



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Biossensores para detecção do vírus Epstein-Barr:
diagnóstico de fisiopatologias.**

Aluna: Renata Pereira Alves Balvedi

Orientadora: Profa. Dra. Ana Graci Brito Madurro

Co-Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

UBERLÂNDIA - MG

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Biossensores para detecção do vírus Epstein-Barr:
diagnóstico de fisiopatologias.**

Aluna: Renata Pereira Alves Balvedi

Orientadora: Profa. Dra. Ana Graci Brito Madurro

Co-Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Bioquímica (Área
Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA – MG
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B198b Balvedi, Renata Pereira Alves.
2015 Biossensores para detecção do vírus Epstein-Barr: diagnóstico de fisiopatologias / Renata Pereira Alves Balvedi -- 2015.
118 f. : il.

Orientadora: Ana Graci Brito Madurro.

Coorientador: João Marcos Madurro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Virus oncogênicos - Teses. 3. Biossensores - Teses. 4. Fisiopatologia - Teses. I. Madurro, Ana Graci Brito. II. Madurro, João Marcos. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Biossensores para detecção do vírus Epstein-Barr:
diagnóstico de fisiopatologias.**

Aluna: Renata Pereira Alves Balvedi

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra. Ana Graci Brito Madurro (Orientadora)

Examinadores:

Membro Externo: Dra. Rosa Amália Fireman Dutra

Membro Externo: Dr. José Roberto Siqueira

Membro Interno: Dr. André Luiz Santos

Membro Interno: Dr. Jonny Yokosawa

Data da Defesa: 20 / 07 / 2015

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Tese foram contempladas

Profa. Dra. Ana Graci Brito Madurro

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois somente Ele conhece a verdade de tudo que tentamos compreender! A Ele pertence tudo o que sou!!!

“Estarei com mãos levantadas
pra te louvar,
pois Tu deste tudo a mim.
meu ser, a Ti oh Senhor se rende
o que sou, é Teu!”

**Me Rendo a Ti
Adoração & Adoradores**

AGRADECIMENTOS

Gratidão é um sentimento de reconhecimento que caminha comigo a vida toda, pois a Deus sou grata pela dádiva que Ele me proporcionou em me abençoar em todos os meus caminhos e ao prazer de sempre servi-Lo.

Agradecimento especial: a Profa. Ana Graci e ao Prof. João Marcos que de forma preparada por Deus, aprendendo como a ciência é dinâmica e que os desafios são superados com muito trabalho (principalmente na semana entre o Natal e o Ano Novo)! Aos membros da banca que atenciosamente aceitaram o convite. Sinto-me honrada pela valorosa contribuição neste trabalho.

A minha família Jânisson, amado esposo, e Arthur Ricardo, amado filho, homens de Deus e em minha vida “Ainda que eu fale a língua dos homens, que eu fale a língua dos anjos sem amor eu nada seria”! Este amor também vem dos meus pais, Ricardo e Conceição, meu irmão Ricardo Jr e minha cunhada Ângela, que sempre deram suporte para que este doutorado e tudo mais!!! Ao meu avô Vicente Francisco de Oliveira, 97 anos, e minha avó Maria Aparecida de Oliveira, 89 anos; com seus olhos de amor incondicional me inspiram em continuar, pois sempre acreditaram que o estudo nos faz melhores!!!!

Meus sogros Hildebrando e Marlene, minhas cunhadas Gláucia e Stael e meus sobrinhos João Pedro e Maria Clara, a Trindade, Thaís, Tiago, Valentina e Otávio muito obrigada pelas palavras de força, almoços deliciosos no domingo e finais de semanas emocionantes!

Minha Madrinha Neuza Maria de Castro e ao meu padrinho Mário Spanó que trilharam o caminho que tanto almejo, como pesquisadores, professores e principalmente como pessoas de caráter inigualável! E a todos os tios e primos que compartilharam todos estes momentos de cumplicidade!

À minha família em Cristo, que pagaram o preço em jejum e oração para que a vitória fosse alcançada. Agradecimentos especiais ao Pastor Ricardo Arturo e Pastora Ana Cláudia, aos Líderes Irmão Valdir e irmã Flávia e aos discipuladores irmão Gil e irmã Simone. A toda Família IBA e Comunidade Vida meu carinho!!!

Aos colegas de laboratório, Larissa, Kellen, Ana Beatriz, Heliane, Héden, Lucas, Erick, Bruno Garcês, Mariana (DL), Zé Manuel, Luciano R., Deusmaque,

Diego, Laíse, Leandro (Japa), Felipe (Grilo), Anderson, Thales, Felipy, Ana Cristina, Lívia, Lídia, Jussara, Danielle, Vinícius, Richard, David, Thiago Tormin, Rodrigo (Banana), Marininha, Drielly, Profa. Mayara Ingring, Dr. Marcelo Levenhagen e todos mais que participaram de maneira direta ou indireta nos projetos de pesquisa. Agradecimento especial à Mayta e Janaína, secretárias da pós-graduação IQ e INGEB, que se tornaram minhas grandes amigas. Sem esquecer quem fez a minha matrícula, querido Gerson. Além dos secretários da graduação da Química, Mário e Ricardo e aos do INGEB, Madson e Ismair; e a abençoada Tianinha, exemplo de um coração prestativo!

Aos professores da pós: Prof. Foued, Profa. Veridiana e Kelly, Prof. Malcon, Profa. Bonetti, Prof. Luiz Ricardo, Pós Paula, Pós Lara, Profa. Neide M. da Silva, Prof. Carlos Ueira, que me ensinaram a compreender a beleza da Bioquímica, Genética, Imunologia e Fisiologia; grande e prazeroso desafio!

Agradeço aos professores do ICBIM que há dez anos me apresentaram a beleza da docência no ensino superior. O exemplo de vocês me motivou a iniciar nesta estrada maravilhosa! E a todos do ICBIM, de 2015, muito obrigada pela recepção e por confirmarem que fiz a escolha certa!

Agradecimento especial ao Prof. João Carlos Gabrille Biffi que me orientou no mestrado, ao grande colega Fábio Manna e a equipe da Endodontia, Dentística, Prótese, toda FOUFU.

À admirável Fabiana Grandeaux, redatora da Agência Intelecto, amiga de grandes escritas e ensinamentos que me fizeram uma pessoa-pesquisadora melhor. À Letícia que sempre com sorriso me acalmava nos momentos ansiosos de entrada dos pedidos de patentes!

Aos funcionários da limpeza e vigilância um particular agradecimento. Ao Prof. André Rezende, Prof. Ádamo Ferreira, Técnico Guilherme e Prof. Noélio Dantas, admiráveis na paciência, companheirismo e na colaboração fundamental nos experimentos de AFM.

Aos coordenadores, professores e colegas do curso de Ciências Biológicas da UFU, que me auxiliaram em finalizar a licenciatura junto com o Doutorado. A grande amiga Danúbia, agradeço pela amizade iniciada na disciplina de Fisiologia Vegetal e que permanece com nossos esposos e filhos amigos!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A. Diâmetro estimado; B. Estruturas do vírus Epstein-Barr.

Adaptado: <http://cullenlab.duhs.duke.edu/research/ebv/>; <http://www.cas.vanderbilt.edu/fanninglab/virology/HSV/BVDNAherpes.htm>

Figura 2: Representação do Ciclo do EBV (Transmissão e Disseminação).

Adaptado: <http://www.immunopaedia.org.za/typo3temp/pics/7d1934a073.jpg>.

Figura 3: Esquemática do processo de infecção do EBV: a) penetração do vírus; b) travessia da barreira epitelial; c) infecção dos Linfócitos B e expressão do EBNA-2; d) desligamento do EBNA-2; e) expressão da LMP-1 (vírus latentes na circulação periférica); f) células de memória na mucosa; g) expressão das proteínas de sobrevivência partículas virais. h) replicação viral e evasão.

(Adaptado) Fonte: <http://www.nature.com/nri/journal/v1/n1/images/nri1001-075a-f4.gif>

Figura 4: Esquema da estruturação de um biossensor.

Adaptado: <http://jonatanbiosensores.blogspot.com.br/>.

Figura 5: Esquema representativo de um genossensor (detecção direta).

Figura 6: A intercalação induz distorções estruturais. A. fita de DNA inalterado. B. fita de DNA intercaladas em três locais (áreas escuras).

Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/File:DNA_intercalation.svg

Figura 7: Fórmula do Tetrametilbenzidina (TMB). A. estrutural e B. espacial

Fonte: <http://it.wikipedia.org/wiki/3,3',5,5'-tetrametilbenzidina>.

Figura 8: Reação de oxirredução do Tetrametilbenzidina (TMB).

Fonte: <http://it.wikipedia.org/wiki/3,3',5,5'-tetrametilbenzidina>.

Figura 9: Na configuração de Otto, o meio dielétrico é colocado entre o prisma e o metal. Na configuração de Kretschmann, o filme metálico é colocado diretamente sobre o prisma e os plásmons são excitados na interface externa. (SOUTO, 2012)

Figura 10: Esquema do Microscópio de Força Atômica (AFM).

Fonte: Site nanoScience Instruments.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de expressão de genes latentes, do vírus Epstein-Barr.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A: Adenina

AF: Aminofenol

AFM: do inglês *Atomic Force Microscopy*

AIDS: do inglês *Acquired Immune Deficiency Syndrome*

ALL: do inglês *Acute Lymphoid Leukemia*

anti-VCA: do inglês *anti-Viral Capsid Antigen*

AP: do inglês *Aminophenol*

ATF: Aminotiofenol

ATP: do inglês *Aminothiophenol*

C: Citosina

CD 20: antígeno de Linfócito B

CV: do inglês *Cyclic Voltammogram*

DNA: do inglês *Desoxyribonucleic Acid*

DPV: do inglês *Differential Pulse Voltammogram*

EA: do inglês *early antigen*

EB: do inglês *ethidium bromide*

EBER: do inglês *Epstein–Barr virus-encoded small RNAs*

EBNA: do inglês *Epstein-Barr Nuclear Antigen*

EBV: do inglês *Epstein-Barr Virus*

ELISA: do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EQM: Eletrodos Quimicamente Modificados

FAB: do inglês *French-American-British* (classification)

G: Guanina

HIS: Hibridização *in situ*

HHV-4: do inglês *Human HerpesVirus 4*

i: Intensidade de corrente elétrica

IARC: do inglês *International Agency for Research on Cancer*

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

LMP: do inglês *Latent Membrane Proteins*

ME: Microscopia Eletrônica

NK: do inglês *Natural Killer*
PCR: do inglês *Polimerase Chain Reaction*
Ph. D: do latim *Philosophiae Doctor*
Poli(4-AF): poli(4-Aminofenol)
Poli(4-ATF): poli (4-Aminotiofenol)
PTLD: do inglês *Post Transplant Lymphoproliferative Disorder*
Rq: Valor médio quadrático (rugosidade)
RS: do inglês *Reed-Sternber*
RNA: do inglês *Ribonucleic Acid*
RNAm: do inglês *Ribonucleic Acid messenger*
SPR: do inglês *Surface Plasmon Resonance*
T: Timina
TMB: Tetrametilbenzidina
VC: Voltametria Cíclica
VPD: Voltametria de Pulso Diferencial

SUMÁRIO

Apresentação	01
Capítulo 1: Fundamentação teórica	
1. Introdução	04
1.1 Vírus Epstein-Barr	05
1.2 Ciclo do EBV (Transmissão e Disseminação)	06
1.3 Fisiopatologias associadas	10
1.4. Testes de diagnóstico laboratorial	12
2. Fisiologia e diagnósticos não invasivos	
2.1 Alterações na Fisiologia Renal	13
2.2 Alterações na Fisiologia Salivar	14
3. Biossensores	
3.1 Definição e Estrutura	16
3.2 Transdutores	17
3.3 Componentes Biológicos	19
3.4 Eletrodos quimicamente modificados (EQM)	20
3.5 Técnicas de imobilização	22
3.6 Mediadores	24
3.7 Técnicas eletroquímicas	28
3.8 Ressonância de Superfície de Plasmon (SPR)	29
3.9 Microscopia de Força Atômica (AFM)	31
4. Referências	32
Capítulo 2: Artigo publicado	40
Abstract	42
1 Detection of a specific biomarker for Epstein-Barr Virus using a polymer-based genosensor.	43
Capítulo 3: Depósito de Patente	66
Resumo	67
1. Uso e aplicação de Tetrametilbenzidina (TMB) em genossensores eletroquímicos	68
2. Figuras	81
3. Reivindicações	88
Conclusão final da Tese	89
Resumo	93
Abstract	95
Anexo 1	96
Anexo 2	98
Anexo 3	99
Anexo 4	102
Anexo 5	103

Apresentação

APRESENTAÇÃO

O biossensor pode ser definido como um dispositivo que utiliza um material biológico (ácidos nucleicos, enzimas, peptídeos, scFv (fragmento sintético de anticorpo), anticorpos-antígenos, células, tecidos animais ou vegetais, organismos, etc), conectado a um transdutor o qual converte o sinal biológico em sinal elétrico passível de ser quantificado. Seu uso traz uma série de vantagens, pois são altamente sensíveis, específicos, seletivos, relativamente fáceis em termos de desenvolvimento, além de acessíveis, rápidos e precisos.

Tais dispositivos têm despertado interesse científico nas últimas décadas, sendo importantes ferramentas analíticas usadas para diagnóstico clínico, detecção de fármacos, resíduos ambientais, controle e qualidade de água e alimentos, indústria de bebidas, controle de doenças, alterações fisiológicas, dentre outras. Vale ressaltar que os biossensores apresentam capacidade de detecção em tempo real na análise clínica e biomédica, realizando testes próximos aos pacientes e usando pouco volume de amostra, já que são capazes de passar por um processo de miniaturização.

O vírus Epstein Barr (EBV) é estudado neste projeto por estabelecer uma relação de latência com o organismo infectado e por estar associado a uma série de fisiopatologias. Seu potencial oncogênico está relacionado às evidências sorológicas da presença do agente viral em neoplasias, além do linfoma de Burkitt, como em carcinomas orais e gástricos, doença de Hodgkin, desordens proliferativas de indivíduos imunocomprometidos, tais como doenças linfoproliferativas pós-transplante e um subconjunto de linfomas de linfócitos T e células NK. Estudos recentes evidenciam também a associação do EBV às doenças autoimunes como a Artrite Reumatoide e o Lúpus Eritematoso.

Mediante o exposto, dois genossensores com a sonda (EBV1) imobilizada em eletrodos de grafite sensibilizados com polímeros, poli(4-ATF) ou poli(4-AF) foram desenvolvidos visando o reconhecimento específico do alvo (EBV2) pela técnica de voltametria de pulso diferencial. O pico de oxidação do brometo de etídio nos eletrodos de grafite modificados com poli(4-ATF) e o pico de redução de tetrametilbenzidina, como novo indicador de hibridização de oligonucleotídeos, nos eletrodos de grafite modificados com poli(4-AF) foram projetados e avaliados

nestas plataformas. Análises de Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR) e Microscopia de Força Atômica (AFM) foram utilizadas para complementar o estudo com os genossensores eletroquímicos a fim de fundamentação teórica e prática. A perspectiva deste projeto é a aplicação no diagnóstico da infecção causada pelo vírus Epstein-Barr (em amostras de soro, saliva e urina) uma vez que a literatura descreve que alterações nas fisiologias urinária e salivar ocorrem na presença do EBV, tornando a detecção do EBV nestes fluidos possível. Esta forma não invasiva de diagnóstico poderá ser avaliada nestes testes rápidos avaliando sua sensibilidade, seletividade, especificidade, rapidez e de baixo custo. Os resultados detalhados nos capítulos a seguir descrevem o desenvolvimento e caracterização destas plataformas, que se mostraram eficientes e eficazes para a detecção do ácido nucleico do vírus Epstein-Barr.

Capítulo 1

Fundamentação Teórica

1. INTRODUÇÃO

1.1. Vírus Epstein-Barr

O vírus Epstein-Barr (EBV), também denominado Herpesvírus Humano 4 (HHV-4), é membro da família *Herpesviridae* e da subfamília γ -herpes. Os vírus desta família são amplamente distribuídos no mundo e estima-se que cerca de 90% da população mundial estejam infectados com um herpes vírus, podendo ser assintomático durante toda a vida do hospedeiro. Como apresentado na Figura 1, o EBV é um vírus constituído por DNA dupla fita linear de aproximadamente 192 mil pares de bases e contém cerca de 85 genes, envolvido por um capsídeo icosaédrico composto de 162 capsômeros, recoberto por um envelope glicoproteico e tegumento (AMON, 2013; LIMA & RABENHORST, 2006; YOUNG & RICKINSON, 2004).

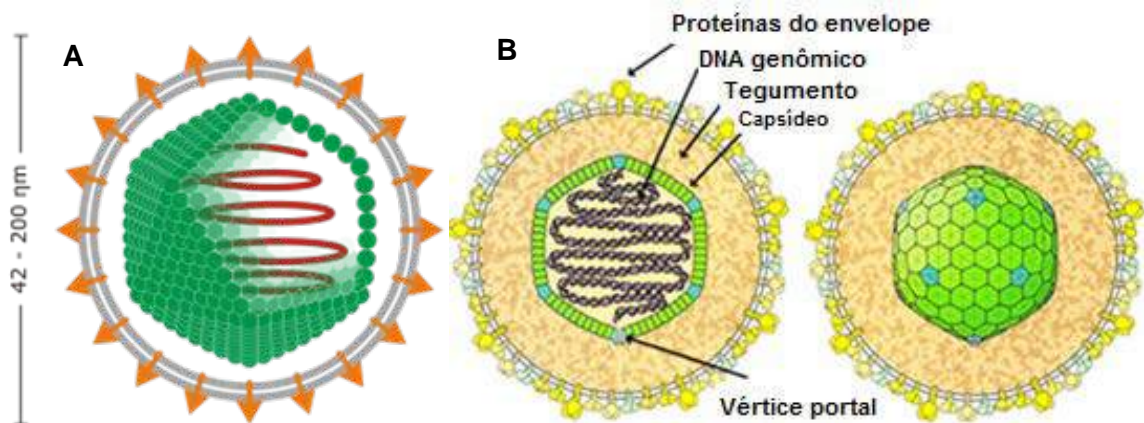


Figura 1: A. Diâmetro estimado; B. Estruturas do vírus Epstein-Barr.

Adaptado: <http://cullenlab.duhs.duke.edu/research/ebv/>; <http://www.cas.vanderbilt.edu/fanninglab/virology/HSV/BVDNAherpes.htm>

O vírus Epstein-Barr foi descoberto há mais de 50 anos, sendo nomeado em homenagem a Michael Anthony Epstein e Yvonne Barr, graduados pela

Universidade de Londres, em 1966, com título Ph.D, e foram os responsáveis pela descoberta e documentação do vírus (EPSTEIN, ACHONG & BARR, 1964).

Em 1958, Denis Parsons Burkitt, ao avaliar micrografias eletrônicas de células cultivadas a partir de um tipo de linfoma muito comum na África Subsaariana (uma variante endêmica denominada Linfoma de Burkitt), observou a presença do EBV. Assim, a associação entre o EBV e este linfoma tornou-se a primeira de uma inesperada e grande variedade de associações descobertas entre este vírus e vários outros tumores (BURKITT, 1958).

O linfoma de Burkitt apresenta-se como doença extranodal e os portadores podem ser afetados sobretudo nas estruturas ósseas, com lesões orais maciças, sendo da mandíbula o mais atingido. Pode ainda afetar diversas estruturas, incluindo rins e ovários. As suas células são morfologicamente idênticas às células da leucemia linfóide aguda (ALL), subtipo FAB L3 ou ALL L3. A imunofenotipagem celular revela positividade do CD21 na extensa maioria dos casos (HECHT & ASTER, 2000; YOUNG & RICKINSON, 2004).

1.2. Ciclo do EBV (Transmissão e Disseminação)

O EBV é transmissível pela saliva e fluidos corporais, que em contato com a mucosa, infecta inicialmente as células epiteliais da orofaringe, nasofaringe e glândulas salivares, onde frequentemente ocorre replicação (ciclo lítico). Posteriormente, os vírus alcançam tecidos linfáticos adjacentes e infectam linfócitos B por meio da ligação entre a glicoproteína viral gp350/220 e o receptor CD21 dessas células de defesa. Após essa associação, o vírus penetra nos linfócitos B por fusão do envoltório (envelope) com a membrana plasmática e o capsídeo é então liberado no citoplasma. O genoma antes linear é transportado para o núcleo, tornando-se circular e permanecendo em estado latente (ciclo lisogênico), sob a forma de DNA episossomal. Os linfócitos B infectados podem se disseminar para outros tecidos linfoides, entretanto é importante ressaltar que partículas virais devem estar disponíveis nas glândulas salivares para que seja possível a sua transmissão por meio da saliva, como mostra a Figura 2 (LIMA & RABENHORST, 2006).

Assim, o genoma viral pode passar por duas fases na célula hospedeira: o ciclo lítico e o ciclo lisogênico (latente).

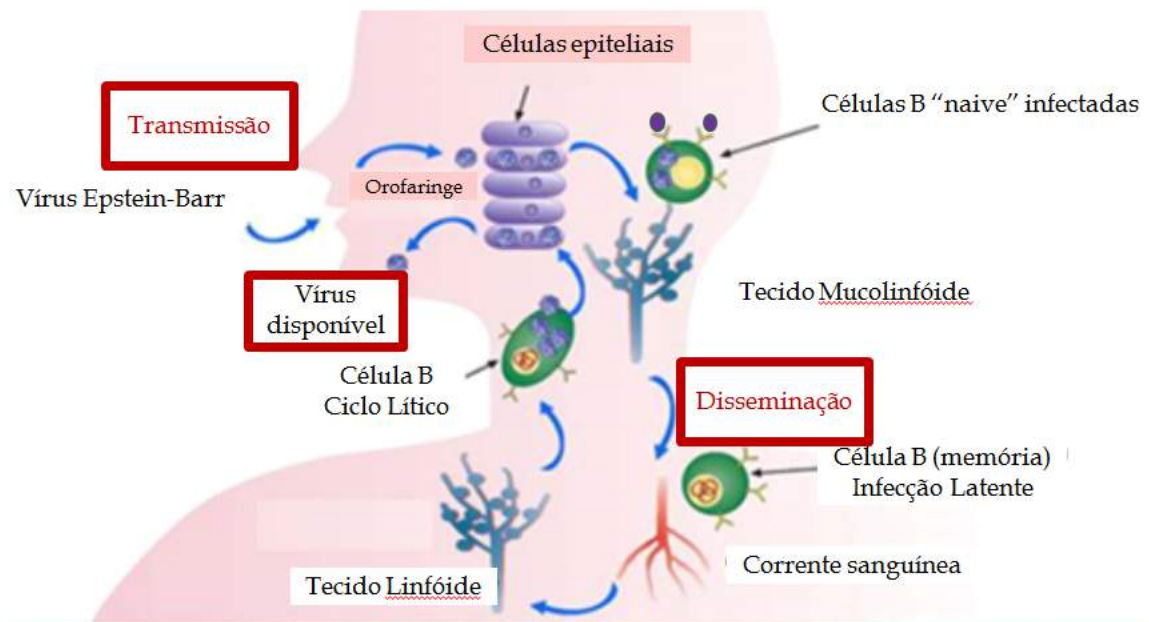


Figura 2: Representação do Ciclo do EBV (Transmissão e Disseminação).
 Adaptado: <http://www.immunopaedia.org.za/typo3temp/pics/7d1934a073.jpg>.

Durante as infecções latentes, é possível verificar a expressão de genes virais que codificam seis proteínas conhecidas como antígenos nucleares do EBV: EBNA-1 (proteína de ligação ao DNA do hospedeiro), EBNA-2 (essencial para a proliferação celular das células-alvo infectadas), EBNA-3 (envolvido na transcrição dos linfócitos B), além de proteínas EBNA-4,5,6 (associadas à ativação ou inibição de genes de interesse). Além dos EBNA, três proteínas de membrana associadas à latência (LMP-1, LMP-2A, LMP-2B) também ganham destaque pelo controle gênico, que permitem ora o estado de latência do vírus ora a sinalização do ciclo lítico.

As principais etapas de infecção pelo EBV são muito complexas. Todo processo é iniciado com a entrada do vírus no corpo do hospedeiro em estruturas linfoepiteliais por meio da saliva contaminada com EBV principalmente pelo beijo. O EBV atravessa a barreira epitelial e infecta os linfócitos tipo B. Nesta etapa, os linfócitos promovem a expressão do Programa de Crescimento do EBV sob a

regulação do antígeno nuclear 2 (EBNA-2). A etapa de crescimento é estagnada quando ocorre o desligamento ou na ausência do EBNA-2, ocorrendo então à expressão da LMP-1. Os vírus, quando em estado de latência, permanecem nas células B de memória as quais podem entrar na circulação periférica por meio dos vasos linfáticos eferentes. Estas células também podem penetrar novamente na mucosa e a partir de então expressar proteínas que proporcionam os sinais necessários para a sobrevivência, em longo prazo, das partículas virais. Por fim, em parte das células infectadas a replicação viral é iniciada, podendo ocorrer o processo de evasão (THOME & TSCHOPP, 2001) ou reinfecção do EBV (Figura 3).

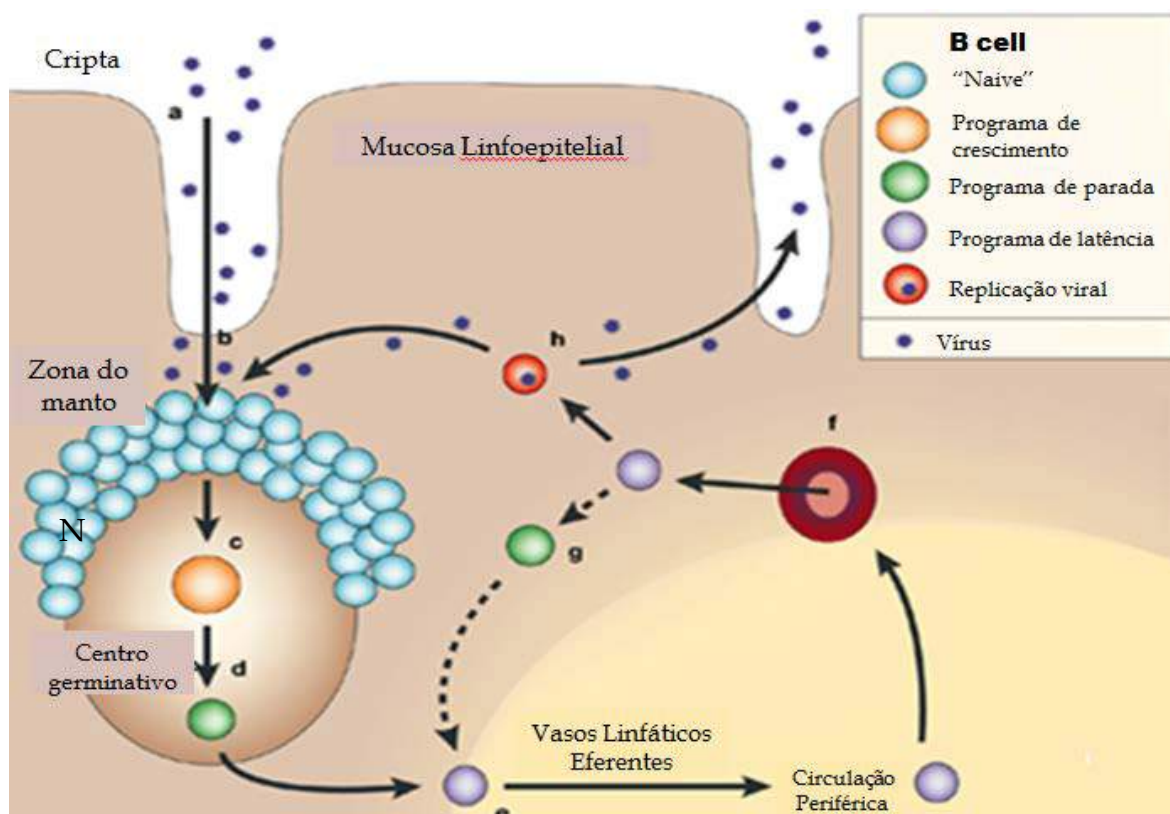


Figura 3: Esquema do processo de infecção pelo EBV: a) penetração do vírus; b) travessia da barreira epitelial; c) infecção dos Linfócitos B e expressão do EBNA-2; d) desligamento do EBNA-2; e) expressão da LMP-1 (vírus latentes na circulação periférica); f) células B de memória na mucosa; g) expressão das proteínas de sobrevivência partículas virais. h) replicação viral e evasão.

Adaptado de: <http://www.nature.com/nri/journal/v1/n1/images/nri1001-075a-f4.gif>

A tabela 1 apresenta os tipos de expressão de genes do EBV em estado de latência e as doenças associadas a cada tipo de latência.

Latência	EBNA1	EBNA2	EBNA3	LMP1	LMP2	EBER	Doença
Tipo 1	+	-	-	-	-	+/-	Linfoma de Burkitt. Carcinoma mamário.
Tipo 2	+	-	-	+	+	+	Carcinoma de nasofaringe. Doença de Hodgkin . Linfoma T.
Tipo 3	+	+	+	+	+	+	Doenças linfoproliferativas .Mononucleose infecciosa.
Tipo 4	-	-	-	+	+	+	Portador saudável.

Legenda: EBNA, antígeno nuclear do vírus Epstein-Barr; LMP, proteína latente de membrana; EBER RNA, codificado do vírus Epstein-Barr. + expressa o gene, - não expressa o gene, +/- pode ou não expressar o gene.

Fonte: Ribeiro-Silva & Zucoloto, 2003.

A mononucleose infecciosa, popularmente conhecida como “Doença do Beijo”, é a principal patologia associada ao EBV. Caracteriza-se por uma patologia transmissível, causada por infecção primária pelo vírus Epstein-Barr (EBV) que afeta, principalmente jovens entre 15 e 25 anos de idade (NAKAOKA *et al.*, 2013). Os principais sintomas consistem em febre glandular (sintoma predominante da infecção), dores de cabeça, inflamação na garganta que não melhora com o uso de antibióticos, inchaço dos gânglios linfáticos no pescoço, principalmente (BRASIL, Ministério da Saúde, 2010).

A propriedade de permanecer em estado latente no hospedeiro após a resolução da infecção primária e a capacidade de posterior reativação, habitualmente, na vigência de disfunções imunológicas, pode ser especialmente grave no contexto da imunossupressão. Assim, quando o indivíduo portador do EBV torna-se imunodeprimido, seja em decorrência de infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV-AIDS), ou porque passou por um transplante que o obrigue a um tratamento com drogas que visam diminuir a rejeição do órgão transplantado ou por estar em tratamento para o câncer, o EBV pode se multiplicar no organismo, causando infecções que podem ser fatais se não detectadas precocemente (ANTENOR, 2004; RIBEIRO-SILVA & ZUCOLOTO, 2003).

1.3. Fisiopatologias associadas

O fato do EBV estar relacionado a diversas patologias graves faz com que o estudo do EBV passe a ser uma questão de saúde pública e de importância para a humanidade.

1.3.1. Carcinomas

O vírus ao estabelecer uma relação oncogênica com o organismo infectado quando inicia sua latência e imortalização dos linfócitos B. A presença do EBV em neoplasias (biópsias e sorologia), além do linfoma de Burkitt, é evidenciado também no caso de carcinomas orais e gástricos (particularmente nasofaríngeos), carcinomas mamários, doença de Hodgkin, doenças linfoproliferativas de indivíduos imunodeficientes, tais como desordens linfoproliferativas pós-transplante (PTLD) e um subconjunto de linfomas de linfócitos T e células NK (YOUNG & RICKINSON, 2004).

De acordo com a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), o vírus Epstein-Barr é classificado como um carcinógeno do grupo I. Não obstante, diversos autores investigam a função das proteínas virais expressas e a participação dessas no desenvolvimento das neoplasias. Alguns estudos tentam correlacioná-las com a superexpressão ou mesmo inibição de proteínas celulares envolvidas em processos oncogênicos. A verificação da clonalidade do EBV, na maioria desses tumores, sugere que as infecções tenham precedido o processo tumorigênico, apontando fortemente para a participação do vírus nesse processo (LIMA & RABENHORST, 2006).

1.3.2. Linfoma de Burkitt

O linfoma de Burkitt é um linfoma linfocítico raro com pouca diferenciação, caracterizado pela proliferação monoclonal de linfócitos B (FREITAS *et al.*, 2008). É um tipo de linfoma não-Hodgkin altamente agressivo que exibe um

elevado grau de proliferação celular dentre os neoplasmas humanos (BOERMA *et al.*, 2004). Tal doença ocorre predominantemente nas primeiras décadas de vida sendo mais comum em indivíduos do sexo masculino e esta neoplasia possui grande afinidade pelos ossos gnáticos, especialmente maxila (BREGANI *et al.*, 2004). Na cavidade oral, este tumor pode progredir rapidamente e se apresentar como uma tumefação facial ou uma massa exofítica envolvendo os maxilares (FREITAS *et al.*, 2008).

1.3.3. Linfoma de Hodgkin

O linfoma de Hodgkin é uma doença linfoproliferativa que foi descrita por Thomas Hodgkin em 1832, sendo caracterizada histopatologicamente pela presença de células neoplásicas denominadas Reed-Sternber (RS), cuja morfologia é variada (MONTEIRO, 2010). Tal anomalia pode ocorrer em qualquer faixa etária, no entanto, é mais comum na idade dos 15 aos 40 anos, atingindo maior frequência entre 25 a 30 anos. Os órgãos e tecidos que compõem o sistema linfático incluem linfonodos, timo, baço, amígdalas, medula óssea e tecidos linfáticos no intestino (BASTIANI *et al.*, 2014). A doença de Hodgkin surge quando um linfócito (mais comumente um linfócito B) transforma-se em uma célula maligna, capaz de multiplicar de forma descontrolada e disseminar-se. A célula maligna de linfócito B começa a se multiplicar, nos linfonodos, produzindo cópias idênticas também chamadas de clones (BASTIANI *et al.*, 2014).

