



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

**DESENVOLVIMENTO DE BIOELETRODO PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA
HEPATITE B USANDO POLI(4-AMINOFENOL) COMO MATRIZ**

Aluno: Erick Guimarães França

Orientadora: Prof. Dra. Ana Graci Brito Madurro

Co-Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

**Uberlândia-MG
2011**



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

**DESENVOLVIMENTO DE BIOELETRODO PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA
HEPATITE B USANDO POLI(4-AMINOFENOL) COMO MATRIZ**

Aluno: Erick Guimarães França

Orientadora: Prof. Dra. Ana Graci Brito Madurro

Co-Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

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

**Uberlândia-MG
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F814d França, Erick Guimarães, 1985-
2011 Desenvolvimento de bioeletrodo para detecção do vírus da
 hepatite B usando poli(4-aminofenol) como matriz / Erick Gui-
 marães França. – 2011.
 63 f. : il.

 Orientadora: Ana Graci Brito Madurro.
 Co-orientador: João Marcos Madurro.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Inclui bibliografia.
 1. Bioquímica - Teses. 2. Hepatite B - Diagnóstico - Teses. I.
 Madurro, Ana Graci Brito. II. Madurro, João Marcos. III. Univer-
 sidade 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

**DESENVOLVIMENTO DE BIOELETRODO PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA
HEPATITE B USANDO POLI(4-AMINOFENOL) COMO MATRIZ**

ALUNO: Erick Guimarães França

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Examinadores: Prof. Dr. Flávio Leandro Souza
Prof. Dr. Gustavo Von Poelhsitz

Data da Defesa: 29 / 07 / 2011

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

Ana Graci Brito Madurro

Agradecimentos

Dedico este trabalho a Deus, e agradeço a ele por me conceder a oportunidade de estar presente na vida de tantas pessoas queridas por mim e nos mostrar a estrela guia Jesus para que sejamos melhores para com o mundo e nós mesmos. Agradeço também a Mãe Maria por conceder tantos pedidos e sempre interceder pelo meu bem.

Aos formadores do meu ser, seja corpo ou mente, Aldo e Marta eu credito o meu sucesso também a vocês e agradeço por me proporcionarem toda a base moral e espiritual necessária para o cumprimento de meu papel de cidadão. A dedicação de vocês ainda resultará em frutos diversos e prósperos para a sociedade. Meu obrigado por assumirem com tamanha responsabilidade minha criação e também por apoiarem o meu crescimento profissional com carinho.

Agradeço a Adele, minha querida companheira, que sempre se mostra um porto seguro em situações de dificuldade e continua sendo o meu farol a apontar um lugar melhor. Obrigado pela companhia e pelo carinho despendido ao longo deste período, pelo suporte e paciência nos momentos de minha ausência ou irritação.

Um bom trabalho se apresenta também pela força de seu grupo, e neste caso eu só tenho a agradecer aos meus amigos e colegas de trabalho. Neste laboratório pude conhecer novas companhias e me aprofundar em outras, sendo que a presença de todos se mostrou indispensável para que este trabalho exista como ele é. Obrigado a todos vocês: Ana Consuelo, Ana Cristina, Deusmaque, Diego, Heden, Isabelas, Lara, Lucas, Luciano, Miquéias, Pâmela, Renata, Sabrina, Vinícius e Zé.

Agradeço em especial a Ana Cristina por me acompanhar na construção de todo este trabalho e colaborar com sua força de vontade para que pudéssemos obter sucesso nos resultados apresentados. Obrigado pela paciência e perseverança.

Aos membros da banca, meu muito obrigado por aceitarem o convite para o encerramento deste mestrado. É uma grande honra poder contar com vocês na comissão examinadora e agradecemos por todas as contribuições feitas ao nosso trabalho.

Agradeço de forma especial também à profa. Ana Graci e ao prof. João Marcos pelo convite feito a mim para que eu pudesse desenvolver este trabalho. Fico extremamente feliz de ter feito parte do grupo de pesquisa LAFIP e ressalto que a experiência teve resultados positivos e satisfatórios. Obrigado pela luz do conhecimento, paciência no dia-a-dia, pelo aprendizado e pela confiança.

Gostaria de agradecer a todos do Programa de pós-graduação em genética e bioquímica pela oportunidade e pelo suporte a este trabalho. E também agradeço aos órgãos financiadores deste projeto, CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Sumário

Apresentação	Erro! Indicador não definido.
Capítulo 1: fundamentação teórica	2
1. Hepatite B	3
2. Polímeros	8
3. Sensores biológicos	11
3.1. Tipos de transdutores	12
3.2. Tipos de sensores biológicos.....	13
3.3. Técnicas para imobilização de biomoléculas.....	16
Referências Bibliográficas	19
Capítulo 2: Preparation of electrochemical bioelectrode for detection of target DNA sequences specific for hepatitis B onto poly(4-aminophenol) matrix	28
Resumo	30
Abstract	31
1. Introduction	31
2. Experimental	34
2.1 Materials	34
2.2 Apparatus	35
2.3 Preparation of poly(4-aminophenol).....	36
2.4. Oligonucleotide probes immobilization on graphite electrode modified with poly(4-aminophenol)	36
2.5. Hybridization detection of oligonucleotides immobilized on poly(4-aminophenol)	37
3. Results and discussion	37
4. Conclusions	47
Acknowledgments	48
References	48

Índice de figuras e tabelas

Capítulo 1:

Figura 1. A evolução da infecção pelo vírus da hepatite B onde HBeAg representa a presença de antígenos em soro sanguíneo para hepatite B	4
Tabela 1: Gasto anual de dólares por paciente no tratamento de hepatite B em diversos países	5
Figura 2. Período de quantificação para exames sorológicos de antígenos, anticorpos e DNA	7
Figura 3. Possível estrutura do poli(4-aminofenol)	11
Figura 4. Esquema de funcionamento de um sensor biológico	11
Figura 5. Esquema para o funcionamento de um sensor enzimático	14
Figura 6. Estrutura química do brometo de etídio	15
Figura 7. Esquema para imobilização de biomoléculas por adsorção	16
Figura 8. Imobilização de biomoléculas por ligação cruzada.	17
Figura 9. Esquema para a imobilização de biomoléculas por oclusão	18
Figura 10. Imobilização de biomoléculas por ligação covalente	18

Capítulo 2:

Figure 1. Differential pulse voltammograms of graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans, containing poly(GA): (a) before hybridization and (b) after 15 minutes of incubation with complementary target poly(CT) or non-complementary poly(GA) (c)	38
Figure 2. Differential pulse voltammograms of ethidium bromide onto graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans, containing poly(GA) before (a) or after hybridization with non-complementary poly(GA) (b) or complementary target poly(CT) (c)	39
Figure 3. (A) Differential pulse voltammograms of ethidium bromide onto graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans, containing poly(GA) before or after hybridization with the target poly(CT) in concentrations different.	40
Figure 4. Differential pulse voltammograms of graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans, containing HepB1 (probe) (a) HepB1 (probe):HepB2 (target) (b) and HepB1 (probe):NonHepB (non-complementary target) (c)	42

Figure 5. Differential pulse voltammograms of ethidium bromide onto modified graphite electrode with poly(4-aminophenol)/HepB1 before hybridization (a) or after hybridization with complementary target HepB2 (b).....	48
Figure 6. (A) Differential pulse voltammograms of ethidium bromide onto graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans, containing ssDNA (HepB1) before or after hybridization with concentrations different of DNA target (HepB2).....	44
Figure 7. Differential pulse voltammograms of accumulated ethidium bromide on modified graphite electrode containing the probe HepB1 before hybridization (a) and after hybridization with: three-base mismatches (Mis3HepB) (b) and complementary oligonucleotide (HepB2) (c).....	48
Figure 8. AFM topographical images of modified graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) without biomolecules (A); after immobilization with biomolecules: HepB1 (B); after hybridization of HepB1 with HepB2 (C).	48

Lista de abreviaturas

- AFM – *atomic force microscopy* (microscopia de força atômica)
- ALP – fosfatase alcalina
- ALS – aspartato aminotransferase
- ALT – alanina aminotransferase
- DNA – *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
- DPV – *differential pulse voltammetry* (voltametria de pulso diferencial)
- dsDNA – *double-strand* DNA (dupla-fita de DNA)
- HBV – *hepatitis b virus* (vírus da hepatite B)
- HepB1 – DNA sonda do vírus da hepatite B
- HepB2 – DNA alvo do vírus da hepatite B
- HIV – *Human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)
- HPV – *human papillomavirus* (vírus do papiloma humano)
- LEP – *light-emitting polymers* (polímeros emissores de luz)
- Mis3HepB – DNA alvo, com 3 pares de bases trocadas, do vírus da hepatite B
- NonHepB – DNA alvo não específico do vírus da hepatite B
- PCR – *polimerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)
- RNA – *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)
- SSC – saline-sodium citrate buffer (tampão citrato de sódio salino)
- ssDNA – *single-strand* DNA (simples-fita de DNA)
- USA – *United States of America* (Estados Unidos da América)
- γGT – γ-glutamyl transferase

Apresentação

Hepatite B é considerada um problema de saúde pública, visto que acomete aproximadamente 2 bilhões de pessoas em todo o mundo. O espectro da doença é muito variável, abrangendo desde um estado de baixo viremia a uma hepatite crônica progressiva, podendo evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular.

O diagnóstico da hepatite B é feita por vários testes serológicos, tais como a quantificação dos marcadores hepáticos (enzimas específicas) e a determinação da quantidade de vírus no sangue por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase.

O desenvolvimento de biossensores para diagnóstico de doenças tem sido alvo de estudo por vários grupos de pesquisa, buscando dispositivos sensíveis, específicos, de baixo custo e de fácil manuseio. As técnicas eletroquímicas são as que concentram o maior número de trabalhos realizados devido à facilidade no processo e na instrumentação, resultados rápidos e confiáveis.

Este trabalho visou a utilização de eletrodos modificados com poli(4-aminofenol) para a imobilização e detecção de oligonucleotídeos modelo ou específicos para hepatite B. Oligonucleotídeos sintéticos foram imobilizados e detectados com sucesso, por meio de detecção direta ou indireta, usando brometo de etídio como indicador da hibridação da dupla fita do DNA.

