Nanoworld (GQM-UFPR).

As imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram obtidas em um microscópio Tescan FEG-SEM, operando a 10 kV, com detector In Beam SE. As imagens de Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS) foram obtidas com um detector da Oxford Instruments acoplado ao microscópio (GQM-UFPR).

7.7 CONSTRUÇÃO DO IMUNOSENSOR SPR

A construção do imunossensor SPR envolveu a modificação do sensor SPR e sua aplicação na detecção de anticorpos específicos. O sensor SPR consiste em um disco de vidro revestido com uma camada fina de ouro (~50 nm).

Uma fina camada de MoS_2 foi depositada sobre o disco de ouro por Spin Coating. Para isso, $200 \mu\text{L}^{-1}$ uma dispersão de MoS_2 com concentração de $0,23 \text{ mg mL}^{-1}$ foi aplicada sobre o disco giratório (5000 rpm) por 50 segundos. O sensor foi então seco sob fluxo de N_2 puro. Após a deposição do MoS_2 , a proteína EDIII-DENV-1 foi imobilizada diretamente sobre a camada de MoS_2 . A funcionalização permitiu que a superfície do sensor reconhecesse especificamente os anticorpos-alvo. A imobilização foi monitorada por SPR e realizada por fisorção mediada por interações hidrofóbicas com a superfície basal das nanofolhas de MoS_2 ¹⁸.

A superfície foi bloqueada com etanolamina 100 mmol L^{-1} para evitar ligações não específicas. O sensor foi então exposto a amostras de soro humano positivo e negativo para avaliar a resposta do imunossensor e sua capacidade de diferenciação.

7.8 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

Foram analisadas 10 amostras de soro humano positivo e 10 negativo. Antes da análise, todas as amostras foram diluídas em tampão PBS (pH 7) na proporção de 1:50 (v/v), garantindo condições padronizadas para a detecção.

Cada amostra foi injetada no equipamento SPR, permitindo o monitoramento em tempo real das interações biomoleculares. Após a exposição da amostra à superfície funcionalizada do sensor, um fluxo contínuo de tampão PBS (pH 7) foi aplicado para remover espécies não ligadas.

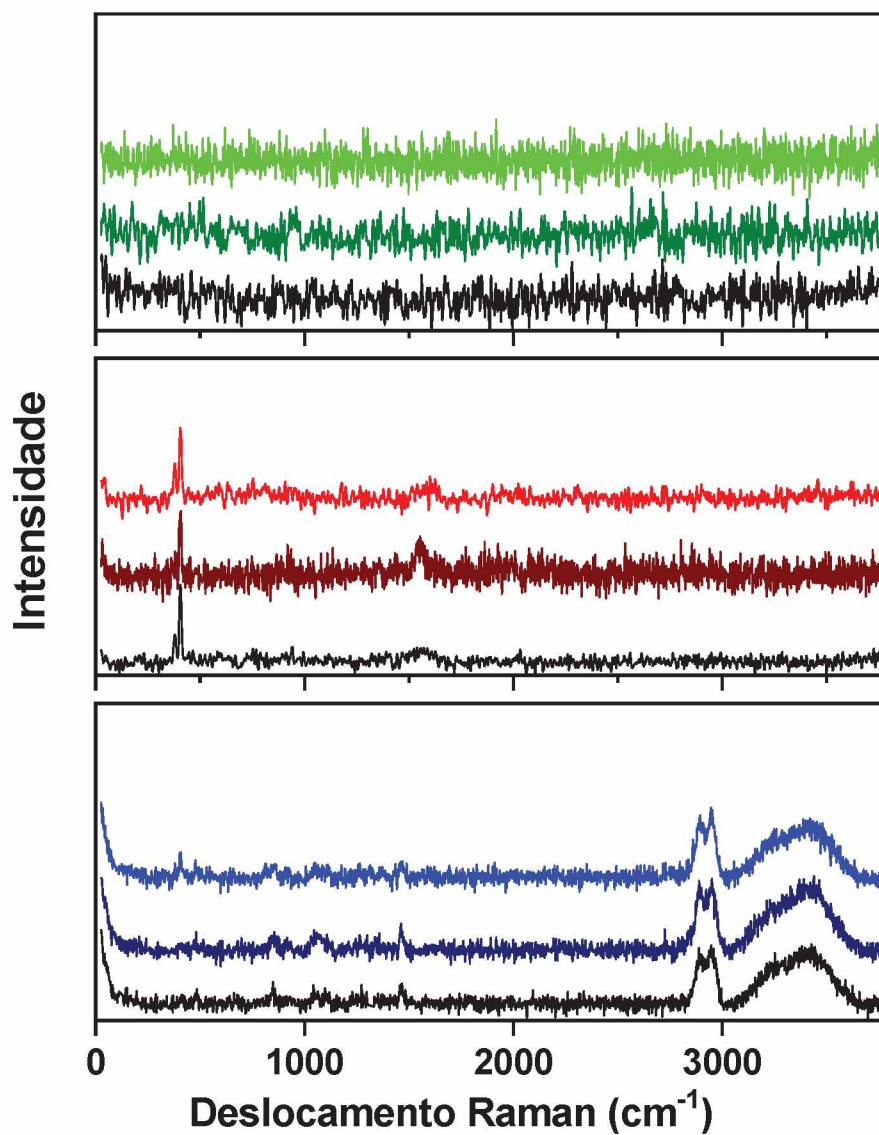
7.9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.9.1 CARACTERIZAÇÃO DO SENSOR SPR MODIFICADO COM MoS₂ NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE EDIII-DENV-1

A análise dos espectros Raman (Figura 26) revela que o substrato de ouro (Au) não modificado não apresenta bandas características relevantes (Figura 26a). Contudo, após a modificação com a dispersão de MoS₂, na ausência da proteína EDIII-DENV-1 (Figura 26b), emergem duas bandas típicas do material localizadas em 379 cm⁻¹ e 405 cm⁻¹, correspondentes aos modos vibracionais E_{2g}¹ e A_{1g}, respectivamente ¹⁸⁸. Essas bandas indicam, respectivamente, a vibração dos átomos de molibdênio e enxofre no plano da camada (modo E_{2g}¹) e o estiramento dos átomos de enxofre perpendicular ao plano, com vibração em direções opostas (modo A_{1g}), confirmando assim a deposição do MoS₂ sobre o substrato de Au.

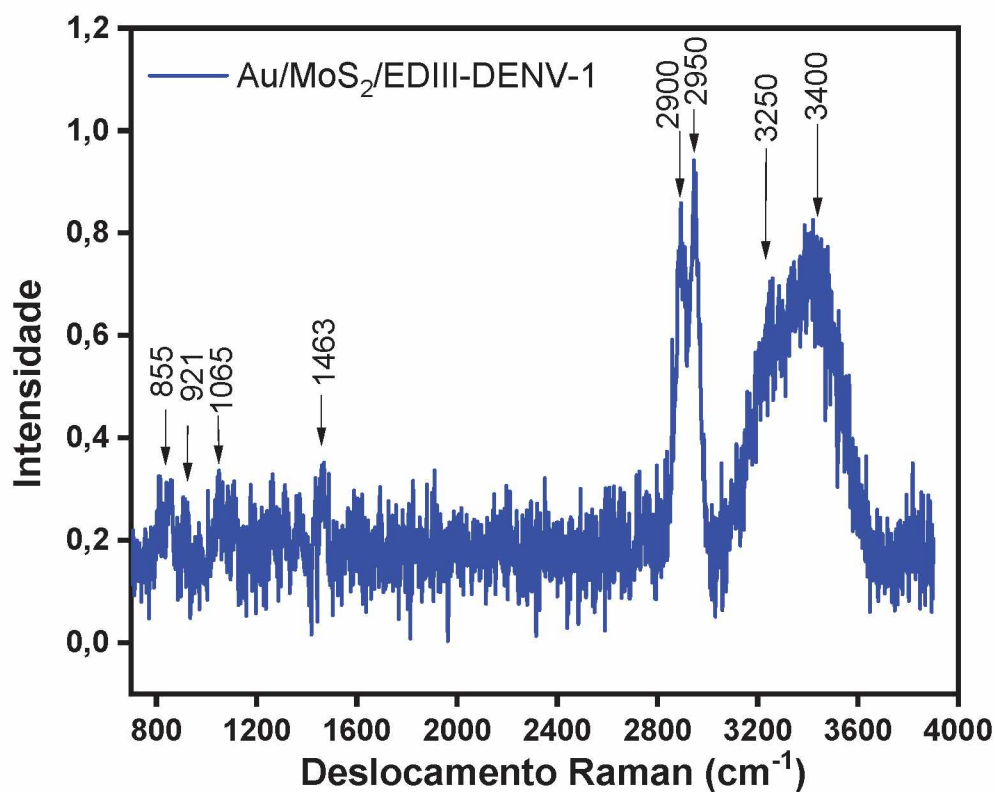
Após a modificação do substrato com MoS₂ e a imobilização da EDIII-DENV-1 (Figura 26c), surgem seis bandas características no espectro Raman. Para melhor visualização, a Figura 27 apresenta o espectro correspondente do substrato modificado com MoS₂ após a imobilização. As principais bandas estão localizadas em 855 cm⁻¹ (estiramento simétrico de CNC), 921 cm⁻¹ (estiramento de C-C), 1065 cm⁻¹ (estiramento de C-O), 1463 cm⁻¹ (deformação de CH₃) e 2900-2950 cm⁻¹ (estiramento de C-H) ^{189,190}. Além disso, as bandas em 3250 e 3400 cm⁻¹ correspondem à vibração de estiramento O-H das moléculas de água do tampão ^{191,192}. Esses resultados confirmam a presença da EDIII-DENV-1 e sua interação com o MoS₂.

FIGURA 26 - ESPECTROS RAMAN ($\lambda = 532$ nm) REGISTRADOS NA FAIXA DE 25 A 3800 cm^{-1} PARA: (a) O SUBSTRATO DE Au NÃO MODIFICADO, (b) O SUBSTRATO DE Au MODIFICADO COM MoS_2 E (c) O SUBSTRATO DE Au MODIFICADO COM MoS_2 E EDIII-DENV-1 EM TAMPÃO PBS.



FONTE: O autor (2025).

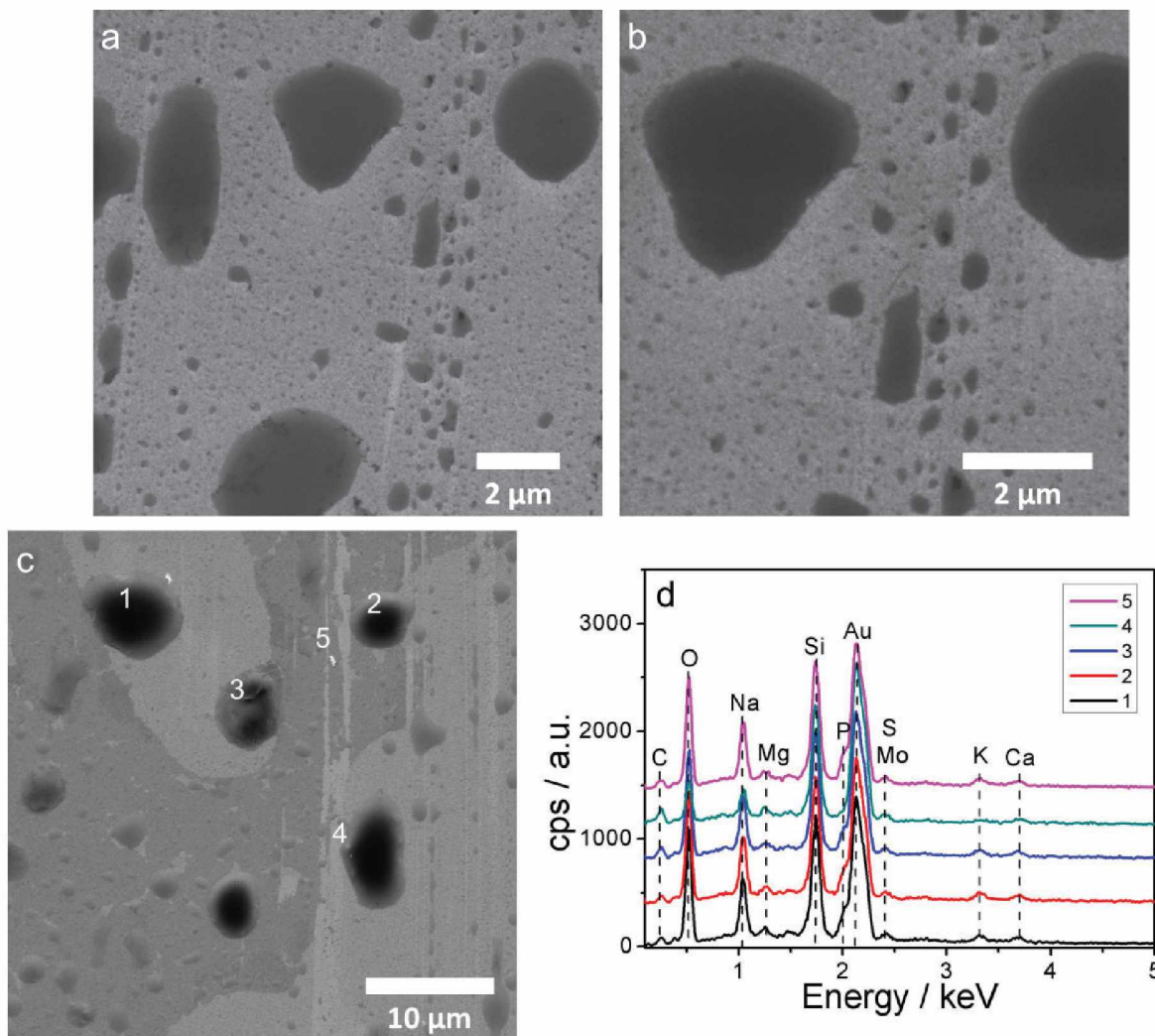
FIGURA 27 - ESPECTROS RAMAN ($\lambda = 532 \text{ nm}$) REGISTRADOS NA FAIXA DE 25 A 3800 cm^{-1} PARA O SUBSTRATO DE Au MODIFICADO COM MoS_2 E EDIII-DENV-1 EM TAMPÃO PBS.



FONTE: O autor (2025).