1.3.4. Doenças autoimunes sistêmicas

Acredita-se que a etiologia destas doenças seja multifatorial, ou seja, fatores genéticos e ambientais associados contribuem para seu desenvolvimento (CRUZ-TAPIAS *et al.*, 2012). Os principais fatores de risco ambiental são as infecções, incluindo as causadas pelo EBV que é suspeito de ter um papel central na patogênese das doenças autoimunes (DRABORG *et al.*, 2013).

As doenças autoimunes sistêmicas são apresentadas sobreposição de sintomas clínicos e auto anticorpos característicos que combatem partes do próprio organismo (DRABORG *et al.*, 2013); citamos o lúpus eritematoso sistêmico e a artrite reumatoide como doenças autoimunes associadas ao EBV (YOUNG & RICKINSON, 2004).

1.4. Testes de diagnóstico laboratorial

O diagnóstico que determina a carga viral do EBV presente no organismo é realizado por meio de exames laboratoriais específicos. Dependendo do resultado, o paciente inicia uma terapia preventiva de outras complicações que podem estar relacionadas à presença do vírus, principalmente em indivíduos que apresentem imunocompetência, nos quais as complicações são recorrentes e agressivas, que apesar de raro pode ser letal (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Os testes utilizados para diagnosticar a infecção causada pelo EBV em soro e em espécimes tumorais permitem analisar a presença e correlacionar à participação do referido vírus no desenvolvimento das várias neoplasias.

As técnicas de diagnóstico disponíveis para o diagnóstico de EBV incluem: i. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); ii. Hibridização *in situ* (HIS); iii. Imunohistoquímica; iv. Imunocitoquímica; v. ELISA e vi. Microscopia Eletrônica (ME). Estas técnicas caracterizam-se por possuir um custo elevado, exigirem mão de obra especializada e uma demorada análise.

Outras tecnologias recentes, tais como o desenvolvimento de biossensores, estão emergindo para uma vertente do diagnóstico de EBV (ALVES-BALVEDI *et al.*, 2014; WEISS & CHEN, 2013; GARTZONIKA *et al.*, 2012; PASCHALE & CLERICI, 2012; TARRAND *et al.*, 2010).

Dessa forma, o diagnóstico precoce de um vírus com propriedades como o EBV pode ser a chave para um tratamento adequado, prevenção de doenças futuras ou até mesmo minimizar os efeitos de rejeição de órgãos em pacientes transplantados.

2. Fisiologia e diagnósticos não invasivos

As primeiras informações sobre o reservatório do EBV consideravam unicamente os linfócitos B em circulação, porém dados recentes demonstraram claramente em pacientes tratados com Rituximab[®], drogas anticâncer, demonstraram a permanência do EBV mesmo na ausência de circulação de linfócitos B. Análises demonstraram que o maior portal do EBV seja a orofaringe, evidências apontando para vias adicionais, incluindo secreções cervicais, leite, sêmen, lágrimas e secreções uretrais (PERERA *et al.*, 2009).

Assim, avaliações mais específicas na fisiologia renal e salivar merecem maior atenção como vias de excreção do EBV, visando o teste de diagnóstico não invasivo.

2.1. Alterações na Fisiologia Renal

A infecção aguda causada pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) causa febre, fadiga e faringite. O envolvimento renal em infecções sistêmicas causado pelo EBV normalmente se manifesta como necrose tubular aguda ou nefrite túbulo-intersticial. Raramente, a infecção pelo EBV causa a síndrome nefrítica devido à doença de lesões mínimas e o tratamento com metilprednisona leva a remissão clínica rápida e completa. A nefropatia de alteração mínima é uma manifestação muito rara em pacientes com infecção por EBV e deve ser considerada em pacientes com Mononucleose infecciosa (MI) e proteinúria (MIKHALKOVA *et al.*, 2012).

Existem também evidências da presença de DNA – EBV, detectado por reação em cadeia da polimerase (PCR) no tecido renal em pacientes com nefrite intersticial, favorecendo a toxicidade renal (BAO *et al.*, 1996). Além disso, receptores de EBV (CD21) foram detectados em células do túbulo proximal e foram regulados positivamente nos tecidos infectados com EBV (CATAUDELLA *et al.*, 2002).

2.1.1. Urina

Na busca de testes diagnósticos não invasivos e na maior facilidade de coleta de amostras, a urina foi o foco de experimentos de detecção do EBV.

A presença do na urina de pacientes com Mononucleose Infecciosa (MI) foi investigada inicialmente em 1994, juntamente com as análises de sangue. Durante o curso clínico da doença e até 2-7 meses após a recuperação, as amostras foram analisadas por meio da PCR e os resultados apresentaram que o DNA do EBV pode ser detectado no sangue e na urina, demonstrando pela primeira vez a presença de EBV infeccioso na urina durante o curso clínico da doença e até meses após a recuperação clínica completa dos pacientes (LANDAU *et al.*, 1994).

Análise em pacientes com Carcinomas Nasofaríngeos mostrou que o DNA de EBV foi detectável na urina de 56% dos pacientes, sendo que estes apresentaram concentrações plasmáticas significativamente mais elevadas de DNA, com uma correlação positiva entre os títulos virais no plasma e na urina de DNA de EBV. Os resultados favorecem a análise de DNA do EBV na urina como uma forma potencialmente aplicável de teste não-invasivo para o monitoramento e prognóstico dos doentes com carcinomas (CHAN *et al.*, 2008).

2.2. Alterações na Fisiologia Salivar

Testes de diagnósticos salivares são utilizados na nanotecnologia dinâmica e emergente por auxiliar no diagnóstico de doenças orais e sistêmicas baseando-se na detecção de biomarcadores. A utilização de fluidos orais está ampliando perspectivas no diagnóstico clínico e no monitoramento de doenças, contribuindo para a assistência ao paciente (MALAMUD & RODRIGUES-CHAVES, 2011).

A utilização de saliva como alternativa para o diagnóstico de patologias e/ou monitoramento é muito atrativa devido à facilidade de obtenção da amostra e, principalmente, pela natureza menos invasiva que a coleta de sangue venoso.

A saliva é um fluido hipotônico em relação ao plasma; contém compostos produzidos localmente nas glândulas salivares (imunoglobulina A [IgA] e α -

amilase), além de compostos difundidos do plasma (água, eletrólitos, proteínas, metabólitos e hormônios). Sua produção e sua composição são dependentes da atividade do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, cuja ação antagônica/complementar pode resultar em diferentes volumes de saliva com perfis proteico e iônico distintos (NUNES & MACEDO, 2013).

Outros estudos avaliaram a carga de DNA do EBV, de forma comparativa no sangue e na saliva, sendo detectado por PCR. Os resultados apresentaram resultados semelhantes na quantificação das amostras em pacientes infectados pelo HIV (IDESAWA *et al.*, 2004; MBULAITIYE *et al.*, 2006).

A detecção simultânea de diferentes vírus nos fluidos orais, utilizando diferentes ensaios, com múltiplas aplicações, é um campo emergente. Muitos destes ensaios estão mudando para incorporar capacidade de multiplexação e de tirar partido das abordagens nanotecnológicas, produzindo aparelhos de diagnóstico automatizados, confiáveis e sensíveis. Contudo, estes sistemas de detecção novos exigem otimização e validação antes da implementação na rotina clínica para testes diagnósticos (MALAMUD & RODRIGUES-CHAVES, 2011).

As potencialidades e limitações da utilização da saliva como ferramenta diagnóstica necessitam ainda ser avaliadas, pois a padronização de algumas variáveis pré-analíticas (escolha correta do melhor sistema de coleta, horários de coleta bem definidos e a contaminação da saliva com sangue proveniente de lesões da mucosa oral) devem ser avaliadas (NUNES, 2013). Ainda pelo fato da coleta de material dificultada em pacientes com xerostomia, neonatos e pacientes com respiradores artificiais.

3. Biossensores

3.1. Definição e estrutura

O biossensor é um dispositivo que utiliza um material biológico (ácidos nucleicos, enzimas, peptídeos, scFv (fragmento sintético de anticorpo), anticorpos, antígenos, células, tecidos animais ou vegetais, organismos, e outros), conectado a um transdutor que converte o sinal biológico em sinal elétrico passível de ser quantificado (Figura 4) e são dispositivos que utilizam a especificidade das reações biológicas para detecção de analitos-alvo (PATHAK *et al.*, 2007). Os biossensores podem ser classificados de acordo com o elemento de reconhecimento biológico, que determina a seletividade ou especificidade do dispositivo; e de acordo com o transdutor, que determina a sensibilidade do dispositivo (RAPP *et al.*, 2010). Seu uso traz uma série de vantagens, pois são altamente sensíveis, específicos e seletivos, relativamente fáceis em termos de desenvolvimento, além de acessíveis, rápidos, precisos e prontos para uso (SONG *et al.*, 2006).

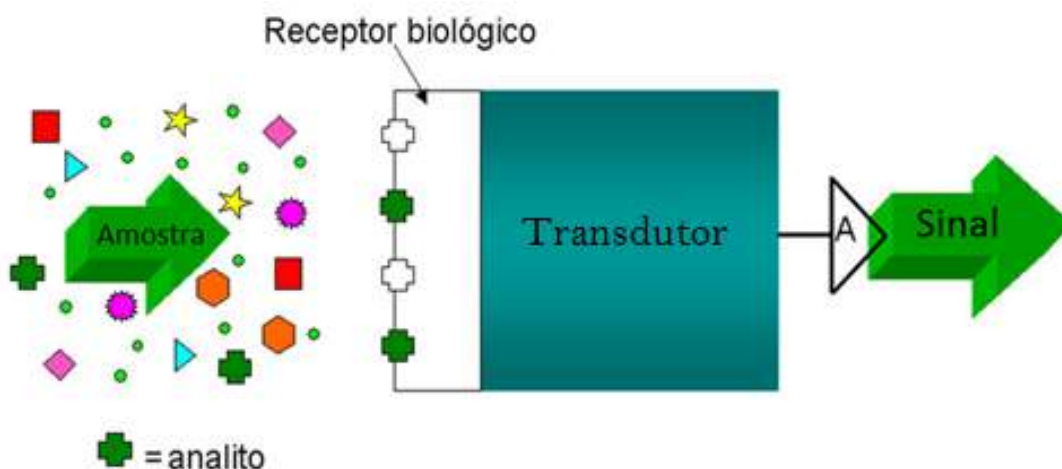


Figura 4: Esquema da estruturação de um biossensor.

Adaptado: Fonte: <http://jonatanbiossensores.blogspot.com.br/>.

Tais dispositivos são importantes ferramentas analíticas usadas para diagnóstico clínico, na detecção de fármacos, resíduos ambientais, controle e qualidade de água e alimentos, indústria de bebidas, controle de doenças, dentre outras. Vale ressaltar que os biossensores apresentam capacidade de detecção

em tempo real, o que é desejado na análise clínica e biomédica, realizando testes próximos aos pacientes e usando pouco volume de amostra, já que são capazes de passar por um processo de miniaturização.

O desenvolvimento de biossensores para o diagnóstico de doenças tem sido muito valorizado atualmente e nesta área já existem várias pesquisas inovadoras. Dentre as várias técnicas de detecção (óptica, calorimétrica, térmica, entre outros) utilizadas em sensores, a eletroquímica tem apresentado maior desenvolvimento nos últimos anos devido à possibilidade de desenvolver testes analíticos simples, rápidos e de baixo custo para a determinação de importantes compostos químicos e biológicos em concentrações mais baixas (SONG *et al.*, 2006).

3.2. Transdutores

A função do transdutor é avaliar e quantificar mudanças físicas ou químicas que ocorrem na reação com o biorreceptor, transformando essa energia em um produto mensurável, como onda eletromagnética, calor, massa, condutância ou intensidade de corrente elétrica. Existem diversos transdutores, tais como o eletroquímico, óptico, piezoelétrico e calorimétrico. Quanto ao princípio de funcionamento do transdutor, os biossensores podem ser denominados potenciométricos (monitoram o potencial elétrico), amperométricos (monitoram a corrente elétrica) ou impedimétricos (monitoram a mudança da impedância; combinação da capacitância e resistência) (POHANKA & SKLÁDAL, 2008).

3.2.1. Transdutor Eletroquímico

Na transdução eletroquímica a captação de sinal é gerada pelo fluxo de íons ou elétrons do sistema e podem ser de dois tipos: **i. Amperométricos** - Mensuram a corrente elétrica resultante da oxidação-redução de espécies eletroativas, sendo que a direção do fluxo de elétrons depende das propriedades do analito e pode ser controlada pela aplicação de um potencial e o sinal será proporcional a concentração do analito, e **ii. Potenciométricos** – Mensuram a

diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o de referência ou dois eletrodos de referência separados por uma membrana seletiva permeável, em que não há fluxo de corrente entre eles (SKOOG *et al.*, 2007).

3.2.2. Transdutor Óptico

São exemplos de transdutores ópticos: guia de onda planar, Ressonância de Superfície de Plasmon (SPR – *Surface Plasmon Resonance*). São utilizados na detecção direta medindo a luz observada ou emitida como um resultado de uma reação química ou biológica (PEREIRA *et al.*, 2002).

3.2.3. Transdutor Condutimétricos

A mensuração de mudanças na condutância ocorre onde a quantidade de moléculas transportadoras de carga no eletrólito é alterada e esta pode ser quantificada (TROJANOWICZ *et al.*, 1995).

3.2.4. Transdutor Piezoelétricos

As alterações de massa ou microviscosidade, onda de cisalhamento e superfície acústica são quantificadas, pois nestas o princípio de revestir a superfície do biossensor com uma substância biologicamente ativa que se liga seletivamente é utilizado. Assim, à medida que a massa no cristal (quartzo) aumenta, a frequência de ressonância das oscilações diminui proporcionalmente (GERARD, 2002).

3.2.5. Transdutor Calorimétricos

Esta mensura o calor nas reações bioquímicas do analito com uma substância biológica ativa adequada, como uma enzima. A maior parte do calor

em reações enzimáticas é perdida para o meio sem ser detectada (WAN *et al.*, 2013; KIMMEL *et al.*, 2012).

3.3. Componentes Biológicos

A principal característica de um biossensor é a especificidade para um analito e para tal é imprescindível à utilização de um componente biológico de reconhecimento (VESTERGAAD, *et al.*, 2007).

A outra classificação, como já descrito, refere-se ao tipo de componente biológico (enzima, anticorpo, DNA, dentre outros). Este biocomponente é denominado sonda, a qual reconhecerá especificamente o seu alvo presente na amostra. Dessa forma, os imunossensores são aqueles em que os componentes biológicos são anticorpos, os biossensores enzimáticos são aqueles que contêm enzimas e os genossensores são aqueles que contêm fragmentos de ácido nucleico como sonda (MEHRVAR & ABDI, 2004).

3.3.1. Genossensor

Os biossensores de DNA são relativamente novos e baseiam-se na detecção específica de sequências de DNA complementares às sequências que foram imobilizadas no eletrodo (KIMMEL *et al.*, 2012).

Assim, a detecção ocorre por meio da hibridização, ou seja, da formação da dupla hélice de DNA entre as sequências complementares. O biossensor de DNA também denominado genossensor, contém uma sonda que, em condições adequadas de temperatura, pH e força iônica, irá interagir com o alvo eventualmente presente na amostra. A detecção eletroquímica de DNA é uma técnica promissora de análise de ácido nucleico, devido ao seu tempo de resposta rápido e de alta sensibilidade. Esta técnica baseia-se em: a) moléculas contendo sequências de DNA (cadeia oligonucleotídica) simples fita imobilizadas sobre a superfície do sensor como elemento de reconhecimento e b) hibridização

específica da sequência sonda obedecendo ao princípio de complementaridades de bases nitrogenadas dos pares A - T e C - G (LABUDA *et al.*, 2010).

A formação de híbridos pode ser detectada e analisada, sendo o sinal de hibridização detectado de duas formas: diretamente, produzido pela oxidação de nucleotídeos da sonda de DNA (detecção livre de marcador, Figura 5) (OLIVEIRA BRETT, 2004); ou indiretamente, utilizando um indicador do processo de hibridação (ALVES-BALVEDI *et al.*, 2014).

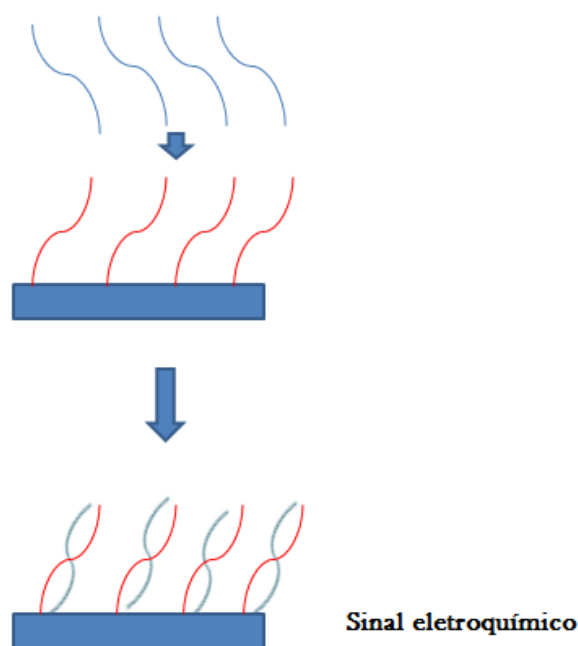


Figura 5: Esquema representativo de um genossensor (detecção direta).

3.4. Eletrodos quimicamente modificados (EQM)

Os eletrodos utilizados em análises eletroquímicas podem ser de diferentes materiais como ouro e platina, ou de materiais caracteristicamente semicondutores como óxido de estanho, grafite, carbono vítreo e pasta de carbono são plataformas propícias. (GOPINATH *et al.*, 2014; SUPRUN *et al.*, 2014; ORAZIO, 2011.).

O eletrodo pode ser quimicamente modificado (EQM) com materiais condutores ou semicondutores deliberadamente tratados com algum reagente,

para adquirir determinadas características desejáveis (RADI, 2010), com o intuito de elevar a capacidade de fixação da molécula biorreceptora sobre a superfície deste (GOPINATH, 2014).

Dentre as modificações, podemos exemplificar a utilização de polímeros que são compostos de origem natural ou sintética com alta massa molar, formados pela repetição de um grande número de unidades químicas chamadas monômeros. Eles atuam como agentes modificadores da superfície do eletrodo, alterando a reatividade, seletividade e sensibilidade; parâmetros estes que os tornam muito atrativos a amplas aplicações, especialmente na área de produção de novos materiais (MILLER, 2007).

A utilização de filmes poliméricos vem intensificando a interação do eletrodo com a sonda biomolecular por modificação da superfície do eletrodo, além de proteger o eletrodo contra a adsorção de analitos inespecíficos (SILVA *et al.*, 2008; GOPINATH, 2014). Vale ressaltar que o sucesso da imobilização das biomoléculas sobre estas matrizes poliméricas deve-se à presença de grupos funcionais como: amino, hidroxila ou ácido carboxílico, os quais facilitam a eletropolimerização e, conseqüentemente, aumentam a retenção de biomoléculas (VIEIRA *et al.*, 2006; ATES, 2013).

Em termos eletroanalíticos, a utilização dos polímeros relaciona-se à possibilidade de manipulação da composição molecular das superfícies. Na polimerização eletroquímica, um monômero é oxidado ou reduzido em uma solução quando o potencial é aplicado, para formar um polímero insolúvel sobre a superfície do eletrodo (RADI, 2010). As vantagens dessa técnica são a simplicidade, reprodutibilidade, estabilidade dos filmes produzidos, possibilidade do controle de espessura e morfologia, entre outros (COSNIER & HOLZINGER, 2011).

Os monômeros de aminofenóis e seus derivados, como os tiofenóis, são compostos promissores em estudos eletroquímicos, uma vez que apresentam dois grupos substituintes diferentes no anel aromático, os quais são química e eletroquimicamente ativos com dois grupos oxidáveis ($-NH_2/-OH$; $-NH_2/-SH$). Durante o processo de síntese de polímeros, os monômeros são oxidados para formar cátions e em seguida reagem formando oligômeros que se depositam na superfície de um eletrodo na forma de polímero. A presença desses grupos

funcionais é adequada para imobilização de biomoléculas e assim com ampla aplicação em sensores e biossensores (ALVES-BALVEDI *et al.*, 2014; VIEIRA, *et al.*, 2006; SALAVAGIONE *et al.*, 2003).

A carga do filme polimérico pode ser positiva ou negativa, dependendo da sua natureza e do pH do meio. Portanto, existe a possibilidade de se escolher o melhor polímero para adequar a interação biomolécula/polímero e propiciar uma interação física. Por outro lado, a força de interação biomolécula/polímero é susceptível às mudanças de pH, temperatura e força iônica do meio (AHUJA *et al.*, 2007).

3.5. Técnicas de imobilização

A imobilização de biomoléculas ativas, assim como a imobilização de mediadores sobre ou no transdutor é uma etapa chave na obtenção de biossensores altamente específicos.

A imobilização pode ser obtida por meio de dois tipos de interações amplamente utilizadas atualmente: não covalentes (como a adsorção física e o aprisionamento mecânico) e covalentes, entre grupos funcionais da biomolécula a ser imobilizada e do filme polimérico.

3.5.1. Adsorção

A adsorção é um tipo de imobilização que utiliza, como força atrativa de fixação, interações não covalentes, isto é, interações relativamente fracas. Uma desvantagem é que, em alguns casos, a imobilização física além da fixação fraca, a orientação das biomoléculas é aleatória.

Uma alternativa para amenizar esta desvantagem é o aprisionamento da biomolécula sobre uma matriz polimérica, que não exige modificação química da biomolécula e a simplicidade é a principal vantagem (GOPINATH *et al.*, 2014).

3.5.2. Aprisionamento ou Oclusão

Nesta técnica ocorre o aprisionamento da biomolécula em uma rede polimérica como um polímero, onde a biomolécula fica confinada nesta rede pois são preparados em conjunto.

A vantagem desta técnica é que a biomolécula não interage quimicamente com o polímero, evitando sua desnaturação. Entretanto, o método possui como desvantagem a diminuição da velocidade de reação em sensores enzimáticos (MATEO *et al.*, 2007)

3.5.3. Ligação covalente

Nas ligações químicas covalentes, os elementos estão compartilhando elétrons. Para se desfazer este tipo de interação, é necessária a aplicação de uma quantidade relevante de energia e por consequência, apresentam maior estabilidade quando comparadas as interações interatômicas e/ou intermoleculares de outra natureza.

Na imobilização de moléculas proteicas sobre eletrodos, a ligação geralmente se estabelece por grupos funcionais expostos a partir das cadeias laterais dos aminoácidos constituintes da biomolécula (XIA, 2013).

Para que a ligação covalente ocorra entre a sonda e o eletrodo, pode-se modificar eletroquimicamente a superfície do eletrodo (EQM), resultando em grupos carboxi passíveis de interagir com os grupos amins da macromolécula proteica ou grupos NH_3^+ passíveis de interagir com os grupos fosfatos (catiônico) do DNA.

3.5.4. Ligação cruzada

A utilização de compostos orgânicos bifuncionais, como o glutaraldeído e cistamina, que estabelecem ligações cruzadas formando ligações covalentes intermoleculares, garante o tipo de ligação cruzada (HASANZADEH *et al.*, 2013).

Para a maioria das aplicações em sensores, a estrutura da biomolécula deve ser mantida e para que isto ocorra as condições como pH deve ser controlado durante toda a construção do biossensor. Em casos onde a imobilização da biomolécula é aleatória e sua orientação espacial pode interferir na eficiência do sensor, a técnica de ligação cruzada deve ser utilizada por promover uma imobilização orientada da sonda e assim promover a captura do alvo, pois os sítios de reconhecimento estão expostos (GOPINATH, 2014).

3.6. Mediadores

Existem diferentes formas pelas quais os compostos podem interagir com o DNA: ligação covalente, ligação eletrostática ou intercalação (RICHARDS & RODGERS, 2007).

Dentre as citadas, a intercalação ocorre no DNA quando um ligante, de um tamanho adequado e determinada natureza química, encaixa-se entre os pares de bases nitrogenadas. Para que isso ocorra é necessário que a dupla fita de DNA se abra de forma dinâmica e este desenrolamento crie um espaço entre os seus pares de bases. Este desenrolamento faz com que os pares de bases se separem, criando uma abertura de cerca de 0,34 nm (3,4 Å) (KEMP *et al.*, 2007). Esta abertura é sugerida, pois em termos de comprimento real, cada par de bases apresenta cerca de 0,34 nm de comprimento ao longo da hélice, e cada volta de hélice contém aproximadamente 10 pares de bases (MADIGAN, *et al.* 2010).

Para as análises de DNA, atualmente são utilizados intercaladores que apresentam propriedades de fluorescência. Estes intercaladores, em sua maioria, são compostos aromáticos planares e devido a esta característica possuem a capacidade de se ligarem à dupla hélice do DNA e ao RNA hibridizado com DNA complementar. A ligação ocorre por via de deslizamento e intercalação entre os pares de bases adjacentes na dupla hélice (REHA *et al.*, 2002).

No caso dos corantes amplamente utilizados como marcadores histológicos, a sua afinidade está associada aos componentes aniônicos (ácidos) dos tecidos, como grupos fosfatos dos ácidos nucleicos, grupos sulfatos de glicosaminoglicanas e grupos carboxilas das proteínas. A habilidade de grupos

aniônicos reagirem com corantes básicos é chamada basofilia e as estruturas celulares que se coram com corantes básicos são denominadas basófilas.

A intercalação é um processo que pode ocasionar alterações estruturais pontuais na cadeia de DNA, como o alongamento ou torção dos pares de bases, que levam a algumas alterações funcionais, tais como, na inibição de transcrição e de replicação e nos processos de reparação do DNA, fazendo com que os intercaladores sejam potentes agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos.

A Figura 6 representa uma condição do DNA frente a ação dos intercaladores.

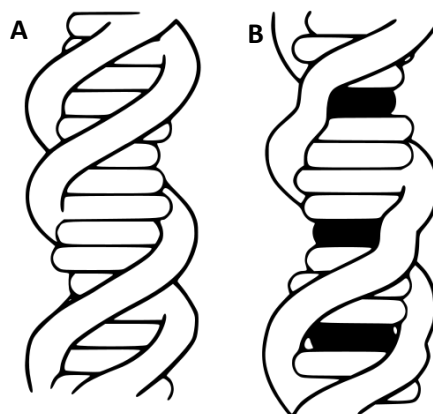


Figura 6: A intercalação induz distorções estruturais. A. fita de DNA inalterado. B. fita de DNA intercaladas em três locais (áreas escuras).

Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/File:DNA_intercalation.svg.

Logo, a busca por mediadores eletroquímicos que possam substituir os já existentes no mercado e que não apresentem tais características desvantajosas faz-se cada vez mais necessário.

3.6.1. Brometo de Etídio

O Brometo de Etídio (BE) é utilizado como um agente de intercalação em laboratórios de biologia molecular para técnicas tais como eletroforese em gel de agarose; quando exposto à luz ultravioleta fica fluorescente com uma cor laranja,

que intensifica quase 20 vezes após a ligação ao DNA entre dois pares de bases de adenina-timina (A - T) (GENTRY *et al.*, 2011).

3.6.2. Laranja de Acridina

Laranja de Acridina é um composto orgânico, fluorescente e catiônico. Este composto é geralmente utilizado para a determinação do ciclo celular por ser um corante seletivo de ácido nucléico. Sendo permeável nas células, interage com o DNA e o RNA por intercalação ou atrações eletrostáticas, respectivamente (FAN *et al.*, 2006).

3.6.3. Azul de Metileno

O azul de metileno é o agente de fotossensibilização amplamente utilizado e alternativo para o brometo de etídio. O modo exato de ligação do azul de metileno ao DNA dupla fita é desconhecido, porém dois possíveis mecanismos de interação foram estabelecidos através da interação eletrostática com a carga negativa da espinha dorsal dos grupos fosfato ou por intercalação entre as bases guanina-citosina (G – C), mas a intercalação no sulco menor do DNA é assumida como sendo o modo de ligação predominante (LAUSTRIT,1986).

3.6.4. Corantes Hoechst

Os corantes Hoechst fazem parte de uma família de corantes fluorescentes azuis utilizados para corar o DNA e evidenciados pela excitação do corante com uma lâmpada de mercúrio ou xênon ou luz ultravioleta. Estes corantes bis-benzimidás foram originalmente desenvolvidos pela empresa Hoechst AG, que nomeou todos os seus compostos por numeração: Hoechst 33258, Hoechst 33342 e Hoechst 34580 (LATT *et al.*, 1975).

6.6.5. Tetrametilbenzidina

O 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina ou TMB (Figura 7) é um substrato cromogênio utilizado em procedimentos de coloração em imunohistoquímica e também utilizados em ensaios imunoabsorventes ligados a enzima (ELISA). Benzidina (4,4-diaminobifenil) é o composto orgânico, amina aromática, com a fórmula $(C_6H_4NH_2)_2$ que é degradado pela luz solar e por luzes fluorescentes, caracterizando-se como fotossensíveis (MARTIN *et al*, 1984).

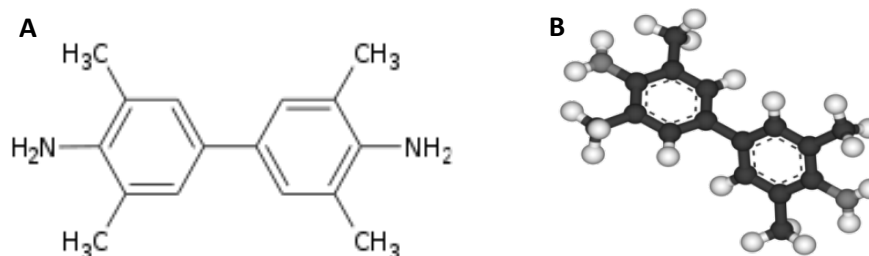


Figura 7: Fórmula do Tetrametilbenzidina (TMB). A. estrutural e B. espacial

Fonte: <http://it.wikipedia.org/wiki/3,3',5,5'-tetrametilbenzidina>.

Observando-se a Figura 8, percebe-se que o tetrametilbenzidina pode doar dois elétrons e mais dois hidrogênios, passando para a forma oxidada. Quando ocorre o contrário, o intercalador recebe os dois elétrons e mais dois hidrogênios, forma reduzida.

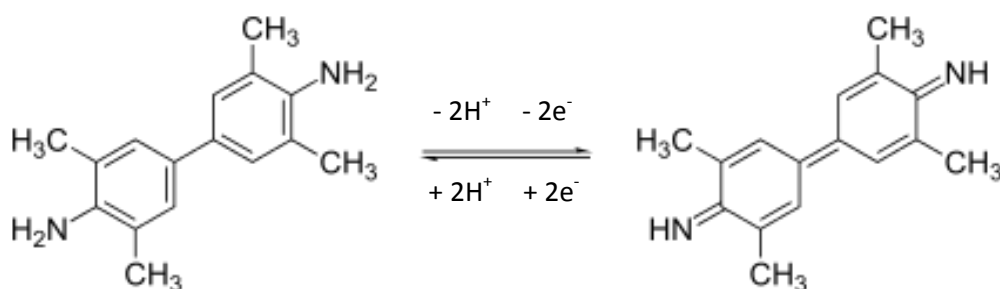


Figura 8: Reação de oxirredução do Tetrametilbenzidina (TMB).

Adaptado: <http://it.wikipedia.org/wiki/3,3',5,5'-tetrametilbenzidina>.

Na literatura, os corantes citados são utilizados em análises de sensores de DNA com base em análises eletroquímicas avaliando-se a redução ou

aumento da corrente quando há formação consistente do duplex de DNA hibridizado. (ALVES-BALVEDI *et al.*, 2014; HAIMING *et al.*, 2012; TRAN *et al.*, 2011).

A escolha do TMB deve-se a estudos de Ames que demonstraram que este composto não é carcinogênico (YANG *et al.*, 2008). Vale salientar que devido a essas características, o tetrametilbenzidina não é tratado como resíduo perigoso, entretanto para fins profiláticos concentrações maiores que 10 mg/ml poderão ser tratadas com hipoclorito de sódio antes do descarte e até mesmo com carvão ativado e levado à incineração, como são propostos para outros intercaladores (AZEVEDO, 2003; MARGARET-ANN *et al.*, 2003).

3.7. Técnicas eletroquímicas

Os métodos eletroquímicos fazem uso de propriedades elétricas mensuráveis (corrente elétrica, diferenças de potencial, acúmulo interfaciais de carga, entre outros) a partir de fenômenos nos quais uma espécie redox interage física e/ou quimicamente com demais componentes do meio, ou mesmo com interfaces. Tais interações são observadas quando se aplicam perturbações controladas ao sistema, como, por exemplo, uma diferença de potencial entre eletrodos de uma célula eletroquímica (PACHECO *et al.*, 2013).

A voltametria é uma técnica eletroquímica que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. Essa técnica é classificada como dinâmica, pois a cela eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica ($i > 0$) que, por sua vez, é medida em função da aplicação controlada de um potencial (SKOOG, HOLLER & NIEMAN, 2002).

Dessa forma, nessa técnica, as informações sobre o analito são obtidas por meio da medida da magnitude da corrente elétrica que surge entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar ao se aplicar uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência (PACHECO *et al.*, 2013).

A voltametria cíclica é a técnica mais comumente usada para adquirir informações qualitativas e quantitativas sobre os processos eletroquímicos. A

eficiência desta técnica resulta de sua característica de fornecer rapidamente informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas (PACHECO *et al.*, 2013).

A voltametria de pulso foi desenvolvida com o objetivo de superar as limitações da tradicional voltametria de varredura linear. Uma das grandes vantagens de seu desenvolvimento é a diminuição dos limites de detecção das técnicas voltamétricas (SKOOG, HOLLER & CROUCH, 2007). Assim, os potenciais são aplicados na forma de pulsos e a corrente é medida algum tempo após a aplicação, quando a corrente não-faradaica tiver decaído (SCHOLZ & BOND, 2010) e os pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente aplicado ao eletrodo de trabalho (PACHECO *et al.*, 2013).