Voltametria de pulso diferencial foi usada para a caracterização de eletrodos modificados contendo sondas poli(GA) ou HepB1 antes e após hibridização com o alvo complementar poli(CT) ou HepB2. Os bioelectrodos produzidos apresentaram limite de detecção de $0,18 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ para o poli (CT) e $2,613 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ para HepB2. Em adição, o sistema é capaz de detectar mutação pontual; uma característica interessante para diagnóstico de doenças genéticas.

CAPÍTULO 1:
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. HEPATITE B

A hepatite B é causada por um vírus com genoma de DNA bicatenar e que pertence à família *Hepadnaviridae*, sendo o único vírus causador de hepatite a possuir DNA como material genético. Tem formato esférico e 3,2 kilobase, sendo a sua estrutura básica um envelope bilipídico e tamanho de aproximadamente 40 nm. Este vírus tem uma grande seletividade para a invasão de hepatócitos, sendo classificado em 8 genótipos (A-H) e tem múltiplos subgenótipos (TIOILLAIS *et al.*, 1985, LAU *et al.*, 1993, FIEL, 2010).

O vírus da hepatite B chega ao fígado através da corrente sanguínea e se estabelece um período de incubação em que o indivíduo ainda não manifesta qualquer sintoma. Uma vez dentro dos hepatócitos, o vírus se multiplica, proteínas do vírus são expressas na superfície da membrana das células, o que causa resposta imunológica contra os hepatócitos infectados e ao dano celular com consequente liberação do DNA viral na corrente sanguínea. O período de infecção até a manifestação de altos níveis de transaminases hepáticas é de 1 a 6 meses (KRUGMAN *et al.*, 1979, HOOFNAGLE *et al.*, 1991).

A hepatite B em seu estágio agudo muitas vezes não é reconhecida por causa da não especificidade de seus sintomas, comumente são náuseas, vômito, dores abdominais, anorexia e mal-estar, e que na maioria dos casos não permanecem por um período superior a 5 dias. Muitos pacientes descobrem evidências sorológicas do vírus, ou que possuem hepatite B crônica, depois de vários meses, ou mesmo anos (MCMAHON *et al.*, 1985).

Caso a doença se manifeste de forma crônica, ela tem por definição a presença de antígenos relacionados ao vírus da hepatite B no soro sanguíneo, evidências de necroinflamação crônica apontada por uma biópsia ou persistente presença de alanina aminotransferase (ALT) em altos níveis sorológicos (HOOFNAGLE, 2003).

A figura 1 mostra como se dá a evolução da infecção por hepatite B em número de incidências por cada 100 pessoas por ano.

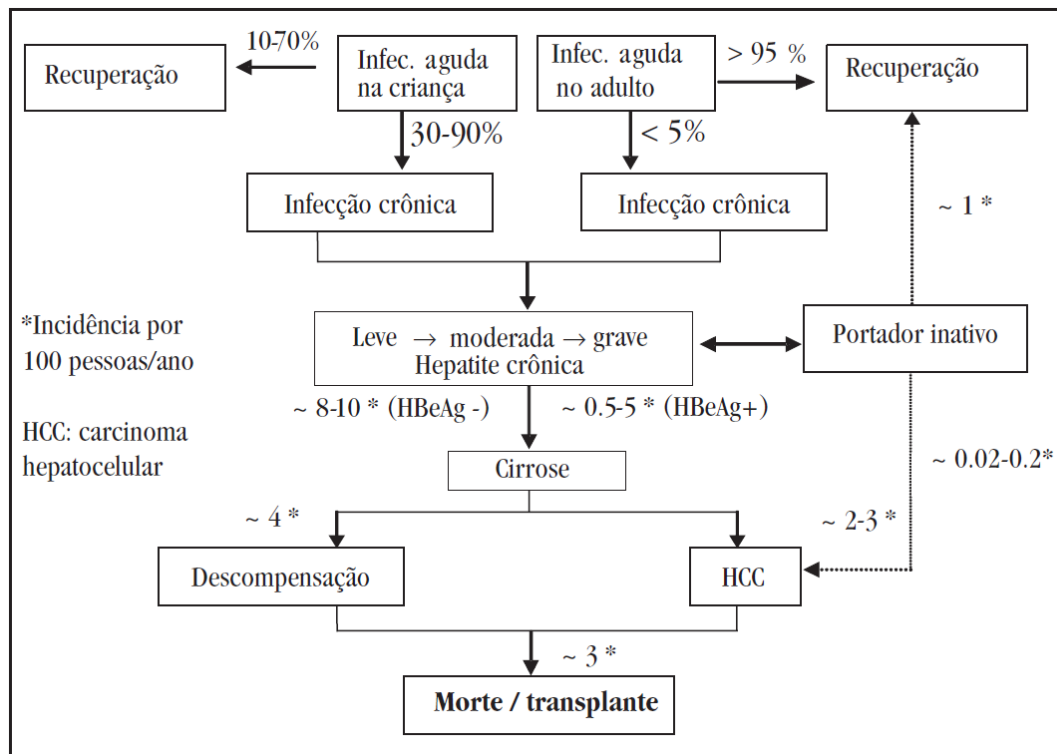


Figura 1. A evolução da infecção pelo vírus da hepatite B onde HBeAg representa a presença de antígenos em soro sanguíneo para hepatite B (FERREIRA & BORGES, 2007).

A infecção pelo vírus da hepatite B é hoje considerada um problema de saúde em escala mundial, atingindo consequências econômicas consideráveis, como explicitadas na tabela 1 (LESMANA *et al.*, 2006 ARMSTRONG *et al.*, 2006, TREPO & PRADAT, 1999, CASTELO *et al.*, 2007). As regiões de maior prevalência dos casos de hepatite B são a Ásia, África, extremo sul da Europa e América Latina, onde os indivíduos portadores do antígeno para hepatite B variam de 2 a 20%. Já em áreas de menor incidência, como a América do Norte, extremo norte da Europa e áreas oceânicas, a taxa se mantém em aproximadamente 0,1% da população total (GANEM & PRINCE, 2004).

Tabela 1: Gasto anual de dólares por paciente no tratamento de hepatite B em diversos países (CASTELO *et al.*, 2007).

País/ano	Gasto por paciente
França/2001	US\$ 141.875
Austrália/2001	US\$ 141.101
Reino Unido/2001	US\$ 138.944
Itália/2001	US\$ 113.161
Estados Unidos/2000	US\$ 106.532
Canadá/2001	US\$ 103.996
Hong Kong/2000	US\$ 91.200
Coréia do Sul/2001	US\$ 72.546
Cingapura/2003	US\$ 66.264
Espanha/2001	US\$ 56.188
Brasil/2005	US\$ 48.060

O que caracteriza esta diferença é que nas regiões hiperendêmicas ocorre a maior incidência da doença em crianças e adolescente com menos de 15 anos, enquanto nas regiões de baixo acometimento de hepatite B os grupos que representam a maioria dos contaminados são os jovens e os adultos, onde os maiores representantes dos contaminados são os usuários de drogas intravenosas, homens homossexuais e imigrantes provindos de áreas hiperendêmicas (CHANG, 2007).

Em números mundiais, há uma expectativa de que aproximadamente 2 bilhões de pessoas já entraram em contato com o vírus da hepatite B e destas 400 milhões adquiriram sua forma crônica. Estima-se que entre 500 mil e um milhão de mortes são atribuídas à hepatite B anualmente e ainda mais 65 milhões, das pessoas que estão cronicamente infectadas atualmente, podem evoluir para óbito (FRANCHIS *et al.*, 2003, KANE, 1995).

No ano de 2007, um estudo apontou as causas de mortalidade em dois tipos de grupos de chineses, os saudáveis e os que apresentavam anticorpos para o vírus da hepatite B, em um período de 12 anos. Os resultados mostraram que existe uma propensão 22 vezes maior de um indivíduo, com altos níveis de anticorpo para o vírus da hepatite B, desenvolver um câncer no fígado que uma pessoa saudável. Enquanto esta proporção para o desenvolvimento de cirrose e de uma hepatite crônica chega a 5,4 vezes superior, a relação entre outras

causas de morte, que não relacionadas ao fígado, se mantêm próxima de 1 (ILOEJE *et al.*, 2007).

No intuito de reduzir os altos números de incidência desta doença, os maiores esforços nas últimas décadas se concentraram na expansão da abrangência de vacinação em crianças, que são as maiores vítimas da doença em regiões hiperendêmicas. Até o ano de 2007, 171 países já haviam inserido vacina contra o vírus da hepatite B em seus programas nacionais de imunização. Antes disso, mais precisamente até 2006, estima-se que apenas 60% das crianças no mundo eram totalmente imunizadas (WHO, 2007).

Um dos casos de maior sucesso da implantação de vacinação em massa se deu em Taiwan, onde as taxas de incidência da doença caíram de 9,8% para 0,5% em indivíduos de idade menor que 15 anos. Outro caso exemplar é a região do Alaska, que apresentou uma redução de 16% para 0% (NI *et al.*, 2007, NAMGYAL, 2003).

Nos últimos 10 anos, o número de tratamentos aprovados para hepatite B aumentou consideravelmente. O maior problema das terapias da década passada era a utilização de antivirais em pacientes com insuficiência hepática e cirrose, sendo que atualmente existem antivirais potentes e seguros para este tipo de paciente, ocorre uma diminuição no número de indivíduos com necessidade de transplante de fígado relacionado à hepatite B (KIM *et al.*, 2009).

O tratamento antiviral em pacientes com sintomas expressivos, como falência aguda do fígado e cirrose descompensada, pode estabilizar as funções do fígado, e é importante no pré-operatório do transplante de fígado e em alguns casos até mesmo retirar temporariamente pacientes da fila de espera pelo transplante. No pós-operatório o tratamento é importante para evitar a re-infecção do indivíduo após o transplante. Durante o tratamento e por no mínimo 24 semanas após, é importante o monitoramento de pacientes para a prevenção contra a reagudização da infecção (YAO *et al.*, 2001, FONTANA *et al.*, 2002).

Os testes preliminares para verificação da função hepática ou hepatite B, realizados sobre o soro ou plasma sanguíneo do paciente, se baseiam na quantificação de bilirrubina, albumina, transaminases como aspartato aminotransferase (ALS) e alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), algumas vezes em associação com γ -glutamil transferase (γ GT) (BAYNES & DOMINICZAK, 2000) e com a técnica de PCR (*polimerase chain reaction*). Esta última permite a determinação da quantidade de vírus específicos para hepatite B, no sangue do paciente (JAFRI & LOK, 2010).