As imagens de MEV (Figura 28a-c) mostram a presença de formas que se assemelham a gotículas cobrindo o substrato MoS_2/Au após a adição de EDIII-DENV-1, sendo formadas pela secagem do soluto utilizado para dispersar a proteína (PBS em KCl). A composição elemental detectada por EDS (Figura 28c, d) mostra a presença de Mo e S, correspondendo à presença de MoS_2 , C e O, correspondendo à presença da proteína, Au (substrato) e Na, Mg, P, K e Ca, correspondendo ao soluto.

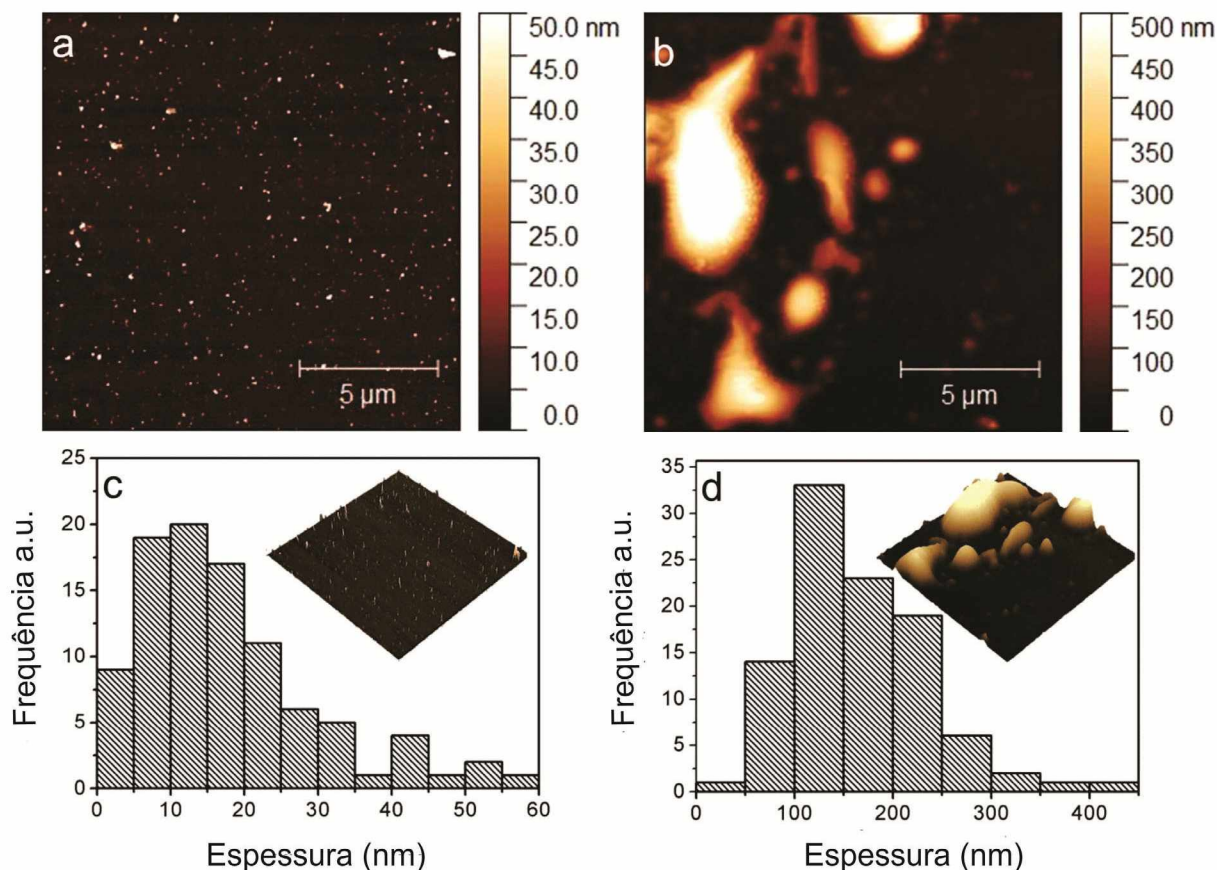
FIGURA 28- IMAGENS DE MEV EM DIFERENTES AMPLIAÇÕES DO MoS_2 NA PRESENÇA DE EDIII-DENV-1 (a-b). MICROGOTÍCULAS DO SOLUTO PODEM SER VISTAS COBRINDO AS PEQUENAS FLOCOS DE MoS_2 NAS IMAGENS DE MEV E NO ESPECTRO DE EDS (c-d).



FONTE: O autor (2025).

Nas imagens de AFM do substrato de Au modificado com MoS_2 na ausência de EDIII-DENV-1 (Figura 29a), pequenas flocos de MoS_2 aderidos ao substrato de Au podem ser observados, com uma espessura média de 13 ± 4 nm (~ 18 camadas), conforme mostrado no histograma (Figura 29c). Após a adição de EDIII-DENV-1 ao MoS_2/Au (Figura 29b), observa-se um aumento notável na espessura (145 ± 20 nm) (Figura 29d). Esse aumento é atribuído à formação de microgotículas do soluto seco ao redor dos flocos de MoS_2 , corroborando com as imagens de MEV (Figura 28).

FIGURA 29 - AS IMAGENS DE AFM REVELAM A MORFOLOGIA DO MoS₂ NA AUSÊNCIA (a) E NA PRESENÇA (b) DE EDIII-DENV-1 NO SUBSTRATO DE Au. OS RESPECTIVOS HISTOGRAMAS DE ESPESSURA (c-d) QUANTIFICAM A UNIFORMIDADE E DISTRIBUIÇÃO DO FILME, COM UMA REPRESENTAÇÃO 3D DAS AMOSTRAS. AS IMAGENS PÓS-IMOBILIZAÇÃO EXIBEM CLARAMENTE UM AUMENTO NA ESPESSURA DO FILME E NAS DIMENSÕES LATERAIS, INDICANDO UMA DEPOSIÇÃO BEM-SUCEDIDA.



FONTE: O autor (2025).

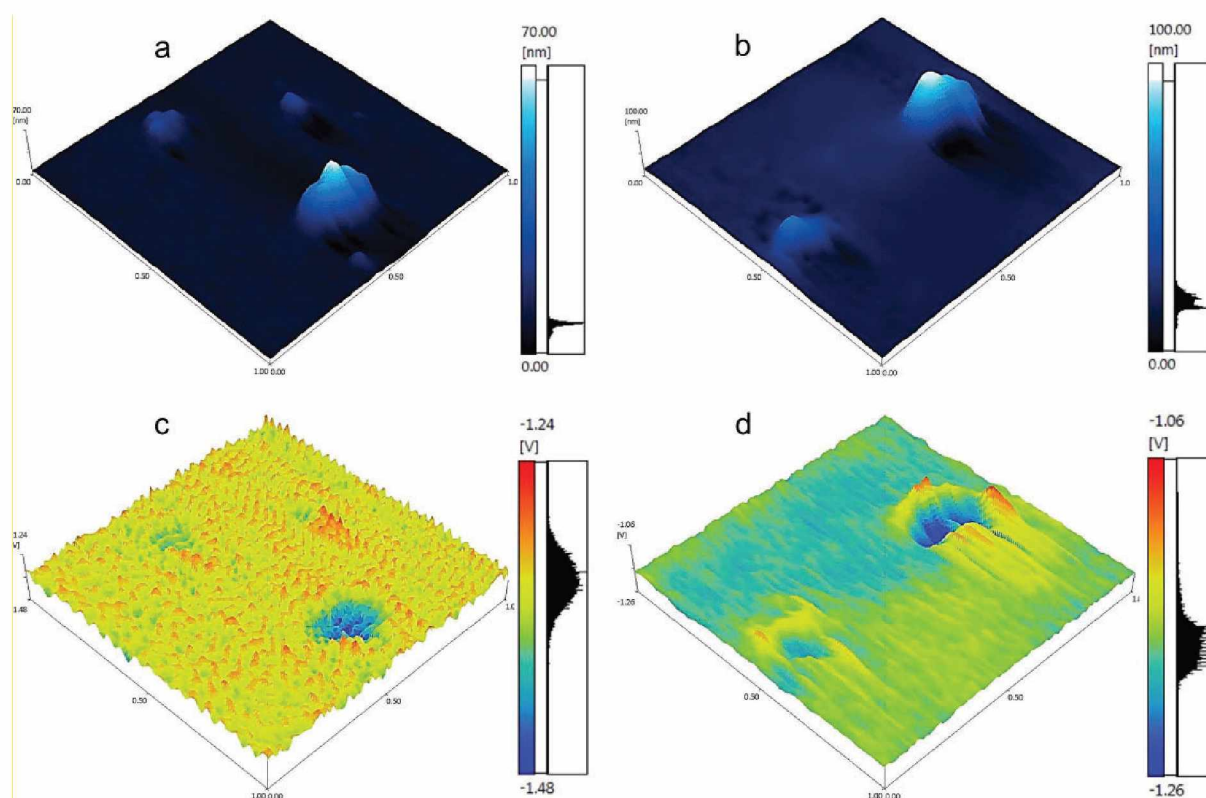
Essa interação (MoS₂ e EDIII-DENV-1) impacta o potencial de superfície, o que reflete a função de trabalho da amostra, conforme evidenciado pelas imagens de KPFM (Figura 30). As regiões selecionadas para análise, tanto na ausência quanto na presença da proteína, têm espessuras comparáveis. A seguinte equação foi utilizada para determinar a função de trabalho das amostras:

$$\begin{aligned} \text{CPD} &= \text{CPD}_{\text{amostra}} - \text{CPD}_{\text{substrato}} \\ \text{CPD} &= [(\Phi_{\text{tip}} - \Phi_{\text{amostra}})/e] - [(\Phi_{\text{tip}} - \Phi_{\text{substrato}})/e] \\ \text{CPD} &= (\Phi_{\text{substrato}} - \Phi_{\text{amostra}})/e \end{aligned} \quad (1)$$

onde CPD é a diferença de potencial de contato, Φ_{tip} é a função de trabalho da ponta, $\Phi_{\text{substrato}}$ é a função de trabalho do substrato (5.1 eV) e Φ_{amostra} é a função de trabalho da amostra. O filme contendo apenas MoS₂ demonstra uma

função de trabalho de 5.26 eV (CPD = -160 mV), consistente com os valores reportados na literatura ^{193,194}. Curiosamente, após a deposição da proteína, a função de trabalho é reduzida para 5.16 eV (CPD = -60 mV) ^{195,196}. Essa diminuição na função de trabalho é um fator que contribui para o melhor desempenho do sensor após a deposição da proteína devido à diminuição do nível de Fermi. Estudos semelhantes mostram que essa modificação no nível de Fermi contribui para a modulação da ressonância de plasmon ^{195,196}. Além disso, essa modificação na interação MoS₂/Au na presença da proteína é corroborada pelos resultados da espectroscopia Raman.

FIGURA 30 - AS IMAGENS TOPOGRÁFICAS EM 3D (a-b) E AS IMAGENS 3D DE KPFM (c-d) DAS AMOSTRAS NA AUSÊNCIA (a,c) E NA PRESENÇA (b,d) DA PROTEÍNA EDIII-DENV-1 REVELAM UMA DIMINUIÇÃO NA FUNÇÃO DE TRABALHO DO FILME DE 5.26 eV PARA 5.16 eV APÓS A DEPOSIÇÃO DA PROTEÍNA.



FONTE: O autor (2025).

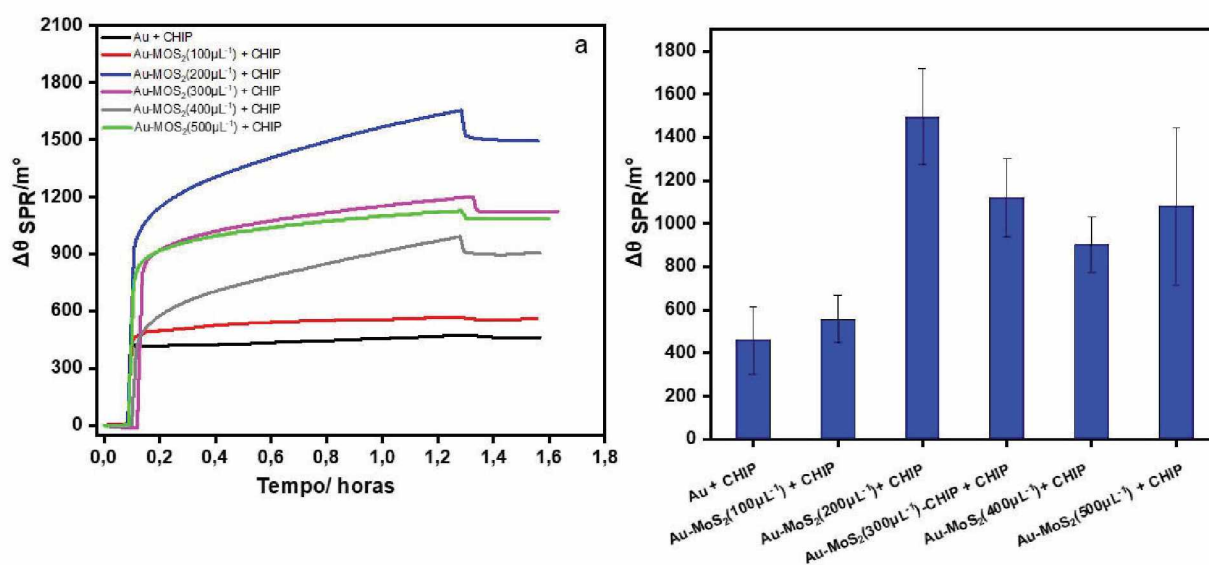
7.10 OTIMIZAÇÃO DAS CAMADAS DE DETECÇÃO SPR

O excelente desempenho do sensor SPR também está relacionado à funcionalização da superfície do sensor ¹⁹⁷. A ligação significativa de biomoléculas pode causar uma mudança no índice de refração do meio próximo à superfície de ouro, o que é medido como um deslocamento no $\Delta\theta_{SPR}$. Para maximizar o desempenho do sensor SPR, foi utilizada uma proteína bem estabelecida, a proteína CHIP, como modelo de prova de conceito e plotamos a variação no ângulo de ressonância em função de diferentes filmes de ouro revestidos com MoS₂, conforme mostrado na Figura 31. A CHIP é um regulador chave em vários mecanismos celulares críticos, particularmente aqueles associados a distúrbios neurodegenerativos ⁷³. Essa proteína desempenha um papel fundamental na manutenção do equilíbrio do conteúdo proteico, principalmente devido aos seus dois domínios funcionais: o domínio TPR amino-terminal, que interage com a Hsp70 e permite sua função como uma chaperona molecular, e o domínio U-box carboxil-terminal, que está principalmente envolvido na atividade da ubiquitina ligase E3 ⁷³.