3.8. Ressonância de Superfície de Plasmon (SPR)

O primeiro relato científico sobre Plásmos de Superfície, segundo Homola (2006), foi em 1902, quando o físico Wood observou faixas estreitas e escuras de feixes luminosos (uma rede de difração metálica) sobre superfícies metálicas quando iluminadas com luz policromática. Estas faixas foram descritas como irregularidades e estavam associadas à excitação de ondas eletromagnéticas na superfície da rede de difração.

Os pesquisadores Otto (1968) e Kretschmann & Reather (1968), observaram que, quando o feixe de luz monocromática incide sobre um fino filme metálico em uma situação de reflexão total atenuada, é possível observar a redução da intensidade de luz refletida. Este fenômeno foi associado à excitação de plásmos na superfície metálica do filme fino.

Assim, a Ressonância de Superfície de Plasmon (SPR, Surface Plasmon Resonance) é uma técnica de aplicação óptica e pode ser definida como a ressonância gerada pela interação da luz com filmes finos metálicos (tipicamente de platina ou de ouro) quando a luz incidente sofre reflexão interna total na interface metal - dielétrico e excita os plásmos de superfície (ondas eletromagnéticas que se propagam na direção paralela ao filme metálico na

interface). Em específicos comprimentos de onda, ocorre a ressonância. Os instrumentos baseados em SPR usam o método óptico para medir índice de refração próximo à superfície com elevada sensibilidade e constante dielétrica.

Na Figura 9 é representada a configuração de Otto, o meio dielétrico é colocado entre o prisma e o metal e configuração de Kretschmann, o filme metálico é colocado diretamente sobre o prisma e os plásmons são excitados na interface externa (SOUTO, 2012). Os sistemas de SPR que operam na configuração de Kretschmann são os de maiores usos nos equipamentos, pois apresentam maior sensibilidade e resolução em relação aos dispositivos desenvolvidos por grades de difração (HOMOLA, 2006; KRETSCHMANN *et al.*, 1968.).

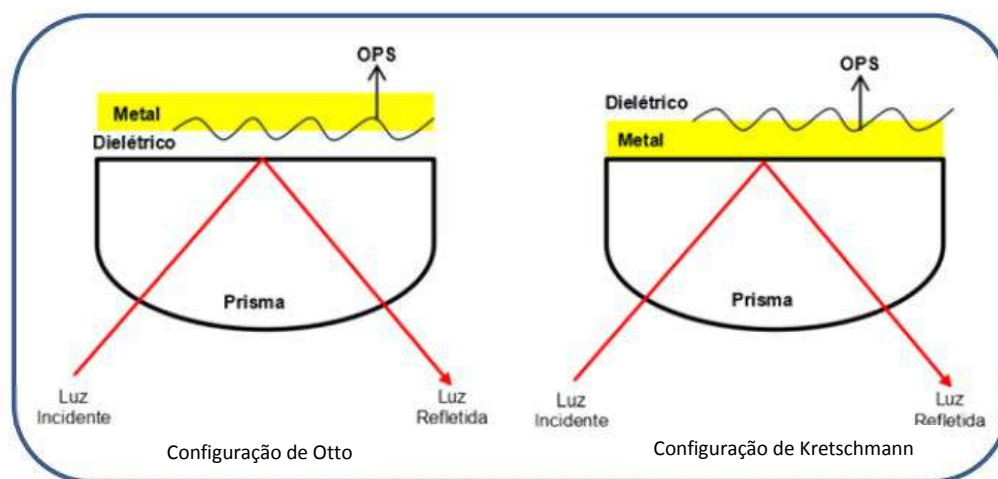


Figura 9: Na configuração de Otto, o meio dielétrico é colocado entre o prisma e o metal. Na configuração de Kretschmann, o filme metálico é colocado diretamente sobre o prisma e os plásmons são excitados na interface externa (SOUTO, 2012).

Além de sua alta sensibilidade, o SPR possui a capacidade de aferições, em tempo real, da interação de moléculas biológicas com a superfície, esta imagem latente SPR (sensorgrama) que tem o potencial para se tornar uma poderosa ferramenta em investigações biomoleculares (JAHANSHAH, 2014). Recentemente, a imagem latente SPR tem sido utilizada com sucesso na caracterização de filmes poliméricos e no acompanhamento das interações e hibridação de DNA (LAO *et al.*, 2009; VAIDYANATHAN *et al.*, 2013). Assim, foi incluído nesta análise deste estudo: (a) Polimerização de filme poli(4-ATF) em

eletrodo de ouro; (b) detalhes no sensorgrama: a imobilização de sonda (EBV1) e reconhecimento do alvo (EBV2) (Anexo1).

3.9. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A Microscopia de Força Atômica (AFM, Atomic Force Microscopy) é uma técnica de caracterização de superfície por varredura e possibilita a obtenção de imagens com a resolução de vários nanômetros (MALIUCHENKO *et al.*, 2003).

As informações são obtidas pela varredura de um cantilever que possui uma sonda em sua extremidade constituída tipicamente de silício ou nitreto de silício com uma ponta de raio de curvatura da ordem de 10 nanômetros. Quando esta é colocada próximo à superfície da amostra, forças entre a ponta e a amostra levam a um desvio do cantilever. Para se construir uma imagem pelo AFM utiliza-se o mapeamento das deflexões do cantilever, no qual o sinal do feixe laser reflete na parte superior do mesmo e este é captado por uma matriz de fotodiodos (Figura 10).

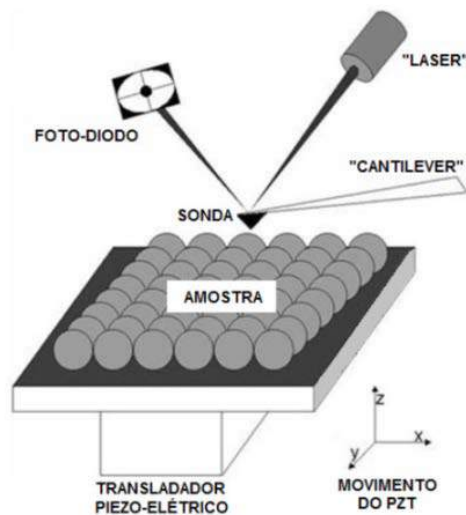


Figura 10: Esquema do Microscópio de Força Atômica (AFM).

Fonte: Site nanoScience Instruments.

Atualmente o AFM é utilizado para o estudo da estrutura, da especificidade de macromoléculas biológicas como o DNA e na caracterização da superfície do biossensor de DNA (genossensor).

4. Referências

- AHUJA, T.; MIR, I. A.; KUMAR, D.; RAJES, H. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials**, v.28, p. 791-805, 2007.
- ALVES-BALVEDI, R. P.; CASTRO, A. C. H.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. Detection of a Specific Biomarker for Epstein-Barr Virus Using a Polymer-Based Genosensor. **Int. J. Mol. Sci.**, v.15, p. 9051-9066, 2014.
- AMON; F. Reactivation of Epstein–Barr virus from latency. **Reviews in Medical Virology**, v. 15, n. 3, p. 149–562004
- ANTENOR, S. Diagnóstico antecipado. Análises Clínicas. **Pesquisa FAPESP**, v. 101, p. 74-77, 2004.
- ATES, M. A review study of (bio)sensor systems based on conducting polymers. **Mat. Sci. Eng.**, Materials for biological applications, v. 33, n. 4, p. 1853–1859, 2013.
- AZEVEDO, M.O. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília: UNB, 2003. 211p.
- BAO, L.; ZHANG, Y. & ZHENG, X. Detection of Epstein-Barr virus DNA in renal tissue from patients with interstitial nephritis. **Zhonghua Nei Ke Za Zhi**, v. 35, p. 542–544, 1996.
- BASTIANI, M. F.; CORRÊA, L. F.; FABRES, R. B.; VALENTINI, V. Prevalência do vírus Epstein- Barr como agente etiológico da Doença de Hodgkin. **News Lab**, v. 124, p. 106-108, 2014.
- BOERMA, E. G.; VAN IMHOFF, G. W.; APPEL, I. M. *et al.* Gender and age-related differences in Burkitt lymphoma - epidemiological and clinical data from The Netherlands. **Eur J Cancer**, v. 40, p. 2781-2787, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância e Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 8ª ed. rev. – Brasília/DF: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em:<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_bolso_4ed.pdf>. Acesso em 08 de Janeiro 2015.

BREGANI, E. R.; BALZARINI, L.; CABIBBE, M. African Burkitt Lymphoma successfully treated with CEOP polychemotherapy. **Acta Tropica**, v.92, p. 91-94, 2004.

BURKITT, D. A sarcoma involving the jaws in African children. **Br J Surg**, v. 46, p. 218-223, 1958.

CATAUDELLA, J.A.; YOUNG, I.D. & ILIESCU, E.A. Epstein-Barr virus-associated acute interstitial nephritis: infection or immuno-logic phenomenon? **Nephron**, v. 92, p. 437-439, 2002.

CHAN, K.C. A.; LEUNG, S. F.; YEUNG, S. F.; CHAN, A. T.C.; LO, Y.M. Quantitative Analysis of the Transrenal Excretion of Circulating EBV DNA in Nasopharyngeal Carcinoma Patients. **Clin Cancer Res**, v. 14, p. 4809-4813, 2008.

COSNIER, S. & HOLZINGER, M. Electrosynthesized polymers for biosensing. **Chem. Soc. Rev.** v. 40, p. 2146–2156, 2011

CRUZ-TAPIAS, P.; ROJAS-VILLARRAGA, A.; MAIER-MOORE, S.; ANAYA, J. M. HLA and Sjogren's syndrome susceptibility. A meta-analysis of worldwide studies. **Autoimm Reviews**, v. 11, n. 4, p. 281–287, 2012.

DRABORG, A. H.; DUUS, K.; HOUEN, G. Epstein-Barr Virus in Systemic Autoimmune Diseases. **Clin Devel Immunol**, 2013.

EPSTEIN, M. A.; ACHONG, B. G., and BARR, Y. M.: Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. **The Lancet**, v. 1, p. 702–703, 1964.

FAN, C.; WANG, W.; ZHAO, B.; ZHANG, S.; MIAO, J. Chloroquine inhibits cell growth and induces cell death in A549 lung cancer cells, **Bioorg. Med. Chem.**, v. 14, n. 9, p. 3218-3222, 2006.

FREITAS, R. A.; BARROS, S. S. L. V.; QUINDERE, L. B. Linfoma de Burkitt oral: relato de caso. **Rev Bras Otorrinol** [online]. v.74, n.3, p. 458-461, 2008.

GARTZONIKA, C.; VRIONI, G; PRAIVALI, E.; PAPPAS, G.; LEVIDIOTOU, S. Utility of Real-Time PCR in the Diagnosis of Primary Epstein-Barr Virus Infection. **J Med Microb Diagn**, v. 2, p. 1- 4, 2012.

GENTRY, A.C.; JUUL, S.; VEIGAARD, C.; KNUDSEN, B.R.; OSHEROFF, N. The geometry of DNA supercoils modulates the DNA cleavage activity of human topoisomerase I. **Nucleic Acids Res**, v. 39, n. 3, p. 1014–1022, 2011.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B.D. Application of conducting polymers to biosensor. **Biosens. Bioelectron.** V. 17, n. 5, p. 345 – 359, 2002.

GOPINATH, S.C.B.; TANG, T.H.; MARIMUTHU, M.; CITARTAN, M.; CHEN, Y.; LAKSHMIPRIYA, t. Current aspects in immunosensors. **Biosens. Bioelectron.**, v. 57, p. 292-302, 2014.

HAIMING, Z.; ZHIQIANG, L.; NAE, Y. L.; JONG, S. K.; EUN-CHEOL, L. Electrochemical DNA detection using Hoechst dyes in microfluidic chips. **Curr. Appl. Phys.**, v. 12, p. 1493-1496, 2012.

HASANZADEH, M.; Shadjoub, N.; Eskandanic, M.; Guardiadi, M.; Omidiniab, E. Electrochemical nano-immunosensing of effective cardiac biomarkers for acute myocardial infarction. **TrAC**, v. 49, p. 20-30, 2013.

HECHT, J. & ASTER, J. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. **J Clin Oncol**, v. 18, p. 3703-3721, 2000.

HOMOLA, J. **Eletromagnetic Theory of Surface Plasmon**. In: Surface Plasmon Resonance Based Sensors. 1st ed. Springer-Verlag, New York., p.3-44, 2006.

IDESAWA, M.; SUGANO, N.; IKEDA, K.; *et al.* Detection of Epstein-Barr virus in saliva by real-time PCR. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, p. 230–232, 2004.

JAHANSHAHI, P.; ZALNEZHAD, E.; SEKARAN, S.D & Adikan, F.R.M. Rapid Immunoglobulin M-Based Dengue Diagnostic Test Using Surface Plasmon Resonance Biosensor. **Scientific Reports**, v. 4, p. 3851-3858, 2014.

KEMP, S.; WHEATE, N.J.; WANG, S.; COLLINS, J.G.; RALPH, S.F.; DAY, A.I.; HIGGINS, V.J.; ALDRICH-WRIGHT, J.R. Encapsulation of platinumium (II)-based DNA intercalators within cucurbit [6,7,8] urils. **J. Biol Inorg Chem**, v. 12, p. 969-979, 2007.

KIMMEL, D. W.; LEBLANC, G.; MESCHIEVITZ, M.E.; CLIFFEL, D.E. Electrochemical Sensors and Biosensors. **Anal. Chem.**, v. 84, p. 685–707, 2012.

KRETSCHMANN, E. & REATHER, H. Radiative decay of nonradiative surface plasmon excited by light. **Z.Naturf.** v. 23A, p. 2135-2136, 1968.

LABUDA, J.; OLIVEIRA-BRETT, A.M.; EVTUGYN, G.; FOJTA, M.; MASCINI, M.; OZSOZ, M.; PALCHETTI, I.; PALEČEK, E. and WANG, J. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology. **IUPAC Technical Report**, v. 82, n. 5, p. 1161–1187, 2010.

LANDAU, Z.; GROSS, R.; SANILEVICH, A.; FRIEDMANN, A.; MITRANI-ROSENBAUM, S. Presence of infective Epstein-Barr virus in the urine of patients with infectious mononucleosis. **J Med Virol.**, v. 44, p. 229-233, 1994.

LAO, A.L.K.; SU, X. & AUNG, K.M.M. SPR study of DNA hybridization with DNA and PNA probes under stringent conditions. **Biosens. Bioelectron.**, v. 24, p. 1717–1722, 2009.

LATT, S.A.; STETTEN, G.; JUERGENS, L.A.; WILLARD, H.F.; SCHER, C.D. Recent developments in the detection of deoxyribonucleic acid synthesis by 33258 Hoechst fluorescence. **J Histochem and cytochem**, v. 23, n. 7, p. 493–505, 1975.

LAUSTRIT, G. Molecular mechanisms of photosensitization. **Biochemic**, v. 68, p. 771–778, 1986.

LIMA, M. A. P & RABENHORST, S. H. B. Associação do vírus Epstein-Barr (EBV) com tumores sólidos. **Rev Bras Cancerol**, v. 52, n. 1, p. 87-96, 2006.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock.**, Artmed Editora, São Paulo, SP, 12^oed., 2010, 1128p.

MALAMUD, D. & RODRIGUEZ-CHAVEZ, I. R. Saliva as a Diagnostic Fluid. **Dent Clin North Am.**, v. 55, p. 159–178, 2011.

MALIUCHENKO N.V.; TONEVITSKIĬ, A.G.; SAVVATEEV, M.N.; BYKOV, V.A.; MOĬSENOVICH, M.M.; AGAPOV, I.I.; KOZLOVSKAIA, N.V.; ARKHIPOVA, V.S.; EGOROVA, S.G.; KIRPICHNIKOV, M.P. Structural features of proteins by intermittent-contact atomic force microscopy **Biofizika**, v. 48, p. 830-836, 2003.

MARGARET-ANN, A. Hazardous laboratory chemicals disposal guide. **CRC**, v. 1, p. 222–223, 2003.

MARTIN, T.L.; MUFSON, E.J.; MESULAM, M.M. The light side of horseradish peroxidase histochemistry. **J Histochem Cytochem**, v. 32, n. 7. p. 793-798, 1984.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; Guisan, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microb Technol**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MBULAITEYE, S.M.; WALTERS, M.; ENGELS, E.A.; *et al.* High levels of Epstein-Barr virus DNA in saliva and peripheral blood from Ugandan mother-child pairs. **J Infect Dis**, v. 193, p. 422–426, 2006.

MEHRVAR, M. & ABDI, M. Recent Developments, Characteristics and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. **Anal Sciences**, v. 20, p. 1113–1126, 2004.

MIKHALKOVA, D.; KHANNA, S.; VAIDYA, R.; SETHI, S.; HOGAN, M.C. Epstein–Barr virus-associated nephrotic syndrome. **Clin Kidney J**, v. 5, p. 50–52, 2012.

MILLER, O. **Laboratório para o Clínico**. 8ª ed. São Paulo : Atheneu, 2007, 65p.

MONTEIRO, T. A. F. **Detecção do genoma do vírus de Epstein Barr (EBV) em tecidos de pacientes com Doença de Hodgkin da região norte do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários). Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Pará, Belém, Pará. 2010.

NAKAOKA, V. Y.; GUTIERREZ, M. M.; PEREIRA, A. M. O.; KASHIWABARA, T. G. B. Mononucleose Infecciosa - Uma Revisão de Literatura. **Revista UNINGÁ Review**, v. 16, n. 1, p. 44-48, 2013.

NANOSCIENCE. NanoScience Instruments. Disponível em: <<http://www.nanoscience.com/products/afm/technology-overview/>> Acesso em 08 de Janeiro de 2015.

NUNES, L. A. S. & MACEDO, D. V. Saliva como fluido diagnóstico para utilização na medicina esportiva: potencialidades e limitações. **J. Bras. Patol.**, v. 49, n. 4, p. 247-255, 2013.

OLIVEIRA, J. L.; FREITAS, R.T.; ARCURI, L.J.; GOMES, A.P.; VITORINA, R.R.; RODRIGUES, D.C.; PAULA, S.O.; SANTANA, L.A.; SIQUEIRA-BATISTA, R. O vírus Epstein-Barr e a mononucleose infecciosa. **Rev Bras Clin Med**. v.10, n.6, p. 535-543, 2012.

OLIVEIRA-BRETT, M.; PIEDADE, J.A.P.; SILVA, L.A.; DICULESCU, V.C. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. **Anal Biochem**, v. 332, n. 2, p. 321–329, 2004.

ORAZIO, P. Biosensors in clinica chemistry. **CI Chimica Acta**, v. 412, p. 1749-1761, 2011.

OTTO, A. Excitation of nonradiative surface Plasmon waves in silver by the method of frustrated total reflection. **Z Phys** v. 216, p. 398-410, 1968.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Rev. Virtual Quim**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PASCHALE, M. & CLERICI, P. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. **World J Virol**, v. 12, n. 1, p. 31-43, 2012.

PATHAK, P.; KATIYAR, V. K.; GIRI, S. Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. **Nanotec**, v. 1, p. 1-10, 2007.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUTOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas **Química Nova** v.25, n.6, p.1012-1021, 2002.

PERERA, R.A.; SAMARANAYAKE, L.P.; TSANG, C.S. Shedding dynamics of Epstein-Barr virus: A type 1 carcinogen. **Arch Oral Biol**, v. 55, p. 639-647, 2010.

POHANKA, M. & SKLÁDAL, P. Electrochemical biosensors – principles and applications. **J Appl Biomed**, v. 6, p. 57–64, 2008.

RADI, A. E. Recent updates of chemically modified electrodes in pharmaceutical analysis. **Comb Chem High T Scr**, v. 13, n. 8, p. 728–52, 2010.

RAPP, B. E.; GRUHL, F. J. & LÄNGE, K. Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications. **ACB**, v. 398, p. 2403–2412, 2010.

REHA, D.; KABELÁČ, M.; RYJÁČEK, F.; SPONER, J.; SPONER, J.E.; ELSTNER, M.; SUHAI, S.; HOBZA, P. Intercalators. Nature the stracking interations between intercalations and DNA base pairs. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 124, p. 3366–3376, 2002.

RIBEIRO-SILVA, A. R. & ZUCOLOTO, S. O Papel do Vírus Epstein-Barr no tumor gênese humana. The role of Epstein-Barr virus in human tumorigenesis. **Rev Med**, v. 36, p. 16-23, 2003.

RICHARDS, A. D. & RODGERS, A. “Metallomolecules sintéticos como agentes para controle da estrutura do DNA”. **Soc Chem Reviews**, v. 36, p. 471-483, 2007.

SALAVAGIONE, H.J.; MIRAS, M.C.; BARBERO, C. Chemical lithography of a conductive polymer using a traceless removable group. **ACS Journal**, v. 125, n. 18, p. 5290-5291, 2003.

SCHOLZ, F. & BOND, A. M. **Electroanalytical methods: guide to experiments and applications**. 2nd. ed. New York: Springer, 2010. 359p.

SILVA, F.B.; VIEIRA, S.N.; FILHO, L.R.G.; BOODTS, J.F.C.; BRITO-MADURRO, A.G.; MADURRO, J.M. Electrochemical investigation of oligonucleotide-DNA hybridization on poly(4-methoxyphenethylamine). **Int. J. Mol. Sci.**, v. 9, n. 7, 1173–1187, 2008.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. & CROUCH, S. R. **Principles of instrumental analysis**. 6th. ed. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, 2007, 1039p.

SONG, S.; XU, H. & FAN, C. Potential Diagnostic Applications of Biosensors: Current and Future Directions. **I J Nanomed**, v. 1, n. 4, p. 433-440, 2006.

SOUTO, D.E.P. **Desenvolvimento de um imunossensor pela técnica de ressonância de plásmons de superfície para detecção em tempo real de anticorpos anti – Leishmania infantum**. 2012. 78p. Dissertação. UFVJM. Diamantina, MG.

SUPRUN, E.V.; SHUMYANTSEVA, V.V.; ARCHAKOV, A.I. Protein electromemistry: application in medicine. **Electrochim. Acta**, p. 1-11, 2014.

TARRANT, J.J.; KEATING, M.J.; O'BRIEN,S.; LA SALA, R.P.; Xiang-Yang Han,; BUESO-RAMOS, C.E. Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 mRNA Is Expressed in a Significant Proportion of Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. **Cancer**, v. 1, p. 880- 887. 2010.

THOME, M & TSCHOPP,J. Regulation of lymphocyte proliferation and death by flip. **Nature: Reviews Immunol**, v. 1, p. 50-58, 2001

TRAN, L.D.; NGUYENA, B.H.; HIEUB, N.V.; TRANC,H.V.; NGUYENC, H.L.; NGUYEN, P.X. Electrochemical detection of short HIV sequences on chitosan/Fe₃O₄ nanoparticle based screen printed electrodes. **Mater Sci Eng**, v. 31, p. 477-485, 2011.

TROJANOWICZ, M,; KRAWCZYK, T. K. Electrochemical biossensor based on enzymes immobilized in electropolymerized films. **Mikrochim. Acta**. V. 121, p. 167-181, 1995.

VAIDYANATHAN, V.G.; XU, L. & CHO, B.P. Binding kinetics of DNA-protein interaction using surface plasmon resonance. **Nature: Protocol Exchange**, doi:10:1038/protex.2013.054, 2013.

VESTERGAAD, M.; KERMAN, K. & TAMIYA, E. An overview of Label-free electrochemical protein sensor. **Sensors**, v. 7, p. 3442-3458, 2007.

- VIEIRA, S.N.; FERREIRA, L.F.; FRANCO, D.L.; AFONSO, A.S.; GONÇALVES, R.A.; BRITO-MADURRO, A.G.; MADURRO, J.M. Electrochemical modification of graphite electrodes with poly(4-aminophenol). **Macromol. Symp.**, p. 236–242, 2006.
- WAN, Y.; SU, Y.; ZHU, X.; LIU, G.; FAN, C. Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. **Biosens. Bioelectron.**, v. 47, p. 1–11, 2013.
- WEISS, L.M. & CHEN Y.Y. EBER In Situ Hybridization for Epstein–Barr Virus. **Methods Mol Biol.**, p. 223-230, 2013.
- WOOD, R. W. On a Remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. **Philos Mag**, v. 4, p. 396-402, 1902.
- XIA, Y. The constant region affects antigen binding of antibodies to DNA by altering secondary structure. **Mol immunol**, v. 56, p. 28-37, 2013.
- YANG, J.; WANG, H. & ZHANG, H. "One-pot synthesis of silver nanoplates and charge-transfer complex nanofibers". **J Phys Chem**, v. 112, n. 34, p. 13065–13069, 2008.
- YOUNG, L.S. & RICKINSON, A.B. Epstein-Barr virus: 40 Years On. **Nature: Rev. Cancer**, v. 4, p. 757–768, 2004.

Capítulo 2

Article

Detection of a Specific Biomarker for Epstein-Barr Virus Using a Polymer-Based Genosensor

Int. J. Mol. Sci. 2014, 15, 9051-9066; doi:10.3390/ijms15059051

International Journal of Molecular Sciences ISSN 1422-0067

www.mdpi.com/journal/ijms

Article

Detection of a Specific Biomarker for Epstein-Barr Virus Using a Polymer-Based Genosensor

Renata P. A. Balvedi 1, Ana C. H. Castro 1, João M. Madurro 2 and Ana G. Brito-Madurro 1,*

1 Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia 38400-902, Brazil; E-Mails: renataalvesbalvedi@hotmail.com (R.P.A.B.); tininha112@yahoo.com.br (A.C.H.C.)

2 Institute of Chemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia 38400-902, Brazil; E-Mail: jmadurro@ufu.br

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: agbrito@iqfu.ufu.br; Tel./Fax: +55-34-3218-2203.

Received: 31 July 2013; in revised form: 4 May 2014 / Accepted: 7 May 2014 /

Published: 21 May 2014

Abstract:

This paper describes methodology for direct and indirect detections of a specific oligonucleotide for Epstein-Barr virus (EBV) using electrochemical techniques. The sequence of oligonucleotide probe (EBV1) revealed a high sequence identity (100%) with the EBV genome. For the development of the genosensor, EBV1 was grafted to the platform sensitized with poly(4-aminothiophenol). After that, the hybridization reaction was carried out with the complementary target (EBV2) on the modified electrode surface using ethidium bromide as DNA intercalator. The oxidation peak currents of ethidium bromide increased linearly with the values of the concentration of the complementary sequences in the range from 3.78 to 756 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. In nonstringent experimental conditions, this genosensor can detect 17.32 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (three independent experiments) of oligonucleotide target, discriminating between complementary and non-complementary oligonucleotides, as well as differentiating one-base mismatch, as required for detection of genetic diseases caused by point mutations. The biosensor also displayed high specificity to the EBV target with elimination of interference from mix (alanine, glucose, uric acid, ascorbic acid, bovine serum albumin (BSA), glutamate and glycine) and good stability (120 days). In addition, it was possible to observe differences between hybridized and non-hybridized surfaces through atomic force microscopy.

Keywords: Epstein-Barr virus; electrochemical detection; genosensor; hybridization; polymer

1. Introduction

Epstein-Barr virus (EBV) is a DNA virus of the γ -herpes subfamily. It infects around 90% of the world's population and may be asymptomatic during the life of the host. Its latent state could be regarded as the causative agent of infectious mononucleosis and has been associated with several malignancies including Burkitt's lymphoma, oral and gastric carcinomas (particularly nasopharyngeal carcinoma), Hodgkin's disease, lymphoproliferative disorders in immunodeficient individuals, such as post-transplant lymphoproliferative diseases and a subset of T and NK cell lymphomas [1–5].

EBV was discovered 40 years ago from examining electron micrographs of cells cultured from Burkitt's lymphoma that indicated a viral etiology and became the first of an unexpectedly wide range of associations discovered between this virus and tumors [6]. It is currently being correlated to autoimmune diseases such as multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and primary Sjögren's syndrome; these are complex disorders with a genetic background and the involvement of environmental factors, including viruses [7,8].

Currently, the detection of the virus can be made by means of several techniques, such as PCR (polymerase chain reaction), in situ hybridization, immunohistochemistry and electron microscopic immunocytochemistry. These techniques have a high cost, demanding skilled labor and time-consuming analysis [9–12]. Other recent technologies, such as the development of biosensors, are emerging and may revolutionize the disease diagnosis [13]. Generally, electrochemical biosensors have high sensitivity and low-cost, having superior properties when compared to alternative analytical techniques [14–16].

Electrochemical DNA sensing is a promising technique of nucleic acid analysis because of its fast response time, high sensitivity and low cost. This technique employs immobilized DNA sequences on the sensor surface as recognition element and sequence-specific hybridization can be monitored and analyzed [17,18]. The signal of the hybridization can be detected directly, produced by nucleotide oxidation of the DNA probe (label-free detection) [19,20] or indirectly, using an indicator of the hybridization process [21,22].

The use of conducting polymeric films can improve the interaction of the electrode with the biomolecular probe by modification of electrode surfaces, in addition to protecting the electrode against adsorption of nonspecific analytes [23–27].

Our research group has reported modifications of electrode surfaces with functionalized polymers, derived from aminophenols [28–31], tyramine [32], hydroxybenzoic acid [33], hydroxyphenylacetic acid [34] and methoxyphenethylamine [27], as well as application of the modified electrodes in the immobilization and detection of biomolecules [35–37].

The success of biomolecules immobilization onto these polymeric matrices is due to the presence of functional groups (amino, hydroxyl and/or carboxylic acid), facilitating electropolymerization and increasing the retention of biomolecules [31].

This work describes a genosensor based on a platform sensitized with poly(4-aminothiophenol)/specific single-strand DNA for EBV. The linear response range, sensitivity, selectivity, repeatability and stability were investigated.

2. Results and Discussion

2.1. Electrochemical Behavior of 4-Aminothiophenol (4-ATP)

The 4-aminothiophenol (4-ATP) electropolymerization was carried out through potential scanning (Figure 1A). The electrochemical characterization was carried out in H₂SO₄ solution (Figure 1B).

Figure 1. (A) Cyclic voltammogram in 4-aminothiophenol (4-ATP) solution (15 mmol·L⁻¹) onto graphite electrode. Supporting electrolyte: H₂SO₄ 0.5 mol·L⁻¹; Scan rate 50 mV·s⁻¹; 100 scans. The arrows indicate the influence of the current response with the increasing of the number of scans; and (B) Cyclic voltammograms of bare graphite electrode functionalized with poly(4-ATP) (a) and bare graphite electrode (b). Supporting electrolyte: H₂SO₄ 0.5 mol·L⁻¹; Scan rate: 50 mV·s⁻¹.

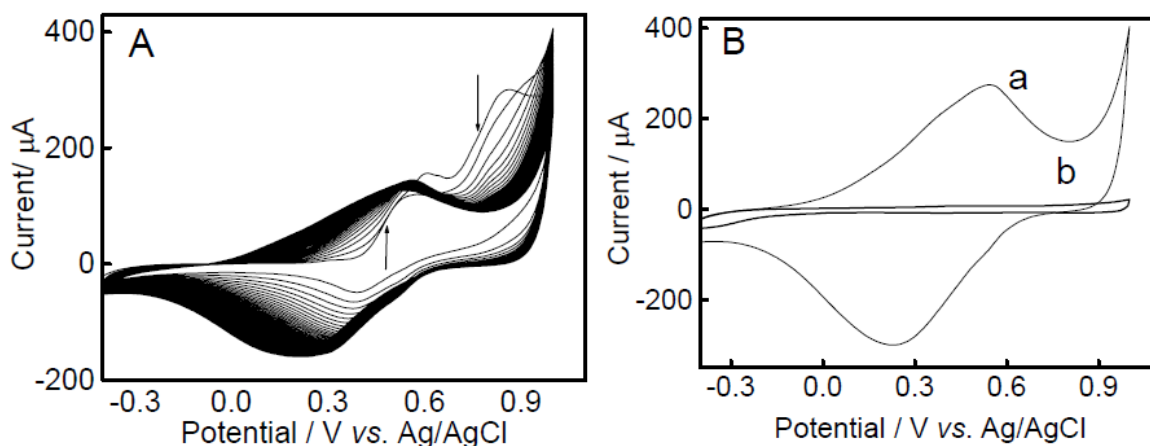


Figure 1A shows a gradual increase in current response between 0.0 and +0.7 V, where the two peaks of oxidation and reduction are observed, indicating the formation of electroactive material. A decrease in the oxidation peak from +0.7 to +1.0 V is attributed to oxidation of the monomer 4-ATP (Figure 1A). The modification of the graphite electrode surface was confirmed in aqueous H_2SO_4 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figure 1B).

2.2. Electrochemical Characterization of the Modified Electrodes

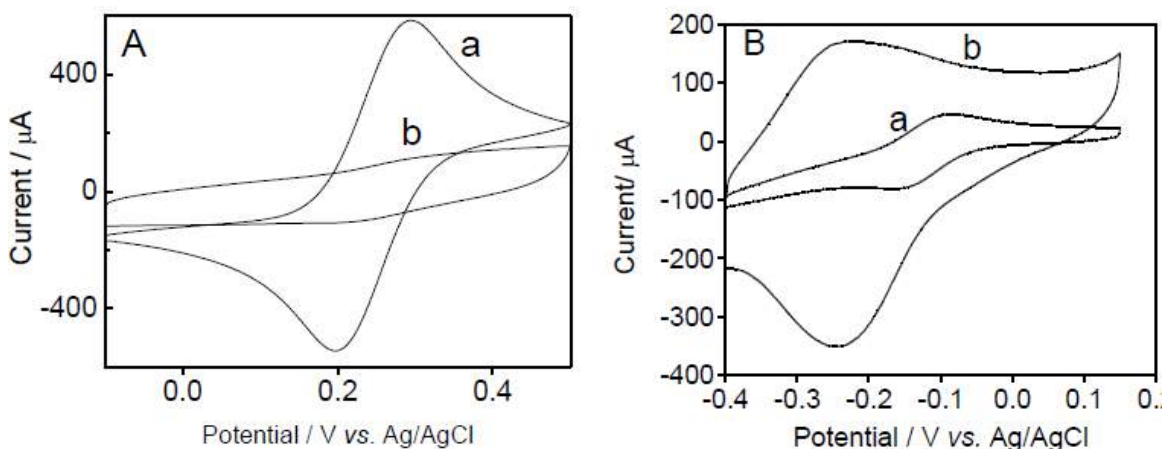
The modified graphite electrodes were studied in aqueous solution containing $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ or $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$ (Figure 2).