Outro exame sorológico muito importante é a dosagem de proteínas (antígenos - Ag) do vírus da hepatite B ou anticorpos contra estas proteínas. São considerados 3 antígenos principais, E-*antigen* (e), *surface* (s) e *core* (c), sendo relacionados na figura 2 de acordo com seu surgimento após a infecção aguda (SHIFFMAN, 2010).

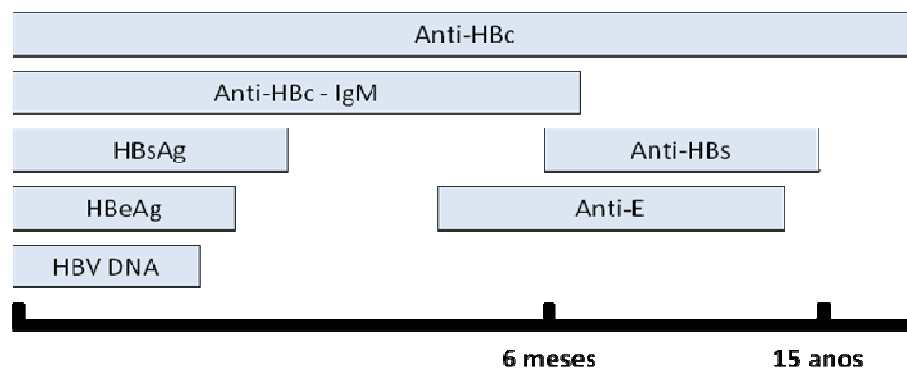


Figura 2. Período de quantificação para exames sorológicos de antígenos, anticorpos e DNA (SHIFFMAN, 2010).

A soro-positividade para HBsAg indica a infecção, enquanto a presença de HBeAg indica a replicação do vírus da hepatite B. A detecção de anti-HBc e anti-HBs mostra que o indivíduo já foi infectado no passado. Caso os exames apontem a soro-positividade para HBsAg por mais de 6 meses, o paciente é considerado como um portador de hepatite B crônica (FIEL, 2010).

As estratégias para a detecção dos marcadores citados anteriormente, podem ser feitas com base em métodos espectrofotométricos,

quimioluminescentes, cromatográficos, fluorescentes, eletroquímicos, dentre outros.

Muitos estudos são voltados para o desenvolvimento dos eletrodos modificados com filmes poliméricos, visando o desenvolvimento dos biossensores eletroquímicos para diagnóstico de doenças.

2. POLÍMEROS

Os polímeros são macromoléculas formadas por várias unidades chamadas de monômeros, que são ligadas covalentemente. Estas macromoléculas são encontradas na natureza com diversas funções como a celulose, o glicogênio, fibras, borracha etc. Mas também são produzidas pelo homem como o polietileno, polipropileno, poliuretano etc. A síntese de polímeros sintéticos pode ocorrer por dois mecanismos distintos: síntese por adição ou síntese por condensação (BOWER, 2002).

A síntese por adição ocorre quando os monômeros possuem uma ou mais insaturações, sendo que se partindo de mais de um tipo de monômeros o resultado será um copolímero. Entretanto, para que ocorra esse tipo de polimerização, há a necessidade de gerar carga em uma molécula ou mesmo um radical, e então esta mesma buscar uma ligação neutra para a reação acontecer, gerando outra molécula radicalar ou com carga. A partir daí o processo se torna uma sequência chamada de “etapa de propagação” (SPERLING, 2006).

Na síntese por condensação verificamos que a reação acontece eliminando uma molécula simples. No caso dos poliésteres pode-se observar a eliminação de H_2O , já que se trata de uma reação de esterificação. Em outros casos pode ocorrer a eliminação de NH_3 , metanol etc (SPERLING, 2006).

Os polímeros sintéticos são estruturas químicas muito importantes no cotidiano da sociedade e assumem papéis variados em meio à população. Dificilmente seria possível imaginar alguma situação cotidiana em que não houvesse algum polímero envolvido. Dentro de um mercado tão amplo, inovações tecnológicas acontecem com tamanha velocidade que é notável o quanto, cada vez mais, os novos polímeros são criados e se engajam em diferentes setores.

Dentre tantas diferentes aplicações, podemos encontrar uma área de pesquisa específica onde o foco dos estudos são os polímeros condutores. A descoberta dos primeiros polímeros condutores se deu no fim da década de 70, e desde então tem motivado a pesquisa em todo o mundo sob a intenção de diversas aplicações. Polímeros condutores como a polianilina, poliacetileno e polipirrol foram extensamente estudados. Há relatos de que um octâmero de anilina foi produzido por Letheby em 1862 (SHIRAKAWA *et al.*, 1977, FROMER & CHANCE, 1986).

Com o seu surgimento, os polímeros condutores logo foram considerados como possíveis substitutos para os condutores e semi-condutores metálicos, mas com diferenças em relação aos metais do ponto de vista das propriedades mecânicas, ópticas e térmicas, tornando-se um grande atrativo para diferentes grupos de pesquisa (KUMAR & SHARMA, 1998).

Diversas aplicações deste tipo de polímero são utilizadas, tais como a proteção de metais recobrando-os, sensores eletroquímicos, LEP (polímeros emissores de luz) em telas de aparelhos eletrônicos, músculos artificiais etc.

Um polímero condutor não mostra condutividade em seu estado neutro, geralmente sua condutividade resulta de oxidação (dopagem p) ou redução (dopagem n), em que é gerada uma carga em sua estrutura de cadeia, que deve possuir insaturações ou anéis aromáticos, sendo os elétrons π de duplas ligações responsáveis pela condutividade (ATKINS & JONES, 2006). Neste caso, é possível observar também mudanças em suas propriedades ópticas, que possibilitam a sua aplicação em *displays* de LEP e sensores ópticos. A presença de contra-íons balanceia a carga da estrutura do polímero dopado.

Os polímeros condutores podem ter afinidade com uma gama muito grande de espécies químicas, como gases, biomoléculas, moléculas orgânicas, íons específicos etc. Anticorpos, ácidos nucleicos, enzimas, ciclodextrinas e outras moléculas biológicas e sintéticas podem interagir com filmes poliméricos condutores. A interação pode ser por afinidade de grupos laterais, ligação covalente ou mesmo eletrostática, o que torna estes polímeros bastante úteis em uma área de sensores, justamente pela sua capacidade condutiva (JUNIOR *et al.*, 1997).

Ao analisar as possíveis rotas para a síntese de um polímero condutor pode-se encontrar as metodologias químicas e também eletroquímicas. A síntese química é efetiva, porém não se apresenta como uma alternativa quantitativamente reprodutiva. Geralmente se usa persulfato de amônio e cloreto de ferro III como agentes oxidantes e este fato é tratado como desvantagem, já que existe a necessidade da adição de agentes químicos externos para que a reação ocorra. Já a síntese eletroquímica dá a possibilidade de uma dopagem finamente ajustada pela escolha de um potencial elétrico, além de não contar com agentes externos e dispor a possibilidade de escolher a espessura do filme gerado na superfície de um eletrodo apenas ajustando parâmetros eletroquímicos como número de ciclos, faixa potencial de varredura etc (LANGE *et al.*, 2008). Durante o processo de síntese eletroquímica de polímeros, os monômeros são oxidados para formarem cátions, e em seguida reagem formando oligômeros que se depositam na superfície de um eletrodo na forma de polímeros (PENG *et al.*, 2008).

Desde 2006, o grupo de pesquisa responsável por este trabalho publica artigos envolvendo a eletropolimerização de aminofenóis e bem como de outros grupos de moléculas como os ácidos hidroxifenilacéticos (VIEIRA *et al.*, 2006, BRITO-MADURRO *et al.*, 2007, SILVA *et al.*, 2009, OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Estes estudos indicam que os aminofenóis são moléculas que possuem dois grupos funcionais oxidáveis (-OH e -NH₂) ligados a um anel aromático, o que confere um interessante perfil para eletropolimerização (VIEIRA *et al.*, 2006). Filmes poliméricos derivados de aminofenóis têm se mostrado eficiente na interação com biomoléculas (BRITO-MADURRO *et al.*, 2007, FRANCO *et al.*, 2008). Em um estudo específico o 4-aminofenol mostrou ser promissor na aplicação de sensores para detecção de DNA com uma incorporação de bases nitrogenadas e oligonucleotídeos melhorando a sensibilidade eletroquímica do material produzido (FERREIRA *et al.*, 2008).

Chen e colaboradores propuseram a possível estrutura para o polímero do 4-aminofenol (figura 3), baseando-se em técnicas eletroquímicas e espectrofotometria. Apesar da proposta de uma estrutura interessante, mais estudos devem ser feitos para que se tenha certeza do mecanismo de formação deste polímero (CHEN *et al.*, 2008).

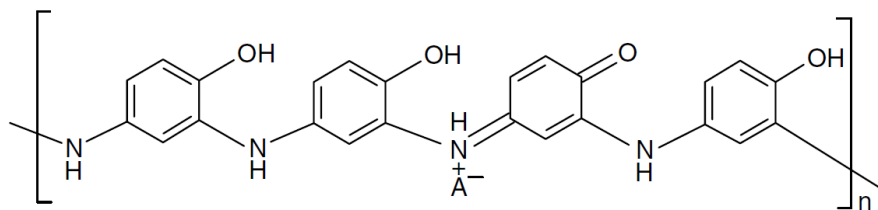


Figura 3. Possível estrutura do poli(4-aminofenol) (CHEN *et al.*, 2008).

Em adição, os polímeros têm-se mostrado excelentes materiais para a utilização como plataforma para o desenvolvimento de sensores biológicos.

3. SENSORES BIOLÓGICOS

Os sensores biológicos, ou biossensores, são dispositivos capazes de reconhecer analiticamente elementos de origem biológica. Estes dispositivos são dotados de uma biomolécula de reconhecimento (sonda) e um transdutor físico-químico, e têm a finalidade de determinar a presença, atividade e concentração de um analito em uma solução, o que torna possível sua aplicação em diversos setores industriais e médicos (THEVENOT *et al.*, 2001).