Inicialmente, a proteína CHIP foi imobilizada diretamente sobre o filme de ouro. Em seguida, a proteína foi imobilizada sobre um filme de ouro revestido com MoS₂, o que causou um deslocamento maior no ângulo SPR em comparação com a superfície não modificada, indicando que o MoS₂ oferece uma imobilização mais eficaz. O MoS₂ bidimensionais atua como uma plataforma eficiente para imobilização de proteínas por meio de fisorção, utilizando interações hidrofóbicas entre os antígenos e a superfície basal do MoS₂ ¹⁸. Isso elimina a necessidade de agente de ligação cruzada e etapas adicionais de biofuncionalização comumente exigidas por métodos convencionais. Sua estrutura promove a ancoragem de biomoléculas, proporcionando um ambiente mais controlado e homogêneo para a interação proteína-superfície. Essa abordagem simplificada não só otimiza o processo de imobilização, mas também melhora a sensibilidade do sensor.

Para otimizar o sistema de revestimento da superfície, foram testados diferentes volumes de dispersão de MoS₂ (0,23 mg mL⁻¹), variando de 100 a 500 µL. Esse processo permitiu observar o efeito da concentração de MoS₂ na formação do filme fino, sua uniformidade e o impacto na imobilização da proteína, permitindo a identificação do volume mais eficaz para a construção otimizada do biossensor SPR. O volume de 200 µL foi identificado como o ideal, proporcionando o deslocamento de ângulo de ressonância mais significativo. Esse volume resultou em uma imobilização de proteína mais eficiente na superfície revestida com MoS₂ em comparação com os outros volumes testados.

FIGURA 31 - OS SENSORGRAMAS MOSTRAM A INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA CHIP E DIFERENTES CONDIÇÕES DE REVESTIMENTO DA SUPERFÍCIE DE OURO COM MoS_2 : A LINHA PRETA REPRESENTA A SUPERFÍCIE DE OURO SEM REVESTIMENTO; A LINHA VERMELHA INDICA A SUPERFÍCIE DE OURO REVESTIDA COM $100 \mu\text{L}^{-1}$ DE DISPERSÃO DE MoS_2 ; A LINHA AZUL MOSTRA A SUPERFÍCIE DE OURO REVESTIDA COM $200 \mu\text{L}^{-1}$ DE DISPERSÃO DE MoS_2 ; A LINHA ROSA CORRESPONDE À SUPERFÍCIE DE OURO REVESTIDA COM $300 \mu\text{L}^{-1}$ DE DISPERSÃO DE MoS_2 ; A LINHA CINZA REPRESENTA A SUPERFÍCIE DE OURO REVESTIDA COM $400 \mu\text{L}^{-1}$ DE DISPERSÃO DE MoS_2 ; A LINHA VERDE MOSTRA A SUPERFÍCIE DE OURO REVESTIDA COM $500 \mu\text{L}^{-1}$ DE DISPERSÃO DE MoS_2 . (B) REPRESENTAÇÃO EM GRÁFICO DE BARRAS DOS VALORES EFETIVOS DE $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ OBTIDOS PARA DIFERENTES CONDIÇÕES DE REVESTIMENTO DA SUPERFÍCIE DE OURO COM MoS_2 .



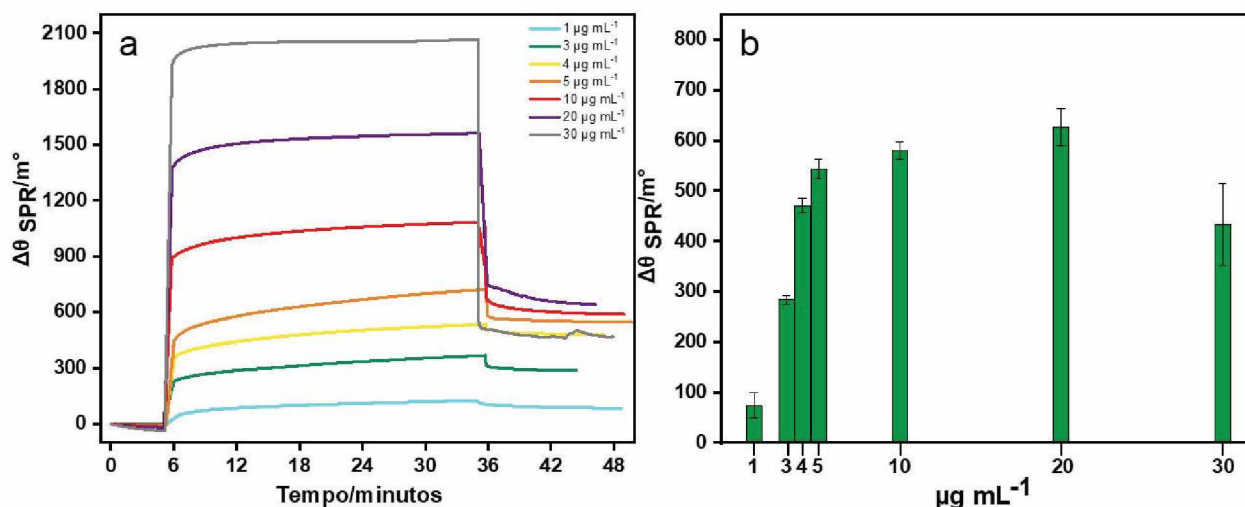
FONTE: O autor (2025).

7.11 AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA ENVELOPE DOMÍNIO III DENV-1 (EDIII-DENV-1) NA SUPERFÍCIE DE OURO REVESTIDA COM MoS_2

Inicialmente, a proteína CHIP foi utilizada como modelo para validar a eficiência da plataforma na imobilização de biomoléculas, permitindo a otimização de parâmetros experimentais, como a quantidade de MoS_2 usada na formação do filme. Com a viabilidade da estratégia confirmada, a investigação avançou para a construção de um biossensor funcional, utilizando a proteína EDIII-DENV-1 como bioreceptor específico. Este sistema visa a detecção seletiva de anticorpos contra o vírus da dengue. Diferentes concentrações da proteína foram testadas e os resultados estão mostrados na Figura 32a. A otimização da concentração da proteína nesta fase é essencial para garantir uma cobertura superficial máxima do sensor, o que, consequentemente, assegura uma sensibilidade superior na detecção dos anticorpos-alvo. A Figura 32b apresenta um gráfico de barras com os valores efetivos de $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ obtidos.

A imobilização da proteína na superfície de ouro revestida com MoS_2 gerou um $\Delta\theta_{\text{SPR}}$. Após a lavagem com tampão PBS a pH 7, obteve-se o $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ efetivo para cada concentração de proteína ¹⁷⁷. Como mostrado na Figura 32, para concentrações menores de proteína, os sensorgramas efetivos obtidos mudaram linearmente com o aumento no número de moléculas. No entanto, a adição de proteína em concentrações mais altas ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $30 \mu\text{g mL}^{-1}$) não resultou em diferenças significativas no $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ efetivo em comparação com a concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Além disso, para a concentração de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, foi observada uma resposta mais baixa em relação ao valor de $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ obtido para $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Isso possivelmente ocorreu devido à saturação da superfície causada pelo número limitado de sítios de ligação disponíveis para a imobilização do EDIII-DENV-1 ¹⁷⁷.

FIGURA 32 -(a) SENSORGRAMAS OBTIDOS EM TEMPO REAL MOSTRAM A ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA EDIII-DENV-1 DISSOLVIDA EM TAMPÃO PBS pH 7. (b) REPRESENTAÇÃO EM GRÁFICO DE BARRAS DOS VALORES EFETIVOS DE $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ OBTIDOS APÓS A INJEÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE EDIII-DENV-1 DISSOLVIDA EM TAMPÃO PBS pH 7.

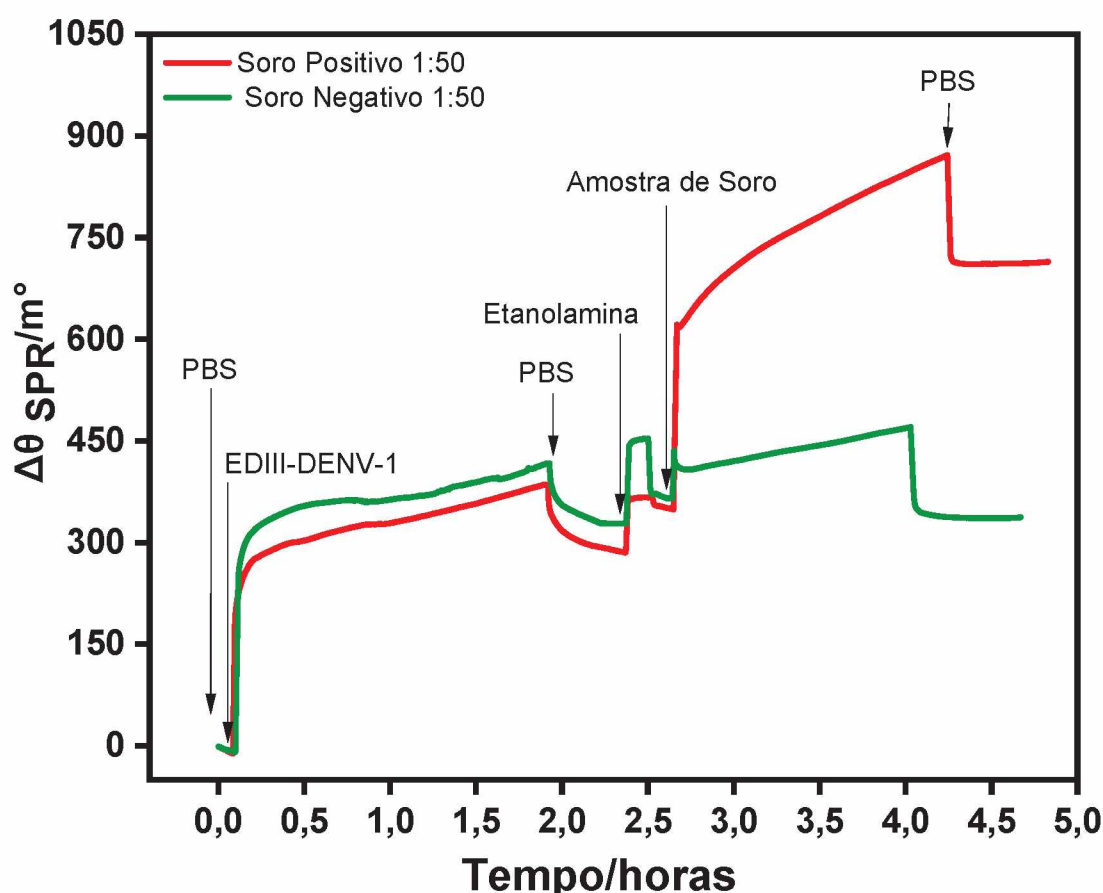


FONTE: O autor (2025).

7.12 MONITORAMENTO EM TEMPO REAL DA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR SPR PARA DIAGNÓSTICO DA DENGUE

Após a seleção da concentração apropriada da proteína, as diferentes etapas da construção do imunossensor foram monitoradas em tempo real, e os resultados são ilustrados na Figura 33. Inicialmente, o tampão PBS a pH 7 foi adicionado para equilibrar a superfície do sensor e estabelecer uma linha de base, e o mesmo tampão foi utilizado para diluir a proteína e o soro humano. Em seguida, a proteína EDIII-DENV-1 ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi imobilizada diretamente na superfície das nanoflocos de MoS_2 , eliminando a necessidade de agentes de ligação cruzada como o glutaraldeído. A superfície basal das nanoflocos de MoS_2 foi utilizada para imobilização via fisorção, com interações hidrofóbicas ocorrendo entre os antígenos, resultando em um aumento acentuado no $\Delta\theta_{\text{SPR}}$, como também observado com a proteína CHIP. As curvas obtidas para os soros positivos (linha vermelha) e negativos (linha verde) mostraram aumentos semelhantes. Em seguida, foi realizada uma lavagem cuidadosa para remover o excesso de proteína, bem como as proteínas que se ligaram de forma fraca à superfície do sensor. A etanolamina foi então utilizada para bloquear os locais de ligação não específicos, resultando em um pequeno aumento no $\Delta\theta_{\text{SPR}}$, confirmando a eficácia do bloqueio, e uma nova etapa de lavagem foi realizada. Na fase de detecção, as amostras de soro humano foram diluídas em PBS na proporção de 1:50. O soro humano positivo, contendo anticorpos específicos para a dengue, mostrou uma ligação clara aos antígenos imobilizados, resultando em um aumento significativo no $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ (curva vermelha). Em contraste, o soro negativo (curva verde) mostrou apenas um leve aumento, confirmando a ausência de ligação específica. Após a lavagem final, a curva vermelha permaneceu estável, enquanto a curva verde voltou aos níveis de linha de base, reforçando a especificidade do imunossensor. Esses resultados destacam a capacidade do imunossensor de discriminar eficientemente entre amostras positivas e negativas para a dengue com base nas $\Delta\theta_{\text{SPR}}$ e no comportamento das curvas.

FIGURA 33 - OS SENSORGRAMAS MOSTRAM AS ETAPAS DA FABRICAÇÃO DO IMUNOSSENSOR. INICIALMENTE, A LINHA DE BASE FOI ESTABELECIDO COM PBS, O MESMO MEIO NO QUAL A PROTEÍNA FOI DILUÍDA. EM SEGUIDA, A IMOBILIZAÇÃO DIRETA DA PROTEÍNA EDIII-DENV-1 ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) NA SUPERFÍCIE BASAL DAS NANOFLOCOS DE MoS_2 FOI REALIZADA, SEGUIDA DE UMA LAVAGEM PARA REMOVER O EXCESSO E ESTABELECEER UMA NOVA LINHA DE BASE. POSTERIORMENTE, FOI REALIZADO O BLOQUEIO COM ETANOLAMINA PARA GARANTIR A LIGAÇÃO ESPECÍFICA DOS ANTICORPOS, SEGUIDO DE OUTRA ETAPA DE LAVAGEM PARA FORMAR UMA LINHA DE BASE. FINALMENTE, NA ETAPA DE DETECÇÃO, AMOSTRAS DILUÍDAS DE SORO HUMANO EM PBS NA PROPORÇÃO DE 1:50 FORAM INTRODUZIDAS. A CURVA VERMELHA REPRESENTA A RESPOSTA A UMA AMOSTRA POSITIVAS, ENQUANTO A CURVA VERDE REPRESENTA UMA AMOSTRA NEGATIVAS TODAS AS ETAPAS E REGIÕES ESTÃO CLARAMENTE IDENTIFICADAS NA FIGURA.