In aqueous solution containing $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, the current of the modified electrode decreases, as well as a larger separation of the peak potentials is observed, denoting difficulty and, eventually, hindrance of the electron transfer to the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ system. Such behavior is also seen in other polymer layers [38,39]. The current response of the electrode modified with poly(4-ATP) is higher in presence of $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$, when compared with bare graphite electrode.

This model of electrostatic interaction promotes the transport of the ruthenium complex to the electrode surface, resulting in the increase of the peak current. This may be emphasized when the behavior of poly(4-ATP) towards the redox couple potassium ferrocyanide/potassium ferricyanide³⁻ is evaluated, being

obtained opposite results. These results indicate that the polymer has an anionic nature.

Figure 2. Cyclic voltammograms of bare graphite and graphite electrode modified with poly(4-ATP): (A) in aqueous solution containing $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ ($5.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) and KCl ($0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (B) in aqueous solution containing $Ru(NH_3)_6Cl_2$ ($5.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) and KCl ($0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Bare graphite electrode (a) and modified graphite electrode with 4-ATP (b) Scan rate: $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Sonmez *et al.* [40] described similar studies using hexaammineruthenium (III) chloride and sulfonated polyelectrolyte as dopant. Cation exchange properties were observed with hexaammineruthenium (III) chloride as an active electrolyte. An increase in the amplitude of the current signal was observed when compared to non-modified electrodes.

2.3. Immobilization and Hybridization

The electrochemical oxidation of natural and synthetic nucleic acids has also been widely studied on pyrolytic graphite electrodes, spectroscopic graphite impregnated with paraffin and glassy carbon [41].

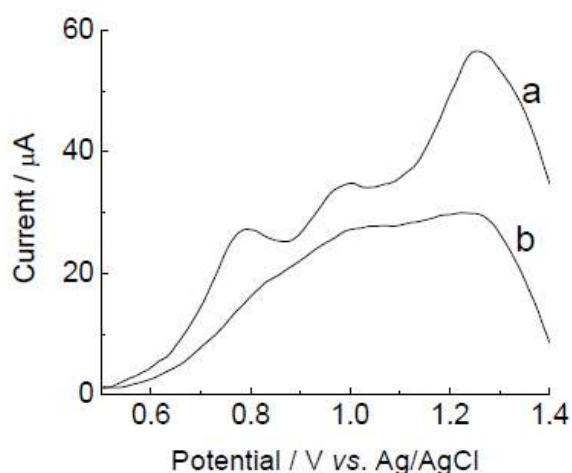
Figure 3 shows the response of the immobilization of the EBV1 probe and the hybridization by direct detection with the complementary target EBV1:EBV2 onto modified graphite electrode. The anchor of the DNA onto the surface of the

modified electrode is not well known but, in agreement with literature [42], the presence of amine groups favors the formation of covalent binding with oligonucleotides by linkages carboxamide or phosphoramidate.

The potential peaks at +0.95 and +1.22 V are attributed to guanosine and adenosine, respectively. These peaks decreased after 20 min at 57 °C, in agreement with Oliveira-Brett *et al.* [43], who reported that hydrogen bonds are formed between complementary sequences during the hybridization of oligonucleotides, leading to a duplex, inside of which it is more difficult to oxidize the bases, decreasing the peak current of the guanosine and adenosine, after the hybridization.

Another reason for the higher current values obtained for single-stranded DNA is that the latter presents higher proximity and a higher degree of adsorption onto the electrode surface, due to its higher conformational flexibility, facilitating the charge transfer between the nitrogenous bases and the electrode [42–44].

Figure 3. Differential pulse voltammograms of graphite electrode modified with poly(4-ATP) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans, containing [EBV1, (oligonucleotide probe) 126 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]: before hybridization (a) and after 20 min of incubation with complementary target (EBV2, 378 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (b). Electrolyte: phosphate buffer (0.10 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), pH 7.4. Modulation amplitude: 0.05 mV. Pulse interval: 0.2 s. Scan rate 5 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Ethidium bromide [(3,8-diamino-5-ethyl-6-phenyl phenatridinium bromide)] is one of the best known intercalating agents, first synthesized in 1952 by Watkins and Woolfe [45]. This intercalator is largely used to visualize the nucleic acids through agarose gel electrophoresis, due to formation of a fluorescent complex. Ethidium bromide does not require changes on the DNA structure, it is a cheap product, the system can be easily constructed and the intercalation is immediate [46].

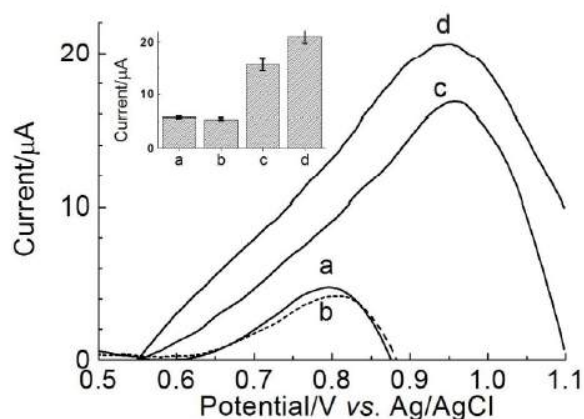
Planar aromatic organic compounds, which also include ethidium bromide, are redox-active markers used in DNA hybridization biosensors [47]. Ethidium bromide is electroactive and its electrochemical behavior was studied in several electrodes (glassy carbon [48], graphite [49], boron-doped diamond [50] and carbon nanotube [51]). Differential pulse voltammetry studies of ethidium bromide on graphite electrode modified with poly(4-aminotiphenol) were carried out by our group; this intercalator was observed to be electroactive in this modified electrode, presenting a oxidation peak in +0.75 V vs. Ag/AgCl.

Figure 4 shows differential pulse voltammograms of indirect detection of target for EBV1, using ethidium bromide as electroactive indicator, in presence of complementary and non-complementary targets, as well as oligonucleotide containing one-base mismatch.

The results showed an increase in the current signal amplitude, in presence of complementary target, indicating the accumulation of ethidium bromide on the surface of the modified electrode containing duplex (Figure 4d). This accumulation indicates occurrence of hybridization process that causes intercalation of the mediator in the double-strand DNA, where a hydrophobic aromatic molecule is attracted to hydrophobic environment of nitrogenous base pairs of DNA from the hydrophilic aqueous environment [52].

Figure 4 also showed that the amplitude of the peak oxidation current for ethidium bromide is about four times higher for the complementary target, compared to the non-complementary target (see voltammograms b and d, as well as bar chart in Figure 4), indicating that the genosensor poly(4-ATP)/EBV1 discriminates complementary target from non-complementary target.

Figure 4. Differential pulse voltammograms of ethidium bromide (1×10^{-6} mol·L⁻¹) onto graphite electrode modified with poly(4-ATP) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans, containing EBV1/probe ($126 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) before hybridization (a) and after hybridization with: non-complementary target ($189 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (b); oligonucleotide containing one-base mismatch EBV2Mis1 ($378 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (c); and complementary target (EBV2, $378 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (d). Electrolyte: phosphate buffer ($0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2 s; Scan rate $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Inset: Bar chart of differential pulse voltammograms responses using the oxidation signal from ethidium bromide.



In addition, the current peak for the complementary oligonucleotide (EBV2, Figure 4d) is about 35% higher (see bar chart, inset Figure 4), when compared to oligonucleotide containing one-base mismatch (EBV2Mis1, Figure 4c), indicating that the device has potential to differentiate mismatches, as required for detection of diseases caused by point mutations. The higher potential values observed after hybridization with the complementary target are due to the higher charge transfer resistance caused by formation of the duplex.

2.4. Interference Studies

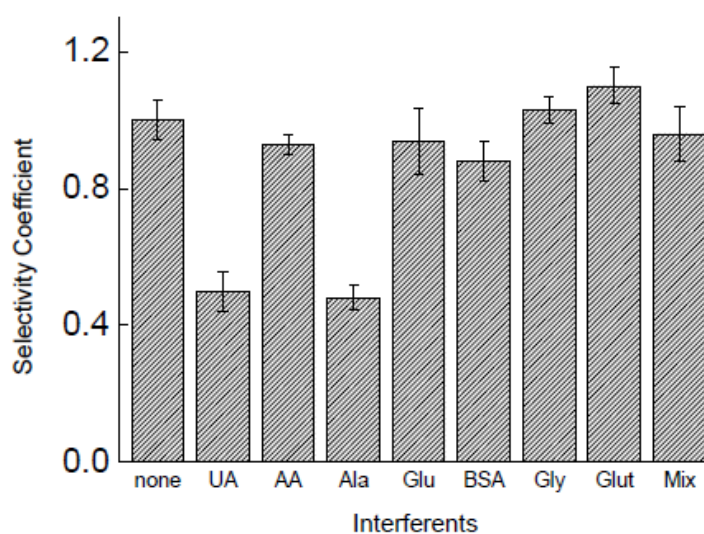
Blood is a complex biological fluid formed by substances such as ascorbic acid, uric acid, urea, albumin and others that can affect the response of the

biosensor [52]. In the literature, it is reported that interferences can influence the accuracy of biosensors [53–55].

The substances studied as potentially interfering with the electrochemical biosensor were: alanine, glucose, uric acid, ascorbic acid, BSA, glutamate, glycine and a mixture of these compounds (Figure 5).

With exception of the uric acid and alanine, the results indicate that the response of the biosensor is not significantly affected in the presence of interfering compounds, since the mixture containing all compounds studied also retained the selectivity for the detection of EBV1 (Figure 5) confirmed by mean selectivity coefficient (SC), calculated using the equation $SC = I_{c+i}/I_c$, where I_{c+i} and I_c are the bioelectrode response for the EBV2 target, in the presence and absence of each compound [53].

Figure 5. Selectivity coefficient for graphite electrode/poly(4-ATP)/EBV1 in the detection of complementary target in absence or presence of the interfering compounds: uric acid (UA) 1 mg·dL⁻¹; ascorbic acid (AA) 3.6 mg·dL⁻¹; glycine (Gly) 1 mmol·L⁻¹; alanine (Ala) 1 mmol·L⁻¹; glucose (Glu) 1 mmol·L⁻¹; bovine serum albumin (BSA) 5 g·dL⁻¹; glutamate (Glut) 1 mmol·L⁻¹ and mixture. Electrolyte: phosphate buffer (0.10 mol·L⁻¹), pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2 s; Scan rate 20 mV·s⁻¹. Ethidium bromide (1 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹) was used as indicator of the hybridization.



The selectivity studies were carried out in deionized water (pH 7). Based on the fact that the phosphate groups of the oligonucleotides are not protonated in this medium, as well as based on the pKa of the compounds studied, (alanine: 2.34 and 9.69; uric acid: 5.40 and 10.3; glycine: 2.34 and 9.60; glutamic acid: 2.16, 4.32 and 9.67; ascorbic acid: 4.17 and 11.57) [56] it is possible suggest that uric acid (positively charged) interacts with the phosphate groups, interfering with the formation of the duplex, while glutamic acid (dianion in pH 7), ascorbic acid (anion in pH 7) and BSA (isoelectric point: 4.85, negatively charged at pH 7) suffer repulsion of the phosphate and do not interfere.

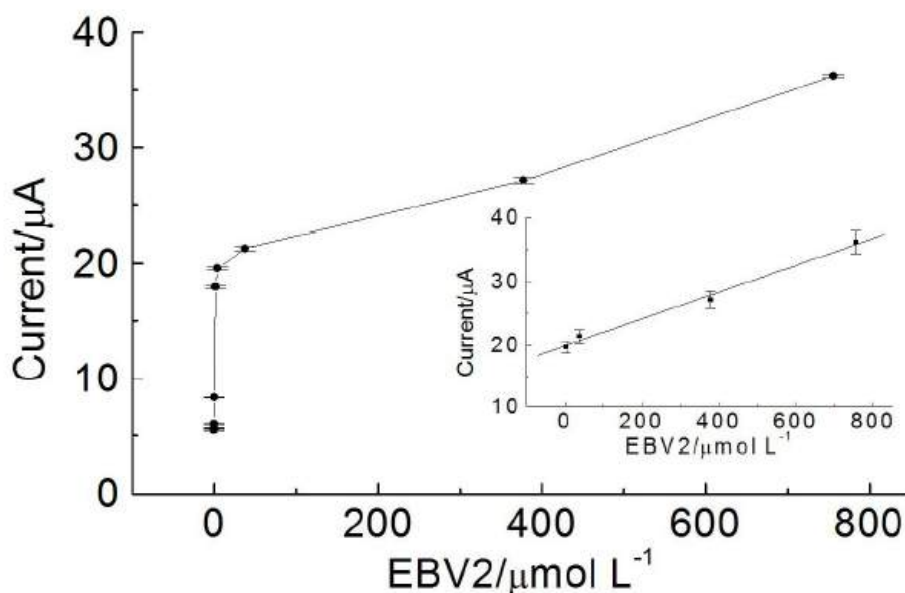
The amino acids alanine and glycine show opposite behavior, although they have similar pKa and isoelectric points. The causes for this fact are not very clear, but a plausible hypothesis is that the slightly higher organic chain of alanine favors the interaction with the nitrogenous bases of the oligonucleotides, by van der Waals' interaction, hindering the formation of the double strand. Another factor is the lower solubility of alanine in water ($167.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$), when compared with glycine ($249.9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$), which is derived from a greater carbon chain, favoring its interaction with the nonpolar part of the oligonucleotides and competing with the formation of double-strand. The high water solubility of glucose ($909 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$) also suggests that the solubility is an important factor for a low interference in the formation of the duplex.

2.5. Calibration Curve

Figure 6 shows the calibration curves generated using the EBV-genosensor system. The current is proportional to concentrations of EBV2 in the range from 3.78 to $756 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, with correlation coefficient of 0.998 , and detection limit of $17.32 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (three independent experiments).

Figure 6. Electrochemical response for the oxidation signal of ethidium bromide ($1 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) obtained after the hybridization of modified electrode containing the probe EBV1 ($126 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) with different concentrations of EBV2

(0, 0.0010, 0.010, 0.10, 1.89, 3.78, 37.8, 378 and 756 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Inset shows linear range of current peak vs. concentration of EBV2.



2.6. Genosensor Stability

In order for commercialization of a biosensor to be feasible, it should have good selectivity and stability during storage to assure reproducibility of measurements. Long-term lifetime is not only beneficial to biosensor transport and storage, but it also helps decrease per measurement costs, of critical importance in pharmaceutical and industrial applications [57].

The stability study of the biological sensor poly(4-ATP):EBV1 is shown in Figure 7. For this analysis, the electrodes were at a temperature of 8 °C for 120 days. During this time, assays using ethidium bromide were performed.

Figure 7. Storage stability profile of genosensor at 8 °C. The biosensors were stored in refrigerators when not in use.

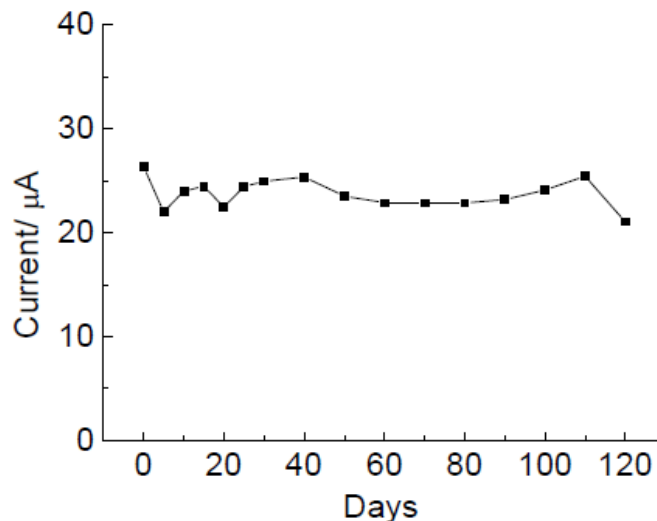
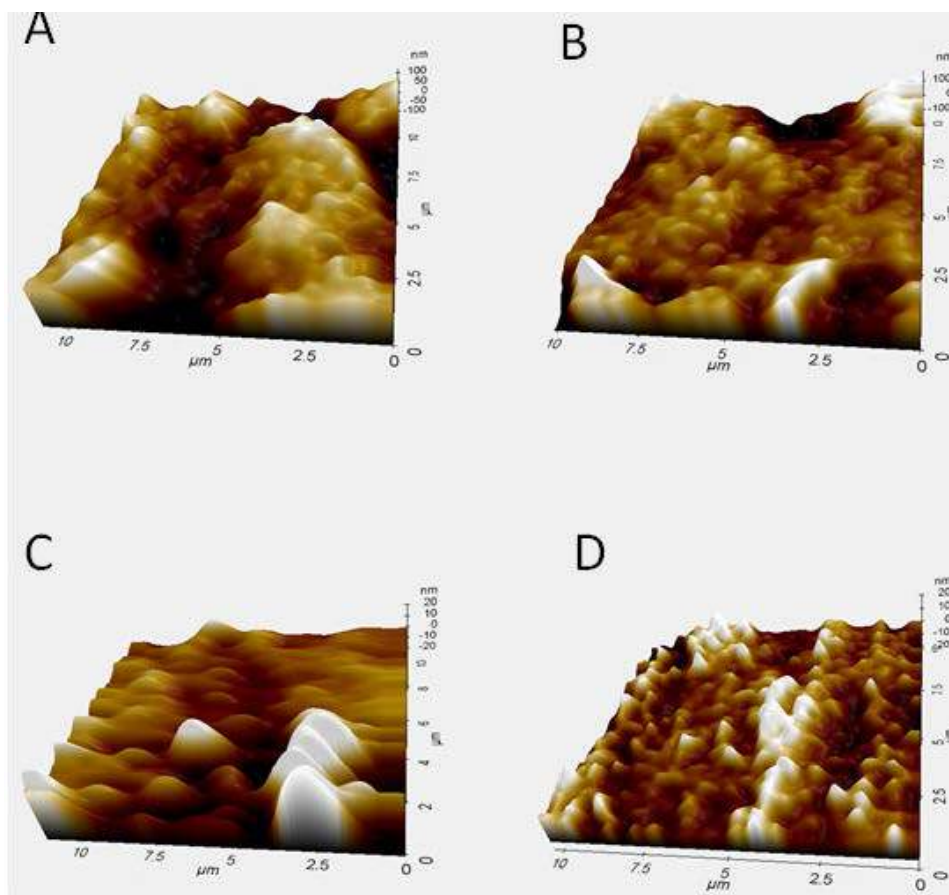


Figure 7 shows that the sensor response remains stable, without loss in biological activity during 120 days, indicating that the electrode modified with poly(4-aminothiophenol) contributed to this stability. Infrared spectroscopy studies of poly(4-aminothiophenol), conducted by our group, indicate that the electropolymerization occurs by formation of a ring-NH-ring bond, with the aromatic thiol being preserved in the polymer. The chemisorption of aromatic thiols at the carbon surface is known in the literature [58], and the presence of amine groups favors the formation of covalent binding with oligonucleotides, indicating that a modification of the electrode surface with poly(4-aminothiophenol) favors the stability and maintenance of biological activity of the device.

2.7. Morphological Characterization of the Genosensor Using Atomic Force Microscopy

Analyses of the surface for bare graphite electrode and graphite modified with poly(4-ATP) in absence or presence of the complementary target, are shown in Figure 8.

Figure 8. Atomic force microscopy (AFM) images of (A) graphite; (B) graphite/poly (4-ATP); (C) graphite/poly(4-ATP)/EBV1; and (D) graphite/poly(4-ATP)/EBV1:EBV2.



Roughness values (R_q) obtained by AFM were: 102.3 ± 4.5 nm (bare graphite electrode), 69.7 ± 6.2 nm [modified electrode with poly(4-ATP)], 13.2 ± 3.5 nm [modified electrode with poly(4-ATP)/EBV1] and 31.8 ± 5.2 nm [modified electrode with poly(4-ATP)/EBV1:EBV2].

As shown in Figures 8B,C, the immobilization of EBV1 produces a decrease in the height and size of the clusters when compared to modified electrode with poly(4-ATP) without biomolecules (Figure 8A), indicating that the oligonucleotide was successfully incorporated on the electrode surface. Both modified electrodes containing poly(4-ATP)/EBV1 (Figure 8C) and poly(4-ATP)/EBV1:EBV2 (Figure 8D) showed topographies with globular aspect, but the latter is less homogenous, presenting larger clusters. These modifications in the electrode surface can be justified based on the fact that double strand DNA molecules are more elongated

and inflexible than single strand DNA, and can form larger structures, suggesting the occurrence of the hybridization event, in agreement with the results obtained in the electrochemical studies. It was demonstrated in the literature that DNA can penetrate conducting films of polypyrrole [59].

3. Experimental Section

3.1. Reagents

All reagents used were of analytical grade and used without further purification. Ultra-high purity water (Master System, Gehaka, Brazil) was used for the preparation of aqueous solutions. 4-Aminothiophenol (4-ATP) (Acros Organics, Geel, Belgium) ($15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) was prepared in ethyl alcohol (PA) and H_2SO_4 solution ($0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) immediately before use. Phosphate buffer solution $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ was prepared at pH 7.4. All experiments were conducted at room temperature ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$).

The oligonucleotides were synthesized by Invitrogen Life Technologies (São Paulo, Brazil) with the following sequences: probe: (EBV1): 5'-AGGGATGCCTGGACACAAGA-3', complementary target (EBV2): 5'-TCTTGTGTCCAGGCATCCCT-3', non-complementary target: 5'-ACAACCCGTTGGACTAAC-3' and (EBV2Mis1): TCTTGTCTCCAGGCATCCCT-3'. Stock solutions of the $3.15 \times 10^{-4} \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ probe and $9.45 \times 10^{-4} \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ target oligonucleotides were prepared in SSC buffer ($0.9 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $90 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium citrate, pH 7.0) and stored in a freezer until use. Buffer components (CH_3COOH and CH_3COONa or Na_2HPO_4 and NaH_2PO_4) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA) (ACS purity) and prepared at pH 4.5 or 7.45, respectively. All reagents were used as received. The experiments were conducted at room temperature ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$).

Analysis of the nucleotide sequence (Table 1) was performed using the Blast program (Basic Local Alignment Search Tool, obtained in <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Table 1. The sequence of EBV1 has identity with Epstein-Barr virus.

Table 1. The sequence of EBV1 has identity with Epstein-Barr virus.

Organism	BLASTn			
	Query cover	E value	Max ident	Access number
Epstein-Barr virus (EBV) genome, strain B95-8	100%	0.079	100%	V01555.2
Epstein-Barr virus (B95-8 isolate)	100%	0.079	100%	K03333.1
Epstein-Barr virus (AG876 isolate)	100%	0.079	100%	K03332.1
Epstein-Barr virus, artifactual joining of B95-8	100%	0.079	100%	M80517.1

E value (Expectation value): number of different alignments with scores equivalent to or better than the score that is expected to occur in a database search by chance. The lower the E value, the more significant is the score.

3.2. Apparatus

Electrochemical polymerization and voltammetric measurements were performed using a potentiostat (CH Instruments, model 460C, Austin, TX, USA), with a graphite disk (6 mm diameter) cut from a graphite rod (99.9995%, Alfa Aesar) as working electrode. Platinum was used as counter electrode. All potentials are referred to the silver-silver chloride reference electrode (Ag/AgCl). The graphite surface, prior to electropolymerization, was mechanically polished with alumina slurry (0.3 μm diameter), ultrasonicated, washed with distilled water and dried in the air. All solutions were degassed by nitrogen bubbling. Film morphology in absence or presence of biomolecules was assessed through atomic force microscopy (AFM) (Park System, model XE-70, Suwon, Korea).

3.3. Electrochemical Polymerization

The monomer solutions were degassed with N_2 prior to electropolymerization. Poly(4-aminothiophenol) films were electrodeposited onto the graphite electrodes from a solution containing 4-aminothiophenol (15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). The electrochemical experiments were conducted at room temperature (25 ± 1 $^\circ\text{C}$), $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, -0.4V and $+1.0 \text{ V}$, 100 scans in three-compartment cell.

3.4. Electrochemical Characterization

The evaluation of ion transport was carried out in $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ solution ($5.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) containing KCl $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (negative probe) or $Ru(NH_3)_6Cl_2$ solution ($5.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) containing KCl $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (positive probe).

3.5. Oligonucleotide Immobilization onto Graphite Electrode/Poly(4-ATP)

The immobilization of oligonucleotide was carried out by applying two consecutive layers of $13 \mu\text{L}$ of $3.15 \times 10^{-4} \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ of the probe (EBV1) on the modified electrode surface and dried at the temperature of $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Then the electrode was immersed in 10 mL phosphate buffer with agitation ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4) and dried in N_2 . The blocking of the binding of non-specific biomolecules on electrode surface was done with BSA 0.5% (w/v) for 3 h, then the electrode was immersed in 10 mL phosphate buffer with agitation ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4) and dried in N_2 . After that, differential pulse voltammetry (DPV) measurements in one-compartment electrochemical cell connected to a potentiostat were obtained by using 1 mL phosphate buffer ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4) as electrolyte to evaluate the electrochemical sign of modified electrode with the probe.

3.6. Investigation on the Hybridization of Oligonucleotide Immobilized onto Poly(4-ATP) Using Guanine and Adenine Monitoring or Ethidium Bromide as Redox Indicator

For the direct detection, $26 \mu\text{L}$ of target (EBV2, $378 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were applied to the modified electrode with EBV1, $126 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The hybridization was carried out at $57 \text{ }^\circ\text{C}$ for 20 min. Then the electrode was immersed in phosphate buffer ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4) and dried in N_2 . The annealing temperature of the oligonucleotide (EBV1) was obtained by gene runner software (version 3.01, obtained in <http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/Gene-Runner.shtml>).

For the indirect detection, after the immobilization of the oligonucleotide probe (EBV1), 26 μL of target (EBV2, $378 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were applied on modified electrode. Hybridization was carried out at $57 \text{ }^\circ\text{C}$ for 20 min. Then the electrode was immersed in phosphate buffer ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4) and dried in N_2 . In sequence, 18 μL of $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ethidium bromide solution (3,8-diamino-5-ethyl-6-phenylphenatridinium bromide) from Merck Millipore (Darmstadt, Germany) in ultra-high purity water were applied on the electrode surface during 5 min. Ethidium bromide binds nucleic acids via intercalative mode and causes major changes to DNA. To evaluate electrochemical sign of ethidium bromide, differential pulse voltammetry measurements were conducted using phosphate buffer ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4) as electrolyte for the evaluation of electrochemical sign of electrode modified containing EBV1:EBV2.

3.7. Specificity of the Biosensor

DNA hybridization is based on the ability of the probe to recognize its corresponding complementary target. To verify the specificity of the probe, 26 μL of the non-complementary target (5'-ACAACCCGTTGGACTAAC-3', $378 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) or one-base mismatch (EBV2Mis1: TCTTGTCTCCAGGCATCCCT-3', $189 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were added on surface of the sensor subjected to the same process of the complementary target. The hybridization was carried out at $57 \text{ }^\circ\text{C}$ for 20 min. Detection of complementary target was done indirectly through the use of a mediator.

3.8. Analysis of Interfering Compounds

For this study, we added the complementary target concentration normally found in the blood to the solution of the interfering compounds ($3.6 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ascorbic acid, $1 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ uric acid, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ alanine, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ glutamate, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ glucose, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ glycine, $5.0 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$ albumine and mixture of these compounds). All experiments were conducted at room temperature ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$).

3.9. Stability Studies

To evaluate the biosensor stability, the modified electrodes containing DNA probe (EBV1) were stored at 8 °C, protected from light and oxygen during 120 days.

3.10. Calibration Curve

To evaluate the sensitivity of genosensor, 26 µL of different concentrations of complementary target (EBV2), 0, 3.78, 37.8, 378 and 756 µmol·L⁻¹ were added to the genosensor. Hybridization was carried out at 57 °C, for 20 min. For the detection, ethidium bromide (1 µmol·L⁻¹, 18 µL) was added to the electrode surface, for 5 min.

4. Conclusions

The results showed that functionalized surfaces with poly(4-ATP) are interesting platforms for the development of a genosensor. The produced genosensor shows interesting properties, such as good stability, selectivity and sensibility. This is a promising technique of molecular analysis of a specific biomarker for Epstein-Barr virus. Further studies will extend the system to determination of EBV in serum, plasma, and saliva samples.

Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Also, we would like to thank teacher Abílio Borghi for the review of the English manuscript.

References

1. Cohen, J.I. Epstein-Barr virus infection. **N. Engl. J. Med.** 2000, 343, 481–492.
2. González, X.; Correnti, M.; Rivera, H.; Perrone, M. Epstein-Barr virus detection and latent membrane protein 1 in oral hairy leukoplakia in HIV+ venezuelan patients. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.** 2010, 15, 297–302.
3. Dolcetti, R.; Masucci, M.G. Epstein-Barr virus: Induction and control of cell transformation. **J. Cell. Physiol.** 2003, 196, 207–218.
4. Al Moustafa, A.E.; Chen, D.; Ghabreau, L.; Akil, N. Association between human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in human oral carcinogenesis. **Med. Hypotheses** 2009, 73, 184–186.
5. Middeldorp, J.M.; Brink, A.A.T.P.; van den Brule, A.J.C.; Meijer, C.J.L.M. Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.** 2003, 45, 1–36.
6. Young, L.S.; Rickinson, A.B. Epstein-Barr virus: 40 years on. **Nat. Rev. Cancer** 2004, 4, 757–768.
7. Niller, H.H.; Wolf, H.; Ay, E.; Minarovits, J. Epigenetic deregulation of Epstein-Barr virus latency and development of autoimmune disease. **Adv. Exp. Med. Biol.** 2011, 711, 82–102.
8. Toussiro, E.; Roudier, J. Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.** 2008, 22, 883–896.
9. Dai, X.Z.; Chen, S.H.; Ge, J.; Han, X.Q.; Zhou, X.H.; Wu, Z.Q.; Zhao, T. Expression pattern of HSAo-miR-9 and its association with BCL6 in EBV-positive and EBV-negative Burkitt's lymphoma cell lines. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao** 2013, 33, 661–666. (In Chinese)
10. Weiss, L.M.; Chen, Y.Y. EBER in situ hybridization for Epstein-Barr virus. **Methods Mol. Biol.** 2013, 999, 223–230.
11. Calore, E.E.; Pérez, N.M.; Martins, J.F.; Cárdenas, P.G. Immunohistochemistry in a case of EBV encephalitis. **Rev. Chil. Infectol.** 2012, 29, 687–688.
12. Strong, M.J.; Xu, G.; Coco, J.; Baribault, C.; Vinay, D.S.; Lacey, M.R.; Strong, A.L.; Lehman, T.A.; Seddon, M.B.; Lin, Z.; *et al.* Differences in gastric carcinoma microenvironment stratify according to EBV infection intensity: Implications for possible immune adjuvant therapy. **PLoS Pathog.** 2013, 9, e1003341.

13. Goulart, L.R.; Vieira, C.U.; Freschi, A.P.; Capparelli, F.E.; Fujimura, P.T.; Almeida, J.F.; Ferreira, L.F.; Goulart, I.M.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M. Biomarkers for serum diagnosis of infectious diseases and their potential application in novel sensor platforms. **Crit. Rev. Immunol.** 2010, 30, 201–222.
14. Drummond, T.G.; Hill, M.G.; Barton, J.K. Electrochemical DNA sensor. **Nat. Biotechnol.** 2003, 21, 1192–1199.
15. Kerman, K.; Kobayashi, M.; Tamiya, E. Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology. **Meas. Sci. Technol.** 2003, 15, R1–R11.
16. Wang, J. Survey and summary from DNA biosensor to gene chip. **Nucleic Acids Res.** 2000, 28, 3011–3016.
17. Popovich, N.D.; Eckhardt, A.E.; Mikulecky, J.C.; Napier, M.E.; Thomas, R.S. Electrochemical sensor for detection of unmodified nucleic acids. **Talanta** 2002, 56, 821–828.
18. Wang, J.; Palecek, E.; Nielsen, P.E.; Rivas, G.; Cai, X.; Shiraishi, H.; Dontha, N.; Luo, D.; Farias, P.A.M. Peptide nucleic acid probes for sequence-specific DNA biosensors. **J. Am. Chem. Soc.** 1996, 118, 7667–7670.
19. Liu, L.; Shen, B.; Shi, J.; Liu, F.; Lu, G.-Y.; Zhu, J.-J. A novel mediator-free biosensor based on co-intercalation of DNA and hemoglobin in the interlayer galleries of [α]-zirconium phosphate. **Biosens. Bioelectron.** 2010, 25, 2627–2632.
20. Wang, J.; Rivas, G.; Fernandes, J.R.; Paz, J.L.L.; Jiang, M.; Waymire, R. Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor. **Anal. Chim. Acta** 1998, 375, 197–203.
21. Chen, Z.-W.; Balamurugan, A.; Chen, S.-M. Detection of DNA by using bio-conducting polymer-Nile blue composite electrode; Nile blue as an indicator. **Bioelectrochemistry** 2009, 75, 13–18.
22. Niu, S.; Zhao, M.; Hu, L.; Zhang, S. Carbon nanotube-enhanced DNA biosensor for DNA hybridization detection using rutin-Mn as electrochemical indicator. **Sens. Actuators B** 2008, 135, 200–205.
23. Budnikov, H.C.; Evtugyn, G.A.; Porfireva, A.V. Electrochemical DNA sensors based on electropolymerized materials. **Talanta** 2012, 102, 137–155.
24. Nambiar, S.; Yeow, J.T. Conductive polymer-based sensors for biomedical applications. **Biosens. Bioelectron.** 2011, 26, 1825–1832.