O reconhecimento do analito pode ser por meio de um processo de interação entre um antígeno e anticorpo, por exemplo, ou também através de uma reação biocatalítica, que tem como exemplo um sistema enzima/substrato. Esta interação pode levar a alguma alteração estrutural ou na solução, que será traduzida em um sinal elétrico através de um transdutor, podendo ser ele eletroquímico, ótico, térmico ou de massa (D'ORAZIO, 2003).

Um biossensor é composto de partes diferentes que cumprem papéis indispensáveis para o seu funcionamento, de acordo com o esquema apresentado a seguir:

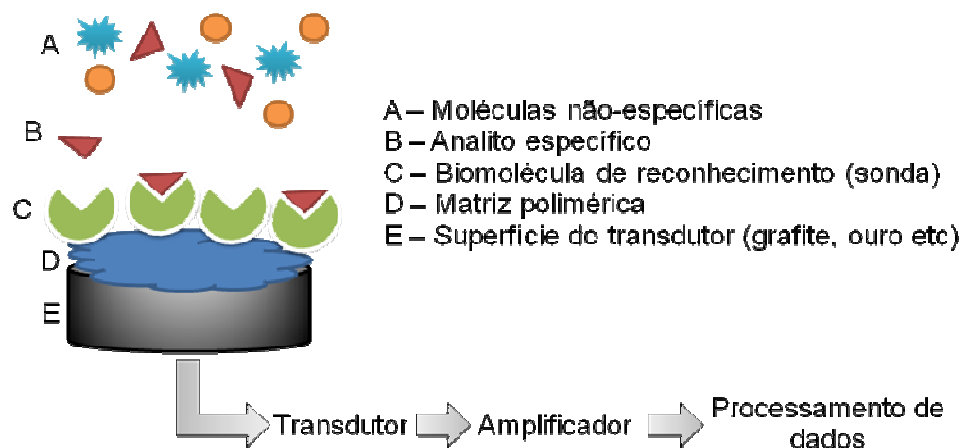


Figura 4. Esquema de funcionamento de um sensor biológico.

Os biossensores têm se mostrado muito promissores em diversas áreas: diagnósticos medicinais, identificação de patógenos em alimentos na indústria alimentícia e no controle ambiental de detritos e poluentes. Estes sensores apresentam importantes perspectivas futuras para o aumento da qualidade de vida da sociedade, reduzindo gastos por se tratar de uma metodologia seletiva e precisa (SHANKARAN *et al.*, 2007).

3.1. Tipos De Transdutores

Transdutores amperométricos: Estes biossensores fazem sua detecção medindo a corrente elétrica produzida durante a oxidação ou redução de um produto ou reagente em um determinado potencial elétrico, seja um valor fixo ou em uma faixa de potencial. O fator determinante em um sensor amperométrico, neste caso, é a transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo e o sistema biológico. Esta transferência geralmente envolve um mediador ou um polímero condutor. Dentro deste contexto, vários filmes poliméricos usados na imobilização de biomoléculas afetam de forma significativa a resposta de biossensores, provavelmente também por mudarem a disposição e a forma em que a enzima se liga ao eletrodo (GERARD *et al.*, 2003).

Transdutores de massa: Os transdutores piezo-elétricos são capazes de realizar a detecção através de alterações da frequência de um cristal de quartzo oscilante. A frequência será alterada toda vez que houver alteração na quantidade de massa depositada na superfície do cristal (VARELA *et al.*, 2000).

Transdutores ópticos: Neste tipo de biossensor a luz é responsável por determinar a medida da reação biológica, podendo analisar a luz absorvida, emitida, ou a refração que ela sofre em uma determinada situação. A luz, neste caso é guiada através de fibras ópticas até o detector. Uma técnica que vem em uma crescente numérica de aplicações é a ressonância plasmônica de superfície, e que consiste na realização de medidas do índice de refração, quantidade de luz absorvida, propriedades fluorescentes das moléculas analisadas ou um meio de transdução químico-óptico (CARVALHO *et al.*, 2003).

Transdutores calorimétricos: Estes sensores biológicos partem do princípio que toda reação biológica envolve uma diferença de entalpia e, a partir deste fato é possível determinar alterações em um meio através da medida de temperatura (XIE *et al.*, 1993).

3.2. Tipos de Sensores Biológicos

Sensores enzimáticos

Os sensores enzimáticos se baseiam na detecção de uma alteração química do meio de trabalho que seja realizada por uma dada enzima. A seguir é indicado um esquema do funcionamento dos sensores enzimáticos, mostrando que ocorre a transferência de elétrons entre a enzima que promove a reação e um mediador, responsável por realizar o sinal elétrico (AHUJA, *et al.*, 2007).

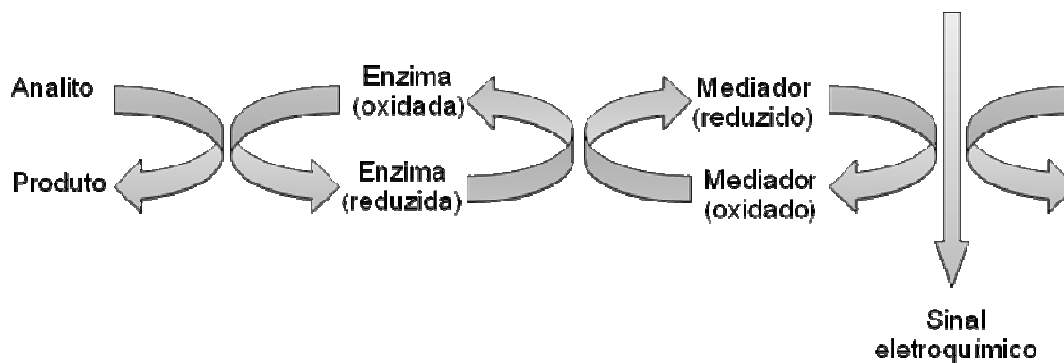


Figura 5. Esquema para o funcionamento de um sensor enzimático.

O biossensor mais conhecido na literatura é utilizado para a dosagem de glicose no sangue, sendo o sensor comercializado até os dias atuais (D'ORAZIO, 2003).

Além do sensor para os níveis de glicose no sangue, é interessante destacar também os sensores para lactato, baseado na enzima lactato desidrogenase, e os sensores para uréia, baseados em enzimas de desaminação (D'ORAZIO, 2003).

Imunossensores

Metodologias que utilizam interações antígeno/anticorpo já se mostram extensamente importantes em diversos laboratórios de análises clínicas e também em outros campos da medicina, indústria farmacêutica, etc.

Os imunossensores baseiam-se na interação extremamente específica entre anticorpo e antígeno, o que o torna muito preciso e seletivo. Estes sensores representam um grande avanço nestas áreas pela capacidade de detectar com uma sensibilidade muito maior e reduzir significativamente os gastos em relação às metodologias convencionais (SKLADAL, 1997).

Usualmente, os imunossensores dependem de um mediador que explicita a interação entre antígeno e anticorpo, pois a interação não apresenta alterações físico-químicas latentes (BUTLER & GUILBAULT, 2006).

A aplicação deste tipo de sensor é muito diversa, mas chama atenção a área específica de diagnóstico, em que várias infecções em seres humanos e animais são determináveis qualitativamente e quantitativamente, sendo mais

comum encontrar biossensores que detectam anticorpos para tal infecção. Este tipo de biossensor se mostra importante pela possibilidade de reduzir os custos e o tempo de diagnósticos para doenças parasitárias, como a doença de chagas, dentre outras (FERREIRA *et al.*, 2006, DUTRA & KUBOTA, 2007).

Genossensores

Esta classe de sensores tem como foco detectar a hibridização de sequências de DNA ou RNA complementares, e suas aplicações vão desde a detecção de material genético de patógenos em amostras de sangue, ao diagnóstico de mutações de marcadores específicos para o câncer de próstata (PENG *et al.*, 2008).

Os genossensores aparecem como um vertente de sensores que se destacam por serem diretos, de rápido resultado e muitas vezes dispensarem o uso de mediadores, convertendo a hibridização diretamente em sinal elétrico. Isso se deve ao fato de o material genético apresentar atividade eletroquímica, e em conjunto com filmes condutores apropriados revela resultados interessantes (PENG *et al.*, 2008).

Apesar da possibilidade de detecção direta de fragmentos de material genético, vários intercaladores de DNA são o escopo de trabalho de diversos pesquisadores, no intuito de melhorar a seletividade e a sensibilidade de tais sensores. Intercaladores clássicos como o brometo de etídio (figura 6) e o azul de metileno são os mais amplamente descritos na literatura e têm comprovada eficácia na mediação de reações eletroquímicas envolvendo DNA (WANG *et al.*, 2008, OLIVEIRA *et al.*, 2010).

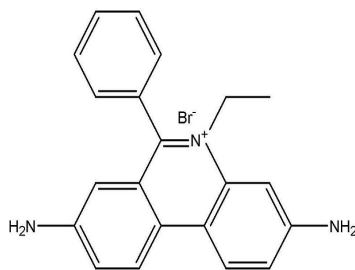


Figura 6. Estrutura química do brometo de etídio.

Dentre os genossensores descritos na literatura, podemos citar os sensores usados na detecção de material genético da bactéria causadora da meningite (PATEL *et al.*, 2010), do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (NIU *et al.*, 2006), do vírus do papiloma humano (HPV) (NASIRIZADEH *et al.*, 2011), e também da bactéria causadora da hanseníase lepra (AFONSO *et al.*, 2010).

3.3. Técnicas para Imobilização de Biomoléculas

Adsorção física

Na adsorção física, como ilustra a figura 7, a biomolécula adsorve na interface entre o polímero e a solução por meio de interações eletrostáticas. A carga do filme polimérico pode ser positiva ou negativa, dependendo da sua natureza e do pH do meio (AHUJA *et al.* 2007). Sendo assim, há a possibilidade de se escolher o melhor polímero para adequar a interação biomolécula/polímero. Outra vantagem é que a técnica dispensa reações com a biomolécula, mantendo-a intacta para a posterior detecção (RAMANATHAN *et al.*, 1996).



Figura 7. Esquema para imobilização de biomoléculas por adsorção.

A desvantagem deste processo está justamente nesta característica, pois a interação biomolécula/polímero pode se enfraquecer com alguma mudança de pH ou alterações na força iônica da solução (AHUJA *et al.* 2007).