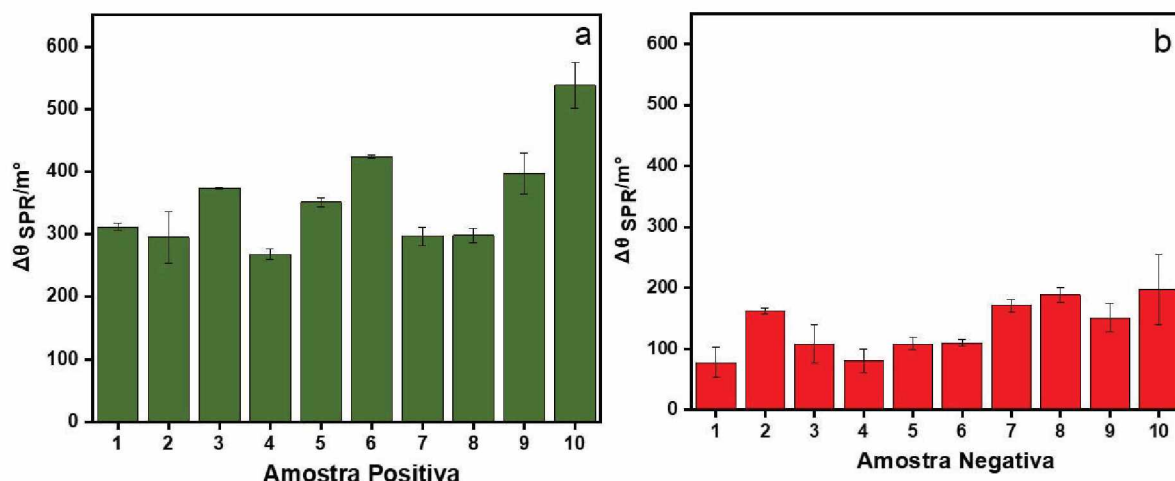
FONTE: O autor (2025).

7.13 IMUNOENSAIO SPR PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA A DENGUE EM SORO HUMANO UTILIZANDO UMA SUPERFÍCIE DE OURO REVESTIDA COM MoS₂.

O desempenho do imunossensor desenvolvido para detectar anticorpos específicos contra o vírus da dengue foi avaliado analisando 10 amostras de soro humano positivas e 10 negativas para infecção por dengue, as quais foram diluídas na proporção de 1:50 utilizando tampão PBS a pH 7. A escolha dessa diluição foi feita para garantir uma concentração adequada de anticorpos nas amostras de soro humano, permitindo uma detecção eficiente pelo imunossensor. Essa diluição ajuda a evitar tanto a saturação do sensor quanto concentrações muito baixas de anticorpos.

Para essa avaliação, amostras de cada grupo foram injetadas e os deslocamentos $\Delta\theta_{SPR}$ foram medidos. A Figura 34a ilustra os resultados obtidos para as amostras positivas, enquanto a Figura 34b mostra os resultados para as amostras negativas. A determinação de $\Delta\theta_{SPR}$ foi realizada considerando a etapa de lavagem com tampão PBS, que visa remover espécies fracamente ligadas e garantir que apenas interações específicas entre os anticorpos e os antígenos imobilizados fossem detectadas ¹⁹⁸. Os resultados demonstraram que o deslocamento $\Delta\theta_{SPR}$ nas amostras positivas foi significativamente maior do que nas amostras negativas. Essa diferença notável indica que o imunossensor é altamente eficaz em distinguir entre amostras positivas e negativas para infecção por dengue, validando sua capacidade de detectar com precisão a presença de anticorpos específicos no soro humano. Além disso, esses resultados reforçam a confiabilidade do imunossensor como uma ferramenta diagnóstica eficaz para a detecção de anticorpos, sugerindo sua aplicabilidade potencial em contextos clínicos e de pesquisa para monitoramento e diagnóstico da infecção.

FIGURA 34 - (a) REPRESENTAÇÃO EM GRÁFICO DE BARRAS DOS VALORES DE $\Delta\theta_{SPR}$ OBTIDOS APÓS A INJEÇÃO DE SORO POSITIVO. (b) REPRESENTAÇÃO EM GRÁFICO DE BARRAS DOS VALORES EFICAZES DE $\Delta\theta_{SPR}$ OBTIDOS APÓS A INJEÇÃO DE SORO NEGATIVO. AS BARRAS MOSTRAM $\Delta\theta_{SPR}$ PARA AMOSTRAS DE SORO HUMANO POSITIVAS E NEGATIVAS PARA INFECÇÃO POR DENGUE, DILUÍDAS NA PROPORÇÃO DE 1:50 EM TAMPÃO PBS A pH 7.



FONTE: O autor (2025).

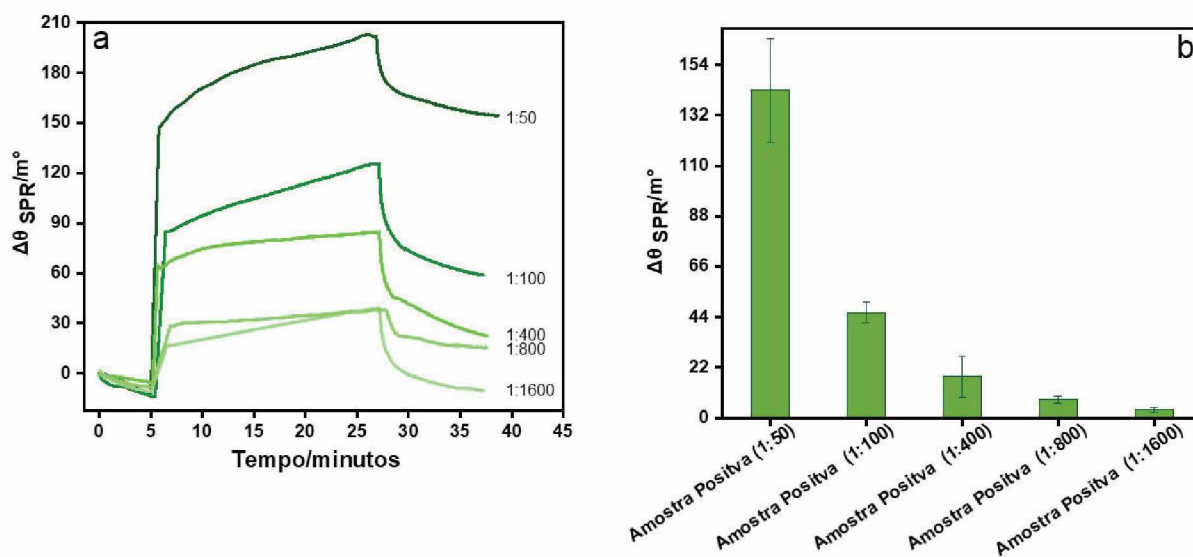
A detecção precoce é essencial no combate à dengue, permitindo uma intervenção rápida e eficaz. Para isso, foi realizado um estudo para identificar a sensibilidade do imunossensor a anticorpos específicos para a dengue em amostras reais. Os testes foram realizados utilizando diferentes diluições de um pool composto por três amostras de soro humano positivas para a doença. A Figura 35^a mostra os valores de $\Delta\theta_{SPR}$ após a injeção desse pool positivo em diferentes diluições, variando de 1:50 a 1:1600. A Figura 35B apresenta os valores de $\Delta\theta_{SPR}$ obtidos após a etapa de lavagem, necessária para remover espécies fracamente ligadas da superfície do imunossensor, conforme mencionado anteriormente.

Os resultados indicam que nosso imunossensor pode detectar interações entre antígenos imobilizados e anticorpos presentes na amostra, mesmo em uma ampla gama de diluições. Uma correlação significativa foi observada entre o fator de diluição e os valores de $\Delta\theta_{SPR}$. À medida que o fator de diluição aumenta, possivelmente resultando em menores concentrações de anticorpos na amostra, os valores de $\Delta\theta_{SPR}$ diminuem em comparação com diluições mais concentradas. Essa relação sugere que a diluição afeta a intensidade das interações moleculares detectadas, refletindo diretamente nos valores de $\Delta\theta_{SPR}$. Esses achados reforçam a sensibilidade e eficácia do imunossensor na detecção de anticorpos, mesmo em concentrações muito diluídas.

A avaliação do desempenho do imunossensor SPR revelou resultados promissores na detecção de anticorpos específicos contra o vírus da dengue. O excelente desempenho do sensor SPR é atribuído à funcionalização de sua superfície, que permite a detecção sensível e específica de interações

biomoleculares ¹⁷⁷. A mudança no $\Delta\theta_{SPR}$ reflete a alteração no índice de refração do meio próximo à superfície de ouro, causada pela ligação de biomoléculas.

FIGURA 35 – (a) SENSORGRAMAS OBTIDOS EM TEMPO REAL MOSTRAM AS ETAPAS DEASSOCIAÇÃO E DISSOCIAÇÃO PARA A ADIÇÃO DE SOROS CANINOS POSITIVOS DISSOLVIDOS EM TAMPÃO PBS pH 7 EM DIFERENTES DILUIÇÕES (v/v) (1:50, 1:100, 1:400, 1:800, 1:1600). (b) REPRESENTAÇÃO EM GRÁFICO DE BARRAS DOS VALORES DE $\Delta\theta_{SPR}$ OBTIDOS APÓS A INJEÇÃO DE SORO POSITIVO.



FONTE: O autor (2025).

8 CONCLUSÕES

Este estudo demonstra a imobilização direta da proteína Envelope Domain III do DENV-1 (EDIII-DENV-1) sobre superfícies de MoS_2 , mediada por interações hidrofóbicas com a superfície basal das nanoflocos de MoS_2 . A modificação do sensor com MoS_2 possibilitou uma imobilização eficiente do antígeno, criando um ambiente favorável para a interação proteína-superfície. O biossensor se destacou pela sua capacidade de distinguir com precisão entre 10 amostras de soro humano positivas para dengue e 10 amostras negativas, mostrando grande potencial para diagnóstico rápido e preciso. Além disso, ao testar diferentes diluições de um pool de amostras de soro positivo, o biossensor foi capaz de detectar anticorpos até a diluição de 1:1600. A caracterização dos filmes de MoS_2 por AFM mostrou que, no substrato de Au modificado com MoS_2 , sem a proteína, pequenas flocos de MoS_2 aderiram ao substrato com uma espessura média de 13 ± 4 nm (~ 18 camadas). Após a adição de EDIII-DENV-1, a espessura aumentou para 145 ± 20 nm, indicando a formação de microgotículas ao redor dos flocos de MoS_2 , o que foi corroborado por imagens de SEM. A função de trabalho do filme de MoS_2 foi de 5,26 eV (CPD = -160 mV), e após a deposição da proteína, essa função diminuiu para 5,16 eV (CPD = -60 mV), contribuindo para um melhor desempenho do sensor devido à redução no nível de Fermi. A combinação de MoS_2 com SPR para detecção de biomoléculas específicas apresenta grande potencial em sistemas diagnósticos, oferecendo uma alternativa acessível, de fácil fabricação e altamente sensível para a detecção de anticorpos, como no caso da dengue, bem como em outras doenças infecciosas.

9 REFERÊNCIAS

1. ABID, S. A.; AHMED MUNEER, A.; AL-KADMY, I. M. S.; et al. Biosensors as a future diagnostic approach for COVID-19. *Life Sciences*, v. 273, p. 119117, 2021. Pergamon.
2. ALLOUZI, M. M. A.; ALLOUZI, S.; AL-SALAHEEN, B.; et al. Current advances and future trend of nanotechnology as microalgae-based biosensor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 187, p. 108653, 2022. Elsevier.
3. AN, Y.; JIANG, X.; BI, W.; et al. Sensitive electrochemical immunosensor for α -synuclein based on dual signal amplification using PAMAM dendrimer-encapsulated Au and enhanced gold nanoparticle labels. *Biosensors & bioelectronics*, v. 32, n. 1, p. 224–230, 2012. *Biosens Bioelectron.* Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22221797/>>. Acesso em: 9/10/2023.
4. ANICHINI, C.; CZEPA, W.; PAKULSKI, D.; et al. Chemical sensing with 2D materials. *Chemical Society Reviews*, v. 47, n. 13, p. 4860–4908, 2018. Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<https://pubs-rsc-org.ez22.periodicos.capes.gov.br/en/content/articlehtml/2018/cs/c8cs00417j>>. Acesso em: 20/10/2024.
5. ASTUTI, I.; YSRAFIL. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, v. 14, n. 4, p. 407–412, 2020. Elsevier. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871402120300849>>. Acesso em: 23/4/2020.
6. AVILA-SALAS, F.; GONZÁLEZ, R. I.; RIÓS, P. L.; ARAYA-DURÁN, I.; CAMARADA, M. B. Effect of the Generation of PAMAM Dendrimers on the Stabilization of Gold Nanoparticles. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 60, n. 6, p. 2966–2976, 2020. American Chemical Society. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00052>>. Acesso em: 6/12/2020.
7. BACHAS-DAUNERT, S.; DIKICI, E.; DEO, S. Biosensors: Design and Applications. *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering*, Second Edition, p. 1–11, 2010.
8. BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; et al. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Advances*, v. 4, n. 4, p. 1583–1600, 2013. The Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/ra/c3ra45991h>>. Acesso em: 25/4/2023.
9. Biosensors Market Size, Industry Report, Trends, Growth Drivers - 2032. Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosensors-market-798.html>>. Acesso em: 8/7/2023.
10. BOLLELLA, P. Enzyme-based amperometric biosensors: 60 years later ... Quo Vadis? *Analytica Chimica Acta*, v. 1234, p. 340517, 2022. Elsevier.