25. Silva, F.B.; Vieira, S.N.; Filho, L.R.G.; Boodts, J.F.C.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M. Electrochemical investigation of oligonucleotide-DNA hybridization on poly(4-methoxy phenethylamine). **Int. J. Mol. Sci.** 2008, 9, 1173–1187.
26. Ahuja, T.; Mir, I.A.; Kumar, D. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials** 2007, 28, 791–805.
27. Guimard, N.K.; Gomez, N.; Schmidt, C.E. Conducting polymers in biomedical engineering. **Prog. Polym. Sci.** 2007, 32, 876–921.
28. Ferreira, L.F.; Boodts, J.F.C.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M. Gold electrodes modified with poly(4-aminophenol): Incorporation of nitrogenated bases and an oligonucleotide. **Polym. Int.** 2008, 57, 644–650.
29. Franco, D.L.; Afonso, A.S.; Ferreira, L.F.; Gonçalves, R.A.; Boodts, J.F.C.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M. Electrodes modified with polyaminophenols: Immobilization of purines and pyrimidines. *Polym. Eng. Sci.* 2008, 48, 2043–2050.
30. Brito-Madurro, A.G.; Ferreira, L.F.; Vieira, S.N.; Goulart, L.R.; Madurro, J.M. Immobilization of purine bases in poly-4-aminophenol matrix. **J. Mater. Sci.** 2007, 42, 3238–3243.
31. Vieira, S.N.; Ferreira, L.F.; Franco, D.L.; Afonso, A.S.; Gonçalves, R.A.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M. Electrochemical modification of graphite electrodes with poly(4-aminophenol). **Macromol. Symp.** 2006, 245–246, 236–242.
32. Castro, C.M.; Vieira, S.N.; Gonçalves, R.A.; Madurro, A.G.B.; Madurro, J.M. Electrochemical and morphologic studies of nickel incorporation on graphite electrodes modified with polytyramine. **J. Mater. Sci.** 2008, 43, 475–482.
33. Ferreira, L.F.; Souza, L.M.; Franco, D.L.; Castro, A.C.H.; Oliveira, A.A.; Boodts, J.F.C.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M. Formation of novel polymeric films derived from 4-hydroxybenzoic acid. *Mater. Chem. Phys.* 2011, 129, 46–52.
34. Oliveira, R.M.L.; Vieira, S.N.; Alves, H.C.; França, E.G.; Franco, D.L.; Ferreira, L.F.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. **J. Mater. Sci.** 2010, 45, 475–482.
35. Santos, O.S.; Nascimento, R.; Rodrigues, L.P.; Santos, F.A.A.; Faria, P.C.B.; Martins, J.R.S.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M.; Goulart, L.R. Functional epitope core motif of the Anaplasma marginale major surface protein 1a and its incorporation onto bioelectrodes for antibody detection. **PLoS One** 2012, 7, e33045.

36. Silva, T.A.R.; Ferreira, L.F.; Boodts, J.F.C.; Eiras, S.P.; Madurro, J.M.; Brito-Madurro, A.G. Poly(4-hydroxyphenylacetic acid): A new material for immobilization of biomolecules. **Polym. Eng. Sci.** 2008, 48, 1963–1970.
37. Coelho, N.M.; Melo, E.I.; Rezende, H.C.; Madurro, A.G.B.; Madurro, J.M. Surface properties of sensors based on aminophenol-polymerized film. **J. Solid State Electrochem.** 2012, 16, 945–951.
38. Sadki, S.; Schottland, P.; Brodie, N.; Sabouraud, G. The mechanism of pyrrole electropolymerization. **Chem. Soc. Rev.** 2000, 29, 283–293.
39. Oh, E.J.; Jang, K.S.; MacDiarmid, A.G. High molecular weight soluble polypyrrole. **Synth. Met.** 2002, 125, 267–272.
40. Sonmez, G.; Schottland, P.; Reynolds, J.R. PEDOT/PAMPS: An electrically conductive polymer composite with electrochromic and cation exchange properties. **Synth. Met.** 2005, 155, 130–137.
41. La-Scalea, M.A.; Serrano, S.H.P.; Gutz, I.G.R. Eletrodos modificados com DNA: Uma nova alternativa em eletroanálise. **Quím. Nova** 1999, 22, 417–424.
42. Tran, L.D.; Piro, B.; Pham, M.C.; Ledoam, T.; Angiari, C.; Dao, L.H.; Teston, F. A polytyramine film for covalent immobilization of oligonucleotides and hybridization. **Synth. Met.** 2003, 139, 251–262.
43. Oliveira-Brett, A.M.; Piedade, J.A.; Silva, L.A.; Diculescu, V.C. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. **Anal. Biochem.** 2004, 332, 321–329.
44. Yang, M.; McGovern, M.E.; Thompson, M. Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry. **Anal. Chem. Acta** 1997, 346, 259–275.
45. Watkins, T.I.; Woolfe, G. Effect of changing the quaternizing group on the trypanocidal activity of dimidium bromide. **Nature** 1952, 169, 506–507.
46. Bugs, M.R.; Cornelio, M.L. Analysis of the ethidium bromide bound to DNA by photoacoustic and FTIR spectroscopy. **Photochem. Photobiol.** 2001, 74, 512–520.
47. Minasyan, S.H.; Tavadyan, L.A.; Antonyan, A.P.; Davtyan, H.G.; Parsadanyan, M.A.; Vardevanyan, P.O. Differential pulse voltammetric studies of ethidium bromide binding to DNA. **Bioelectrochemistry** 2006, 68, 48–55.

48. Oliveira, C.B.; Nascimento, V.B. Electrochemical oxidation mechanism of ethidium bromide at a glassy carbon electrode. **Electroanalysis** 2013, 25, 2117–2123.
49. Hu, X.; Wang, Q.; He, P.; Fang, Y. Spectroelectrochemical study on the electrochemical reduction of ethidium bromide. **Anal. Sci.** 2002, 18, 645–650.
50. Zhang, C.; Liu, L.; Wang, J.; Rong, F.; Fu, D. Electrochemical degradation of ethidium bromide using boron-doped diamond. **Sep. Purif. Technol.** 2013, 107, 91–101.
51. Wei, Y.; Liu, Z.; Gao, C.; Wang, L.; Liu, J.; Huang, X. Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials: A new approach for detection of organic micropollutants. **Prog. Chem.** 2010, 24, 616–627.
52. Waring, M.; Makoff, A. Breakdown of pulse-labeled ribonucleic acid and polysomes in bacillus megaterium: Actions of streptolydigin, echinomycin, and triostins. **Mol. Pharmacol.** 1974, 10, 214–224.
53. Saxena, U.; Chakraborty, M.; Goswami, P. Covalent immobilization of cholesterol oxidase on self-assembled gold nanoparticles for highly sensitive amperometric detection of cholesterol in real samples. **Biosens. Bioelectron.** 2011, 26, 3037–3043.
54. Yoo, E.H.; Lee, S.Y. Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice. **Sensors** 2010, 10, 4558–4576.
55. Hsu, C.T.; Hsiao, H.C.; Lee, M.S.; Chang, S.F.; Lee, T.C.; Tsai, Y.S.; Zen, J.M. Assessing the quality of bionime self-monitoring blood glucose system rightest GM110: A critical evaluation of interference and ambient circumstances. **Clin. Chim. Acta** 2009, 402, 119–123.
56. Gokel, G.W. **Dean's Handbook of Organic Chemistry**, 2nd ed.; McGraw-Hill: New York, NY, USA, 2004.
57. Rubio-Retama, J.; Lopez-Cabarcos, E.; Lopez-Ruiz, B. High stability amperometric biosensor based on enzyme entrapment in Microgels. **Talanta** 2005, 68, 99–107.
58. Medard, C.; Morin, M. Chemisorption of aromatic thiols onto a glassy carbon surface. **J. Electroanal. Chem.** 2009, 632, 120–126.
59. Lassale, N.; Mailley, P.; Vieil, E.; Vilache, T.; Roget, A.; Correia, J.P.; Abrantes, L.M. Electronically conductive polymer grafted with oligonucleotides as

electrosensors of DNA. Preliminary study of real time monitoring by in situ techniques. **J. Electroanal. Chem.** 2001, 509, 48–57.

Capítulo 3

Depósito de Patente

Uso e aplicação de Tetrametilbenzidina (TMB) em genossensores eletroquímicos

RESUMO

O uso de indicadores eletroquímicos em sensores biológicos é uma ferramenta que promove a melhora da sensibilidade do sistema de diagnóstico. O indicador brometo de etídio, por ser mais barato, é amplamente utilizado em laboratórios de nanotecnologia, porém tem seu uso restrito por suas propriedades carcinogênicas e teratogênicas por induzir distorções estruturais ao DNA que intercala. Outros indicadores que não apresentam estas características são dispendiosos e de difícil importação, inviabilizando seu uso em diagnóstico de rotina. Nestas condições a busca de novos indicadores eletroquímicos sem a propriedade cancerígena que coloque os pesquisadores e usuários em risco e de custo acessível é foco de numerosos trabalhos nas indústrias de reagentes.

Sendo assim, o objeto deste pedido de patente trata-se do uso e aplicação do Tetrametilbenzidina (TMB) como um notável indicador eletroquímico de ácidos nucleicos (DNA e RNA) por detectar a presença de sondas de DNA e alvos complementares hibridizados em genossensores.

Com as descobertas das respostas eletroquímicas que o TMB apresenta na presença do DNA, além de não apresentar mutagenicidade e teratogenicidade, este indicador pode ser utilizado em diferentes configurações de genossensores para o monitoramento de microorganismos ou para o diagnóstico de doenças.

RELATÓRIO DESCRITIVO

Uso e aplicação de tetrametilbenzidina (TMB) em genossensores eletroquímicos

Campo da Invenção

O presente pedido de Patente de Invenção trata-se do uso e aplicação de Tetrametilbenzidina (TMB) como indicador eletroquímico para hibridização DNA a partir da construção de um sensor biológico e do sensor propriamente dito aplicado à detecção do vírus Epstein-Barr, por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial. A presente invenção apresenta vantagens inerentes à sua aplicabilidade, sensibilidade, seletividade, baixo custo e além de ser um indicador com propriedades não carcinogênicas/teratogênicas.

Estado da Técnica

O uso de indicadores eletroquímicos em sensores biológicos é uma ferramenta que promove a melhora da sensibilidade do sistema de diagnóstico. O indicador brometo de etídio, por ser mais barato, é amplamente utilizado em laboratórios de nanotecnologia, porém tem seu uso restrito por suas propriedades mutagênicas, podendo ser carcinogênicas e teratogênicas, por induzir distorções estruturais ao DNA que intercala (WARING, M. J. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. **J. Mol. Biol.** 13 (1): 269–282, 1965. / McCANN, J. & AMES, B. N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. **PNAS** 72 (12): 5135–5139, 1975.). Outros indicadores utilizados como intercaladores da dupla fita do DNA, tais como Hoesch, Acridine Orange e Syber Green são potencialmente carcinogênicos e teratogênicos; e também potencialmente causadores de deleção ou inserção de nucleotídeos, inviabilizando seu uso em diagnóstico de rotina (Ohta, T.; Tokishita, S.; Yamagata, H. Ethidium bromide and SYBR Green I enhance the genotoxicity of UV-irradiation and chemical mutagens in *E. coli*.

Mutat Res. 492(1-2):91-97, 2001.). Nestas condições a busca de novos indicadores eletroquímicos sem a propriedade cancerígena que coloque os pesquisadores e usuários em risco e de custo acessível é foco de numerosos trabalhos nas indústrias de reagentes.

Atualmente o 3,3', 5,5' Tetrametilbenzidina (TMB) é um substituto não carcinogênico (teste de Ames negativo) para benzidina adequado como substrato de peroxidase e produz um produto final solúvel que é na cor azul pálido e pode ser monitorado espectrofotometricamente até 370 ou 620-650nm (HOLLAND, V. R.; SAUNDERS, B. C.; ROSE, F.L.; WALPOLE, A.L. A safer substitute for benzidine in the detection of blood. **Tetrahedron** 30: 3299, 1974. / CHUNG, K. T.; CHEN, S. C.; WONG, T. Y.; LI, Y. S.; WEI, C. I.; CHOU, M. W. Mutagenicity studies of benzidine and its analogs: Structure-activity relationships. **Toxicol Sci** 56 (2): 351–356, 2000 / CHUNG, K. T.; CHEN, S. C.; CLAXTON, L. D. Review of the Salmonella typhimurium mutagenicity of benzidine, benzidine analogues, and benzidine-based dyes". **Mutat Res/Rev Mutat Res** 612(1): 58–76, 2006.

O TMB está presente nos métodos tradicionais no ensaio imunoenzimático (ELISA) (Como apresentado nas patentes: US3791932; US4503143; US4942127; US5206150). Como também está presente nos testes para identificação de anticorpos e diagnóstico do vírus Epstein-Barr (EBV) utilizando ELISA (Como apresentado nas patentes: EP 1597280 B1; US 5374520 A; EP 1558634 A2; US 5256768 A).

Estes imunoenaios configuram parte do algoritmo para o levantamento de incidência do EBV desde o momento em que tem sido associado à etiologia de vários tumores, incluindo as síndromes linfoproliferativas de células B, o linfoma de células T e a doença de Hodgkin. No entanto, dentre as desvantagens destes ensaios estão o uso de reagentes em grande quantidade, equipamentos e sua manutenção de custos elevados e pessoal capacitado, fatores que inviabilizam a utilização destes ensaios em campo (*in house*). Além do descrito, essas técnicas não permitem um diagnóstico rápido em função das amostras necessitarem de tratamento prévio (centrifugação, aquecimento, sonicação). Outras desvantagens que podem ser citadas, o volume de sangue utilizado nesses ensaios pode ser avaliado por ser colhido por punção venosa (um método doloroso e invasivo) que traz desconforto ao paciente.

No final dos anos 1950 Denis Parsons Burkitt descreveu pela primeira vez a existência do EBV associado a um linfoma (Linfoma de Burkitt) que incidia principalmente em crianças na África (BURKITT DP. Sarcoma involving jaws in African children. **Br J Surg**, 46: 218–23, 1958). O EBV foi detalhado na década de 60 por Epstein e colaboradores a partir de investigações realizadas em cultivo *in vitro* de amostras suspeitas de linfomas enviadas por Burkitt, nos quais por meio da microscopia eletrônica, foi possível identificar a presença de um vírus com morfologia típica dos vírus do grupo Herpes (EPSTEIN, M. A.; ACHONG, B. G., and BARR, Y. M.: Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. **The Lancet**, 1: 702–703, 1964). Em 1970, O EBV foi detectado em tecidos de pacientes com carcinoma nasofaríngeo (ZUR HAUSEN H; SCHULTE-HOLTHAUSEN H; KLEIN G; HENLE W; HENLE G; CLIFFORD P & SANTESSON L. EBV DNA in biopsies of Burkitt's tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. **Nature**, 228: 1056-1058, 1970). Na década de 1980, o EBV foi associado ao linfoma não Hodgkin e à leucemia de células pilosas, em pacientes com AIDS (GREENSPAN JS; GREENSPAN D; LENNETTE ET; ABRAMS DI; CONANT MA; PETERSEN V & FREESE UK. Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral hairy leukoplakia, an AIDS-associated lesion. **NEJM**, 313: 1564-1571, 1985). Em 1997, o vírus Epstein-Barr foi classificado pela International Agency for Research on Cancer, como um carcinógeno de grau I que, comprovadamente, causa neoplasias em humanos (NIEDOBITEK, G.; AGATHANGGELOU, A.; HERBST, H.; WHITEHEAD, L.; WRIGHT, D.H.; YOUNG, L.S. Epstein–Barr Virus (EBV) Infection In Infectious Mononucleosis: Virus Latency, Replication And Phenotype Of Ebv-Infected Cells. **J. Pathol.**, 182(2): 151–159, 1997).

Também existem evidências de que o EBV possa estar associado a outros tumores malignos, como o carcinoma gástrico, o carcinoma mamário, o leiomiossarcoma, em pessoas imunodeprimidas, o carcinoma linfoepitelioma-like de glândulas salivares, pulmão, timo, trato hepatobiliar e esôfago (RIBEIRO-SILVA, A. R. & ZUCOLOTO, S. The role of Epstein-Barr virus in human tumorigenesis. **Medicina**, 36: 16-23, 2003).

O EBV é transmissível pela saliva e fluidos corporais que em contato com a mucosa infecta inicialmente as células epiteliais da orofaringe, nasofaringe e glândulas salivares, onde frequentemente ocorre replicação.

Observa-se que o estado da arte deste diagnóstico necessita de estratégias cuja detecção seja rápida e acessível, visando a obtenção de um método de baixo custo e que utilize pequena quantidade de amostra. Inovações nos métodos com características de baixo custo, sensíveis, seletivas, estáveis e menos invasivas já existem como as de monitoramento de glicose (U.S.: 5.708.247, 5.951.836, 6.241.862, e 6.284.125; uso das tiras de teste e um dispositivo de monitoramento, U.S.: 6413410 e 6733655). Estes modelos abriram espaço para o desenvolvimento de novas tecnologias aplicáveis no campo de diagnóstico de DNA, utilizando plataformas modificadas com filmes poliméricos e indicadores de DNA como o brometo de etídio (BE) (BR1020120055562; BR1020130313106). O BE é relatado desde 1965 como uma droga tripanossomicida e que forma prontamente complexos com ácidos nucleicos *in vitro*. Estudos mostram que as estruturas de dupla hélice do DNA são estabilizadas por ligação de etídio, mas em diferentes extensões, dependendo da natureza dos pares de nucleotídeos atuando como intercalador e assim com propriedades carcinogênico-teratogênicas.

Diante do exposto, estudos convergem para o desenvolvimento de uma metodologia que utiliza o TMB como agente indicador de hibridização de DNA em genossensores, com o objetivo de aprimorar as linhas de diagnósticos já existentes nestas áreas de interesse e priorizar a proteção dos profissionais construtores desta tecnologia e dos consumidores que terão acesso a este dispositivo de diagnóstico, sendo assim objetos deste pedido de patente de invenção.

Descrição e detalhamento dos componentes da invenção

Visando proporcionar um dispositivo de baixo custo para o diagnóstico de ácidos nucléicos (DNA e RNA), a presente invenção apresenta o uso e a aplicação do TMB em um sensor biológico que possui a capacidade de identificar

o EBV por meio da utilização de sondas específicas baseadas em fragmentos de DNA, imobilizadas sobre a superfície transdutora de um eletrodo, para a detecção de alvos complementares de DNA do EBV.

Devido a sua capacidade de detectar fragmentos de ácidos nucleicos sintéticos, a técnica apresentada neste pedido de patente mostra-se adequada ao diagnóstico. No caso do EBV a detecção pode ocorrer durante a fase de replicação viral, que configura os sítios primários da infecção principalmente nas células epiteliais para posteriormente infectar as células B ou até mesmo sítios de permanência como as células tumorais.

O sensor biológico exposto apresenta em sua metodologia vantagens de miniaturização do sistema de diagnóstico, o que culmina na necessidade de pequenas quantidades de amostra sanguínea, minimizando o desconforto oriundo da coleta de sangue por punção venosa, quando do diagnóstico em amostras reais de sangue ou pequenas amostras de materiais biopsiados.

A aplicação resulta na construção de um sensor biológico que utiliza: um eletrodo de grafite como material condutor, modificado com filme polimérico poli(4-aminofenol); um oligonucleotídeo sonda sintético para EBV(EBV1) específico para o DNA viral 20-mer (sequência 5'-AGGGATGCCTGGACACAAGA-3'): posição no genoma (B95-8) e, opcionalmente, TMB usado como mediador eletroquímico, no caso de detecções indiretas.

Para os ensaios de detecção do alvo complementar e especificidade do sensor biológico, são utilizadas as seguintes sequências de oligonucleotídeos sintéticos como: alvo complementar para EBV (EBV2) 20-mer (sequência 5'-TCTTGTGTCCAGGCATCCCT-3'); alvo não complementar para EBV (NM2) 18-mer (sequência 5'-ACAACCCGTTGGACTAAC-3'); alvo contendo mutação em duas bases nitrogenadas do DNA para EBV (mis2EBV2) 20-mer (sequência 5'-TCTTGTGT**GG**AGGCATCCCT-3'); No entanto a presente invenção não se limita apenas à utilização destes componentes.

O eletrodo utilizado deve ser de um material preferencialmente condutor e, apresentar inércia eletroquímica na faixa de 0,0 V à +1,4 V (versus Ag/AgCl), tal como o grafite, carbono vítreo, pasta de carbono, diamante, ouro, platina ou até mesmo combinações destes materiais. Estes materiais também podem estar

incorporados aos materiais nanotecnológicos como filmes poliméricos, grafeno, nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro, visando o aumento da condutividade e melhoramento de sinais eletroquímicos.

O eletrodo de grafite devidamente polido foi o material selecionado para a construção do sensor biológico, por apresentar características como: custo relativamente baixo, inércia eletroquímica e rugosidade adequada à incorporação de polímeros e biocomponentes em sua superfície.

O polímero poli(4-aminofenol) ou poli(4-AF) foi eletrodepositado sobre a superfície do eletrodo de grafite, a fim de ser empregado como funcionalizador da superfície do eletrodo, visando otimizar as propriedades de transferência eletrônica e a incorporação eficiente de biomoléculas, tal como o fragmento de DNA específico para EBV.

O oligonucleotídeo específico empregado na detecção de DNA viral da EBV foi imobilizado na superfície do eletrodo por adsorção. Os oligonucleotídeos utilizados foram diluídos em tampão citrato de sódio ou SSC (cloreto de sódio $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$, citrato de sódio $0,03 \text{ mol.L}^{-1}$), nas faixas de concentrações: $0,126 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ a $1,26 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ para a sonda e $0,378 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ a $3,78 \times 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$ para os alvos.

A solução de TMB ($5,0 \text{ mmol.L}^{-1}$) que ao doar dois elétrons (dois hidrogênios), passa para a forma oxidada e ao receber os dois elétrons retornam à sua forma reduzida que propicia que esta transferência eletrônica seja quantificada eletroquimicamente.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Para uma melhor compreensão das características da presente proposta de uso do TMB como indicador de DNA, resultados gráficos exemplificadores, não limitativos, são apresentados em anexo, os quais representam uma forma de produção do genossensor para diagnóstico de EBV.

A FIGURA 1 apresenta um gráfico de monitoramento do pico de redução do TMB; por voltametria de pulso diferencial (VPD), em tampão fosfato, pH: 7,4;

com modulação de amplitude 0,05 mV, intervalo de pulso 0,2 s e velocidade de varredura entre 5 mV. s⁻¹ a 20 mV. s⁻¹. Diferentes concentrações de TMB: (a) 0,5 mmol.L⁻¹, (b) 1,0 mmol.L⁻¹, (c) 2,5 mmol.L⁻¹, (d) 5,0 mmol.L⁻¹ foram disponibilizadas em FIGURA 1A: pico de redução do TMB em eletrodo de grafite e FIGURA 1B: pico de redução do TMB em eletrodo de grafite modificado com poli(4-AF) somente nas concentrações (c) 2,5 mmol.L⁻¹ e (d) 5 mmol.L⁻¹.

A FIGURA 2 apresenta um gráfico da detecção direta dos oligonucleotídeos específicos para EBV; por voltametria de pulso diferencial (VPD), em tampão fosfato, pH: 7,4; com modulação de amplitude 0,05 mV, intervalo de pulso 0,2 s e velocidade de varredura entre 5 mV. s⁻¹ a 20 mV. s⁻¹ Na Figura 2A o resultado indica uma eficiente imobilização de sonda em eletrodo de grafite. Na Figura 2B os resultados indicam uma eficiente imobilização de sonda e detecção do alvo sobre eletrodos de grafite modificados com poli(4-AF). De acordo com a literatura (ALVES V.A.; BRETT C. M. A. "Characterization of passive films formed on mild steels in bicarbonate solution by EIS". *Electrochim. Acta.* 47(13-14): 2081-2091, 2002.), os picos de oxidação presentes em potenciais cujos valores ficam próximos de + 0,64 V, +0,97 V e +1,24 V são atribuídos às bases nitrogenadas oxiguanosina (8 GO), guanosina monofosfato (G) e adenosina monofosfato (A), respectivamente. Ao ocorrer a hibridização da sonda (EBV1) com o seu alvo complementar (EBV2) há um decréscimo na amplitude de sinal de corrente, uma vez que quando as ligações de hidrogênio são formadas, ou seja, formação das dupla fita do DNA, ocasionando um distanciamento da dupla hélice do DNA da superfície do eletrodo, dificultando a eletrooxidação dos resíduos de bases nitrogenadas do DNA, diminuindo o pico de oxidação da guanosina monofosfato e adenosina monofosfato (BALVEDI R.P.A., CASTRO A.C.H., MADURRO J.M., BRITO-MADURRO A.G. "Detection of a Specific Biomarker for Epstein-Barr Virus Using a Polymer-Based Genosensor" *Int J. Mol. Sci.* 15:9051-9066, 2014).

A FIGURA 3 representa um gráfico de detecção indireta a partir do monitoramento do pico de redução do intercalador TMB, para detecção de oligonucleotídeo específico para EBV; em solução de tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹,

pH: 7,4; por voltametria de pulso diferencial (VPD), modulação de amplitude de 0,05 mV, intervalo de pulso 0,2 s e velocidade de varredura entre 5 mV.s⁻¹ a 20 mV.s⁻¹. Na FIGURA 3A (a) imobilização da sonda e (b) detecção do alvo, com o uso do TMB como indicador ocorreu em eletrodos de grafite; (c) imobilização da sonda e (d) detecção do alvo, com o uso do TMB como indicador ocorreu em eletrodos de grafite modificados com poli(4-AF). Na FIGURA 3B o gráfico de barras diferencia a imobilização da sonda e reconhecimento do alvo por detecção indireta na ausência (a e b) e presença (c e d) de filme polimérico em eletrodo de grafite. Estudos indicam a eficiente imobilização de sonda e detecção de alvo, os valores médios das respostas obtidas para diferentes correntes nos eletrodos modificados demonstraram maiores valores na presença do TMB, após hibridização da sonda com o alvo complementar. Partindo deste princípio, o tetrametilbenzidina (TMB) é o objeto de monitoramento neste gráfico. Os resultados apresentados nos gráficos mostram um maior valor na amplitude do sinal de corrente nos experimentos quando se utiliza o TMB na fita hibridizada.

Esta resposta pode ocorrer devido interação de TMB à dupla fita de DNA, que é considerada como resultado de uma interação hidrofóbica, onde esta interação é atraída para o ambiente hidrofóbico presente no pareamento dos resíduos de bases nitrogenadas no DNA dupla fita (BARRA, C. V.; ROCHA, F. V.; GAUTIER, A.; MOREL, L.; QUILLES, M. B.; CARLOS, I.Z.; TREU-FILHO, O.; FREM, R. C. G.; MAURO, A. E.; NETIO, A. V. G. Synthesis, cytotoxic activity and DNA interaction of Pd(II) complexes bearing N'-methyl-3,5-dimethyl-1-thiocarbamoylpyrazole. *Polyhedron* 65: 214-220, 2013). No ensaio onde o TMB foi testado diretamente sobre o eletrodo contendo exclusivamente a sonda, o sinal de corrente mostrou-se baixo. Os resultados apontam que em eletrodos modificados com poli(4-AF) (c e d), quando comparados aos eletrodos sem filme, há uma melhora de 2,5 vezes na resposta de corrente, intensificando a sensibilidade do sistema de detecção.

A FIGURA 4 apresenta um gráfico do monitoramento do pico de redução do TMB, para detecção de EBV, variando o tempo de disponibilização do EBV2 para que ocorra a hibridização entre EBV1:EBV2, em diferentes tempos. (a) 0 minutos com EBV2 (somente EBV1), (b) 5 minutos, (c) 10 minutos, (d) 20 minutos

e (e) 30 minutos. A detecção foi realizada em solução de tampão fosfato pH 7,4; por voltametria de pulso diferencial (VPD), modulação de amplitude de 0,05 mV, intervalo de pulso 0,2 s e velocidade de varredura entre 5 mV.s⁻¹ a 20 mV.s⁻¹. Os resultados indicam que o tempo de 30 minutos apresenta maior amplitude do sinal de corrente, sendo o tempo adequado para conduzir os experimentos de hibridização. O inserto apresenta o gráfico de barras dos dados voltamétricos obtidos (n=3).

A FIGURA 5 apresenta um gráfico de especificidade do genossensor para EBV. (a) EBV1/grafite/poli(4-AF); (b) EBV1/grafite/poli(4-AF): alvo não complementar ao EBV1, NM2; (c) EBV1/grafite/poli(4-AF): Mutação de duas bases nitrogenadas do EBV2, Mis2EBV2; (d) EBV1/grafite/poli(4-AF): alvo complementar ao EBV1, EBV2. Detecção realizada em solução de tampão fosfato pH=7,4, por voltametria de pulso diferencial (VPD), modulação de amplitude de 0,05 mV, intervalo de pulso 0,2 s e velocidade de varredura entre 5 mV.s⁻¹ a 20 mV.s⁻¹. Além da especificidade do genossensor para EBV, é observado que a resposta de corrente de redução do TMB reduz significativamente (cerca de 2 vezes), quando a sonda fica em contato com o oligonucleotídeo contendo duas mutações em sua sequência, em comparação com o oligonucleotídeo complementar. Este fato é justificado pela falta de emparelhamento completo entre as duas sequências de oligonucleotídeos. Este resultado indica que apenas uma sequência de oligonucleotídeos complementar causa um aumento significativo no sinal de TMB na dupla fita do DNA, demonstrando que é possível detectar troca de uma ou de mais bases nitrogenadas na sequência de oligonucleotídeos (UHLIN M., WIKELL H., SUNDIN M., BLENNOW O., MAEURER M., RINGDEN O., WINIARSKI J., LJUNGMAN P., REMBERGER M., MATTSSON J. Risk factors for Epstein-Barr virus related post-transplant lymphoproliferative disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematol.* 98:1-28, 2013). Esta detecção é importante para diagnóstico de doenças genéticas causadas por mutações pontuais.

A FIGURA 6A apresenta um gráfico de barras que demonstra a variação de corrente elétrica em relação às diferentes concentrações do alvo (EBV2) em

solução de tampão fosfato, 0,1 mol.L⁻¹, pH=7,4 (a) 10⁻⁶ mol.L⁻¹, (b) 10⁻⁷ mol.L⁻¹, (c) 10⁻⁸ mol.L⁻¹, (d) 10⁻⁹ mol.L⁻¹, (e) 10⁻¹² mol.L⁻¹ e (f) 0 mol.L⁻¹. A detecção foi realizada em tampão fosfato, 0,1 mol.L⁻¹, pH=7,4, por voltametria de pulso diferencial (VPD), modulação de amplitude de 0,05 mV, intervalo de pulso 0,2 s e velocidade de varredura entre 5 mV.s⁻¹ a 20 mV.s⁻¹. Figura 6B apresenta a curva de calibração construída a partir destes resultados, mostrando que o sistema apresenta um limite de detecção de 46 nmol.L⁻¹, limite de quantificação de 460 nmol.L⁻¹, coeficiente de correlação linear $r = 0.995$ ($n=3$).

A FIGURA 7 apresenta resultados do teste de estabilidade do genossensor durante 30 dias. As medidas foram realizadas em intervalos de 5 dias utilizando voltametria de pulso diferencial (VPD), modulação de amplitude de 0,05 mV, intervalo de pulso 0,2 s e velocidade de varredura entre 5 mV.s⁻¹ a 20 mV.s⁻¹ em tampão fosfato, 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,4. Durante todo o período analisado, o genossensor manteve 100% de sua estabilidade.

EXEMPLOS DE ATUAÇÃO DA INVENÇÃO

Exemplo 1

Preparo do sensor biológico

A polimerização eletroquímica e detecção das biomoléculas foram realizadas em células de três ou um compartimento, respectivamente, acopladas a um potenciostato CHI Instruments 760 C. O disco de grafite de 6 mm de diâmetro x 3 mm de altura foi obtido a partir cortes de um cilindro de grafite de alta pureza (99,9995%) utilizado como eletrodo de trabalho. Este eletrodo de trabalho foi polido mecanicamente em alumina suspensa em água deionizada (Buehler, 0,3 micrômetros). Utilizou-se uma placa de platina de 1 cm² como contra eletrodo e como eletrodo de referência prata-cloreto de prata [Ag/AgCl (KCl 3,0 mol.L⁻¹)].

Os eletrodos foram colocados na célula eletroquímica com solução de 4-aminofenol ($2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, em ácido perclórico $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$), efetuou-se desaeração com nitrogênio ultra puro, e a polimerização foi conduzida por voltametria cíclica, por 100 varreduras de potencial, na faixa de potencial de 0,00 V à +1,00V, com velocidade de 50 mV.s^{-1} . O material resultante foi submetido a um tratamento eletroquímico que consistiu de 6 varreduras de potencial realizadas nas mesmas condições anteriores, efetuadas em solução de ácido perclórico $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. (Técnica protegida nos pedidos de patentes BR1020120055562; BR1020130313106).

Gotejou-se $10 \mu\text{L}$ de uma solução da sonda EBV1 (na faixa de concentração: $0,126 \times 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$ a $1,26 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; dissolvida em tampão citrato de sódio $0,03 \text{ mol.L}^{-1}$) à superfície do eletrodo modificado com poli(4-AF). Para acelerar a evaporação do solvente o eletrodo foi colocado em um dessecador à temperatura ambiente (tempo entre 10 minutos a 40 minutos, e, em seguida, a superfície do eletrodo modificado que recebeu a sonda EBV1 foi lavada em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e pH 7,4). A superfície do eletrodo modificado foi posteriormente imersa em solução bloqueadora, albumina de soro bovino (BSA) a 0,5% (1 a 2h) à 37°C , e novamente lavada em tampão fosfato, $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,4.

Ao genossensor produzido, gotejou-se $30 \mu\text{L}$ do alvo complementar ($0,189 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ a $1,89 \times 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$) dissolvido em tampão citrato de sódio $0,03 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,0) sobre sua superfície, ficando em contato por um período compreendido entre 10 min a 40 min, acima de 25°C , visando promover a hibridização. Após este período as superfícies dos sensores biológicos foram lavadas em tampão fosfato, e secas a temperatura ambiente.