Ligação cruzada

A ligação cruzada (figura 8) consiste em se utilizar um agente bifuncional que se liga à biomolécula em forma de uma espécie de “rede”. Estes reagentes bifuncionais possuem grupos terminais reativos que são os responsáveis por promover a imobilização.

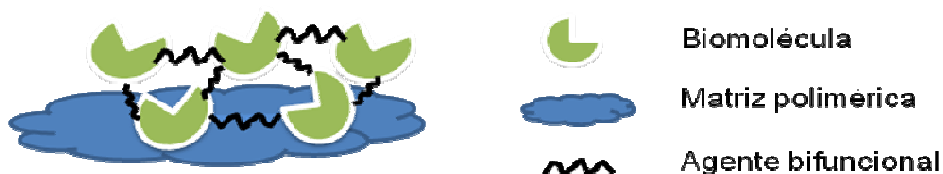


Figura 8. Imobilização de biomoléculas por ligação cruzada.

A grande vantagem deste tipo de imobilização é a perda mínima de biomoléculas, já que, geralmente, a escolha do agente bifuncional se dá pela sua afinidade com os grupamentos da biomolécula. Porém, por se tratar de uma aplicação de material reativo, há certo risco de que a biomolécula se torne inativa (CHAUBEY *et al.*, 2000).

Aprisionamento ou oclusão

Uma alternativa para a imobilização de biomoléculas é a oclusão (figura 9), onde a biomolécula é aprisionada enquanto ocorre a formação do filme polimérico. Neste caso pode ocorrer em conjunto, a adsorção da biomolécula com o monômero em solução e assim a molécula é aprisionada enquanto o filme polimérico cresce na superfície do eletrodo (AHUJA *et al.*, 2007).

A vantagem deste processo é que a interação polímero/biomolécula é máxima e a biomolécula se localiza muito próxima ao transdutor, porém isso também confere uma desvantagem, pois dificulta a aproximação do analito e sua consequente interação com a sonda (GAMBHIR *et al.*, 2001).



Figura 9. Esquema para a imobilização de biomoléculas por oclusão.

Ligação covalente

No caso de se desejar um biossensor que tenha um tempo de vida maior, é recomendável imobilizar a biomolécula no polímero através de uma ligação covalente. Esta alternativa minimiza a perda de material para a solução através de difusão e aumenta consideravelmente a estabilidade do sensor (AHUJA *et al.*).



Figura 10. Imobilização de biomoléculas por ligação covalente.

Para se ligar covalentemente a biomolécula ao filme polimérico a biomolécula deve possuir uma região não ativa biologicamente que seja capaz de reagir e se ligar a alguma plataforma polimérica que também deve ser funcionalizável.

Apesar de ser uma grande vantagem comercial se ter um sensor que é mais estável, do ponto de vista do reaproveitamento da matriz polimérica é desvantajoso (RAMANATHAN *et al.*, 2000).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO A. S.; GOULART, L. R.; GOULART, I. M. B.; MACHADO, A. E. H.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. A Promising Bioelectrode Based on Gene of *Mycobacterium leprae* Immobilized onto Poly(4-aminophenol). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 118, p. 2921–2928, 2010.

AHUJA, T.; MIR, I. A.; KUMAR, D.; RAJESH. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials**, v. 28, p. 791-805, 2007.

ARMSTRONG, G. L.; WASLEY, A.; SIMARD, E. P.; MCQUILLAN, G. M.; KUHNERT, W. L.; ALTER, M. J. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, p. 705-714, 2006.

ATKINS, P.; JONES, L. **Principios de Química, Questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 3ª ed., Porto Alegre, Bookman, 2006.

BOWER, D. I. **An Introduction to Polymer Physics**. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 2002.

BRITO-MADURRO, A. G.; FERREIRA, L. F.; VIEIRA, S. N.; FILHO, L. R. G.; MADURRO, J. M. Immobilization of purine bases in poly-4-aminophenol matrix. **Journal of Materials Science**, v. 42, p. 3238-3243, 2007.

BUTLER, D.; GUILBAULT, G. G. Disposable Amperometric Immunosensor for the Detection of 17- β Estradiol Using Screen-Printed Electrodes. **Actuators Sens. B**, v. 113, p. 692, 2006.

CARVALHO, R. M.; RATH S.; KUBOTA, L T. SPR - uma nova ferramenta para biossensores. **Química Nova**, v. 26, p. 97-104, 2003.

CASTELO, A.; PESSÔA, M. G.; BARRETO, T. C. B. B.; ALVES, M. R. D.; ARAÚJO, D. V. Estimativas de custo da hepatite crônica b no sistema único de saúde brasileiro em 2005. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, p. 486-491, 2007.

CHANG, M-H. Hepatitis B virus infection. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 12, p. 160-167, 2007.

CHAUBEY, A.; GERARD, M.; SINGHAL, R.; SINGH, V. S.; MALHOTRA B. D. Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole-polyvinyl sulphonate composite films for application to lactate biosensors. **Electrochimica Acta**, v. 46, p. 723–729, 2000.

CHEN, C.; SUN C.; GAO Y. Electrosynthesis of a Net-like Microstructured Poly(p-aminophenol) Film Possessing Electrochemical Properties in a Wide pH Range. **Journal of Macromolecular Science**, v. 45, p. 972–979, 2008.

CLARK, JR L. C.; LYONS C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102: p. 29-45, 1962.

D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 334, p. 41–69, 2003.

DUTRA, R. F.; KUBOTA, L. T. An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyldextran-modified gold chip. **Clinica Chimica Acta**, v. 376, p. 114–120, 2007.

FERREIRA, A. A. P.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M.; OLIVEIRA, D. R.; COSTA, P. I.; GUELL, A. G.; SANZ, F.; BENEDETTI, A. V.; YAMANAKA, H. Investigation of the interaction between Tc85-11 protein and antibody anti-T. cruzi by AFM and amperometric measurements. **Electrochimica Acta**, v. 51, p. 5046-5052, 2006.

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. **Polymer International**, v. 57, p. 644-650 2008.

FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S. Avanços no tratamento da hepatite pelo vírus. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 451-462, 2007.

FIEL, M. I. Pathology of Chronic Hepatitis B and Chronic Hepatitis C. **Clinic Liver Diseases**, v. 14, p. 555–575, 2010.

FONTANA, R. J.; HANN, H. W.; PERRILLO, R. P. Determinants of early mortality in patients with decompensated chronic hepatitis B treated with antiviral therapy. **Gastroenterology**, v. 123, p. 719-727, 2002.

FRANCHIS, R.; HADENGUE, A.; LAU, G.; LAVANCHY, D.; LOK, A.; MCINTYRE, N. EASL international consensus conference on hepatitis B, 13–14 September 2002, Geneva, Switzerland. Consensus statement (long version). **Journal of Hepatology**, v. 39, p. 3-25, 2003.

FRANCO, D. L.; AFONSO, A. S.; FERREIRA, L. F.; GONCALVES, R. A.; BOODTS, J. F. C.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Electrodes modified with polyaminophenols: immobilization of purines and pyrimidines. **Polymer Engineering and Science**, v. 48, p. 2043-2050, 2008.

FROMMER, J. E.; CHANCE, R. R. Electrically Conductive Polymers. **Encyclopedia of Polymer Science and Engineering**, v. 5, p. 462, 1986.

GAMBHIR, A.; GERARD, M.; MULCHANDANI, A.; MALHOTRA, B. D. Characterization of D9A Immobilized on Electrochemically Prepared Conducting Polypyrrole-Polyvinyl Sulfonate Films. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 96, p. 303–309, 2001.

GANEM, D.; PRINCE, A. M. Hepatitis B virus infection natural history and clinical consequences. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, p. 1118-1129, 2004.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 17, p. 345-359, 2002.

HOOFNAGLE, J. H.; DIBISCEGLIE, A. M. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. **Seminars in Liver Disease**, v. 11, p. 73-83, 1991.

HOOFNAGLE, J. H. Challenges in therapy of chronic hepatitis B. **Journal of Hepatology**, v. 39, p. 230-235, 2003

ILOEJE, U. H.; YANG, H-I.; JEN, C-L.; SU, J.; WANG, L-Y.; YOU, S-L.; CHEN, C-J. Risk and Predictors of Mortality Associated With Chronic Hepatitis B Infection. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, p. 921-931, 2007.

JAFRI, S-M. R.; LOK, A. S-F. Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis B. **Clinics in Liver Disease**, v. 14, p. 425-438, 2010.

JÚNIOR, L. R.; NETO, G. O.; KUBOTA, L. T. Transdutores potenciométricos a base de polímeros condutores: aplicações analíticas. **Química Nova**, v. 20, p. 519-527, 1997.

KANE, M. Global program for control of hepatitis B infection. **Vaccine**, v. 13, p. 47-49, 1995.

KIM, W. R.; TERRAULT, N. A.; PEDERSEN, R. A. Trends in waiting list registration for liver transplantation for viral hepatitis in the United States. **Gastroenterology**, v. 137, p. 1680-1686, 2009.

KRUGMAN, S.; OVERBY, L. R.; MUSHAHWAR, I. K. Viral hepatitis type B. Studies on natural history and prevention re-examined. **The New England Journal of Medicine**, v. 300, p. 101-106, 1979.

KUMAR, D.; SHARMA, R. C. Advances in conductive polymers. **European Polymer Journal**, v. 34, p. 1053-1060, 1998.

LANGE, U.; ROZNYATOVSKAYA, N.V.; MIRSKY, V.M. Conducting polymers in chemical sensors and arrays. **Analytica chimica acta**, v. 614, p. 1–26, 2008.

LAU, J. Y. N.; WRIGHT, T. L. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. **Lancet**, v. 342, p. 1335-1344, 1993.

LESMANA, L. A.; LEUNG, N. W-Y.; MAHACHAI, V.; PHIET, P. H.; SUH, D. J.; YAO, G. B. Hepatitis B: overview of the burden of disease in the Asia–Pacific region. **Liver International**, v. 26, p. 3-10. 2006

MCMAHON, B. J.; ALWARD, W. L.; HALL, D. B. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. **Journal of Infectious Diseases**, v. 151, p. 599–603, 1985.

NAMGYAL, P. Impact of hepatitis B immunization, Europe and worldwide. **Journal of Hepatology**, v. 39, p. 77–82, 2003.