11. BONFIM, K. S. ÓXIDO DE GRAFENO QUIMICAMENTE MODIFICADO COM O DENDRÍMERO PAMAM G.0 PARA APLICAÇÃO ELETROANALÍTICA, 2. mar. 2018. Ilha Solteira, SP: Universidade Estadual Paulista (UNESP). Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/153336>>. Acesso em: 10/4/2020.
12. Brasil é líder em casos de dengue no mundo, com 82% do total registrado, diz OMS | Exame. .Disponível em: <<https://exame.com/brasil/brasil-e-lider-em-casos-de-dengue-no-mundo-com-82-do-registrado-diz-oms/>>. Acesso em: 14/6/2025.
13. Brasil é país com mais casos de dengue no mundo, alerta OMS | Agência Brasil. .Disponível em: <<https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2023-12/brasil-e-pais-com-mais-casos-de-dengue-no-mundo-mostra-dados-da-oms>>. Acesso em: 15/2/2025.
14. BRINDHA, J.; BALAMURALI, M. M.; CHANDA, K. An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases—Leishmaniasis and Chagas Diseases. *Frontiers in Chemistry*, v. 9, p. 622286, 2021. Frontiers Media S.A. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 17/2/2025.
15. BURKE, J. J.; STEGEMAN, G. I.; TAMIR, T. Surface-polariton-like waves guided by thin, lossy metal films. *Physical Review B*, v. 33, n. 8, p. 5186, 1986. American Physical Society. Disponível em: <<https://journals.aps.org/prb/abstract/10.1103/PhysRevB.33.5186>>. Acesso em: 15/12/2024.
16. Butantan pede à Anvisa registro da sua vacina contra a dengue, 1ª do mundo em dose única - Instituto Butantan. .Disponível em: <<https://butantan.gov.br/noticias/butantan-pede-a-anvisa-registro-da-sua-vacina-contra-a-dengue-1-a-do-mundo-em-dose-unica>>. Acesso em: 15/2/2025.
17. CARBONARA, M.; IATTA, R.; MIRÓ, G.; et al. Feline leishmaniosis in the Mediterranean Basin: a multicenter study. *Parasites and Vectors*, v. 17, n. 1, 2024. Parasit Vectors. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39160611/>>. Acesso em: 17/2/2025.
18. CARDOSO, L.; SCHALLIG, H.; PERSICETTI, M. F.; PENNISI, M. G. New Epidemiological Aspects of Animal Leishmaniosis in Europe: The Role of Vertebrate Hosts Other Than Dogs. *Pathogens* 2021, Vol. 10, Page 307, v. 10, n. 3, p. 307, 2021. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-0817/10/3/307/htm>>. Acesso em: 17/2/2025.
19. DO CARMO, D. R.; DE OLIVEIRA, D. R.; BARBOSA, P. F. P.; et al. A Cubic Silsesquioxane Chemically Modified with a PAMAM Dendrimer G0: an Application in Electro-Oxidation of Ascorbic Acid. *Silicon*, v. 11, n. 6, p. 2961–2974, 2019. Silicon. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12633-019-0086-3>>. Acesso em: 2/5/2019.
20. CARRASQUILLA, M. C.; ORTIZ, M. I.; AMÓRTEGUI-HERNÁNDEZ, D.; et al. Pathogens, reservoirs, and vectors involved in the transmission of vector-borne and zoonotic diseases in a Colombian region. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, v. 54, n. 2, p. 1145–1156, 2023. Braz J Microbiol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36828985/>>. Acesso em: 13/2/2025.

21. CARVALHO, B. M.; MAIA, C.; COURTENAY, O.; et al. A climatic suitability indicator to support *Leishmania infantum* surveillance in Europe: a modelling study. *The Lancet Regional Health - Europe*, v. 43, 2024. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S2666776224001388/fulltext>>. Acesso em: 17/2/2025.
22. DE CARVALHO, R. M.; RATH, S.; KUBOTA, L. T. SPR - Uma nova ferramenta para biossensores. *Quimica Nova*, v. 26, n. 1, p. 97–104, 2003. SBQ.
23. ÇEVİK, E.; BAHAR, Ö.; ŞENEL, M.; ABASIYANIK, M. F. Construction of novel electrochemical immunosensor for detection of prostate specific antigen using ferrocene-PAMAM dendrimers. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 86, p. 1074–1079, 2016. Elsevier.
24. CHAKKARAPANI, L. D.; ARUMUGAM, S.; BRANDL, M. Layer-by-layer sensor architecture of polymers and nanoparticles for electrochemical detection of uric acid in human urine samples. *Materials Today Chemistry*, v. 22, p. 100561, 2021. Elsevier.
25. CHAN, K. K.; SUNDARAM, V.; TAN, J.; et al. Enhanced activity of *Candida antarctica* lipase B in cholinium aminoate ionic liquids: a combined experimental and computational analysis. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, p. 1–15, 2023. Taylor & Francis. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com.ez22.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1080/07391102.2023.2262590>>. Acesso em: 31/5/2024.
26. CHAND, K.; CAO, D.; ELDIN FOUAD, D.; et al. Green synthesis, characterization and photocatalytic application of silver nanoparticles synthesized by various plant extracts. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 13, n. 11, p. 8248–8261, 2020. Elsevier.
27. CHATURVEDI, R.; SHARMA, A. Key Facets for the Elimination of Vector-Borne Diseases Filariasis, Leishmaniasis, and Malaria. *ACS Infectious Diseases*, v. 11, p. 287–304, 2025. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsinfecdis.4c00431>>. Acesso em: 15/2/2025.
28. CHAWLA, M.; KAUSHIK, R. D.; SINGH, J.; MANILA. Optimization and computational studies evaluating molecular dynamics of EDA cored polymeric dendrimer. *Scientific Reports* 2020 10:1, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020. Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-020-77540-x>>. Acesso em: 31/3/2022.
29. CHIU, N. F.; TAI, M. J.; NURROHMAN, D. T.; et al. Immunoassay-amplified responses using a functionalized mos2-based spr biosensor to detect papp-a2 in maternal serum samples to screen for fetal down's syndrome. *International Journal of Nanomedicine*, v. 16, p. 2715–2733, 2021. Dove Press. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/immunoassay-amplified-responses-using-a-functionalized-mos2-based-spr-peer-reviewed-fulltext-article-IJN>>. Acesso em: 20/2/2025.
30. CHOI, S. H.; SHAOLIN, Z.; YANG, W. Layer-number-dependent work function of MoS2 nanoflakes. *Journal of the Korean Physical Society*, v. 64, n. 10, p. 1550–

- 1555, 2014. Korean Physical Society. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.3938/jkps.64.1550>>. Acesso em: 27/1/2025.
31. CHUNG, K.; LEE, J. S.; KIM, E.; et al. Enhancing the Performance of Surface Plasmon Resonance Biosensor via Modulation of Electron Density at the Graphene–Gold Interface. *Advanced Materials Interfaces*, v. 5, n. 19, p. 1800433, 2018. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/admi.201800433>>. Acesso em: 23/2/2025.
 32. 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. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>>. Acesso em: 17/1/2025.
 33. COELHO, D. Caracterização eletroquímica de uma monocamada auto-organizada mista composta por ácido 3-mercaptopropiônico e ácido 11-mercaptopundecanóico. 2007.
 34. COMBE, M.; LACOUX, X.; MARTINEZ, J.; et al. Expression, refolding and bio-structural analysis of a tetravalent recombinant dengue envelope domain III protein for serological diagnosis. *Protein expression and purification*, v. 133, p. 57–65, 2017. *Protein Expr Purif.* Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28274805/>>. Acesso em: 15/8/2024.
 35. CROOKS, R. M.; ZHAO, M.; SUN, L.; CHECHIK, V.; YEUNG, L. K. Dendrimer-encapsulated metal nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications to catalysis. *Accounts of Chemical Research*, v. 34, n. 3, p. 181–190, 2001. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>. Acesso em: 27/11/2020.
 36. CUI, F.; YUE, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Z.; ZHOU, H. S. Advancing Biosensors with Machine Learning. *ACS Sensors*, v. 5, n. 11, p. 3346–3364, 2020. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs-acscs-org.ez22.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1021/acssensors.0c01424>>. Acesso em: 29/6/2023.
 37. DANLARD, I.; AKOWUAH, E. K. Assaying with PCF-based SPR refractive index biosensors: From recent configurations to outstanding detection limits. *Optical Fiber Technology*, v. 54, p. 102083, 2020. Academic Press Inc.
 38. DEVADAS, B.; PERIASAMY, A. P.; BOUZEK, K. A review on poly(amidoamine) dendrimer encapsulated nanoparticles synthesis and usage in energy conversion and storage applications. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 444, p. 214062, 2021. Elsevier.
 39. DING, Q.; CZECH, K. J.; ZHAO, Y.; et al. Basal-Plane Ligand Functionalization on Semiconducting 2H-MoS₂ Monolayers. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 9, n. 14, p. 12734–12742, 2017. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsami.7b01262>>. Acesso em: 22/2/2025.
 40. ELANCHEZIYAN, M.; SENTHILKUMAR, S. Covalent immobilization and enhanced electrical wiring of hemoglobin using gold nanoparticles encapsulated

- PAMAM dendrimer for electrochemical sensing of hydrogen peroxide. *Applied Surface Science*, v. 495, p. 143540, 2019. North-Holland.
41. ENDO, T.; YOSHIMURA, T.; ESUMI, K. Synthesis and catalytic activity of gold–silver binary nanoparticles stabilized by PAMAM dendrimer. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 286, n. 2, p. 602–609, 2005. Academic Press.
 42. ESUMI, K.; ISONO, R.; YOSHIMURA, T. Preparation of PAMAM- and PPI-Metal (Silver, Platinum, and Palladium) Nanocomposites and Their Catalytic Activities for Reduction of 4-Nitrophenol. *Langmuir*, v. 20, n. 1, p. 237–243, 2004. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/la035440t>>. Acesso em: 23/2/2021.
 43. ESUMI, K.; SUZUKI, A.; AIHARA, N.; USUI, K.; TORIGOE, K. Preparation of gold colloids with UV irradiation using dendrimers as stabilizer. *Langmuir*, v. 14, n. 12, p. 3157–3159, 1998. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la980162x>>. Acesso em: 6/12/2020.
 44. FERNANDES, D. Quantificação eletroquímica de analitos de interesse ambiental e biológico, empregando novos materiais preparados a partir de silsesquioxanos funcionalizados. Aleph, 2015.
 45. FLEISCHMANN, W. A.; CAO, L. C.; NURJADI, D.; VELAVAN, T. P. Addressing the rise of autochthonous vector-borne diseases in a warming Europe. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 149, p. 107275, 2024. Elsevier.
 46. FRANCKEVIČIUS, M.; GUSTAINYTĖ, A.; KONDRITAS, R.; et al. PPI-SA and PAMAM-SA dendrimers assisted synthesis of silver nanoparticles: Structure, optical properties and stability. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 16, n. 4, p. 1–13, 2014. Kluwer Academic Publishers. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-014-2343-0>>. Acesso em: 9/10/2023.
 47. FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Self-assembled monolayers applications for the development of electrochemical sensors. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 381–389, 2003.
 48. GASTELBONDO-PASTRANA, B.; ECHEVERRI-DE LA HOZ, D.; SANCHEZ, L.; et al. Climatic variables and their relationship with vector-borne disease cases in Colombia, 2011-2021. *Frontiers in Tropical Diseases*, v. 5, p. 1481991, 2024. Frontiers Media SA.
 49. GHOSH, S.; BANTHIA, A. K. Biocompatibility and antibacterial activity studies of polyamidoamine (PAMAM) dendron, side chain dendritic oligourethane (SCDOU). *Journal of biomedical materials research. Part A*, v. 71, n. 1, p. 1–5, 2004. J Biomed Mater Res A. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15368249/>>. Acesso em: 19/10/2023.
 50. GHOSH, S.; YADAV, S.; VASANTHAN, N.; SEKOSAN, G. A study of antimicrobial property of textile fabric treated with modified dendrimers. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 115, n. 2, p. 716–722, 2010. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/app.31127>>. Acesso em: 25/10/2023.
 51. GIANNAZZO, F.; PANASCI, S. E.; SCHILIRÒ, E.; KOOS, A.; PÉCZ, B.

- Integration of graphene and MoS₂ on silicon carbide: Materials science challenges and novel devices. *Materials Science in Semiconductor Processing*, v. 174, p. 108220, 2024. Pergamon.
52. GONÇALVES, C. DE C.; PINHEIRO, G. M. S.; DAHLSTRÖM, K. M.; et al. On the structure and function of Sorghum bicolor CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein): A link between chaperone and proteasome systems. *Plant Science*, v. 296, p. 110506, 2020. Elsevier.
 53. GOSLING, J. P. ENZYME IMMUNOASSAY. *Immunoassay*, p. 287–308, 1996. Academic Press. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780122147302500145>>. Acesso em: 25/4/2023.
 54. GOU, Y.; YANG, X.; HE, L.; et al. Bio-inspired peptide decorated dendrimers for a robust antibacterial coating on hydroxyapatite. *Polymer Chemistry*, v. 8, n. 29, p. 4264–4279, 2017. The Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/py/c7py00811b>>. Acesso em: 25/10/2023.
 55. GUAN, G.; ZHANG, S.; LIU, S.; et al. Protein induces layer-by-layer exfoliation of transition metal dichalcogenides. *Journal of the American Chemical Society*, v. 137, n. 19, p. 6152–6155, 2015. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jacs.5b02780>>. Acesso em: 21/2/2025.
 56. GUO, D.; LOU, C.; WANG, N.; et al. Poly (styrene-divinyl benzene-glycidylmethacrylate) stationary phase grafted with poly amidoamine (PAMAM) dendrimers for rapid determination of phenylene diamine isomers in HPLC. *Talanta*, v. 168, p. 188–195, 2017. Elsevier.
 57. GUPTA, D.; CHAUHAN, V.; KUMAR, R. A comprehensive review on synthesis and applications of molybdenum disulfide (MoS₂) material: Past and recent developments. *Inorganic Chemistry Communications*, v. 121, p. 108200, 2020. Elsevier.
 58. HALEEM, A.; JAVAID, M.; SINGH, R. P.; SUMAN, R.; RAB, S. Biosensors applications in medical field: A brief review. *Sensors International*, 1. jan. 2021. Elsevier.
 59. HAO, X.; ST-PIERRE, J. P.; ZOU, S.; CAO, X. Localized surface plasmon resonance biosensor chip surface modification and signal amplifications toward rapid and sensitive detection of COVID-19 infections. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 236, p. 115421, 2023. Elsevier.
 60. HASAN, M. R.; SHARMA, P.; KHAN, S.; et al. Dengue-virosensor: advancement of dengue virus-based biosensors. *Sensors and Diagnostics*, 16. jan. 2024. Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<https://pubs-rsc-org.ez22.periodicos.capes.gov.br/en/content/articlehtml/2025/sd/d4sd00262h>>. Acesso em: 27/1/2025.
 61. HEGDE, S. S.; SHIVAKUMAR; BHAT, B. R.; et al. A novel and ultrasensitive high-surface porous carbon-based electrochemical biosensor for early detection of dengue virus. *Biosensors and Bioelectronics: X*, v. 20, p. 100525, 2024. Elsevier.