Exemplo 2

Detecção do alvo complementar de EBV

A detecção do alvo complementar foi realizada de forma direta pelo monitoramento dos picos de oxidação das bases nitrogenadas, ou indireta por

meio do uso de um mediador, que amplifica o sinal de resposta. Neste último caso, pode-se adicionar uma alíquota de 18µL de uma solução de TMB (na faixa de concentrações de 1×10^{-7} mol.L⁻¹ a 1×10^{-4} mol.L⁻¹) à superfície do sensor biológico, deixando em contato por alguns minutos à temperatura ambiente, seguido de lavagem desta superfície em tampão fosfato (0,1 mol.L⁻¹, pH 7,4).

A detecção do sinal foi realizada por um potenciostato, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial. Como eletrólito empregou-se tampão fosfato, (0,1 mol.L⁻¹, pH 7,4), eletrodo de platina como contra eletrodo e eletrodo de prata/cloreto de prata como referência. A leitura foi realizada sob modulação da amplitude de 0,05 mV, intervalo de pulso 0,2 s, velocidade de varredura entre 5 mV.s⁻¹ a 20 mV.s⁻¹ a 20 mV.s⁻¹. Para as detecções direta e indireta utilizou-se a faixa de potencial de 0,0V a +1,4V e -0,15 V a +0,6V, respectivamente.

Exemplo 3

Detecção do alvo não complementar de EBV

A detecção do alvo não complementar também pode ser realizada de forma direta pelo monitoramento dos picos de oxidação das bases nitrogenadas, ou indireta, utilizando um mediador, que amplifica o sinal de resposta. Neste caso deve-se adicionar uma alíquota de 18µL de uma solução de TMB (na faixa de concentrações de 1×10^{-7} mol.L⁻¹ a 1×10^{-4} mol.L⁻¹) à superfície do sensor biológico, deixando em contato durante alguns minutos à temperatura ambiente, seguido de lavagem em tampão fosfato (0,1 mol.L⁻¹ e pH 7,4).

A leitura do sinal foi realizada por um potenciostato, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial. O eletrólito utilizado foi tampão fosfato (0,1 mol.L⁻¹ e pH 7,4), eletrodo platina como contra eletrodo e eletrodo de prata/cloreto de prata como referência. A leitura foi realizada sob modulação da amplitude de 0,05 mV, intervalo de pulso 0,2 s, velocidade de varredura entre 5 mV.s⁻¹ a 20 mV.s⁻¹. Para a detecção direta utilizou-se a faixa de potencial de 0,0 V a +1,4 V, e -0,15 V a +0,6V para a detecção indireta.

Exemplo 4

Detecção do alvo complementar com três bases nitrogenadas trocadas

A detecção do alvo complementar com duas bases nitrogenadas trocadas pode ser realizada de forma direta pelo monitoramento dos picos de oxidação das bases nitrogenadas, ou indireta por meio do uso de um mediador, que amplifica o sinal de resposta. Neste caso deve-se adicionar uma alíquota de 18 μ L de uma solução de TMB (na faixa de concentrações de 1×10^{-7} mol.L⁻¹ a 1×10^{-4} mol.L⁻¹) à superfície do sensor biológico, deixando em contato durante alguns minutos à temperatura ambiente, seguido de lavagem em tampão fosfato (0,1 mol.L⁻¹ e pH 7,4).

A leitura do sinal foi realizada por um potenciostato, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial. Como eletrólito empregou-se tampão fosfato (0,1 mol.L⁻¹ e pH 7,4), eletrodo platina como contra eletrodo, eletrodo de prata-cloreto de prata como referência. A leitura foi realizada sob modulação da amplitude de 0,05 mV, intervalo de pulso 0,2 s, velocidade de varredura entre 5 mV.s⁻¹ a 20 mV.s⁻¹. Para a detecção direta utilizou-se a faixa de potencial de 0,0 V a +1,4 V e -0,15 V a +0,6 V para a detecção indireta.

CONCLUSÕES

Foi possível a construção de um genossensor baseado detecção de um novo mediador eletroquímico que se interage a oligonucleotídeos. Nesta proposta específica para EBV imobilizado (EBV1/sonda), em um eletrodo de material condutor modificado com filme polimérico. Este genossensor foi capaz de detectar o alvo (EBV2/alvo), bem como discriminar oligonucleotídeos não específicos ou contendo duas bases nitrogenadas trocadas nesta sequência. O genossensor desenvolvido apresenta limite de detecção baixo, na faixa de nmol.L⁻¹, para EBV por detecção indireta utilizando o TMB como indicador de hibridização.

FIGURA 1A

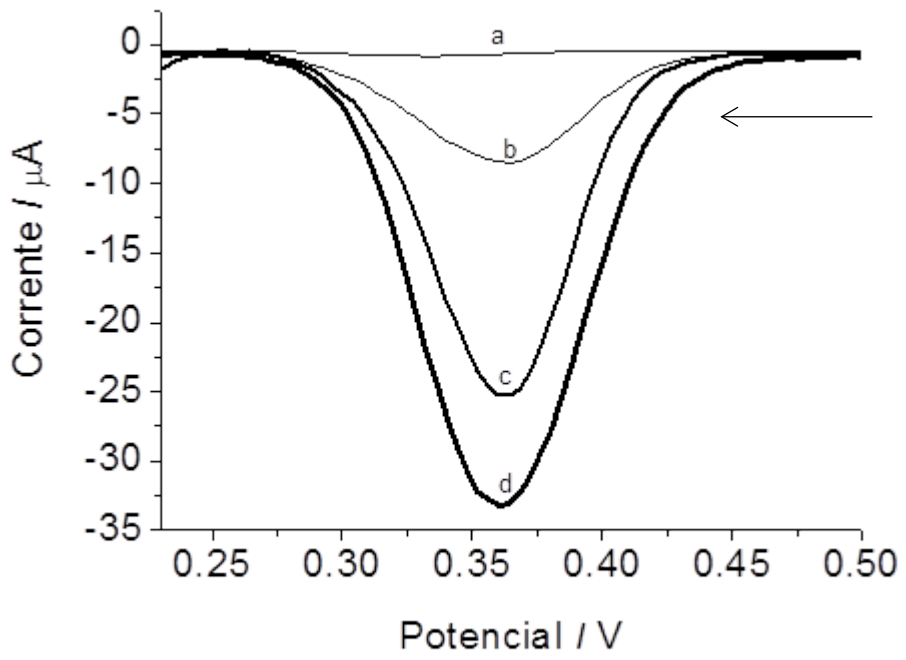


FIGURA 1B

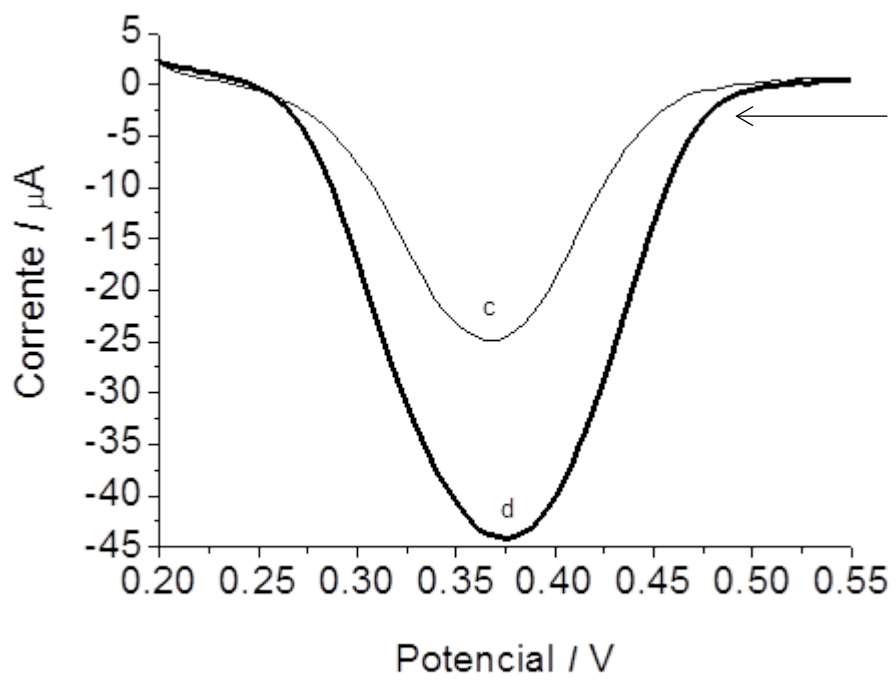


FIGURA 2A

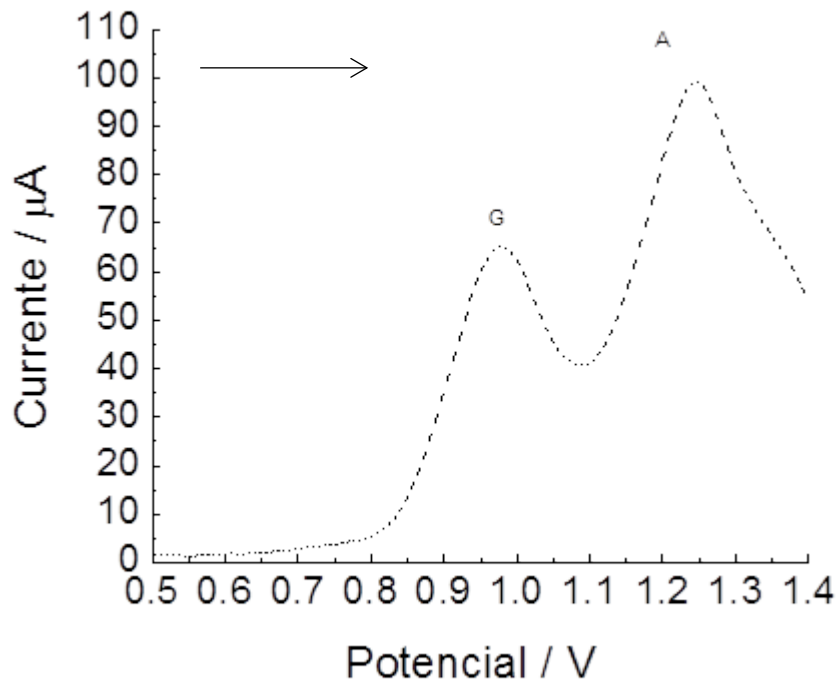


FIGURA 2B

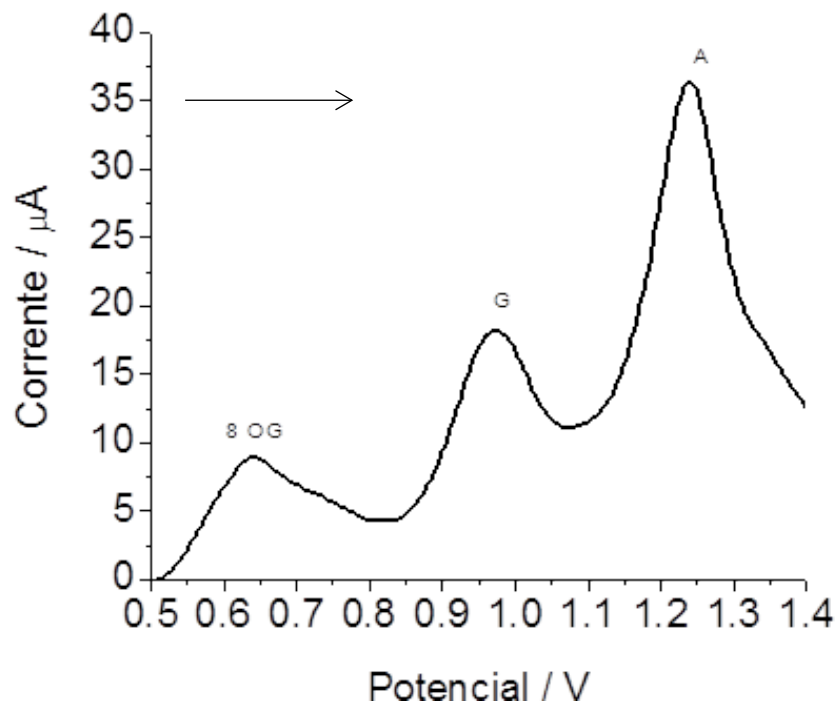


FIGURA 3A

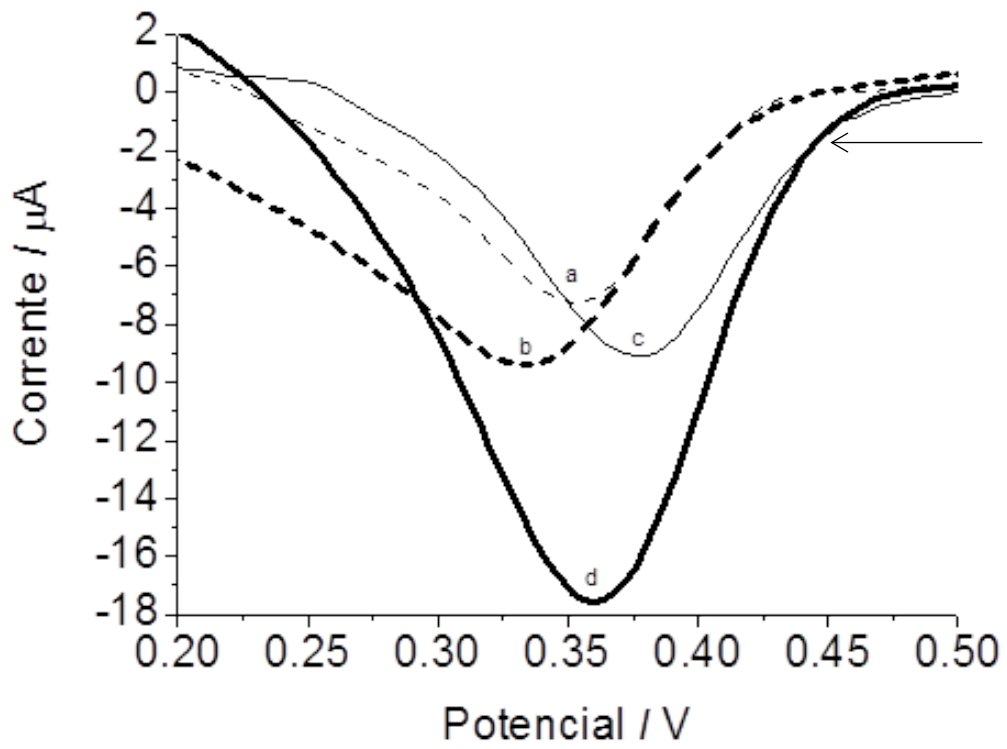


FIGURA 3B

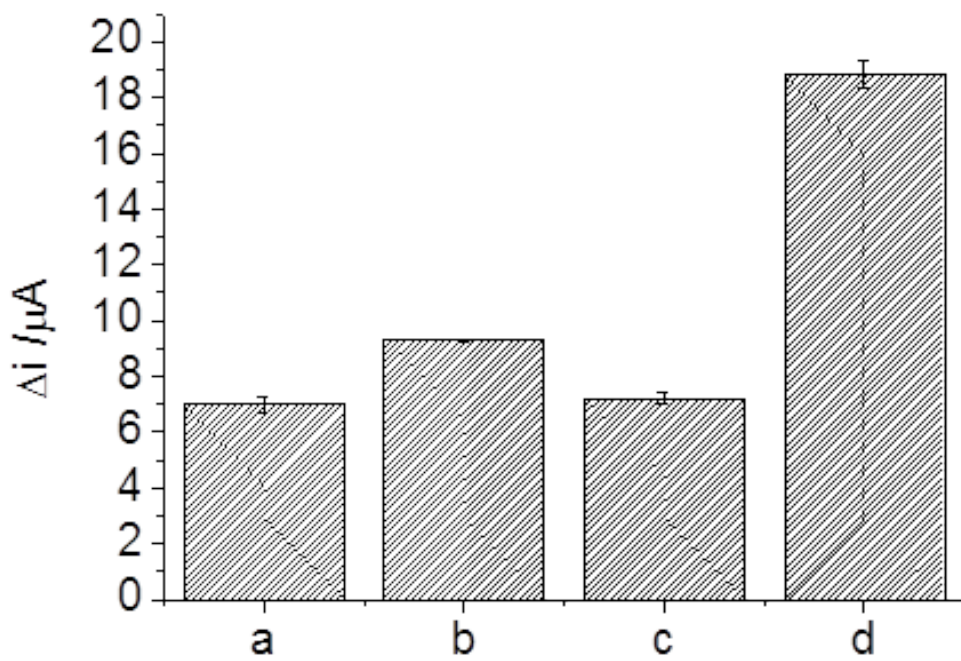


FIGURA 4

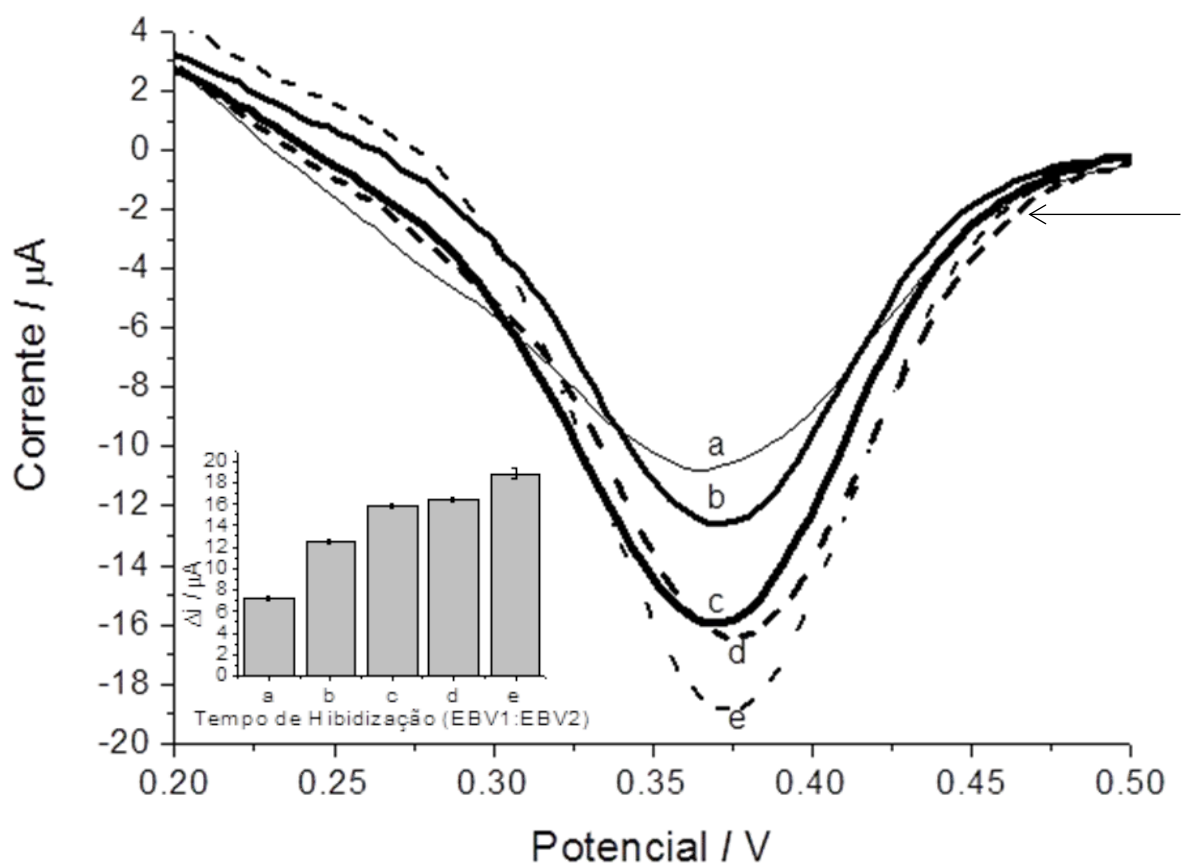


FIGURA 5A

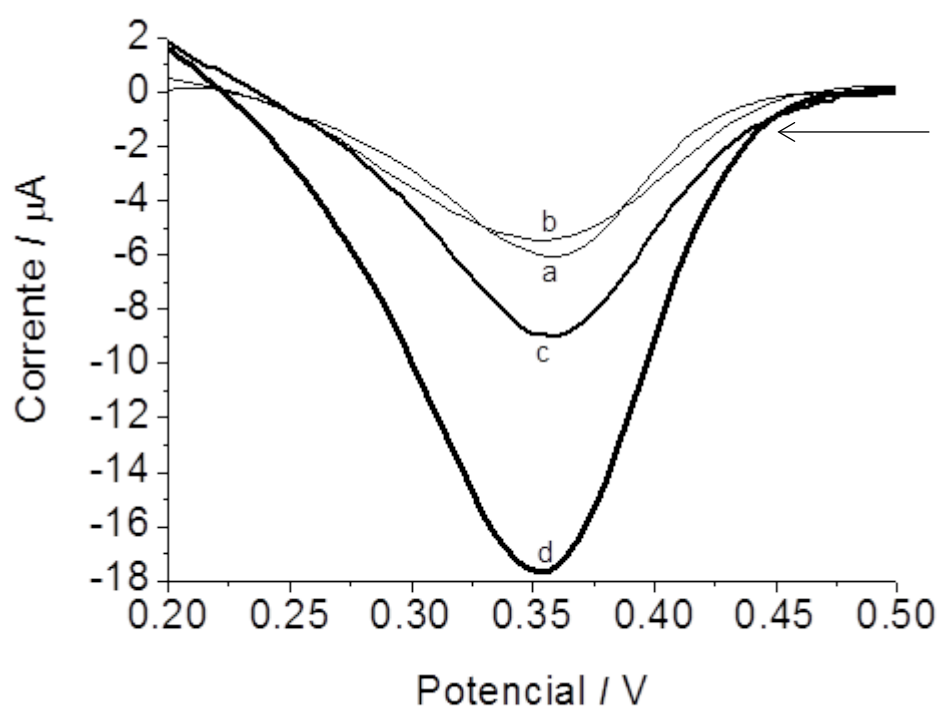


FIGURA 5B

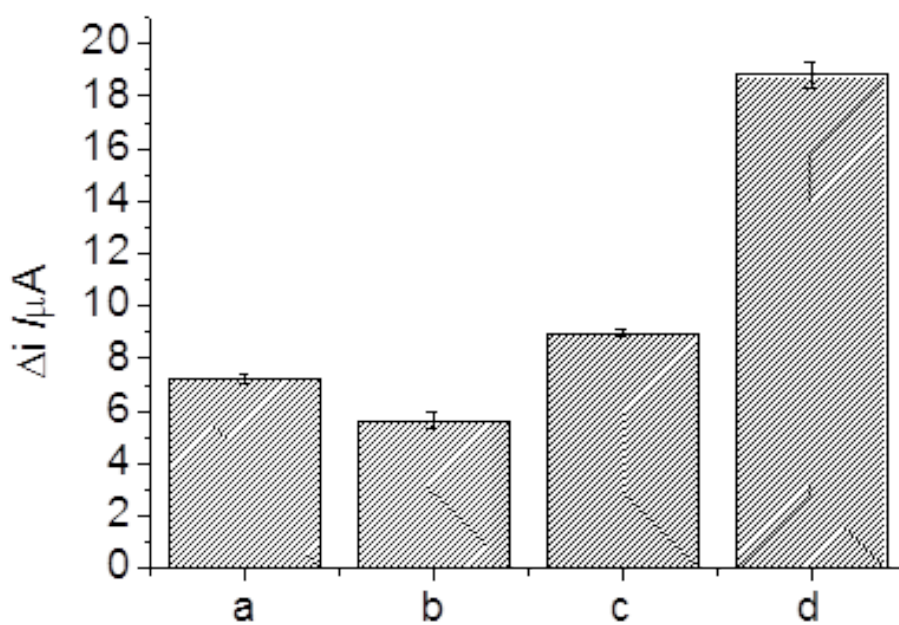


FIGURA 6A

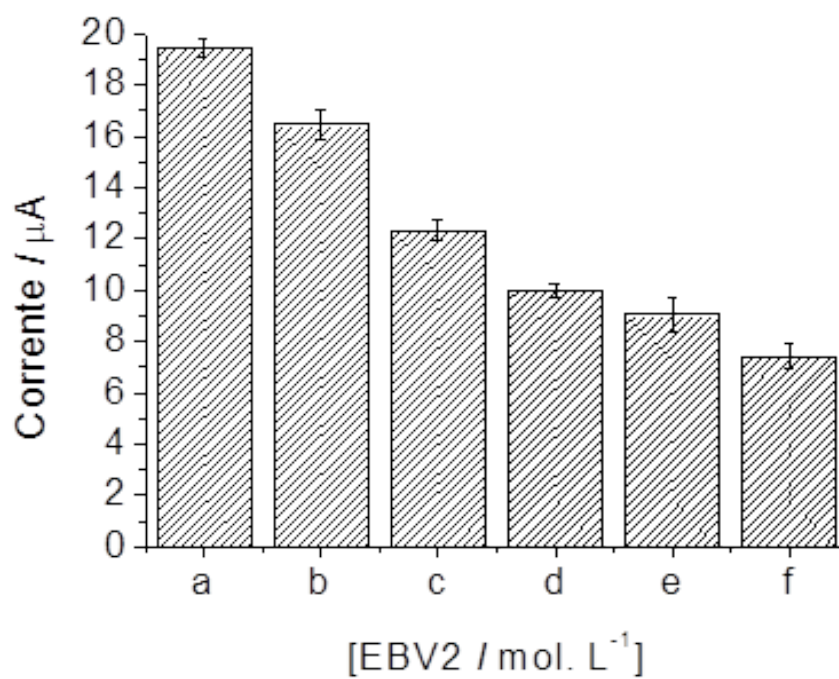


FIGURA 6B

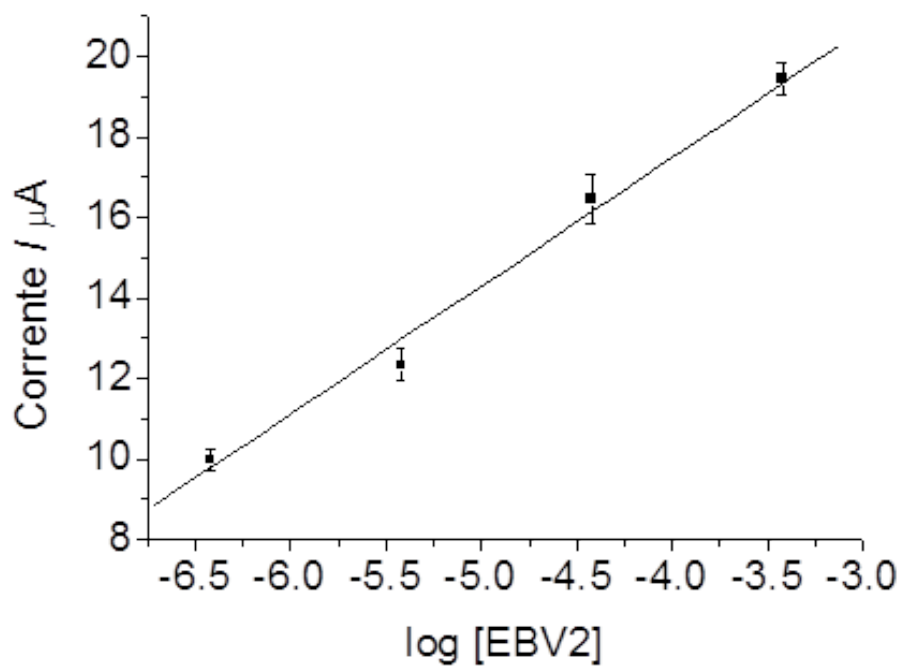
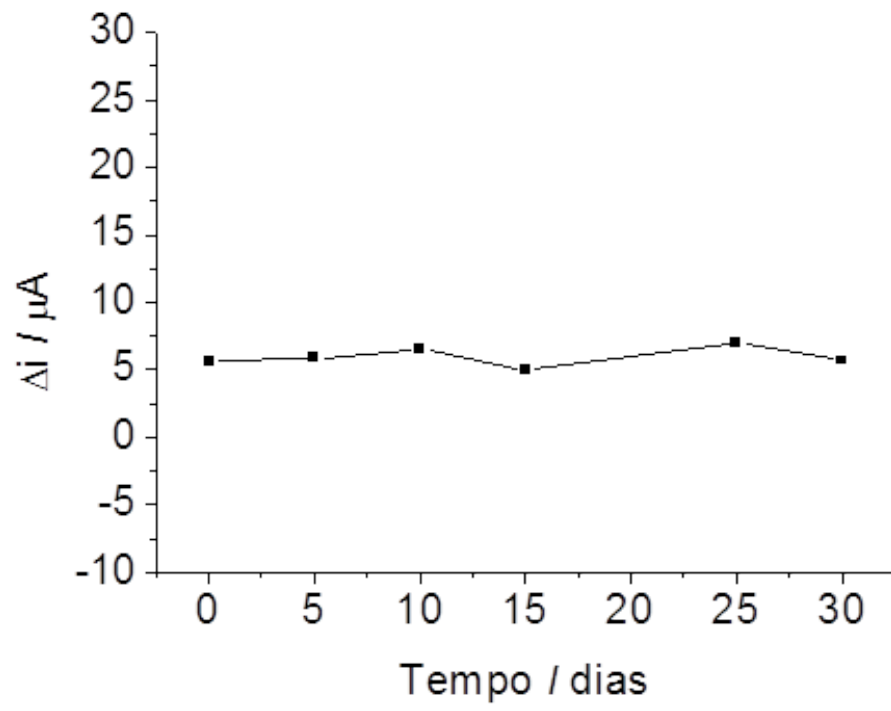


FIGURA 7



REIVINDICAÇÕES

1) “**USO DO TMB**” caracterizado por ser utilizado na detecção de ácidos nucleicos por análise eletroquímica indireta, acompanhando a variação dos sinais eletroquímicos por voltametria, do pico de oxidação ou redução de indicador entre a sonda e alvo de oligonucleotídeos específicos e identificação dos não específicos em qualquer oligonucleotídeo (DNA ou RNA).

2) “**APLICAÇÃO DO TMB**” caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a) Imobilização de um oligonucleotídeo (DNA) na forma de simples fita (sonda para EBV) composto da sequência 5'-AGGGATGCCTGGACACAAGA-3',

b) Detecção direta do gene viral do EBV com DNA complementar (alvo para EBV a sequência 5'-TCTTGTGTCCAGGCATCCCT-3') caracterizando o seu sinal eletroquímico,

c) Detecção indireta do gene viral EBV com DNA complementar (alvo para EBV a sequência 5'-TCTTGTGTCCAGGCATCCCT-3') monitorando o sinal eletroquímico amplificado do TMB.

d) Detecção indireta do DNA não complementar para EBV (5'-ACAACCCGTTGGACTAAC-3') e DNA de duas bases nitrogenadas trocadas para EBV (Mis2EBV) (5'-TCTTGTGTGGAGGCATCCCT-3'), caracterizando o seu sinal eletroquímico,

e) Caracterização final dos sinais eletroquímicos indicativos da formação do híbrido de DNA, nas detecções eletroquímicas direta e indireta. Sendo que na detecção indireta com o uso do TMB mostrou-se eficaz a interação a dupla fita de DNA.

3) “**APLICAÇÃO DO TMB**” de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por utilizar grafite modificado com poli(4-aminofenol), para a incorporação de alvos biológicos, podendo ser substituído por outro material polimérico ou não, de origem sintética ou natural, nanocompósitos contendo polímeros e nanotubos de carbono, grafeno, nanopartículas de ouro; depositados quimicamente, eletroquimicamente, biologicamente ou fisicamente no eletrodo.

Conclusão final da Tese

A riqueza literária dos levantamentos epidemiológicos das fisiopatologias associadas ao vírus Epstein-Barr motivaram o grupo de pesquisa a desenvolver plataformas de diagnóstico do DNA-EBV.

A interdisciplinaridade de grandes áreas ocorreu naturalmente, pois a Fisiologia, Genética, Patologia, Bioquímica, Química Eletro-Analítica, Física, Biologia Molecular e Celular foram necessárias para que a dinâmica diagnóstica fosse projetada.

O genossensor para EBV, em plataforma de grafite modificada com poli(4-ATF) apresentou efetiva imobilização da sonda e hibridização com seu alvo complementar. A detecção indireta avaliando pico de oxidação do BE como indicador apresentou faixa linear de resposta de 3,78-756 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e limite de detecção de 17,32 nmol.L^{-1} . Em adição, o genossensor é capaz de discriminar o alvo não complementar e *mismatch* de uma base. Neste último caso, a sonda complementar apresentou resposta de cerca de 35% maior do que a do *mismatch* de uma base nitrogenada (mis1EBV2). As imagens das superfícies obtidas por microscopia de força atômica comprovaram a sensibilização da superfície com a sonda e a hibridização com o alvo complementar.

O genossensor para EBV, em plataforma de grafite modificada com poli(4-AF), apresentou efetiva imobilização da sonda e hibridização com seu alvo complementar. Na detecção indireta avaliando o pico de redução do TMB como indicador apresentou faixa linear de resposta de 378 nmol.L^{-1} - 378 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e limite de detecção de 46 nmol.L^{-1} . Este genossensor é capaz de discriminar *mismatch* de duas bases nitrogenadas sendo que, a sonda complementar apresentou resposta de cerca de 35% maior do que a do mis2EBV2. A modificação da superfície com a sonda EBV1 e a detecção do alvo complementar EBV2 foram também confirmadas por imagens da topografia das superfícies.

Os dois genossensores obtidos para a detecção do EBV2, utilizando BE ou TMB como indicadores de DNA, são eficientes e detectam na faixa de nanomoles (nmol.L^{-1}), com boa faixa linear de resposta. Os genossensores além de suas especificidades são seletivos para as mutações pontuais, o que os tornam relevantes, já que os vírus sofrem mutações espontâneas, o que torna ambas as plataformas indicadas para amostras reais em modelos experimentais mais sofisticados e fisiologicamente controlados.