NASIRIZADEH, N.; ZARE, H. R.; POURNAGHI-AZAR, M. H.; HEJAZI, M. S. Introduction of hematoxylin as an electroactive label for DNA biosensors and its employment in detection of target DNA sequence and single-base mismatch in human papilloma virus corresponding to oligonucleotide. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 2638–2644, 2011.

NI, Y. H.; HUANG, L. M.; CHANG, M. H. Two decades of universal hepatitis B vaccination in Taiwan: impact and implication for future strategies. **Gastroenterology**, v. 132, p. 1287-1293, 2007.

NIU, S.; ZHANG, S-S.; WANG, L.; LI, X-M. Hybridization biosensor using di(1,10-phenanthroline) (imidazo[f]1,10-phenanthroline)cobalt(II) as electrochemical indicator for detection of human immunodeficiency virus DNA. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 597, p. 111-118, 2006

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. Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: a new matrix for oligonucleotide hybridization. **Journal of Materials Science**, v. 45, p. 475-482, 2010.

PATEL, M. K.; SOLANKI, P. R.; KUMAR, A.; KHARE, S., GUPTA, S.; MALHOTRA, B. D. Electrochemical DNA sensor for *Neisseria meningitidis* detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 2586–2591, 2010.

PENG, H.; ZHANG, L.; SOELLER, C.; TRAVAS-SEJDIC, J. Conducting polymers for electrochemical DNA sensing. **Biomaterials**, v. 30, p. 2132–2148, 2009.

RAMANATHAN, K.; RAM, M. K.; VERGHESE, M. M.; MALHOTRA, B. D. Dielectric spectroscopic studies on polypyrrole glucose oxidase films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 60, p. 2309–2316, 1996.

RAMANATHAN, K.; PANDEY, S. S.; KUMAR, R.; GULATI, A.; MURTHY, A. S. N.; MALHOTRA, B. D. Covalent immobilization of glucose oxidase to poly(o-amino benzoic acid) for application to glucose biosensor. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 78, p. 662–667, 2000.

SHANKARAN, D. R.; GOBI, K. V.; MIURA, N. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. **Sensors and Actuators B**, v. 121, p. 158–177, 2007.

SHIFFMAN, M. L. Management of Acute Hepatitis B. **Clinics in Liver Disease**, v. 14, p. 75-91, 2010.

SHIRAKAWA, H.; LOUIS, E. J.; MACDIARMID, A. G.; CHIANG, C. K. ; HEEGER, A. J. Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, $(CH)_x$. **Journal of Chemical Society Chemical Communications**, v. 16, p. 578-580, 1977.

SILVA, T. A. R.; FERREIRA, L. F.; SOUZA, L. M.; FILHO, L. R. G.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. New approach to immobilization and specific-sequence detection of nucleic acids based on poly(4-hydroxyphenylacetic acid). **Materials Science & Engineering**, v. 29, p. 539-545, 2009.

SKLADAL, P. Advances in electrochemical immunosensors. **Electroanalysis**, v. 9, p. 737-745, 1997.

SPERLING, L. H., **Introduction to Physical Polymer Science**. 4^a ed., Wiley Interscience, New Jersey, USA, 2006.

THEVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classifications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, p. 121-31, 2001.

TIOLLAIS, P.; POURCEL, C.; DEJEAN, A. The hepatitis B virus. **Nature**, v. 37, p. 489-495, 1985.

TREPO, C.; PRADAT, P. Hepatitis C virus infection in Western Europe. **Journal of Hepatology**, v. 31. p. 80-83, 1999.

VARELA, H.; MALTA, M.; TORRESI, R. M. Técnicas *in situ* de baixo custo em eletroquímica: a microbalança a cristal de quartzo. **Química Nova**, v.23, p 664-679, 2000.

VIEIRA, S. N.; FERREIRA, L. F.; FRANCO, D. L.; AFONSO, A. S.; GONCALVES, R. A.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M.; Electrochemical modification of graphite electrodes with poly(4-aminophenol). **Macromolecular Symposia**, 245-246, p. 236-242. 2006.

WANG, L-R.; QU, N.; GUO, L-H.; Electrochemical displacement method for the investigation of binding interaction of polycyclic organic compounds with DNA. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 3910-3914, 2008.

WHO U. WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system. Global summary. WHO/IVB/2007. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_IVB_2007_eng.pdf. Acessado em 15/06/2010.

XIE, B.; KHAYYAMI, M.; NWOSU, T.; LARSSON, P.; DANIELSSON, B.; Ferrocene mediated thermal biosensor. **Analyst**, v. 118, p. 845-848, 1993.

YAO, F. Y.; TERRAULT, N. A.; FREISE, C. Lamivudine treatment is beneficial in patients with severely decompensated cirrhosis and actively replicating hepatitis B infection awaiting liver transplantation: a comparative study using a matched, untreated cohort. **Hepatology**, v. 34, p. 411-416, 2001.

O capítulo II está de acordo com as normas da revista Bioelectrochemistry
(http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/504080/description#description)

CAPÍTULO 2:

***Preparation of electrochemical
bioelectrode for detection of target DNA
sequences specific for hepatitis B onto
poly(4-aminophenol) matrix***

Preparation of electrochemical bioelectrode for detection of target DNA sequences
specific for hepatitis B onto poly(4-aminophenol) matrix

Erick G. França¹, Ana C. H. Castro¹,
João M. Madurro², Ana G. Brito-Madurro^{1,*}

1. Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia,
Uberlândia, Brazil

2. Institute of Chemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Brazil.

*Author to whom correspondence should be addressed. Tel. +55 34 32182203;

Fax: +55 3432182203; E-mail: agbrito@iqufu.ufu.br

Resumo

Eletrodos modificados de grafite com poli(4-aminofenol), contendo oligonucleotídeos sonda em sua superfície foram usados para a detecção de oligonucleotídeos poli(CT) ou um fragmento-alvo de DNA de Hepatite B. 4-aminofenol foi eletropolimerizado em meio ácido foi utilizado para promover uma melhor interação entre a superfície do eletrodo de grafite e os grupos funcionais do DNA. Voltametria de pulso diferencial foi utilizada para a caracterização do eletrodo modificado contendo as sondas poli(GA) ou HepB1 antes e depois da hibridização com o alvo complementar poli(CT) ou HepB2, através da detecção direta monitorando os grupos oxidáveis das bases de DNA, ou indireta usando o brometo de etídio como indicador do processo de hibridização. O bioeletrodo produzido apresentou limite de detecção $0,18 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ para o poli(CT) e $2,613 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ para HepB2. A detecção indireta baseado no brometo de etídio foi promissora na discriminação de bases *mismatch*, uma propriedade desejável para detecções de doenças relacionadas com ocorrência de pontos de mutação. Em adição, foi possível observar diferenças entre as superfícies hibridizadas e não hibridizadas através de microscopia de força atômica

Palavras-chave: bioeletrodo, diagnóstico, Hepatite B, poli(4-aminofenol).

Abstract

Graphite electrodes modified with poly(4-aminophenol), containing oligonucleotide probes in their surface were used for detection of poly(CT) or HepB2 oligonucleotides. Poly(4-aminophenol) electrodeposited in acidic medium was used to promote a better interaction between the graphite electrode surface and functional groups of DNA. Differential pulse voltammetry was used for characterization of modified electrode containing poly(GA) or HepB1 probes before or after hybridization with the complementary targets poly(CT) or HepB2, by direct detection monitoring the oxidizable DNA bases, or indirect detection using ethidium bromide as indicator of the hybridization process. The produced bioelectrodes presents detection limit of $0.18 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ for poly(CT) and $2.613 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ for HepB2. The indirect detection based on ethidium bromide was promising to discriminate mismatches, a very desirable condition for detection of disease related point-mutation. In addition, it was possible observe differences between hybridized and non-hybridized surfaces by atomic force microscopy.

Keywords: bioelectrode, diagnosis, hepatitis B, poly(4-aminophenol).

1. Introduction

Infection with hepatitis B is considered a health problem worldwide and the extent and economic consequences of this disease are considerable (Chen et al., 2011, Lesmana et al., 2006, Armstrong et al., 2006, Trepo et al., 1999).

There is an expectation that approximately 2 billion people have hepatitis B and 400 million acquired its chronic form. It is estimated that between 500,000 and 1 million deaths are attributable to hepatitis B each year and approximately one third of the world's population has serological evidence of past or present infection with hepatitis B virus (HBV), making it one of the most common human pathogens (Usama et al., 2011, Chen et al., 2011, Franchis et al., 2003, Kane et al., 1995).

The spectrum of disease is diverse and variable, ranging from a low viremic inactive carrier state to progressive chronic hepatitis, which may evolve to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Usama et al., 2011, Xie et al., 2011).

The main functions of the liver are processing nutrients from food, make bile, remove toxins from the body and build proteins. Inflammation of the liver, or hepatitis, interferes with these important functions, leading to poor health, characterized by the following symptoms: jaundice, loss of appetite, fatigue and muscle and joint aches (Chen et al., 2011).

The diagnosis of hepatitis B is made by various serological tests. These should be associated with markers of liver injury, as the measurement of liver enzymes, and also together with the Polymerase Chain Reaction (Lesmana et al., 2006) which allows the determination of the virus circulating amount in the blood. The importance of monitor patients is the prevention of acute relapse of infection (Jafri et al., 2010).

The detection of specific-DNA for diseases has great value in the diagnosis of several viral diseases, bacterial and even cancer. Thus, researches on biosensors have great significance in development of technologies that perform diagnostics rapid, precise and simplified (Peng et al., 2009). The miniaturization these equipment and its selectivity for diagnosis may indicate its versatility and

efficiency that will eventually prevail in the laboratory examinations and even in medical clinics (Teles and Fonseca, 2008).

Genosensors consists in a DNA probe that is immobilized onto the electrode surface and can bind specifically in a specific target DNA sequence, generating an electrical signal which is traduced to an analytical response (Dolatabadi et al., 2011). This signal can be direct, produced by nucleotides oxidation of DNA probe (label-free detection) (Liu et al., 2010, Wang et al., 1998) or indirect, using a indicator of the hybridization process (Chen et al., 2009 Niu et al., 2008). Several genosensors are reported in literature aiming the disease diagnosis, for example: detection of human papillomavirus (HPV) (Nasirizadeh et al., 2011, Dell'Atti et al., 2007) and human immunodeficiency virus (HIV) (Zhang et al., 2010, Niu et al., 2006), hepatitis C (Skládal et al., 2004), dengue virus (Silva et al., 2009), Hansen bacillus (Afonso et al., 2010), and others.