62. ILUNGA, A. K.; MEIJBOOM, R. Catalytic oxidation of methylene blue by dendrimer encapsulated silver and gold nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 411, p. 48–60, 2016. Elsevier.
63. IONESCU, R. E. Use of Cysteamine and Glutaraldehyde Chemicals for Robust Functionalization of Substrates with Protein Biomarkers—An Overview on the Construction of Biosensors with Different Transductions. *Biosensors*, 29. jul. 2022. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-6374/12/8/581/htm>>. Acesso em: 7/2/2023.
64. JAVAID, M.; SARFRAZ, M. S.; AFTAB, M. U.; et al. WebGIS-Based Real-Time Surveillance and Response System for Vector-Borne Infectious Diseases. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2023, Vol. 20, Page 3740, v. 20, n. 4, p. 3740, 2023. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-4601/20/4/3740/htm>>. Acesso em: 13/2/2025.
65. JIANG, G.; LIU, S.; YU, T.; et al. PAMAM dendrimers with dual-conjugated vancomycin and Ag-nanoparticles do not induce bacterial resistance and kill vancomycin-resistant Staphylococci. *Acta Biomaterialia*, v. 123, p. 230–243, 2021. Elsevier.
66. KALANTAR-ZADEH, K.; OU, J. Z. Biosensors Based on Two-Dimensional MoS₂. *ACS Sensors*, v. 1, n. 1, p. 5–16, 2016. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acssensors.5b00142>>. Acesso em: 18/10/2024.
67. KASHYAP, R.; BARUAH, U. R.; GOGOI, A.; MONDAL, B. Sensitivity-Enhanced Surface Plasmon Resonance Sensor Based on Zinc Oxide and BlueP-MoS₂ Heterostructure. *Plasmonics*, v. 18, n. 5, p. 1679–1693, 2023. Springer. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez22.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s11468-023-01884-z>>. Acesso em: 20/10/2024.
68. KAUSHIK, S.; TIWARI, U. K.; PAL, S. S.; SINHA, R. K. Rapid detection of Escherichia coli using fiber optic surface plasmon resonance immunosensor based on biofunctionalized Molybdenum disulfide (MoS₂) nanosheets. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 126, p. 501–509, 2019. Elsevier.
69. KAVITHA, M.; PARIDA, M. R.; PRASAD, E.; VIJAYAN, C.; DESHMUKH, P. C. Generation of Ag Nanoparticles by PAMAM Dendrimers and their Size Dependence on the Aggregation Behavior of Dendrimers. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 210, n. 16, p. 1310–1318, 2009. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/macp.200900155>>. Acesso em: 6/10/2023.
70. KAYA, H. O.; CETIN, A. E.; AZIMZADEH, M.; TOPKAYA, S. N. Pathogen detection with electrochemical biosensors: Advantages, challenges and future perspectives. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 882, p. 114989, 2021. Elsevier.
71. KÉKI, S.; TÖRÖK, J.; DEÁK, G.; DARÓCZI, L.; ZSUGA, M. Silver Nanoparticles

- by PAMAM-Assisted Photochemical Reduction of Ag⁺. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 229, n. 2, p. 550–553, 2000. Academic Press.
72. KHALEQUE, M. A.; HOSSAIN, S. I.; ALI, M. R.; et al. Bioreceptor modified electrochemical biosensors for the detection of life threatening pathogenic bacteria: a review. *RSC Advances*, v. 14, n. 39, p. 28487–28515, 2024. Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<https://pubs-rsc-org.ez22.periodicos.capes.gov.br/en/content/articlehtml/2024/ra/d4ra04038d>>. Acesso em: 9/12/2024.
 73. KHAN, M. Z. H.; HASAN, M. R.; HOSSAIN, S. I.; AHOMMED, M. S.; DAIZY, M. Ultrasensitive detection of pathogenic viruses with electrochemical biosensor: State of the art. *Biosensors and Bioelectronics*, 15. out. 2020. Elsevier.
 74. KRETSCHMANN, E.; RAETHER, H. Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section A Journal of Physical Sciences*, 1968.
 75. KRISHNAN, U.; KAUR, M.; SINGH, K.; KUMAR, M.; KUMAR, A. A synoptic review of MoS₂: Synthesis to applications. *Superlattices and Microstructures*, v. 128, p. 274–297, 2019. Academic Press.
 76. KUMAR, S.; BASU, M.; GHOSH, M. K. Chaperone-assisted E3 ligase CHIP: A double agent in cancer. *Genes & Diseases*, v. 9, n. 6, p. 1521–1555, 2022. Elsevier.
 77. KUMARI, D.; PERVEEN, S.; SHARMA, R.; SINGH, K. Advancement in leishmaniasis diagnosis and therapeutics: An update. *European Journal of Pharmacology*, v. 910, p. 174436, 2021. Elsevier.
 78. KYRIAKIDOU, E. A.; KHIVANTSEV, K.; GOSTANIAN, T. M.; ALEXEEV, O. S.; AMIRIDIS, M. D. Silica-supported gold/dendrimer nanocomposites with controlled sizes of gold particles. *Applied Catalysis A: General*, v. 504, p. 482–492, 2015. Elsevier.
 79. LAI, W.; LUO, R.; TANG, Y.; et al. Salidroside directly activates HSC70, revealing a new role for HSC70 in BDNF signalling and neurogenesis after cerebral ischemia. *Phytotherapy Research*, p. 1–22, 2024. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ptr.8178>>. Acesso em: 27/3/2024.
 80. LAMBERT, A. S.; VALIULIS, S. N.; MALINICK, A. S.; TANABE, I.; CHENG, Q. Plasmonic Biosensing with Aluminum Thin Films under the Kretschmann Configuration. *Analytical Chemistry*, v. 92, n. 13, p. 8654–8659, 2020. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs-acsc-org.ez22.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1021/acs.analchem.0c01631>>. Acesso em: 21/10/2024.
 81. LEE, M. F.; LONG, C. M.; POH, C. L. Current status of the development of dengue vaccines. *Vaccine: X*, v. 22, p. 100604, 2025. Elsevier.
 82. Leishmaniose. Disponível em: <https://www-who-int.translate.goog/?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=pt&_x_tr_hl=pt&_x_tr_pto=tc&_x_tr_hist=true#tab=tab_1>. Acesso em: 17/2/2025.
 83. Leishmaniose - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. Disponível

- em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>>. Acesso em: 17/2/2025.
84. LESNIAK, W.; BLELINSKA, A. U.; SUN, K.; et al. Silver/dendrimer nanocomposites as biomarkers: Fabrication, characterization, in vitro toxicity, and intracellular detection. *Nano Letters*, v. 5, n. 11, p. 2123–2130, 2005. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl051077u>>. Acesso em: 15/7/2022.
 85. LI, F.; YUAN, J.; LI, D.; LI, S.; HAN, Z. Study on the structure of aqueous potassium chloride solutions using the X-ray diffraction and Raman spectroscopy methods. *Journal of Molecular Structure*, v. 1081, p. 38–43, 2015. Elsevier.
 86. LI, L.; CAO, X.; YU, F.; YAO, Z.; XIE, Y. G1 dendrimers-mediated evolution of silver nanostructures from nanoparticles to solid spheres. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 261, n. 2, p. 366–371, 2003. Academic Press.
 87. LI, Y.; HE, H.; LU, W.; JIA, X. A poly(amidoamine) dendrimer-based drug carrier for delivering DOX to gliomas cells. *RSC Advances*, v. 7, n. 25, p. 15475–15481, 2017. The Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/ra/c7ra00713b>>. Acesso em: 31/3/2022.
 88. LIU, L.; JIANG, S.; WANG, L.; ZHANG, Z.; XIE, G. Direct detection of microRNA-126 at a femtomolar level using a glassy carbon electrode modified with chitosan, graphene sheets, and a poly(amidoamine) dendrimer composite with gold and silver nanoclusters. *Microchimica Acta*, v. 182, n. 1–2, p. 77–84, 2015. Springer-Verlag Wien. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00604-014-1273-y>>. Acesso em: 9/10/2023.
 89. LU, C.; HUANG, Z.; LIU, B.; et al. Poly-cytosine DNA as a High-Affinity Ligand for Inorganic Nanomaterials. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 56, n. 22, p. 6208–6212, 2017. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<https://onlinelibrary-wiley-com.ez22.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1002/anie.201702998>>. Acesso em: 21/2/2025.
 90. LU, C.; LIU, Y.; YING, Y.; LIU, J. Comparison of MoS₂, WS₂, and graphene oxide for DNA adsorption and sensing. *Langmuir*, v. 33, n. 2, p. 630–637, 2017. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs-acscs-org.ez22.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1021/acs.langmuir.6b04502>>. Acesso em: 21/2/2025.
 91. LU, M.; ZHU, H.; BAZUIN, C. G.; PENG, W.; MASSON, J. F. Polymer-Templated Gold Nanoparticles on Optical Fibers for Enhanced-Sensitivity Localized Surface Plasmon Resonance Biosensors. *ACS Sensors*, v. 4, n. 3, p. 613–622, 2019. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acssensors.8b01372>>. Acesso em: 6/2/2023.
 92. LUO, X.; IMAE, T. Photochemical synthesis of crown-shaped platinum nanoparticles using aggregates of G4-NH₂ PAMAM dendrimer as templates. *Journal of Materials Chemistry*, v. 17, n. 6, p. 567–571, 2007. The Royal Society of Chemistry. Disponível em:

- <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2007/jm/b611867b>>. Acesso em: 6/10/2023.
93. LUZ, J. G. G.; SOUTO, D. E. P.; MACHADO-ASSIS, G. F.; et al. Development and evaluation of a SPR-based immunosensor for detection of anti-Trypanosoma cruzi antibodies in human serum. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 212, p. 287–296, 2015. Elsevier.
 94. MAK, K. F.; SHAN, J. Photonics and optoelectronics of 2D semiconductor transition metal dichalcogenides. *Nature Photonics* 2016 10:4, v. 10, n. 4, p. 216–226, 2016. Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www-nature-com.ez22.periodicos.capes.gov.br/articles/nphoton.2015.282>>. Acesso em: 20/10/2024.
 95. MANNA, A.; IMAE, T.; AOI, K.; OKADA, M.; YOGO, T. Synthesis of dendrimer-passivated noble metal nanoparticles in a polar medium: Comparison of size between silver and gold particles. *Chemistry of Materials*, v. 13, n. 5, p. 1674–1681, 2001. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/cm000416b>>. Acesso em: 25/10/2023.
 96. MAO, Z.; PENG, X.; ZHOU, Y.; et al. Review of Interface Modification Based on 2D Nanomaterials for Surface Plasmon Resonance Biosensors. *ACS Photonics*, v. 9, n. 12, p. 3807–3823, 2022.
 97. MARINOV, A. D.; BRAVO PRIEGUE, L.; SHAH, A. R.; et al. Ex Situ Characterization of 1T/2H MoS₂ and Their Carbon Composites for Energy Applications, a Review. *ACS Nano*, v. 17, n. 6, p. 5163–5186, 2023. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsnano.2c08913>>. Acesso em: 20/10/2024.
 98. MARTINEZ, R. D.; BUITRAGO, A. A.; HOWELL, N. W.; HEARN, C. H.; JOENS, J. A. The near U.V. absorption spectra of several aliphatic aldehydes and ketones at 300 K. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics*, v. 26, n. 5, p. 785–792, 1992. Elsevier.
 99. MASSON, J. F. Surface Plasmon Resonance Clinical Biosensors for Medical Diagnostics. *ACS Sensors*, v. 2, n. 1, p. 16–30, 2017. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs-acscs-org.ez22.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1021/acssensors.6b00763>>. Acesso em: 21/10/2024.
 100. MELO, R. L. F.; NETO, F. S.; DARI, D. N.; et al. A comprehensive review on enzyme-based biosensors: Advanced analysis and emerging applications in nanomaterial-enzyme linkage. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 264, p. 130817, 2024. Elsevier.
 101. MITCHELL, J. S.; LOWE, T. E. Ultrasensitive detection of testosterone using conjugate linker technology in a nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 7, p. 2177–2183, 2009. Elsevier.
 102. MOHALLEM, M. Nanopartículas de prata e seus nanocompósitos com polianilina: síntese, caracterização e propriedades UFPR, 2005. Disponível em:

- <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/3098>>. Acesso em: 15/7/2021.
103. MORTAZAVI, B.; JAVVAJI, B.; SHOJAEI, F.; et al. Exceptional piezoelectricity, high thermal conductivity and stiffness and promising photocatalysis in two-dimensional MoSi₂N₄ family confirmed by first-principles. *Nano Energy*, v. 82, p. 105716, 2021. Elsevier.
 104. MSELLEMU, D.; TANNER, M.; YADAV, R.; MOORE, S. J. Occupational exposure to malaria, leishmaniasis and arbovirus vectors in endemic regions: A systematic review. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*, v. 6, p. 100185, 2024. Elsevier.
 105. NARESH, V.; LEE, N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors*, v. 21, n. 4, p. 1–35, 2021. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). Disponível em: <[pmc/articles/PMC7915135/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3915135/)>. Acesso em: 18/10/2023.
 106. NEMANASHI-MAUMELA, M.; NONGWE, I.; MOTENE, R. C.; DAVIDS, B. L.; MEIJBOOM, R. Au and Ag nanoparticles encapsulated within silica nanospheres using dendrimers as dual templating agent and their catalytic activity. *Molecular Catalysis*, v. 438, p. 184–196, 2017. Elsevier.
 107. NEMANASHI, M.; MEIJBOOM, R. Synthesis and characterization of Cu, Ag and Au dendrimer-encapsulated nanoparticles and their application in the reduction of 4-nitrophenol to 4-aminophenol. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 389, n. 1, p. 260–267, 2013. Academic Press.
 108. NEMATI, S. S.; DEHGHAN, G.; RASHTBARI, S.; TAN, T. N.; KHATAEE, A. Enzyme-based and enzyme-free metal-based glucose biosensors: Classification and recent advances. *Microchemical Journal*, v. 193, p. 109038, 2023. Elsevier.
 109. NGUYEN, S. H.; VU, P. K. T.; TRAN, M. T. Absorbance biosensors-based hybrid MoS₂ nanosheets for Escherichia coli detection. *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2023. Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-023-37395-4>>. Acesso em: 18/10/2024.
 110. NING, D.; ZHANG, H.; ZHENG, J. Electrochemical sensor for sensitive determination of nitrite based on the PAMAM dendrimer-stabilized silver nanoparticles. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 717–718, p. 29–33, 2014. Elsevier.
 111. NOGUEIRA, M. L.; CINTRA, M. A. T.; MOREIRA, J. A.; et al. Efficacy and safety of Butantan-DV in participants aged 2–59 years through an extended follow-up: results from a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3, multicentre trial in Brazil. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 24, n. 11, p. 1234–1244, 2024. Elsevier.
 112. NOH, J. H.; MEIJBOOM, R. Catalytic evaluation of dendrimer-templated Pd nanoparticles in the reduction of 4-nitrophenol using Langmuir–Hinshelwood kinetics. *Applied Surface Science*, v. 320, p. 400–413, 2014. North-Holland.
 113. NOVAZNURSYAH COSTRADA, A.; FELICIA; SITI AMINAH, N.; et al. Detection of Envelope Glycoprotein Domain III (ED III) Based on Surface-Enhanced Raman Scattering for Dengue Diagnosis. *Journal of Physics: Conference Series*, v. 2696, n. 1, p. 012013, 2024. IOP Publishing. Disponível

- em: <<https://iopscience-iop-org.ez22.periodicos.capes.gov.br/article/10.1088/1742-6596/2696/1/012013>>.
Acesso em: 20/10/2024.
114. NOVOSELOV, K. S.; GEIM, A. K.; MOROZOV, S. V.; et al. Two-dimensional gas of massless Dirac fermions in graphene. *Nature* 2005 438:7065, v. 438, n. 7065, p. 197–200, 2005. Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www-nature-com.ez22.periodicos.capes.gov.br/articles/nature04233>>. Acesso em: 20/10/2024.
 115. OLIVEIRA, D. R.; ZARBIN, A. J. G.; SOUTO, D. E. P. Exploring the versatility of dendrimer-stabilized silver nanoparticle platforms: synthesis, characterization, and protein immobilization for enhanced biosensing applications. *New Journal of Chemistry*, v. 48, n. 39, p. 17000–17012, 2024. Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<https://pubs-rsc-org.ez22.periodicos.capes.gov.br/en/content/articlehtml/2024/nj/d4nj02593h>>. Acesso em: 21/10/2024.
 116. OLIVERIO, M.; PEROTTO, S.; MESSINA, G. C.; LOVATO, L.; DE ANGELIS, F. Chemical Functionalization of Plasmonic Surface Biosensors: A Tutorial Review on Issues, Strategies, and Costs. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 9, n. 35, p. 29394–29411, 2017. American Chemical Society.
 117. OMAR, N. A. S.; FEN, Y. W.; ABDULLAH, J.; et al. Sensitive Detection of Dengue Virus Type 2 E-Proteins Signals Using Self-Assembled Monolayers/Reduced Graphene Oxide-PAMAM Dendrimer Thin Film-SPR Optical Sensor. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020. Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-020-59388-3>>. Acesso em: 11/8/2022.
 118. OMS lança plano estratégico global para combater o aumento da dengue e outras doenças arbovirais transmitidas pelo Aedes. Disponível em: <https://www-who-int.translate.goog/news/item/03-10-2024-who-launches-global-strategic-plan-to-fight-rising-dengue-and-other-aedes-borne-arboviral-diseases?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=pt&_x_tr_hl=pt&_x_tr_pto=tc>. Acesso em: 15/2/2025.
 119. OTTAVIANI, M. F.; VALLUZZI, R.; BALOGH, L. Internal Structure of Silver–Poly(amidoamine) Dendrimer Complexes and Nanocomposites. *Macromolecules*, v. 35, n. 13, p. 5105–5115, 2002. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma010492f>>. Acesso em: 31/3/2022.
 120. OTTO, A. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift für Physik*, v. 216, n. 4, p. 398–410, 1968. Springer-Verlag.
 121. PAL, K.; PAULSON, A. T.; ROUSSEAU, D. Biopolymers in Controlled-Release Delivery Systems. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications*, p. 329–363, 2013. William Andrew Publishing.
 122. PAN, B.; KONG, F.; JU, X.; et al. Molecular mechanism of the carboxyl

- terminus of Hsc70-interacting protein in TAU hyperphosphorylation induced by AICl₃ in N2a cells. *Toxicology*, v. 495, p. 153610, 2023. Elsevier.
123. PANDE, S.; CROOKS, R. M. Analysis of poly(amidoamine) dendrimer structure by UV-Vis spectroscopy. *Langmuir*, v. 27, n. 15, p. 9609–9613, 2011. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la201882t>>. Acesso em: 31/3/2022.
 124. PEI, X.; XU, Z.; ZHANG, J.; LIU, Z.; TIAN, J. Electroactive dendrimer-encapsulated silver nanoparticles for sensing low-abundance proteins with signal amplification. *Analytical Methods*, v. 5, n. 13, p. 3235–3241, 2013. The Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2013/ay/c3ay40518d>>. Acesso em: 15/7/2021.
 125. PENG, T. C.; LIN, W. C.; CHEN, C. W.; TSAI, D. P.; CHIANG, H. P. Enhanced Sensitivity of Surface Plasmon Resonance Phase-Interrogation Biosensor by Using Silver Nanoparticles. *Plasmonics*, v. 6, n. 1, p. 29–34, 2011. Springer. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11468-010-9165-4>>. Acesso em: 6/2/2023.
 126. PLOWMAN, B. J.; SIDHUREDDY, B.; SOKOLOV, S. V.; et al. Electrochemical Behavior of Gold–Silver Alloy Nanoparticles. *ChemElectroChem*, v. 3, n. 7, p. 1039–1043, 2016. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/celc.201600212>>. Acesso em: 9/6/2023.
 127. POCKER, Y.; DICKERSON, D. G. The hydration of propionaldehyde, isobutyraldehyde, and pivalaldehyde. Thermodynamic parameters, buffer catalysis, and transition state characterization. *Journal of Physical Chemistry*, v. 73, n. 11, p. 4005–4012, 1969. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100845a074>>. Acesso em: 9/10/2023.
 128. POURZANGIABADI, M.; NAJAFI, H.; FALLAH, A.; GOUDARZI, A.; POULADI, I. Dengue virus: Etiology, epidemiology, pathobiology, and developments in diagnosis and control – A comprehensive review. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 127, p. 105710, 2025. Elsevier.
 129. POWELL, C. J.; SWAN, J. B. Origin of the Characteristic Electron Energy Losses in Aluminum. *Physical Review*, v. 115, n. 4, p. 869, 1959. American Physical Society. Disponível em: <<https://journals.aps.org/pr/abstract/10.1103/PhysRev.115.869>>. Acesso em: 15/12/2024.
 130. RAI, R.; KENNEDY, A. L.; ISINGIZWE, Z. R.; JAVADIAN, P.; BENBROOK, D. M. Similarities and differences of Hsp70, hsc70, Grp78 and mortalin as cancer biomarkers and drug targets. *Cells*, v. 10, n. 11, p. 2996, 2021. MDPI. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4409/10/11/2996/htm>>. Acesso em: 31/3/2024.
 131. RAJ, S.; CHAND MALI, S.; TRIVEDI, R. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Enicostemma axillare* (Lam.) leaf extract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 503, n. 4, p. 2814–2819, 2018. Academic Press.

132. RAJESH, R.; VENKATESAN, R. Encapsulation of silver nanoparticles into graphite grafted with hyperbranched poly(amidoamine) dendrimer and their catalytic activity towards reduction of nitro aromatics. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 359, p. 88–96, 2012. Elsevier.
133. RAMÍREZ, R. E. H.; MILITELLO, M. P.; ARBELOA, E. M.; LIJANOVA, I. V. New dendritic porphyrins: Synthesis, spectroscopic and antibacterial evaluation. *Journal of Molecular Structure*, v. 1280, p. 135034, 2023. Elsevier.
134. RAMOS, M. K.; MARTINS, G.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; et al. Nanoarchitected graphene/copper oxide nanoparticles/MoS₂ ternary thin films as highly efficient electrodes for aqueous sodium-ion batteries. *Materials Horizons*, v. 10, n. 12, p. 5521–5537, 2023. The Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2023/mh/d3mh00982c>>. Acesso em: 20/10/2024.
135. RAMOS, M. K.; ZARBIN, A. J. G. 2D materials-based nanoarchitectonics for metal-ion batteries. *Materials Nanoarchitectonics: From Integrated Molecular Systems to Advanced Devices*, p. 207–240, 2024. Elsevier.
136. REBELO, R.; BARBOSA, A. I.; CABALLERO, D.; et al. 3D biosensors in advanced medical diagnostics of high mortality diseases. *Biosensors and Bioelectronics*, 1. abr. 2019. Elsevier Ltd.
137. REIMÃO, J. Q.; COSER, E. M.; LEE, M. R.; COELHO, A. C. Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods. *Microorganisms* 2020, Vol. 8, Page 1632, v. 8, n. 11, p. 1632, 2020. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/8/11/1632/htm>>. Acesso em: 17/2/2025.
138. ROVIDA, F.; FACCINI, M.; MOLINA GRANÈ, C.; et al. The 2023 dengue outbreak in Lombardy, Italy: A one-health perspective. *Travel Medicine and Infectious Disease*, v. 64, p. 102795, 2025. Elsevier.
139. SÁNCHEZ, A.; VILLALONGA, A.; MARTÍNEZ-GARCÍA, G.; PARRADO, C.; VILLALONGA, R. Dendrimers as soft nanomaterials for electrochemical immunosensors. *Nanomaterials*, 1. dez. 2019. MDPI AG.
140. SARKAR, M.; BESBES, M.; MOREAU, J.; et al. Hybrid plasmonic mode by resonant coupling of localized plasmons to propagating plasmons in a Kretschmann configuration. *ACS Photonics*, v. 2, n. 2, p. 237–245, 2015. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ph500351b>>. Acesso em: 26/10/2023.
141. SCHAADT, D. M.; FENG, B.; YU, E. T. Enhanced semiconductor optical absorption via surface plasmon excitation in metal nanoparticles. *Applied Physics Letters*, v. 86, n. 6, p. 1–3, 2005. AIP Publishing. Disponível em: <aip/apl/article/86/6/063106/117593/Enhanced-semiconductor-optical-absorption-via>. Acesso em: 23/10/2023.
142. SCHACKART, K. E.; YOON, J. Y. Machine Learning Enhances the Performance of Bioreceptor-Free Biosensors. *Sensors* 2021, Vol. 21, Page 5519, v. 21, n. 16, p. 5519, 2021. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1424-8220/21/16/5519/htm>>. Acesso em: 9/12/2024.

143. SCHMIDT, A.; RAMOS, M. K.; FERREIRA, C. M.; BRAZ, B. A.; ZARBIN, A. J. G. Molybdenum-based materials/carbon nanotubes nanocomposites prepared as thin and transparent films for aqueous K-ion batteries. *Electrochimica Acta*, v. 387, p. 138500, 2021. Pergamon.
144. SCHMIDT, A.; ZARBIN, A. J. G. Molybdenum-based two-dimensional materials: Synthesis, dispersion, exfoliation and thin film deposition. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 554, p. 80–90, 2019. Academic Press.
145. SHARMA, I.; MEHTA, B. R. Enhanced charge separation at 2D MoS₂/ZnS heterojunction: KPFM based study of interface photovoltage. *Applied Physics Letters*, v. 110, n. 6, 2017. American Institute of Physics Inc. Disponível em: <https://aip/apl/article/110/6/061602/33132/Enhanced-charge-separation-at-2D-MoS2-ZnS>. Acesso em: 27/1/2025.
146. SILVESTRINI FERNANDES, D.; SILVEIRA BONFIM, K.; DO CARMO, D. R. Silver Hexacyanoferrate (III) on a Hybrid Graphene Oxide/PAMAM Dendrimer Surface and Application as an Electrocatalyst in the Detection of Isoniazid. *Electroanalysis*, v. 30, n. 6, p. 1107–1116, 2018. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/elan.201800005>. .
147. SILVESTRINI FERNANDES, D.; SILVEIRA BONFIM, K.; DO CARMO, D. R. Silver Hexacyanoferrate (III) on a Hybrid Graphene Oxide/PAMAM Dendrimer Surface and Application as an Electrocatalyst in the Detection of Isoniazid. *Electroanalysis*, v. 30, n. 6, p. 1107–1116, 2018.
148. SINGH, A. K.; MITTAL, S.; DAS, M.; SAHARIA, A.; TIWARI, M. Optical biosensors: a decade in review. *Alexandria Engineering Journal*, v. 67, p. 673–691, 2023. Elsevier.
149. SINGH, A.; SHARMA, A.; AHMED, A.; et al. Recent Advances in Electrochemical Biosensors: Applications, Challenges, and Future Scope. *Biosensors 2021*, Vol. 11, Page 336, v. 11, n. 9, p. 336, 2021. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6374/11/9/336/htm>. Acesso em: 13/12/2024.
150. SINGH, M. K.; PAL, S.; VERMA, A.; DAS, R.; PRAJAPATI, Y. K. A nanolayered structure for sensitive detection of hemoglobin concentration using surface plasmon resonance. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, v. 127, n. 11, p. 1–10, 2021. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00339-021-04985-w>. Acesso em: 27/3/2024.
151. SINGH, S.; SAGGU, I. S.; SINGH, SUKHJINDER; et al. Detection of DMF and NH₃ at Room Temperature Using a Sensor Based on a MoS₂/Single-Walled Carbon Nanotube Composite. *ACS Applied Nano Materials*, v. 6, n. 12, p. 10698–10712, 2023. American Chemical Society. Disponível em: <https://pubs-acsc-org.ez22.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1021/acsanm.3c01638>. Acesso em: 20/10/2024.
152. SKINNER, E. B.; GLIDDEN, C. K.; MACDONALD, A. J.; MORDECAI, E. A. Human footprint is associated with shifts in the assemblages of major vector-