A literatura aponta modelos animais que permitam avaliar a dinâmica viral *in vivo* do EBV em infecções primárias e o DNA-EBV ou expressão do RNAm em sangue é quantificado por técnicas como PCR, por exemplo. Para o processo de novas plataformas de diagnóstico, como os genossensores, modelos animais poderiam ser utilizados a fim de quantificar a presença do DNA-EBV no sangue e também nos fluidos corporais como urina e saliva, uma vez que o EBV altera fisiologicamente os néfrons (nefrites; alterações na concentração/diluição de urina) e as glândulas salivares.

Ao se calibrar o sensor mediante o uso em amostras de modelos animais com níveis de contaminação controlados, este apresentará seletividade, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação e assim poderiam ser implementados para os testes em amostras reais humanas de urina e saliva para detectar e quantificar o DNA-EBV.

O diagnóstico rápido, barato, miniaturizado e principalmente não invasivo para o EBV é uma inovação tecnológica que possui potencial de ser incorporado em sistemas e serviços de saúde como banco de sangue e hospitais.

Resumo

Resumo

O vírus Epstein Barr (EBV) é estudado neste projeto por estabelecer uma relação de latência com o organismo infectado e a uma série de fisiopatologias. Seu potencial oncogênico está relacionado às evidências sorológicas da presença do agente viral em neoplasias e também às doenças autoimunes como a Artrite Reumatoide e o Lúpus Eritematoso.

Processos de detecção são necessários e têm despertado interesse científico nas últimas décadas, sendo importantes ferramentas analíticas usadas para diagnóstico clínico, controle de doenças, alterações fisiológicas, dentre outras.

Mediante o exposto, dois genossensores foram desenvolvidos visando o reconhecimento específico do EBV pela eletroquímica. O pico de oxidação do brometo de etídio nos eletrodos de grafite modificados com poli(4-ATF) e o pico de redução de tetrametilbenzindina, como novo indicador de hibridização de oligonucleotídeos, nos eletrodos de grafite modificados com poli(4-AF) foram projetados e avaliados nestas plataformas. Análises de Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR) e Microscopia de Força Atômica (AFM) foram utilizadas para complementar o estudo a fim de fundamentação teórica e prática. A perspectiva deste projeto é a aplicação no diagnóstico da infecção causada pelo vírus Epstein-Barr (em amostras de soro, saliva e urina) de forma não invasiva em testes rápidos avaliando sua sensibilidade, seletividade, especificidade, rapidez e de baixo custo.

PALAVRAS-CHAVE: Vírus Epstein-Barr, fisiopatologias associadas, diagnóstico, genossensor, tetrametilbenzindina e brometo de etídio.

Abstract

Abstract

The Epstein Barr virus (EBV) is studied in this project to establish a latency compared with the infected organism and to a number of pathophysiologies. Its oncogenic potential associated with serological evidence of the presence of the viral agent for cancer and also for autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and lupus erythematosus.

Detection processes are necessary and have attracted scientific interest in recent decades, and they are important analytical tools used for clinical diagnosis, disease control, physiological changes, among others.

Through the above two genosensors were developed to the specific recognition of EBV by electrochemistry. The peak oxidation of ethidium bromide (EB) in graphite electrodes modified with poly (4-ATP) and the peak tetramethylbenzidine (TMB) reduction, as a new indicator of hybridization oligonucleides, in graphite electrodes modified with poly (AP-4) were designed and evaluated these platforms. Analysis of Surface Plasmon Resonance (SPR) and Atomic Force Microscopy (AFM) were used to complement the study to theoretical and practical application. The prospect of this project is the application in the diagnosis of infection caused by the Epstein-Barr virus (in serum samples, saliva and urine) non-invasively in rapid tests evaluating their sensitivity, selectivity, specificity, speed and low cost.

KEYWORDS: Epstein-Barr virus, viral pathophysiology, diagnosis, genosensor, tetramethylbenzidine and ethidium bromide.

ANEXO 1

Resposta ao alvo EBV2 pelo sensor de SPR

A técnica de Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR) baseia-se em propriedades ópticas e pode ser empregada para estudos de fenômenos de superfície, monitorando a medida da mudança do índice de refração devido, por exemplo, a interação entre biomoléculas.

Neste resultado, apresentamos um sensor óptico para avaliar a imobilização da sonda e a hibridização de DNA (EBV1/sonda: EBV2/alvo), Figuras 1 e 2.

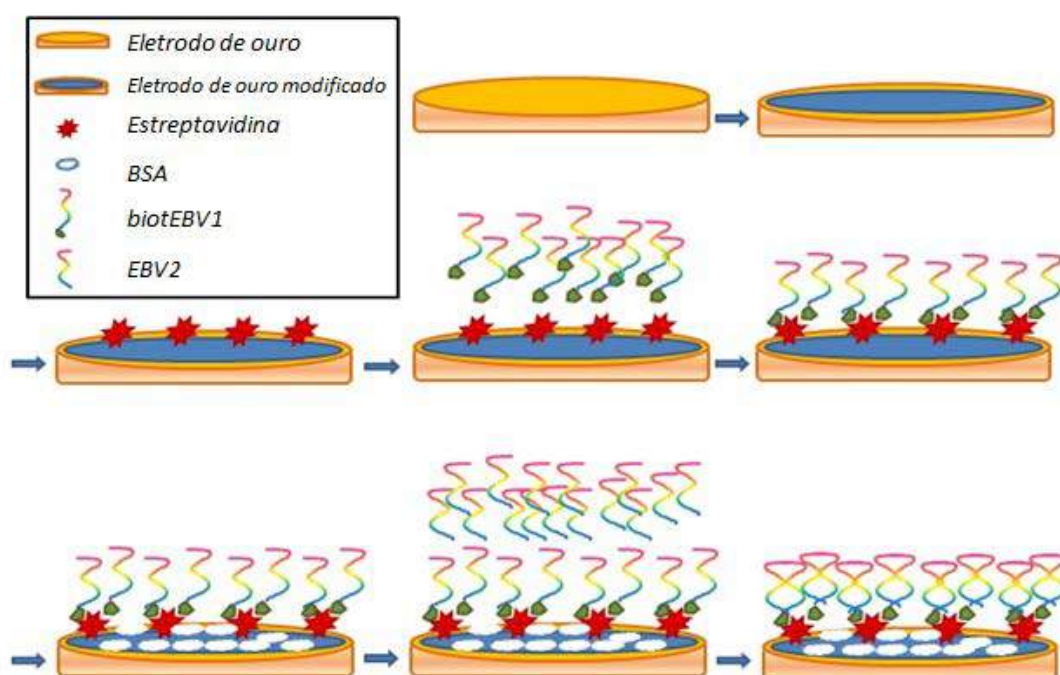


Figura 1.1: Esquema do genossensor para EBV no SPR

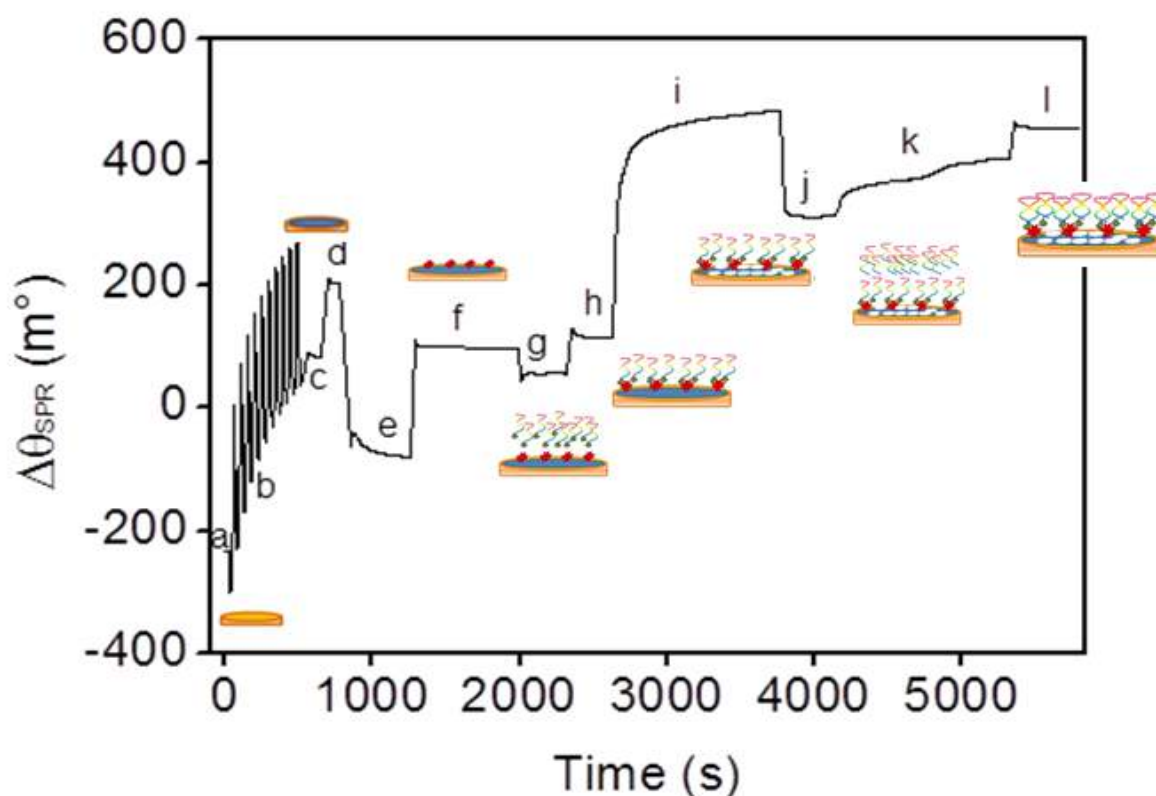


Figura 1.2: Sensorgrama da eletrodeposição de poli(4-ATF), imobilização de biotEBV1(sonda) e detecção do alvo EBV2. a- Linha de base em ácido sulfúrico, b- Polimerização de poli(4ATF), c- Linha de base em ácido sulfúrico, d- Linha base em tampão fosfato, e- Estreptavidina, f- Linha de base em tampão fosfato, g- EBV1-biot (sonda), h- Linha de base em tampão fosfato, i- BSA 0,5% (m/v), j- Linha base em tampão fosfato, k- EBV2 (alvo complementar), l- Linha base em tampão fosfato.

O deslocamento angular em miligráus é usado como uma unidade de resposta para quantificar a ligação de macromoléculas à superfície do sensor sendo convertido para massa pela seguinte relação: $120 \text{ m}^\circ = 1 \text{ ng/mm}^2$

Como indicado na Figura 2, a imobilização de biotEBV1 e a hibridação de biotEBV1:EBV2 em ouro modificado com poli (4-ATF) resultou em mudanças na média de 65,25 miligráus e 149,79 miligráus, respectivamente. Esses valores indicam a adsorção de biotEBV1 e biotEBV2 de $0,54 \text{ ng/mm}^2$ e $1,25 \text{ ng/mm}^2$, respectivamente. Estes resultados sugerem a formação do da dupla fita do DNA, ou seja, o reconhecimento do alvo complementar (EBV2).

ANEXO 2

Análise da superfície do sensor

As imagens de AFM apresentadas foram obtidas por meio de sistemas de microscópio de força atômica modelo XE-70 de fabricação Park System[®] e SPM 9600[®] (Shimadzu). As imagens geradas pelo AFM foram varridas em 10 x 10 μm utilizando o modo não contato com resolução real de 10 nm (Figura 3).

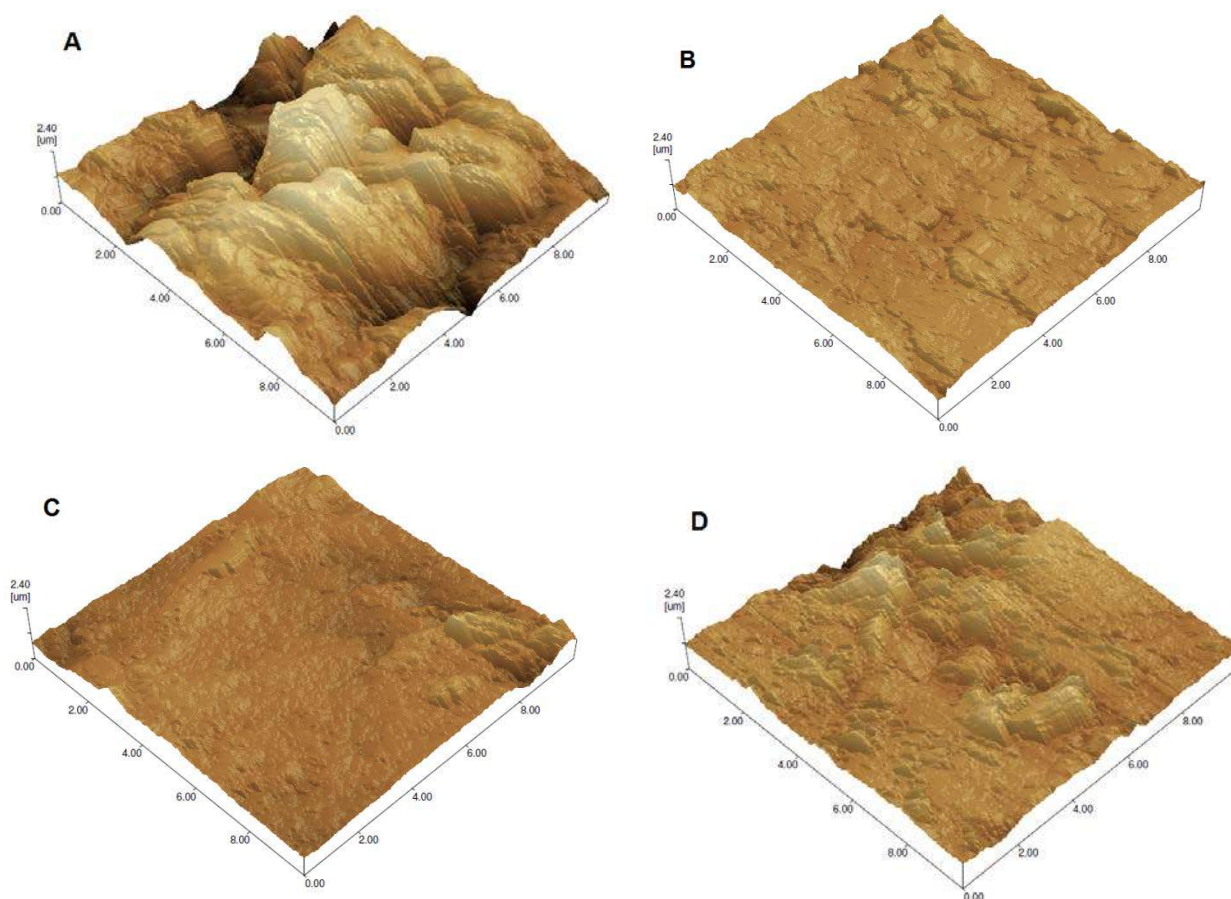


Figura 2.1: Imagens obtidas por microscopia de força atômica: (A) grafite; (B) grafite/poli(4-AF); (C) grafite/poli(4-AF)/EBV1; e (D) grafite/poli(4-AF)/EBV1:EBV2. Valores de rugosidade (R_q): 163.88 ± 1.23 nm (grafite), 74.81 ± 0.80 nm [grafite/poli(4-AF)], 105.07 ± 5.08 nm [grafite/poli(4-AF)/EBV1] e 264.67 ± 1.24 nm [grafite/poli(4-AF)/EBV1:EBV2].

ANEXO 3

Caracterização eletroquímica de poli(4AF)

Perfil voltamétrico de eletropolimerização do poli(4AF) em eletrodo de grafite. A fim de promover melhorias nas propriedades de transferência eletrônica e para uma apropriada incorporação de biomoléculas.

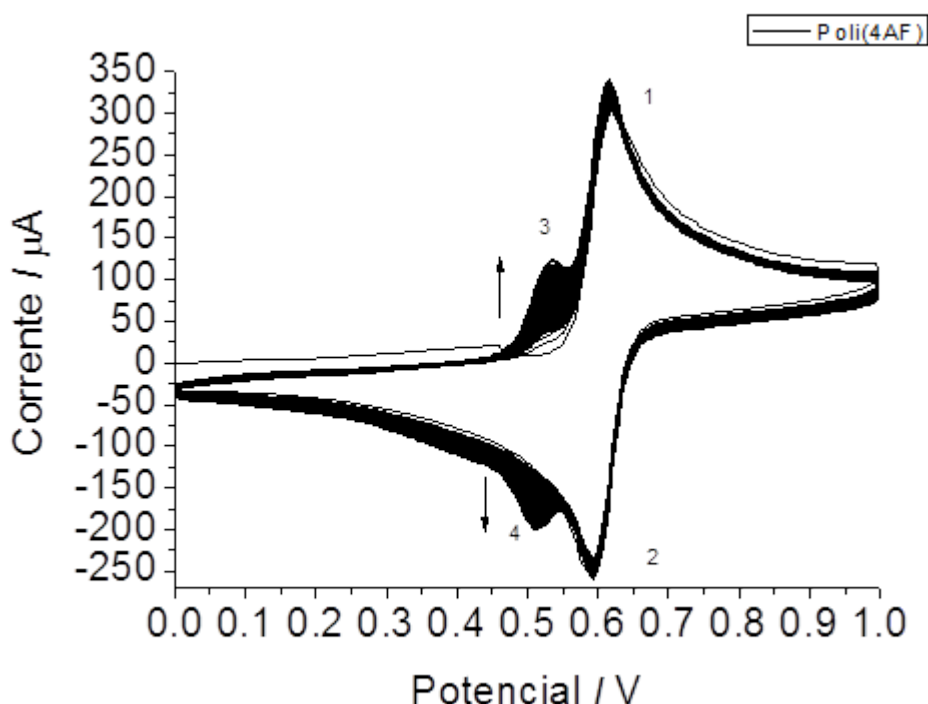


Figura 3.1: Perfil da eletrodeposição do poli (4-AF) por VC. Janela de potencial de 0 V a +1,0V com solução de monômero de 4-AF ($2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ e ácido clorídrico (HClO_4) $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, pH: 0,4); $V = 50 \text{ mV.s}^{-1}$ e $n = 100$. As setas indicam o aumento do polímero com o aumento progressivo número de varreduras.

Em meio reacional ácido, na primeira varredura apresenta uma onda de oxidação em torno de 0,6V atribuída à oxidação do monômero, a partir da segunda varredura de potencial observou-se o surgimento de mais uma onda de oxidação, entre 0,45V e 0,55V. Em 1 e 2 há diminuição gradual dos valores de corrente de oxidação/redução, referente ao consumo do monômero 4-AF; e 3 e 4

durante as progressivas varreduras ocorrem o aumento nos valores de corrente destes picos, caracterizando a formação de poli(4AF).

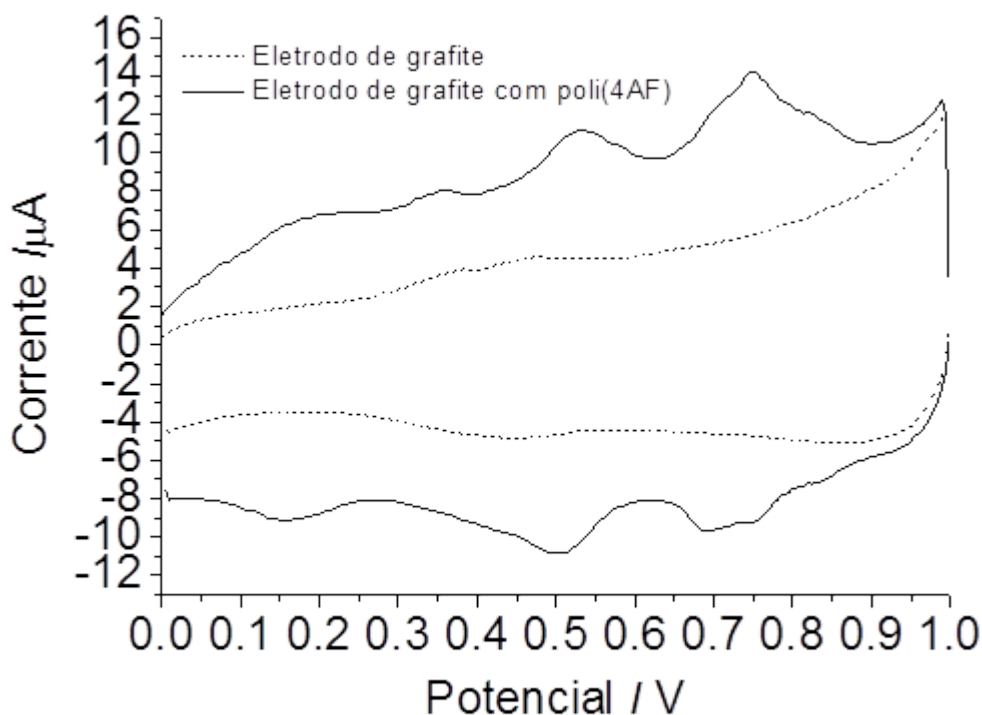


Figura 3.2: Caracterização eletroquímica do poli (4AF) preparado em meio ácido com ácido clorídrico (HClO_4) $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, pH: 0,4; $V= 50\text{mV.s}^{-1}$; $n= 2$; que por VC demonstra um aumento de resposta de corrente eletroquímica do eletrodo modificado com poli(4AF)(—) quando comparado com o eletrodo de grafite sem o filme polimérico (.....).

Os dois pares de picos de oxidação e redução referentes ao filme polimérico e ao monômero são observados nos perfis eletroquímicos. O principal pico de oxidação do eletrodo de grafite em solução de 4-AF está localizado em +0,54V, enquanto o pico de redução é observado em +0,50V. Já o pico de oxidação de monômero está localizado em +0,75V, enquanto o pico de redução está em +0,69V.

O aumento de corrente com sucessivas varreduras de potencial indicando a formação de um material na superfície do eletrodo de grafite, onde se observa um aumento de corrente nas medidas em solução contendo par redox $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ (VIEIRA, *et al.*, 2006).

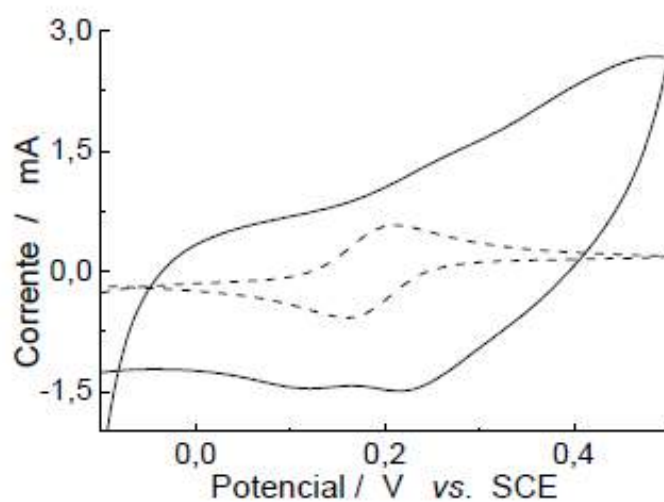


Figura 3.3: VC em eletrodo de grafite em $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ em KNO_3 . Eletrodo de grafite sem filme (- - -) e com poli(4-AF) (—), $V=100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. (VIEIRA, *et al.*, 2006)

ANEXO 4



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação



DECLARAÇÃO

Declaro para devidos fins que o pedido de depósito de patente intitulado **“USO E APLICAÇÃO DE TETRAMETILBENZIDINA (TMB) EM GENOSSENSORES ELETROQUÍMICOS”**, foi protocolado junto ao INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial) em **15/06/2015** recebendo o número de processo **BR 10 2015 014042 8**, cujos inventores são **Ana Graci Brito Madurro, João Marcos Madurro, Renata Pereira Alves Balvedi e Larissa Pereira Caetano**.

Por ser verdade, firmo a presente.

Uberlândia, 16 de junho de 2015.

Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Dr. Foued Salmen Espindola
Diretor de Inovação e Transferência de Tecnologia
Portaria R Nº. 2087/2012

Article

Detection of a Specific Biomarker for Epstein-Barr Virus Using a Polymer-Based Genosensor

Renata P. A. Balvedi ¹, Ana C. H. Castro ¹, João M. Madurro ² and Ana G. Brito-Madurro ^{1,*}

¹ Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia 38400-902, Brazil; E-Mails: renataalvesbalvedi@hotmail.com (R.P.A.B.); tininha112@yahoo.com.br (A.C.H.C.)

² Institute of Chemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia 38400-902, Brazil; E-Mail: jmadurro@ufu.br

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: agbrito@iqufu.ufu.br; Tel./Fax: +55-34-3218-2203.

Received: 31 July 2013; in revised form: 4 May 2014 / Accepted: 7 May 2014 /

Published: 21 May 2014

Abstract: This paper describes methodology for direct and indirect detections of a specific oligonucleotide for Epstein-Barr virus (EBV) using electrochemical techniques. The sequence of oligonucleotide probe (EBV1) revealed a high sequence identity (100%) with the EBV genome. For the development of the genosensor, EBV1 was grafted to the platform sensitized with poly(4-aminothiophenol). After that, the hybridization reaction was carried out with the complementary target (EBV2) on the modified electrode surface using ethidium bromide as DNA intercalator. The oxidation peak currents of ethidium bromide increased linearly with the values of the concentration of the complementary sequences in the range from 3.78 to 756 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. In nonstringent experimental conditions, this genosensor can detect 17.32 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (three independent experiments) of oligonucleotide target, discriminating between complementary and non-complementary oligonucleotides, as well as differentiating one-base mismatch, as required for detection of genetic diseases caused by point mutations. The biosensor also displayed high specificity to the EBV target with elimination of interference from mix (alanine, glucose, uric acid, ascorbic acid, bovine serum albumin (BSA), glutamate and glycine) and good stability (120 days). In addition, it was possible to observe differences between hybridized and non-hybridized surfaces through atomic force microscopy.

Keywords: Epstein-Barr virus; electrochemical detection; genosensor; hybridization; polymer

1. Introduction

Epstein-Barr virus (EBV) is a DNA virus of the γ -herpes subfamily. It infects around 90% of the world's population and may be asymptomatic during the life of the host. Its latent state could be regarded as the causative agent of infectious mononucleosis and has been associated with several malignancies including Burkitt's lymphoma, oral and gastric carcinomas (particularly nasopharyngeal carcinoma), Hodgkin's disease, lymphoproliferative disorders in immunodeficient individuals, such as post-transplant lymphoproliferative diseases and a subset of T and NK cell lymphomas [1–5].

EBV was discovered 40 years ago from examining electron micrographs of cells cultured from Burkitt's lymphoma that indicated a viral etiology and became the first of an unexpectedly wide range of associations discovered between this virus and tumors [6]. It is currently being correlated to autoimmune diseases such as multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and primary Sjögren's syndrome; these are complex disorders with a genetic background and the involvement of environmental factors, including viruses [7,8].

Currently, the detection of the virus can be made by means of several techniques, such as PCR (polymerase chain reaction), *in situ* hybridization, immunohistochemistry and electron microscopic immunocytochemistry. These techniques have a high cost, demanding skilled labor and time-consuming analysis [9–12]. Other recent technologies, such as the development of biosensors, are emerging and may revolutionize the disease diagnosis [13]. Generally, electrochemical biosensors have high sensitivity and low-cost, having superior properties when compared to alternative analytical techniques [14–16].

Electrochemical DNA sensing is a promising technique of nucleic acid analysis because of its fast response time, high sensitivity and low cost. This technique employs immobilized DNA sequences on the sensor surface as recognition element and sequence-specific hybridization can be monitored and analyzed [17,18]. The signal of the hybridization can be detected directly, produced by nucleotide oxidation of the DNA probe (label-free detection) [19,20] or indirectly, using an indicator of the hybridization process [21,22].

The use of conducting polymeric films can improve the interaction of the electrode with the biomolecular probe by modification of electrode surfaces, in addition to protecting the electrode against adsorption of nonspecific analytes [23–27].

Our research group has reported modifications of electrode surfaces with functionalized polymers, derived from aminophenols [28–31], tyramine [32], hydroxybenzoic acid [33], hydroxyphenylacetic acid [34] and methoxyphenethylamine [27], as well as application of the modified electrodes in the immobilization and detection of biomolecules [35–37].

The success of biomolecules immobilization onto these polymeric matrices is due to the presence of functional groups (amino, hydroxyl and/or carboxylic acid), facilitating electropolymerization and increasing the retention of biomolecules [31].

This work describes a genosensor based on a platform sensitized with poly(4-aminothiophenol)/specific single-strand DNA for EBV. The linear response range, sensitivity, selectivity, repeatability and stability were investigated.

2. Results and Discussion

2.1. Electrochemical Behavior of 4-Aminothiophenol (4-ATP)

The 4-aminothiophenol (4-ATP) electropolymerization was carried out through potential scanning (Figure 1A). The electrochemical characterization was carried out in H_2SO_4 solution (Figure 1B).

Figure 1. (A) Cyclic voltammogram in 4-aminothiophenol (4-ATP) solution ($15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) onto graphite electrode. Supporting electrolyte: H_2SO_4 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Scan rate $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; 100 scans. The arrows indicate the influence of the current response with the increasing of the number of scans; and (B) Cyclic voltammograms of bare graphite electrode (a) and graphite electrode functionalized with poly(4-ATP) (b). Supporting electrolyte: H_2SO_4 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Scan rate: $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

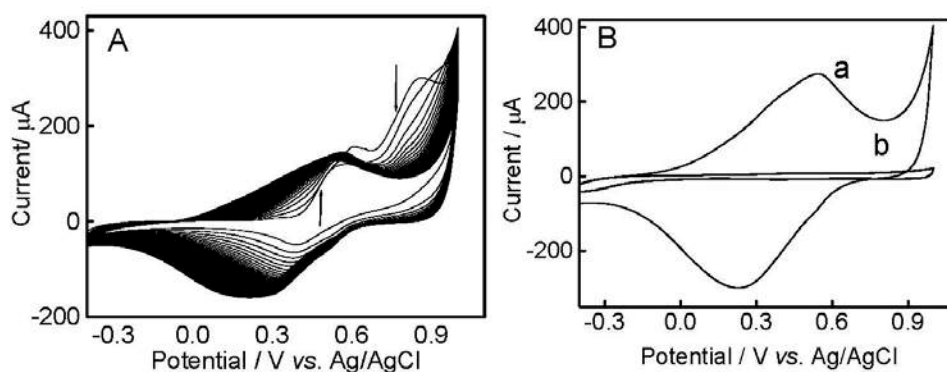


Figure 1A shows a gradual increase in current response between 0.0 and +0.7 V, where the two peaks of oxidation and reduction are observed, indicating the formation of electroactive material.

A decrease in the oxidation peak from +0.7 to +1.0 V is attributed to oxidation of the monomer (Figure 1A). The modification of the graphite electrode surface was confirmed in aqueous H_2SO_4 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figure 1B).

2.2. Electrochemical Characterization of the Modified Electrodes

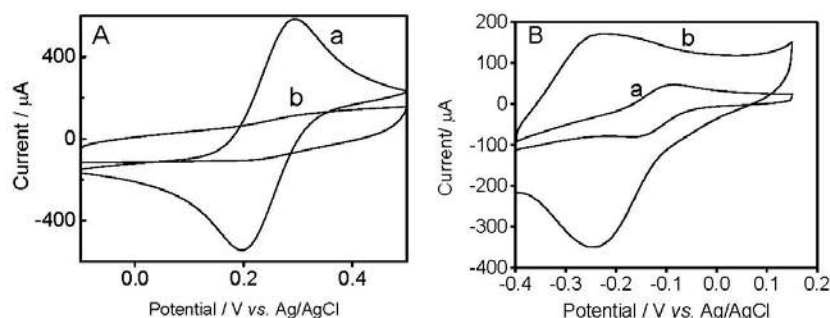
The modified graphite electrodes were studied in aqueous solution containing $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ or $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$ (Figure 2).

In aqueous solution containing $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, the current of the modified electrode decreases, as well as a larger separation of the peak potentials is observed, denoting difficulty and, eventually, hindrance of the electron transfer to the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ system. Such behavior is also seen in other polymer layers [38,39]. The current response of the electrode modified with poly(4-ATP) is higher in presence of $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$, when compared with bare graphite electrode.

This model of electrostatic interaction promotes the transport of the ruthenium complex to the electrode surface, resulting in the increase of the peak current. This may be emphasized when the behavior of poly(4-ATP) towards the redox couple potassium ferrocyanide/potassium ferricyanide

is evaluated, being obtained opposite results. These results indicate that the polymer has an anionic nature.

Figure 2. Cyclic voltammograms of bare graphite and graphite electrode modified with poly(4-ATP): (A) in aqueous solution containing $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ ($5.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) and KCl ($0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (B) in aqueous solution containing $Ru(NH_3)_6Cl_2$ ($5.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) and KCl ($0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Bare graphite electrode (a) and modified graphite electrode with 4-ATP (b) Scan rate: $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Sonmez *et al.* [40] described similar studies using hexaammineruthenium (III) chloride and sulfonated polyelectrolyte as dopant. Cation exchange properties were observed with hexaammineruthenium (III) chloride as an active electrolyte. An increase in the amplitude of the current signal was observed when compared to non-modified electrodes.

2.3. Immobilization and Hybridization

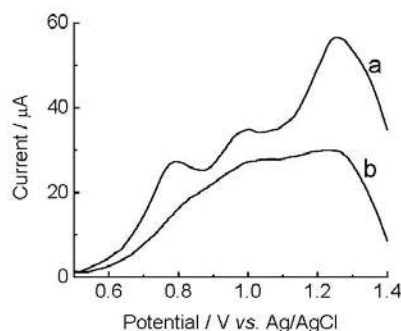
The electrochemical oxidation of natural and synthetic nucleic acids has also been widely studied on pyrolytic graphite electrodes, spectroscopic graphite impregnated with paraffin and glassy carbon [41].

Figure 3 shows the response of the immobilization of the EBV1 probe and the hybridization by direct detection with the complementary target EBV1:EBV2 onto modified graphite electrode. The anchor of the DNA onto the surface of the modified electrode is not well known but, in agreement with literature [42], the presence of amine groups favors the formation of covalent binding with oligonucleotides by linkages carboxamide or phosphoramidate.