Approaches for development of biosensors have been suggested to detect DNA sequence hybridization, including optical (Scarano et al., 2010), piezoelectric (Lucarelli et al., 2008) and electrochemical (Sadik et al., 2009) transduction techniques. Electrochemical detection of nucleic acids has attracted interest because of the high sensitivity allowed by electrochemical methods, while using relatively inexpensive instruments (lost et al., 2011).

Strategies for immobilization of DNA probe are diverse and can improve the interaction and electrochemical signal of biosensors (Ahuja et al., 2007). The use of conducting polymeric films has several advantages like modification of electrode surfaces with a material that can bind with biomolecules through functionalizations and protection of electrode against the adsorption of nonspecific analites (Ahuja et al., 2007, Guimard et al., 2007).

Our research group has reported the electrodes modification with functionalized polymers derived from aminophenols (Brito-Madurro et al., 2007, Vieira et al., 2006) and other groups of molecules such as hidroxyphenylacetic acid (Oliveira et al., 2010, Silva et al., 2009, Silva et al., 2008) and hydroxybenzoic acid (Ferreira et al., 2011). Poly(4-aminophenol) showed efficient immobilization of pyrimidines and purines and good electrochemistry response for both, mainly guanosine and adenosine (Ferreira et al., 2008, Franco et al., 2008). The success of biomolecules immobilization onto this polymeric matrix is due the presence of amino and hydroxyl groups in the monomer, facilitating the electropolymerization and the functionalization of the polymer structure, allowing the retention of biomolecules (Afonso et al., 2010).

The scope of this work is to develop a new bioelectrode for detection of specific DNA sequence to hepatitis B virus by direct or indirect electrochemical detection, based on poly(4-aminophenol) matrix.

2. Experimental

2.1 Materials

All reagents used were of analytical grade without previous purification. Ultra high purity water (Millipore Milli-Q system) was used in the preparation of the solution. Oligonucleotides were synthesized by Invitrogen Life Technologies (USA) and DNA fragments of hepatitis B were synthesized by Alpha DNA (Canada). The oligonucleotides used have the following sequences: poly(GA) 5'-GGGGGGGGAAAAAAA-3', poly(CT) 3'-CCCCCCCCTTTTTTTT-5'. DNA fragments have the related sequences: hepatitis B virus DNA probe (HepB1) 5'-GAGGAGTTGGGGGAGCACATT-3', hepatitis B virus DNA target (HepB2) 5'-

AATGTGCTCCCCCAACTCCTC-3', DNA non-complementary for hepatitis B virus (NonHepB) 5'-CGGTGTTGTCCCATTGTTCT-3', and three-base mismatch for hepatitis B virus DNA (Mis3HepB) 5'-AATGTGCTCTTTCAACTCCTC. Stock solutions of DNA probe and target were prepared in SSC buffer (sodium chloride 0.3 mol.L⁻¹, sodium citrate 0.03 mol.L⁻¹, both obtained from Sigma-Aldrich Chemical, USA) at pH value of 7.0 and storage at -12°C. The monomer 4-aminophenol was purchased from Acros Organics, HClO₄ (70%) was obtained from Sigma-Aldrich Chemical and ethidium bromide purchased from Merck KGaA (Germany). For detection studies, phosphate buffer 0.1 mol.L⁻¹ (Na₂HPO₄ 0.061 mol.L⁻¹, NaH₂PO₄ 0.039 mol.L⁻¹ at pH value 7.3) was prepared. All solutions were previously deoxygenated by bubbling N₂ before utilization.

2.2 Apparatus

Electrochemical polymerization and electrochemical measurements was performed in a potentiostat from CH Instruments model 760C, with a three-compartment electrode cell. A graphite disk, 6 mm diameter, was used as working electrode. Platinum plate and silver/silver chloride (Ag/AgCl, KCl 3.0 mol.L⁻¹) electrode were used as counter electrode and reference electrode, respectively. All experiments were conducted at room temperature. Film morphology in absence or presence of biomolecules was assessed by atomic force microscopy (AFM) (Shimadzu SPM 9600, tapping mode).

2.3 Preparation of poly(4-aminophenol)

Prior to the electropolymerization, the bare graphite electrode was mechanically polished with alumina (0.3 μm) slurry, ultrasonicated, washed with deionized water and dried in the air. 4-Aminophenol solution was deaerated with ultra pure nitrogen for ca. 45 minutes, prior to electropolymerization. The monomer 4-aminophenol was electropolymerized on graphite electrode through continuous cycling of the potential, according to Vieira *et al* (Vieira et al., 2006). After the electropolymerization, the modified electrode was rinsed with deionized water to remove non-reacting monomers.

2.4. Oligonucleotide probes immobilization on graphite electrode modified with poly(4-aminophenol)

The oligonucleotides immobilization was carried out by dropping of 18 μL of $0.063 \times 10^{-6} \mu\text{mol.L}^{-1}$ of poly(GA) or HepB1, onto the modified electrodes, and dried at room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) in a desiccator for 5 minutes. The electrode was immersed for 30 s in water and after in a 0.5% BSA solution (Bovine Serum Albumin) by 2 hours at 37°C . Then, the electrode was washed in phosphate buffer and dried.

2.5. Hybridization detection of oligonucleotides immobilized on poly(4-aminophenol)

Hybridization experiments were carried out using both synthetic oligonucleotides poly(CT) and HepB2. After the immobilization of the oligonucleotide probes, 18 μL of concentrations different of poly(CT) ($0.18 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, $0.6 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, $1.6 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ and $1.8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) or HepB2 targets ($1.89 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$, $1.89 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$, $3.78 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$, $7.56 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$, $1.89 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ and $1.89 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) were applied on the modified electrodes. Hybridization was carried out at 42°C or 55°C to poly(CT) or HepB2, respectively, for 15 minutes. The electrodes were then rinsed by immersion in water, during 30 s, under agitation. To detection, ethidium bromide ($20 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, 15 μL) was added on the electrode surface. Another step of rinsing was carried out by immersion in water during 30 s.

3. Results and discussion

The immobilization of DNA probes on the electrode surface is of great importance in the fabrication of DNA biosensors. Modification of electrodes with DNA was carried out by differential pulse voltammetry (DPV), and it was analyzed the alterations in electrochemical response of adenine and guanine when in a hybridization event. Fig. 1 shows the DPV of a graphite electrode/poly(4-aminophenol)/poly(GA), in absence or in presence of non-complementary or complementary target.

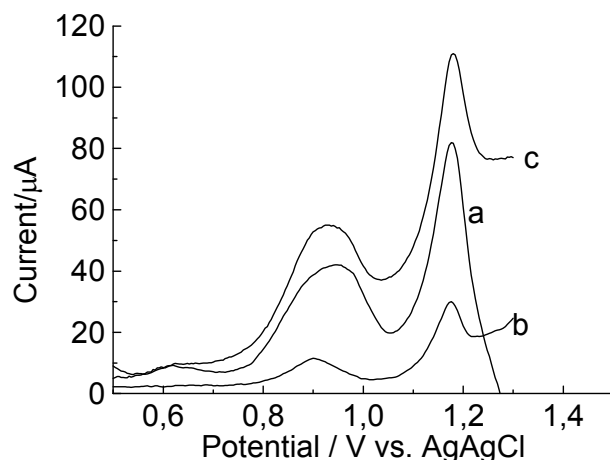


Figure 1. Differential pulse voltammograms of graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans, containing poly(GA): (a) before hybridization and (b) after 15 minutes of incubation with complementary target poly(CT) or non-complementary poly(GA) (c). Electrolyte: phosphate buffer (0.10 mol L^{-1}), pH 7.4. Modulation amplitude: 0.05 mV . Pulse interval: 0.2 s ; 5 mVs^{-1} .

The guanosine and adenosine oxidation peaks were observed at about $+0.92 \text{ V}$ and at $+1.18 \text{ V}$, respectively. After interaction, the oxidation peak current of the guanine and adenosine was decreased with the incubation time, after 15 min of hybridization, in solution.

These results are in agreement with Oliveira-Brett *and col.* (2004), who reported that during the oligonucleotides hybridization, hydrogen bonds are formed between complementary sequences leading to a duplex, inside of which it is more difficult to oxidize the bases, decreasing the oxidation peak current of the guanosine and adenosine, after hybridization. Other factor that affects these responses is that the single strand DNA 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 nitrogenated bases and the electrode (Silva *et al.*, 2008, La-Scalea *et al.*, 1999, Yang *et al.*, 1997).

The same sequence studied previously, by direct detection of oligonucleotides, was used for the indirect detection, using ethidium bromide as hybridization indicator. Ethidium bromide (3,8-diamino-5-ethyl-6-phenyl phenanthridinium bromide) is a widely known drug that very efficiently intercalate into DNA. X-ray analyses and computational modelling studies have already indicated that ethidium bromide intercalation results in lengthening of the DNA helix and unwinding of the phosphodiester backbone (Nakamoto *et al.*, 2008).

In this way, experiments were carried out using an electrode modified containing polymeric film and synthetic oligonucleotide as transducer and ethidium bromide as electroactive intercalator. Figure 2 shows differential pulse voltammograms of ethidium bromide onto graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) containing poly(GA) before or after hybridization with non-complementary poly(GA) or complementary target poly(CT).

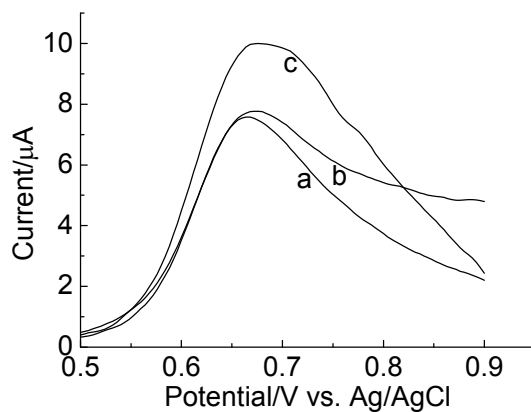


Figure 2. Differential pulse voltammograms of ethidium bromide onto graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans, containing poly(GA) before (a) or after hybridization with

non-complementary poly(GA) (b) or complementary target poly(CT) (c). Electrolyte: phosphate buffer (0.10 mol.L^{-1}), pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2s; 20 mVs^{-1} .