- borne diseases. *Nature Sustainability* 2023 6:6, v. 6, n. 6, p. 652–661, 2023. Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41893-023-01080-1>>. Acesso em: 13/2/2025.
153. SONG, H.; WANG, Q.; ZHAO, W. M. A novel SPR sensor sensitivity-enhancing method for immunoassay by inserting MoS₂ nanosheets between metal film and fiber. *Optics and Lasers in Engineering*, v. 132, p. 106135, 2020. Elsevier.
 154. SOUTO, D. E. P. Estudo da imobilização de antígenos de *Leishmania infantum* sobre plataformas organizadas empregando SPR e QCM para detecção de anticorpos específicos da Leishmaniose Visceral UNICAMP, 2016. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS.
 155. SOUTO, D. E. P.; FONSECA, A. M.; BARRAGAN, J. T. C.; et al. SPR analysis of the interaction between a recombinant protein of unknown function in *Leishmania infantum* immobilised on dendrimers and antibodies of the visceral leishmaniasis: A potential use in immunodiagnosis. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 70, p. 275–281, 2015. Elsevier Ltd.
 156. SOUTO, D. E. P.; VOLPE, J.; GONÇALVES, C. DE C.; RAMOS, C. H. I.; KUBOTA, L. T. A brief review on the strategy of developing SPR-based biosensors for application to the diagnosis of neglected tropical diseases. *Talanta*, v. 205, p. 120122, 2019. Elsevier B.V.
 157. SOUTO, D. E. P.; VOLPE, J.; DE OLIVEIRA, D. R. SPR Sensors: From Configurations to Bioanalytical Applications. *Tools and Trends in Bioanalytical Chemistry*, p. 223–239, 2022. Springer, Cham. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-82381-8_10>. Acesso em: 15/12/2024.
 158. ŠTOFIK, M.; STRÝHAL, Z.; MALÝ, J. Dendrimer-encapsulated silver nanoparticles as a novel electrochemical label for sensitive immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 7, p. 1918–1923, 2009. Elsevier.
 159. STUART, E. J. E.; TSCHULIK, K.; LOWINSOHN, D.; CULLEN, J. T.; COMPTON, R. G. Gold electrodes from recordable CDs for the sensitive, semi-quantitative detection of commercial silver nanoparticles in seawater media. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 195, p. 223–229, 2014. Elsevier.
 160. SUNI, I. I. Substrate Materials for Biomolecular Immobilization within Electrochemical Biosensors. *Biosensors 2021*, Vol. 11, Page 239, v. 11, n. 7, p. 239, 2021. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-6374/11/7/239/htm>>. Acesso em: 13/12/2024.
 161. SUREKHA, B.; KOMMANA, N. S.; DUBEY, S. K.; et al. PAMAM dendrimer as a talented multifunctional biomimetic nanocarrier for cancer diagnosis and therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 204, p. 111837, 2021. Elsevier.
 162. TABASSUM, R.; KANT, R. Recent trends in surface plasmon resonance based fiber–optic gas sensors utilizing metal oxides and carbon nanomaterials as functional entities. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 310, p. 127813, 2020. Elsevier.

163. TANG, D.; YUAN, R.; CHAI, Y. Ligand-functionalized core/shell Ag@Au nanoparticles label-free amperometric immun-biosensor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 94, n. 5, p. 996–1004, 2006. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bit.20922>>. Acesso em: 23/10/2023.
164. TIROLI-CEPEDA, A. O.; SERAPHIM, T. V.; PINHEIRO, G. M. S.; et al. Studies on the effect of the J-domain on the substrate binding domain (SBD) of Hsp70 using a chimeric human J-SBD polypeptide. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 124, p. 111–120, 2019. Elsevier.
165. TOKUHISA, H.; ZHAO, M.; BAKER, L. A.; et al. Preparation and characterization of dendrimer monolayers and dendrimer - Alkanethiol mixed monolayers adsorbed to gold. *Journal of the American Chemical Society*, v. 120, n. 18, p. 4492–4501, 1998. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja9742904>>. Acesso em: 28/3/2024.
166. VAIDYANATHAN, A.; LAKSHMY, S.; SANYAL, G.; et al. Nitrobenzene sensing in pristine and metal doped 2D dichalcogenide MoS₂: Insights from density functional theory investigations. *Applied Surface Science*, v. 550, p. 149395, 2021. North-Holland.
167. VEDHANAYAGAM, M.; NAIR, B. U.; SREERAM, K. J. Effect of functionalized gold nanoparticle on collagen stabilization for tissue engineering application. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 123, p. 1211–1220, 2019. Elsevier.
168. VERICAT, C.; VELA, M. E.; BENITEZ, G.; CARRO, P.; SALVAREZZA, R. C. Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. *Chemical Society Reviews*, v. 39, n. 5, p. 1805, 2010. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=b907301a>>. Acesso em: 10/4/2020.
169. VERSIANI, A. F.; ASTIGARRAGA, R. G.; ROCHA, E. S. O.; et al. Multi-walled carbon nanotubes functionalized with recombinant Dengue virus 3 envelope proteins induce significant and specific immune responses in mice. *Journal of nanobiotechnology*, v. 15, n. 1, 2017. *J Nanobiotechnology*. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28376812/>>. Acesso em: 20/10/2024.
170. WANG, LIN; MORITA, A.; NORTH, N. M.; et al. Identification of Ion Pairs in Aqueous NaCl and KCl Solutions in Combination with Raman Spectroscopy, Molecular Dynamics, and Quantum Chemical Calculations. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 127, n. 7, p. 1618–1627, 2023. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jpcc.2c07923>>. Acesso em: 20/10/2024.
171. WANG, LINA; WU, J.; WANG, X.; FU, S. Defect engineering of MoS₂-based materials as supercapacitors electrode: A mini review. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 959, p. 170548, 2023. Elsevier.
172. WANG, T.; ZHU, H.; ZHUO, J.; et al. Biosensor based on ultrasmall MoS₂ nanoparticles for electrochemical detection of H₂O₂ released by cells at the nanomolar level. *Analytical Chemistry*, v. 85, n. 21, p. 10289–10295, 2013. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs-acscs>>.

- org.ez22.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1021/ac402114c>. Acesso em: 20/10/2024.
173. WANG, X.; ZHOU, J.; WANG, H. Bioreceptors as the key components for electrochemical biosensing in medicine. *Cell Reports Physical Science*, v. 5, n. 2, 2024. Cell Press. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S2666386424000213/fulltext>>. Acesso em: 7/12/2024.
 174. WANG, Y.; NIU, S.; ZHANG, Z.; et al. Reversible pH Manipulation of the Fluorescence Emission from Sectorial Poly(amido amine) Dendrimers. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 10, n. 7, p. 4227–4233, 2010. American Scientific Publishers.
 175. WANG, Z.; LI, Y.; YANG, X.; et al. Mechanism and Complex Roles of HSC70 in Viral Infections. *Frontiers in microbiology*, v. 11, p. 1577, 2020. *Front Microbiol.* Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32849328/>>. Acesso em: 27/3/2024.
 176. WANG, Z.; WANG, J.; WANG, F.; et al. One-step hydrothermal synthesis of high-performance stable Ni-doped 1T-MoS₂ electrodes for supercapacitors. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 947, p. 169505, 2023. Elsevier.
 177. WEI, X.; YIN, M.; ZHANG, L.; et al. Surface Plasmon Resonance (SPR) biosensor for detection of mycotoxins: A review. *Journal of Immunological Methods*, 1. nov. 2022. Elsevier.
 178. WIJAYA, E.; LENAERTS, C.; MARICOT, S.; et al. Surface plasmon resonance-based biosensors: From the development of different SPR structures to novel surface functionalization strategies. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 1. out. 2011. Elsevier Ltd.
 179. WU, R.; DONG, M.; LIU, L. Nano–Bio Interface of Molybdenum Disulfide for Biological Applications. *Coatings 2023*, Vol. 13, Page 1122, v. 13, n. 6, p. 1122, 2023. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-6412/13/6/1122/hlm>>. Acesso em: 21/2/2025.
 180. WU, Y.; LUO, Z.; HUANG, M.; et al. An improved biocatalyst from *Candida antarctica* lipase B immobilized on metal organic frameworks for kinetic resolution of chiral secondary alcohols. *Molecular Catalysis*, v. 550, p. 113584, 2023. Elsevier.
 181. WU, Y.; SUN, M. Recent progress of MXene as an energy storage material. *Nanoscale Horizons*, v. 9, n. 2, p. 215–232, 2024. Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<https://pubs-rsc-org.ez22.periodicos.capes.gov.br/en/content/articlehtml/2024/nh/d3nh00402c>>. Acesso em: 20/10/2024.
 182. WYPYCH, F. Dissulfeto de molibdênio, um material multifuncional e surpreendente: doze anos depois. *Química Nova*, v. 37, n. 7, p. 1220–1226, 2014. Sociedade Brasileira de Química. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/XSBr6w5Wndhqf6gXTYBRYms/?lang=pt>>. Acesso em: 16/1/2025.
 183. XIAO, M.; WEI, S.; CHEN, J.; et al. Molecular Mechanisms of Interactions

- between Monolayered Transition Metal Dichalcogenides and Biological Molecules. *Journal of the American Chemical Society*, v. 141, n. 25, p. 9980–9988, 2019. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jacs.9b03641>>. Acesso em: 22/2/2025.
184. YAN, J.; WANG, K.; LIU, H.; et al. Construction of electrochemical biosensors based on MoSe₂@1T-MoS₂ heterojunction for the sensitive and rapid detection of miRNA-155 biomarker in breast cancer. *Bioelectrochemistry*, v. 154, p. 108541, 2023. Elsevier.
185. YANG, D.; ZHANG, R.; ZHAO, T.; et al. Efficient reduction of 4-nitrophenol catalyzed by 4-carbo-methoxypyrrolidone modified PAMAM dendrimer–silver nanocomposites. *Catalysis Science & Technology*, v. 9, n. 21, p. 6145–6151, 2019. The Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<https://pubs-rsc.org.ez22.periodicos.capes.gov.br/en/content/articlehtml/2019/cy/c9cy01655d>>. Acesso em: 23/10/2023.
186. YANG, L.; ZHOU, Y.; WANG, S.; et al. Noncell-autonomous HSC70.1 chaperone displays homeostatic feedback regulation by binding its own mRNA. *The New phytologist*, v. 237, n. 6, p. 2404–2421, 2023. *New Phytol.* Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36564968/>>. Acesso em: 27/3/2024.
187. YU, M. W.; ISHII, S.; KU, J. R.; et al. Graphene-Loaded Plasmonic Zirconium Nitride and Gold Nanogroove Arrays for Surface-Charge Modifications. *ACS Applied Nano Materials*, v. 3, n. 6, p. 5002–5007, 2020. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsanm.0c01144>>. Acesso em: 23/2/2025.
188. ZHANG, K.; FENG, Y.; WANG, F.; YANG, Z.; WANG, J. Two dimensional hexagonal boron nitride (2D-hBN): synthesis, properties and applications. *Journal of Materials Chemistry C*, v. 5, n. 46, p. 11992–12022, 2017. The Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<https://pubs-rsc.org.ez22.periodicos.capes.gov.br/en/content/articlehtml/2017/tc/c7tc04300g>>. Acesso em: 20/10/2024.
189. ZHANG, P.; WANG, Z.; LIU, L.; et al. Modulation the electronic property of 2D monolayer MoS₂ by amino acid. *Applied Materials Today*, v. 14, p. 151–158, 2019. Elsevier.
190. ZHANG, S.; HU, Z. WEI; MAO, C. YUAN; SHI, C. HE; XU, Y. MING. CHIP as a therapeutic target for neurological diseases. *Cell Death & Disease* 2020 11:9, v. 11, n. 9, p. 1–12, 2020. Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41419-020-02953-5>>. Acesso em: 25/4/2023.
191. ZHANG, Y.; LIU, X.; LI, L.; et al. An electrochemical paracetamol sensor based on layer-by-layer covalent attachment of MWCNTs and a G4.0 PAMAM modified GCE. *Analytical Methods*, v. 8, n. 10, p. 2218–2225, 2016. The Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/ay/c5ay03241e>>. Acesso em: 31/3/2022.
192. ZHANG, Y.; ZHANG, R.; GUO, Y.; LI, Y.; LI, K. A review on MoS₂ structure, preparation, energy storage applications and challenges. *Journal of Alloys and*

- Compounds, v. 998, p. 174916, 2024. Elsevier.
193. ZHAO, M.; CROOKS, R. M. Intradendrimer exchange of metal nanoparticles. *Chemistry of Materials*, v. 11, n. 11, p. 3379–3385, 1999. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/cm990435p>>. Acesso em: 15/7/2022.
 194. ZHAO, Z.; HUANG, C.; HUANG, Z.; et al. Advancements in electrochemical biosensing for respiratory virus detection: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 139, p. 116253, 2021. Elsevier.
 195. ZHENG, J.; DICKSON, R. M. Individual water-soluble dendrimer-encapsulated silver nanodot fluorescence. *Journal of the American Chemical Society*, v. 124, n. 47, p. 13982–13983, 2002. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>. Acesso em: 23/2/2021.
 196. ZHENG, J.; STEVENSON, M. S.; HIKIDA, R. S.; VAN PATTEN, P. G. Influence of pH on dendrimer-protected nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 106, n. 6, p. 1252–1255, 2002. American Chemical Society. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp013108p>>. Acesso em: 3/8/2022.
 197. ZHOU, Y.; LIU, H.; ZHANG, W.; et al. MoS₂-mediated gap-mode surface plasmon enhancement: Construction of SPR biosensor for direct detection of LECT2. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 425, p. 136938, 2025. Elsevier.
 198. ZISIS, T.; FREDDOLINO, P. L.; TURUNEN, P.; et al. Interfacial Activation of *Candida antarctica* Lipase B: Combined Evidence from Experiment and Simulation. *Biochemistry*, v. 54, n. 38, p. 5969–5979, 2015. NIH Public Access. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4697882/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27131882/)>. Acesso em: 27/3/2024.