The potential peaks at $+0.95$ and $+1.22 \text{ V}$ are attributed to guanosine and adenosine, respectively. These peaks decreased after 20 min at $57 \text{ }^\circ\text{C}$, in agreement with Oliveira-Brett *et al.* [43], who reported that hydrogen bonds are formed between complementary sequences during the hybridization of oligonucleotides, leading to a duplex, inside of which it is more difficult to oxidize the bases, decreasing the peak current of the guanosine and adenosine, after the hybridization.

Another reason for the higher current values obtained for single-stranded DNA is that the latter presents higher proximity and a higher degree of adsorption onto the electrode surface, due to its higher conformational flexibility, facilitating the charge transfer between the nitrogenous bases and the electrode [42–44].

Figure 3. Differential pulse voltammograms of graphite electrode modified with poly(4-ATP) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans, containing [EBV1, (oligonucleotide probe) $126 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]: before hybridization (a) and after 20 min of incubation with complementary target (EBV2, $378 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (b). Electrolyte: phosphate buffer ($0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), pH 7.4. Modulation amplitude: 0.05 mV. Pulse interval: 0.2 s. Scan rate $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



Ethidium bromide [(3,8-diamino-5-ethyl-6-phenyl phenatridinium bromide)] is one of the best known intercalating agents, first synthesized in 1952 by Watkins and Woolfe [45]. This intercalator is largely used to visualize the nucleic acids through agarose gel electrophoresis, due to formation of a fluorescent complex. Ethidium bromide does not require changes on the DNA structure, it is a cheap product, the system can be easily constructed and the intercalation is immediate [46].

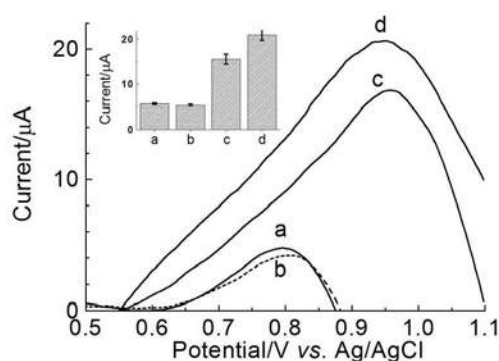
Planar aromatic organic compounds, which also include ethidium bromide, are redox-active markers used in DNA hybridization biosensors [47]. Ethidium bromide is electroactive and its electrochemical behavior was studied in several electrodes (glassy carbon [48], graphite [49], boron-doped diamond [50] and carbon nanotube [51]). Differential pulse voltammetry studies of ethidium bromide on graphite electrode modified with poly(4-aminotiophenol) were carried out by our group; this intercalator was observed to be electroactive in this modified electrode, presenting a oxidation peak in $+0.75 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

Figure 4 shows differential pulse voltammograms of indirect detection of target for EBV1, using ethidium bromide as electroactive indicator, in presence of complementary and non-complementary targets, as well as oligonucleotide containing one-base mismatch.

The results showed an increase in the current signal amplitude, in presence of complementary target, indicating the accumulation of ethidium bromide on the surface of the modified electrode containing duplex (Figure 4d). This accumulation indicates occurrence of hybridization process that causes intercalation of the mediator in the double-strand DNA, where a hydrophobic aromatic molecule is attracted to hydrophobic environment of nitrogenous base pairs of DNA from the hydrophilic aqueous environment [52].

Figure 4 also showed that the amplitude of the peak oxidation current for ethidium bromide is about four times higher for the complementary target, compared to the non-complementary target (see voltammograms b and d, as well as bar chart in Figure 4), indicating that the genosensor poly(4-ATP)/EBV1 discriminates complementary target from non-complementary target.

Figure 4. Differential pulse voltammograms of ethidium bromide ($1 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) onto graphite electrode modified with poly(4-ATP) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans, containing EBV1/probe ($126 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) before hybridization (a) and after hybridization with: non-complementary target ($189 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (b); oligonucleotide containing one-base mismatch EBV2Mis1 ($378 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (c); and complementary target (EBV2, $378 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (d). Electrolyte: phosphate buffer ($0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2 s; Scan rate $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Inset: Bar chart of differential pulse voltammograms responses using the oxidation signal from ethidium bromide.



In addition, the current peak for the complementary oligonucleotide (EBV2, Figure 4d) is about 35% higher (see bar chart, inset Figure 4), when compared to oligonucleotide containing one-base mismatch (EBV2Mis1, Figure 4c), indicating that the device has potential to differentiate mismatches, as required for detection of diseases caused by point mutations. The higher potential values observed after hybridization with the complementary target are due to the higher charge transfer resistance caused by formation of the duplex.

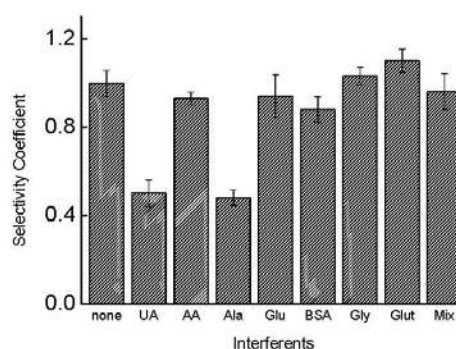
2.4. Interference Studies

Blood is a complex biological fluid formed by substances such as ascorbic acid, uric acid, urea, albumin and others that can affect the response of the biosensor [52]. In the literature, it is reported that interferences can influence the accuracy of biosensors [53–55].

The substances studied as potentially interfering with the electrochemical biosensor were: alanine, glucose, uric acid, ascorbic acid, BSA, glutamate, glycine and a mixture of these compounds (Figure 5).

With exception of the uric acid and alanine, the results indicate that the response of the biosensor is not significantly affected in the presence of interfering compounds, since the mixture containing all compounds studied also retained the selectivity for the detection of EBV1 (Figure 5) confirmed by mean selectivity coefficient (SC), calculated using the equation $SC = I_{c+i}/I_c$, where I_{c+i} and I_c are the bioelectrode response for the EBV2 target, in the presence and absence of each compound [53].

Figure 5. Selectivity coefficient for graphite electrode/poly(4-ATP)/EBV1 in the detection of complementary target in absence or presence of the interfering compounds: uric acid (UA) $1 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$; ascorbic acid (AA) $3.6 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$; glycine (Gly) $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; alanine (Ala) $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; glucose (Glu) $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; bovine serum albumin (BSA) $5 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$; glutamate (Glu) $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ and mixture. Electrolyte: phosphate buffer ($0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2 s; Scan rate $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Ethidium bromide ($1 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was used as indicator of the hybridization.



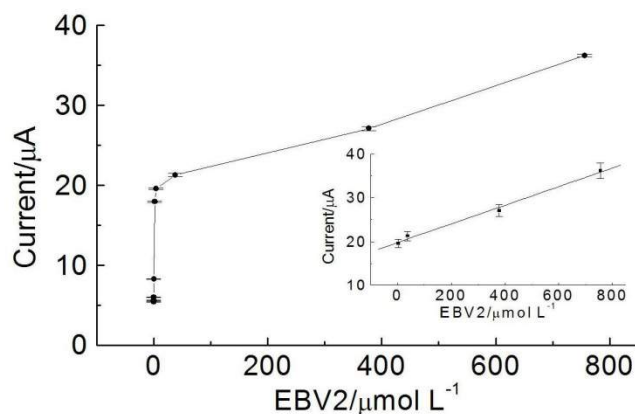
The selectivity studies were carried out in deionized water (pH 7). Based on the fact that the phosphate groups of the oligonucleotides are not protonated in this medium, as well as based on the pKa of the compounds studied, (alanine: 2.34 and 9.69; uric acid: 5.40 and 10.3; glycine: 2.34 and 9.60; glutamic acid: 2.16, 4.32 and 9.67; ascorbic acid: 4.17 and 11.57) [56] it is possible suggest that uric acid (positively charged) interacts with the phosphate groups, interfering with the formation of the duplex, while glutamic acid (dianion in pH 7), ascorbic acid (anion in pH 7) and BSA (isoelectric point: 4.85, negatively charged at pH 7) suffer repulsion of the phosphate and do not interfere.

The amino acids alanine and glycine show opposite behavior, although they have similar pKa and isoelectric points. The causes for this fact are not very clear, but a plausible hypothesis is that the slightly higher organic chain of alanine favors the interaction with the nitrogenous bases of the oligonucleotides, by van der Waals' interaction, hindering the formation of the double strand. Another factor is the lower solubility of alanine in water ($167.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$), when compared with glycine ($249.9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$), which is derived from a greater carbon chain, favoring its interaction with the nonpolar part of the oligonucleotides and competing with the formation of double-strand. The high water solubility of glucose ($909 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$) also suggests that the solubility is an important factor for a low interference in the formation of the duplex.

2.5. Calibration Curve

Figure 6 shows the calibration curves generated using the EBV-genosensor system. The current is proportional to concentrations of EBV2 in the range from 3.78 to $756 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, with correlation coefficient of 0.998, and detection limit of $17.32 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (three independent experiments).

Figure 6. Electrochemical response for the oxidation signal of ethidium bromide ($1 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) obtained after the hybridization of modified electrode containing the probe EBV1 ($126 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) with different concentrations of EBV2 (0, 0.0010, 0.010, 0.10, 1.89, 3.78, 37.8, 378 and $756 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Inset shows linear range of current peak vs. concentration of EBV2.



2.6. Genosensor Stability

In order for commercialization of a biosensor to be feasible, it should have good selectivity and stability during storage to assure reproducibility of measurements. Long-term lifetime is not only beneficial to biosensor transport and storage, but it also helps decrease per measurement costs, of critical importance in pharmaceutical and industrial applications [57].

The stability study of the biological sensor poly(4-ATP):EBV1 is shown in Figure 7. For this analysis, the electrodes were at a temperature of 8°C for 120 days. During this time, assays using ethidium bromide were performed.

Figure 7. Storage stability profile of genosensor at 8°C . The biosensors were stored in refrigerators when not in use.

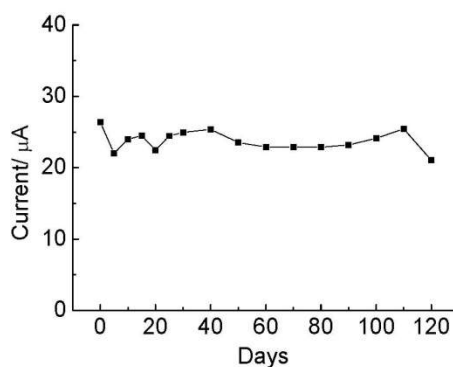
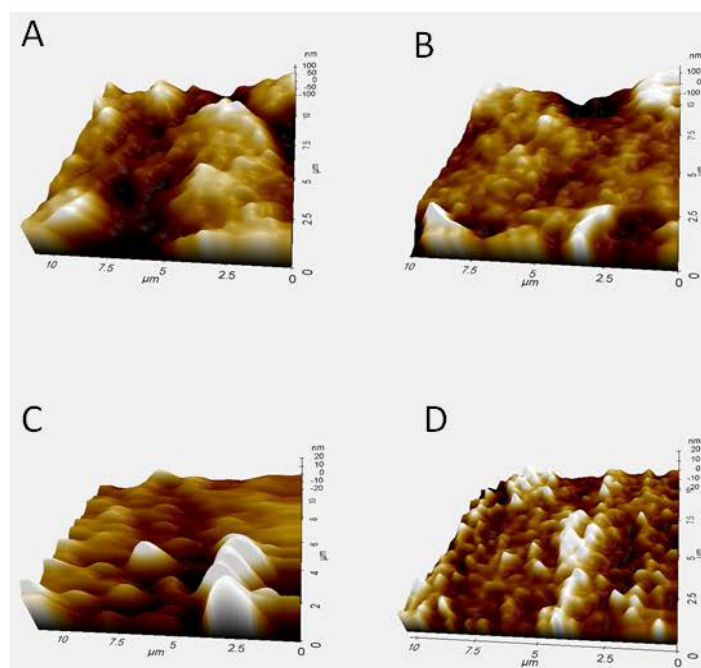


Figure 7 shows that the sensor response remains stable, without loss in biological activity during 120 days, indicating that the electrode modified with poly(4-aminothiophenol) contributed to this stability. Infrared spectroscopy studies of poly(4-aminothiophenol), conducted by our group, indicate that the electropolymerization occurs by formation of a ring-NH-ring bond, with the aromatic thiol being preserved in the polymer. The chemisorption of aromatic thiols at the carbon surface is known in the literature [58], and the presence of amine groups favors the formation of covalent binding with oligonucleotides, indicating that a modification of the electrode surface with poly(4-aminothiophenol) favors the stability and maintenance of biological activity of the device.

2.7. Morphological Characterization of the Genosensor Using Atomic Force Microscopy

Analyses of the surface for bare graphite electrode and graphite modified with poly(4-ATP) in absence or presence of the complementary target, are shown in Figure 8.

Figure 8. Atomic force microscopy (AFM) images of (A) graphite; (B) graphite/poly(4-ATP); (C) graphite/poly(4-ATP)/EBV1; and (D) graphite/poly(4-ATP)/EBV1:EBV2.



Roughness values obtained by AFM were: 102.3 ± 4.5 nm (bare graphite electrode), 69.7 ± 6.2 nm [modified electrode with poly(4-ATP)], 13.2 ± 3.5 nm [modified electrode with poly(4-ATP)/EBV1] and 31.8 ± 5.2 nm [modified electrode with poly(4-ATP)/EBV1:EBV2].

As shown in Figures 8B,C, the immobilization of EBV1 produces a decrease in the height and size of the clusters when compared to modified electrode with poly(4-ATP) without biomolecules

(Figure 8A), indicating that the oligonucleotide was successfully incorporated on the electrode surface. Both modified electrodes containing poly(4-ATP)/EBV1 (Figure 8C) and poly(4-ATP)/EBV1:EBV2 (Figure 8D) showed topographies with globular aspect, but the latter is less homogenous, presenting larger clusters. These modifications in the electrode surface can be justified based on the fact that double strand DNA molecules are more elongated and inflexible than single strand DNA, and can form larger structures, suggesting the occurrence of the hybridization event, in agreement with the results obtained in the electrochemical studies. It was demonstrated in the literature that DNA can penetrate conducting films of polypyrrole [59].

3. Experimental Section

3.1. Reagents

All reagents used were of analytical grade and used without further purification. Ultra-high purity water (Master System, Gehaka, Brazil) was used for the preparation of aqueous solutions. 4-Aminothiophenol (Acros Organics, Geel, Belgium) ($15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) was prepared in ethyl alcohol (PA) and H_2SO_4 solution ($0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) immediately before use. Phosphate buffer solution $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ was prepared at pH 7.4. All experiments were conducted at room temperature ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$). The oligonucleotides were synthesized by Invitrogen Life Technologies (São Paulo, Brazil) with the following sequences: probe: (EBV1): 5'-AGGGATGCCTGGACACAAGA-3', complementary target (EBV2): 5'-TCTTGTGTCCAGGCATCCCT-3', non-complementary target: 5'-ACAACCCGTTGG ACTAAC-3' and (EBV2Mis1): TCTTGTCTCCAGGCATCCCT-3'. Stock solutions of the $3.15 \times 10^{-4} \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ probe and $9.45 \times 10^{-4} \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ target oligonucleotides were prepared in SSC $6\times$ buffer ($0.9 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $90 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium citrate, pH 7.0) and stored in a freezer until use. Buffer components (CH_3COOH and CH_3COONa or Na_2HPO_4 and NaH_2PO_4) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA) (ACS purity) and prepared at pH 4.5 or 7.45, respectively. All reagents were used as received. The experiments were conducted at room temperature ($25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$).

Analysis of the nucleotide sequence (Table 1) was performed using the Blast program (Basic Local Alignment Search Tool, obtained in <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Table 1. The sequence of EBV1 has identity with Epstein-Barr virus.

Organism	BLASTn			
	Query cover	E value	Max ident	Access number
Epstein-Barr virus (EBV) genome, strain B95-8	100%	0.079	100%	V01555.2
Epstein-Barr virus (B95-8 isolate)	100%	0.079	100%	K03333.1
Epstein-Barr virus (AG876 isolate)	100%	0.079	100%	K03332.1
Epstein-Barr virus, artifactual joining of B95-8	100%	0.079	100%	M80517.1

E value (Expectation value): number of different alignments with scores equivalent to or better than the score that is expected to occur in a database search by chance. The lower the E value, the more significant is the score.

3.2. Apparatus

Electrochemical polymerization and voltammetric measurements were performed using a potentiostat (CH Instruments, model 460C, Austin, TX, USA), with a graphite disk (6 mm diameter) cut from a graphite rod (99.9995%, Alfa Aesar) as working electrode. Platinum was used as counter electrode. All potentials are referred to the silver-silver chloride reference electrode (Ag/AgCl). The graphite surface, prior to electropolymerization, was mechanically polished with alumina slurry (0.3 μm diameter), ultrasonicated, washed with distilled water and dried in the air. All solutions were degassed by nitrogen bubbling. Film morphology in absence or presence of biomolecules was assessed through atomic force microscopy (AFM) (Park System, model XE-70, Suwon, Korea).

3.3. Electrochemical Polymerization

The monomer solutions were degassed with N_2 prior to electropolymerization. Poly(4-aminothiophenol) films were electrodeposited onto the graphite electrodes from a solution containing 4-aminothiophenol (15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). The electrochemical experiments were conducted at room temperature (25 ± 1 $^\circ\text{C}$), 50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$, -0.4 and $+1.0$ V, 100 scans in three-compartment cell.

3.4. Electrochemical Characterization

The evaluation of ion transport was carried out in $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ solution (5.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) containing KCl 0.10 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (negative probe) or $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$ solution (5.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) containing KCl 0.10 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (positive probe).

3.5. Oligonucleotide Immobilization onto Graphite Electrode/Poly(4-ATP)

The immobilization of oligonucleotide was carried out by applying two consecutive layers of 13 μL of 3.15×10^{-4} $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ of the probe (EBV1) on the modified electrode surface and dried at the temperature of 37 ± 1 $^\circ\text{C}$. Then the electrode was immersed in 10 mL phosphate buffer with agitation (0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4) and dried in N_2 . The blocking of the binding of non-specific biomolecules on electrode surface was done with BSA 0.5% (w/v) for 3 h, then the electrode was immersed in 10 mL phosphate buffer with agitation (0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4) and dried in N_2 . After that, differential pulse voltammetry (DPV) measurements in one-compartment electrochemical cell connected to a potentiostat were obtained by using 1 mL phosphate buffer (0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4) as electrolyte to evaluate the electrochemical sign of modified electrode with the probe.

3.6. Investigation on the Hybridization of Oligonucleotide Immobilized onto Poly(4-Atp) Using Guanine and Adenine Monitoring or Ethidium Bromide as Redox Indicator

For the direct detection, 26 μL of target (EBV2, 378 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were applied to the modified electrode with EBV1, 126 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The hybridization was carried out at 57 $^\circ\text{C}$ for 20 min. Then the electrode was immersed in phosphate buffer (0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4) and dried in N_2 . The annealing temperature of the oligonucleotide (EBV1) was obtained by gene runner software (version 3.01, obtained in <http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/Gene-Runner.shtml>).

For the indirect detection, after the immobilization of the oligonucleotide probe (EBV1), 26 μL of target (EBV2, $378 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were applied on modified electrode. Hybridization was carried out at 57°C for 20 min. Then the electrode was immersed in phosphate buffer ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4) and dried in N_2 . In sequence, 18 μL of $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ethidium bromide solution (3,8-diamino-5-ethyl-6-phenylphenatridinium bromide) from Merck Millipore (Darmstadt, Germany) in ultra-high purity water were applied on the electrode surface during 5 min. Ethidium bromide binds nucleic acids via intercalative mode and causes major changes to DNA. To evaluate electrochemical sign of ethidium bromide, differential pulse voltammetry measurements were conducted using phosphate buffer ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4) as electrolyte for the evaluation of electrochemical sign of electrode modified containing EBV1:EBV2.

3.7. Specificity of the Biosensor

DNA hybridization is based on the ability of the probe to recognize its corresponding complementary target. To verify the specificity of the probe, 26 μL of the non-complementary target (5'-ACAACCCGTTGGACTAAC-3', $378 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) or one-base mismatch (EBV2Mis1: TCTTGT CTCCAGGCATCCCT-3', $189 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were added on surface of the sensor subjected to the same process of the complementary target. The hybridization was carried out at 57°C for 20 min. Detection of complementary target was done indirectly through the use of a mediator.

3.8. Analysis of Interfering Compounds

For this study, we added the complementary target concentration normally found in the blood to the solution of the interfering compounds ($3.6 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ascorbic acid, $1 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ uric acid, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ alanine, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ glutamate, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ glucose, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ glycine, $5.0 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$ albumine and mixture of these compounds). All experiments were conducted at room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$).

3.9. Stability Studies

To evaluate the biosensor stability, the modified electrodes containing DNA probe (EBV1) were stored at 4°C , protected from light and oxygen during 120 days.

3.10. Calibration Curve

To evaluate the sensitivity of genosensor, 26 μL of different concentrations of complementary target (EBV2), 0, 3.78, 37.8, 378 and $756 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ were added to the genosensor. Hybridization was carried out at 57°C , for 20 min. For the detection, ethidium bromide ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 18 μL) was added to the electrode surface, for 5 min.

4. Conclusions

The results showed that functionalized surfaces with poly(4-ATP) are interesting platforms for the development of a genosensor. The produced genosensor shows interesting properties, such as good stability, selectivity and sensibility. This is a promising technique of molecular analysis of a specific

biomarker for Epstein-Barr virus. Further studies will extend the system to determination of EBV in serum, plasma, and saliva samples.

Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Also, we would like to thank teacher Abílio Borghi for the review of the English manuscript.

Author Contributions

All authors contributed equally to this work.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Cohen, J.I. Epstein-Barr virus infection. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 481–492.
2. González, X.; Correnti, M.; Rivera, H.; Perrone, M. Epstein-Barr virus detection and latent membrane protein 1 in oral hairy leukoplakia in HIV+ venezuelan patients. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* **2010**, *15*, 297–302.
3. Dolcetti, R.; Masucci, M.G. Epstein-Barr virus: Induction and control of cell transformation. *J. Cell. Physiol.* **2003**, *196*, 207–218.
4. Al Moustafa, A.E.; Chen, D.; Ghabreau, L.; Akil, N. Association between human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in human oral carcinogenesis. *Med. Hypotheses* **2009**, *73*, 184–186.
5. Middeldorp, J.M.; Brink, A.A.T.P.; van den Brule, A.J.C.; Meijer, C.J.L.M. Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2003**, *45*, 1–36.
6. Young, L.S.; Rickinson, A.B. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 757–768.
7. Niller, H.H.; Wolf, H.; Ay, E.; Minarovits, J. Epigenetic deregulation of Epstein-Barr virus latency and development of autoimmune disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2011**, *711*, 82–102.
8. Toussirot, E.; Roudier, J. Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **2008**, *22*, 883–896.
9. Dai, X.Z.; Chen, S.H.; Ge, J.; Han, X.Q.; Zhou, X.H.; Wu, Z.Q.; Zhao, T. Expression pattern of HSAo-miR-9 and its association with BCL6 in EBV-positive and EBV-negative Burkitt's lymphoma cell lines. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **2013**, *33*, 661–666. (In Chinese)
10. Weiss, L.M.; Chen, Y.Y. EBER *in situ* hybridization for Epstein-Barr virus. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *999*, 223–230.
11. Calore, E.E.; Pérez, N.M.; Martins, J.F.; Cárdenas, P.G. Immunohistochemistry in a case of EBV encephalitis. *Rev. Chil. Infectol.* **2012**, *29*, 687–688.

12. Strong, M.J.; Xu, G.; Coco, J.; Baribault, C.; Vinay, D.S.; Lacey, M.R.; Strong, A.L.; Lehman, T.A.; Seddon, M.B.; Lin, Z.; *et al.* Differences in gastric carcinoma microenvironment stratify according to EBV infection intensity: Implications for possible immune adjuvant therapy. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003341.
13. Goulart, L.R.; Vieira, C.U.; Freschi, A.P.; Capparelli, F.E.; Fujimura, P.T.; Almeida, J.F.; Ferreira, L.F.; Goulart, I.M.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M. Biomarkers for serum diagnosis of infectious diseases and their potential application in novel sensor platforms. *Crit. Rev. Immunol.* **2010**, *30*, 201–222.
14. Drummond, T.G.; Hill, M.G.; Barton, J.K. Electrochemical DNA sensor. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1192–1199.
15. Kerman, K.; Kobayashi, M.; Tamiya, E. Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology. *Meas. Sci. Technol.* **2003**, *15*, R1–R11.
16. Wang, J. Survey and summary from DNA biosensor to gene chip. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 3011–3016.
17. Popovich, N.D.; Eckhardt, A.E.; Mikulecky, J.C.; Napier, M.E.; Thomas, R.S. Electrochemical sensor for detection of unmodified nucleic acids. *Talanta* **2002**, *56*, 821–828.
18. Wang, J.; Palecek, E.; Nielsen, P.E.; Rivas, G.; Cai, X.; Shiraishi, H.; Dontha, N.; Luo, D.; Farias, P.A.M. Peptide nucleic acid probes for sequence-specific DNA biosensors. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7667–7670.
19. Liu, L.; Shen, B.; Shi, J.; Liu, F.; Lu, G.-Y.; Zhu, J.-J. A novel mediator-free biosensor based on co-intercalation of DNA and hemoglobin in the interlayer galleries of [α]-zirconium phosphate. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2627–2632.
20. Wang, J.; Rivas, G.; Fernandes, J.R.; Paz, J.L.L.; Jiang, M.; Waymire, R. Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor. *Anal. Chim. Acta* **1998**, *375*, 197–203.
21. Chen, Z.-W.; Balamurugan, A.; Chen, S.-M. Detection of DNA by using bio-conducting polymer-Nile blue composite electrode; Nile blue as an indicator. *Bioelectrochemistry* **2009**, *75*, 13–18.
22. Niu, S.; Zhao, M.; Hu, L.; Zhang, S. Carbon nanotube-enhanced DNA biosensor for DNA hybridization detection using rutin-Mn as electrochemical indicator. *Sens. Actuators B* **2008**, *135*, 200–205.
23. Budnikov, H.C.; Evtugyn, G.A.; Porfireva, A.V. Electrochemical DNA sensors based on electropolymerized materials. *Talanta* **2012**, *102*, 137–155.
24. Nambiar, S.; Yeow, J.T. Conductive polymer-based sensors for biomedical applications. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 1825–1832.
25. Silva, F.B.; Vieira, S.N.; Filho, L.R.G.; Boodts, J.F.C.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M. Electrochemical investigation of oligonucleotide-DNA hybridization on poly(4-methoxy phenethylamine). *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 1173–1187.
26. Ahuja, T.; Mir, I.A.; Kumar, D. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. *Biomaterials* **2007**, *28*, 791–805.
27. Guimard, N.K.; Gomez, N.; Schmidt, C.E. Conducting polymers in biomedical engineering. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 876–921.

28. Ferreira, L.F.; Boodts, J.F.C.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M. Gold electrodes modified with poly(4-aminophenol): Incorporation of nitrogenated bases and an oligonucleotide. *Polym. Int.* **2008**, *57*, 644–650.
29. Franco, D.L.; Afonso, A.S.; Ferreira, L.F.; Gonçalves, R.A.; Boodts, J.F.C.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M. Electrodes modified with polyaminophenols: Immobilization of purines and pyrimidines. *Polym. Eng. Sci.* **2008**, *48*, 2043–2050.
30. Brito-Madurro, A.G.; Ferreira, L.F.; Vieira, S.N.; Goulart, L.R.; Madurro, J.M. Immobilization of purine bases in poly-4-aminophenol matrix. *J. Mater. Sci.* **2007**, *42*, 3238–3243.
31. Vieira, S.N.; Ferreira, L.F.; Franco, D.L.; Afonso, A.S.; Gonçalves, R.A.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M. Electrochemical modification of graphite electrodes with poly(4-aminophenol). *Macromol. Symp.* **2006**, *245–246*, 236–242.
32. Castro, C.M.; Vieira, S.N.; Gonçalves, R.A.; Madurro, A.G.B.; Madurro, J.M. Electrochemical and morphologic studies of nickel incorporation on graphite electrodes modified with polytyramine. *J. Mater. Sci.* **2008**, *43*, 475–482.
33. Ferreira, L.F.; Souza, L.M.; Franco, D.L.; Castro, A.C.H.; Oliveira, A.A.; Boodts, J.F.C.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M. Formation of novel polymeric films derived from 4-hydroxybenzoic acid. *Mater. Chem. Phys.* **2011**, *129*, 46–52.
34. Oliveira, R.M.L.; Vieira, S.N.; Alves, H.C.; França, E.G.; Franco, D.L.; Ferreira, L.F.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. *J. Mater. Sci.* **2010**, *45*, 475–482.
35. Santos, O.S.; Nascimento, R.; Rodrigues, L.P.; Santos, F.A.A.; Faria, P.C.B.; Martins, J.R.S.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M.; Goulart, L.R. Functional epitope core motif of the *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and its incorporation onto bioelectrodes for antibody detection. *PLoS One* **2012**, *7*, e33045.
36. Silva, T.A.R.; Ferreira, L.F.; Boodts, J.F.C.; Eiras, S.P.; Madurro, J.M.; Brito-Madurro, A.G. Poly(4-hydroxyphenylacetic acid): A new material for immobilization of biomolecules. *Polym. Eng. Sci.* **2008**, *48*, 1963–1970.
37. Coelho, N.M.; Melo, E.I.; Rezende, H.C.; Madurro, A.G.B.; Madurro, J.M. Surface properties of sensors based on aminophenol-polymerized film. *J. Solid State Electrochem.* **2012**, *16*, 945–951.
38. Sadki, S.; Schottland, P.; Brodie, N.; Sabouraud, G. The mechanism of pyrrole electropolymerization. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 283–293.
39. Oh, E.J.; Jang, K.S.; MacDiarmid, A.G. High molecular weight soluble polypyrrole. *Synth. Met.* **2002**, *125*, 267–272.
40. Sonmez, G.; Schottland, P.; Reynolds, J.R. PEDOT/PAMPS: An electrically conductive polymer composite with electrochromic and cation exchange properties. *Synth. Met.* **2005**, *155*, 130–137.
41. La-Scalea, M.A.; Serrano, S.H.P.; Gutz, I.G.R. Eletrodos modificados com DNA: Uma nova alternativa em eletroanálise. *Quím. Nova* **1999**, *22*, 417–424.
42. Tran, L.D.; Piro, B.; Pham, M.C.; Ledoam, T.; Angiari, C.; Dao, L.H.; Teston, F. A polytyramine film for covalent immobilization of oligonucleotides and hybridization. *Synth. Met.* **2003**, *139*, 251–262.
43. Oliveira-Brett, A.M.; Piedade, J.A.; Silva, L.A.; Diculescu, V.C. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 321–329.

44. Yang, M.; McGovern, M.E.; Thompson, M. Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry. *Anal. Chem. Acta* **1997**, *346*, 259–275.
45. Watkins, T.I.; Woolfe, G. Effect of changing the quaternizing group on the trypanocidal activity of dimidium bromide. *Nature* **1952**, *169*, 506–507.
46. Bugs, M.R.; Cornelio, M.L. Analysis of the ethidium bromide bound to DNA by photoacoustic and FTIR spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 512–520.
47. Minasyan, S.H.; Tavadyan, L.A.; Antonyan, A.P.; Davtyan, H.G.; Parsadanyan, M.A.; Vardevanyan, P.O. Differential pulse voltammetric studies of ethidium bromide binding to DNA. *Bioelectrochemistry* **2006**, *68*, 48–55.
48. Oliveira, C.B.; Nascimento, V.B. Electrochemical oxidation mechanism of ethidium bromide at a glassy carbon electrode. *Electroanalysis* **2013**, *25*, 2117–2123.
49. Hu, X.; Wang, Q.; He, P.; Fang, Y. Spectroelectrochemical study on the electrochemical reduction of ethidium bromide. *Anal. Sci.* **2002**, *18*, 645–650.
50. Zhang, C.; Liu, L.; Wang, J.; Rong, F.; Fu, D. Electrochemical degradation of ethidium bromide using boron-doped diamond. *Sep. Purif. Technol.* **2013**, *107*, 91–101.
51. Wei, Y.; Liu, Z.; Gao, C.; Wang, L.; Liu, J.; Huang, X. Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials: A new approach for detection of organic micropollutants. *Prog. Chem.* **2010**, *24*, 616–627.
52. Waring, M.; Makoff, A. Breakdown of pulse-labeled ribonucleic acid and polysomes in bacillus megaterium: Actions of streptolydigin, echinomycin, and triostins. *Mol. Pharmacol.* **1974**, *10*, 214–224.
53. Saxena, U.; Chakraborty, M.; Goswami, P. Covalent immobilization of cholesterol oxidase on self-assembled gold nanoparticles for highly sensitive amperometric detection of cholesterol in real samples. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 3037–3043.
54. Yoo, E.H.; Lee, S.Y. Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice. *Sensors* **2010**, *10*, 4558–4576.
55. Hsu, C.T.; Hsiao, H.C.; Lee, M.S.; Chang, S.F.; Lee, T.C.; Tsai, Y.S.; Zen, J.M. Assessing the quality of bionime self-monitoring blood glucose system rightest GM110: A critical evaluation of interference and ambient circumstances. *Clin. Chim. Acta* **2009**, *402*, 119–123.
56. Gokel, G.W. *Dean's Handbook of Organic Chemistry*, 2nd ed.; McGraw-Hill: New York, NY, USA, 2004.
57. Rubio-Retama, J.; Lopez-Cabarcos, E.; Lopez-Ruiz, B. High stability amperometric biosensor based on enzyme entrapment in Microgels. *Talanta* **2005**, *68*, 99–107.
58. Medard, C.; Morin, M. Chemisorption of aromatic thiols onto a glassy carbon surface. *J. Electroanal. Chem.* **2009**, *632*, 120–126.
59. Lassale, N.; Mailley, P.; Vieil, E.; Vilache, T.; Roget, A.; Correia, J.P.; Abrantes, L.M. Electronically conductive polymer grafted with oligonucleotides as electrochemical sensors of DNA. Preliminary study of real time monitoring by *in situ* techniques. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *509*, 48–57.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).