Figure 2 shows that the oxidation potential of ethidium bromide onto the modified electrode containing the probe is about +0.65V (Fig. 2a). When non-complementary target poly(GA) is added, the current signal observed is very similar to the probe (Fig. 2b). In addition, when occur the interaction between poly(GA):poly(CT), ethidium bromide intercalates in the double strand formed, increasing the concentration of the hybridization indicator on the surface of modified electrode (see Fig. 2c), indicating the occurrence of the hybridization event.

Fig. 3 shows differential pulse voltammograms of ethidium bromide as a redox intercalator at a modified graphite electrode, when the immobilized poly(GA) probe was hybridized with different concentrations of the complementary target poly(CT) and the linear dependence after hybridization with the complementary target.

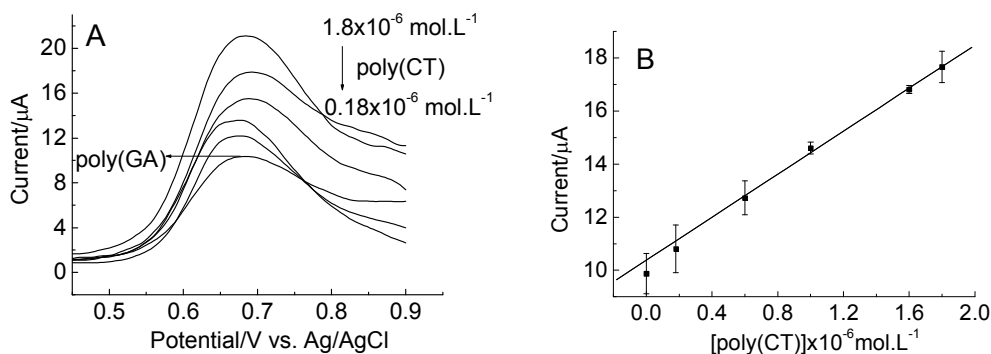


Figure 3. (A) Differential pulse voltammograms of ethidium bromide onto graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans, containing poly(GA) before or after hybridization with the

target poly(CT) in concentrations different. Electrolyte: phosphate buffer (0.10 mol.L⁻¹), pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2s; 20mVs⁻¹. (B) Calibration data for the oxidation signal of ethidium bromide, obtained after hybridization of the probe poly(GA) with the complementary target poly(CT).

With the increase of the concentration of the complementary target, the current value increased rapidly, indicating accumulation of ethidium bromide onto the surface. There was an excellent linear relation of the current to concentration of complementary target from 0.18×10^{-6} mol.L⁻¹ to 1.8×10^{-6} mol.L⁻¹ with a correlation coefficient of 0.996. The linear regression equation was $i(\mu A) = 4.052 \times 10^{-6} [\text{poly(CT)}] + 1.038 \times 10^{-5}$ for $n=3$ with correlation coefficient of 0.996, indicating that it is possible to detect the complementary target with detection limit of 0.18×10^{-6} mol.L⁻¹.

Studies were conducted using oligonucleotide probe specific for hepatitis B virus DNA, suitable for capture of target sequences. After modifying the surface of modified electrode with DNA probe (HepB1), the specificity of the bioelectrode was studied by testing its response to oligonucleotides specific for hepatitis B as complementary target (HepB2) or control sequences, non-complementary NonHepB. The results are shown in Fig. 4.

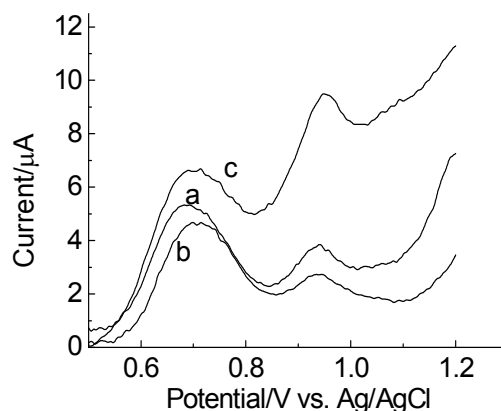


Figure 4. Differential pulse voltammograms of graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans, containing HepB1 (probe) (a) HepB1 (probe):HepB2 (target) (b) and HepB1 (probe):NonHepB (non-complementary target) (c). Electrolyte: phosphate buffer (0.10 mol.L^{-1}), pH 7.4, Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2s; 20 mVs^{-1} .

The results showed in Fig. 4 show a decrease in the signal amplitude, after hybridization with the complementary target (Fig. 4a and 4b), in accordance with the results obtained for poly(GA):poly(CT) sequences, (see Fig. 1). In addition, the bioelectrode distinguished between complementary (Fig. 4b) and non-complementary sequence (Fig. 4c), suggesting effective selectivity.

Experiments aiming indirect detection of DNA fragment specific for hepatitis B (HepB2) using ethidium bromide as hybridization indicator were carried out (Fig. 5).

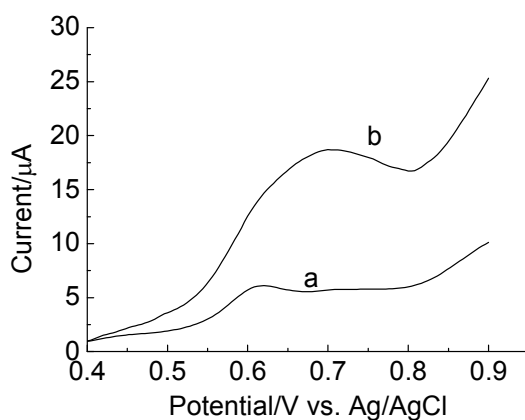


Figure 5. Differential pulse voltammograms of ethidium bromide onto modified graphite electrode with poly(4-aminophenol)/HepB1 before hybridization (a) or after hybridization with complementary target HepB2 (b). Electrolyte: phosphate buffer (0.10 mol.L^{-1}), pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2s; 20mVs^{-1} .

Figure 5 shows that, when occur the interaction between HepB1:HepB2, the signal to ethidium bromide oxidation increases (Fig. 5b), indicating that the concentration of the indicator increased on the surface of modified electrode. This is due to intercalation of ethidium bromide in the double strand formed, confirming that the hybridization process occurred.

Figure 6 shows the differential pulse voltammograms of ethidium bromide at a modified graphite electrode, after hybridization of the immobilized probe (HepB1) with the complementary target (HepB2) and the linear dependence after hybridization.

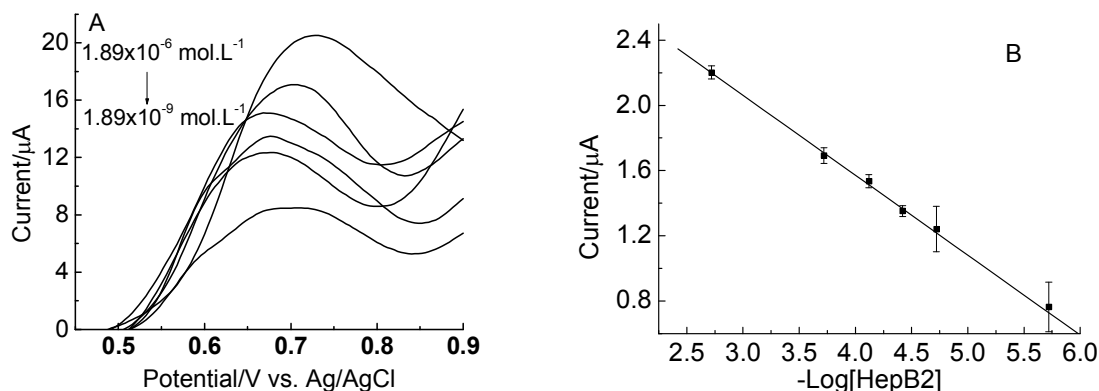


Figure 6. (A) Differential pulse voltammograms of ethidium bromide onto graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans, containing ssDNA (HepB1) before or after hybridization with concentrations different of DNA target (HepB2). Electrolyte: phosphate buffer (0.10 mol.L^{-1}), pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2s; 20mVs^{-1} . (B) Calibration data for the oxidation signal of ethidium bromide obtained after hybridization of modified electrode containing the probe with complementary target.

With the increase of HepB2 concentration from $1.89 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ to $1.89 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, the response signal of ethidium bromide on the bioelectrode increased. The detection limit (three independent experiments) of HepB2 (target) achieved was $2.613 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$, with a correlation coefficient of 0.998. Also, the ability of this bioelectrode to provide effective discrimination against mutation points is shown in Figure 7.

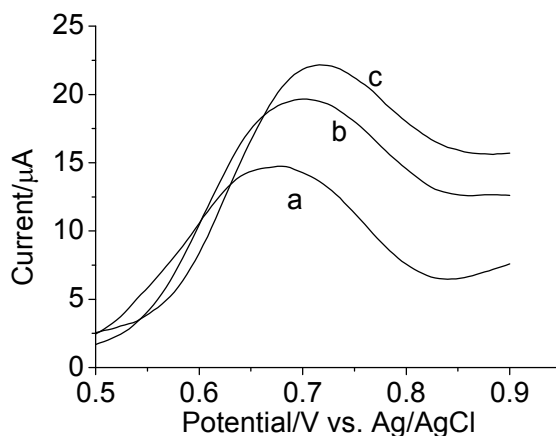


Figure 7. Differential pulse voltammograms of accumulated ethidium bromide on modified graphite electrode containing the probe HepB1 before hybridization (a) and after hybridization with: three-base mismatches (Mis3HepB) (b) and complementary oligonucleotide (HepB2) (c).

As shown in Fig. 7, oxidation signal of the ethidium bromide presented variation between the bioelectrodes after hybridization with three-base mismatches (Mis3HepB, Fig. 7b) or with complementary oligonucleotide (HepB2, Fig. 7c), suggesting that the bioelectrode is promising to evaluate mismatches, as desired for detection of disease-related point mutation.

AFM images were used to evaluate the surface modification of the electrode modified with poly(4-aminophenol) without biomolecules and after immobilization with the biomolecule probe and after hybridization with the complementary target (Fig. 8).

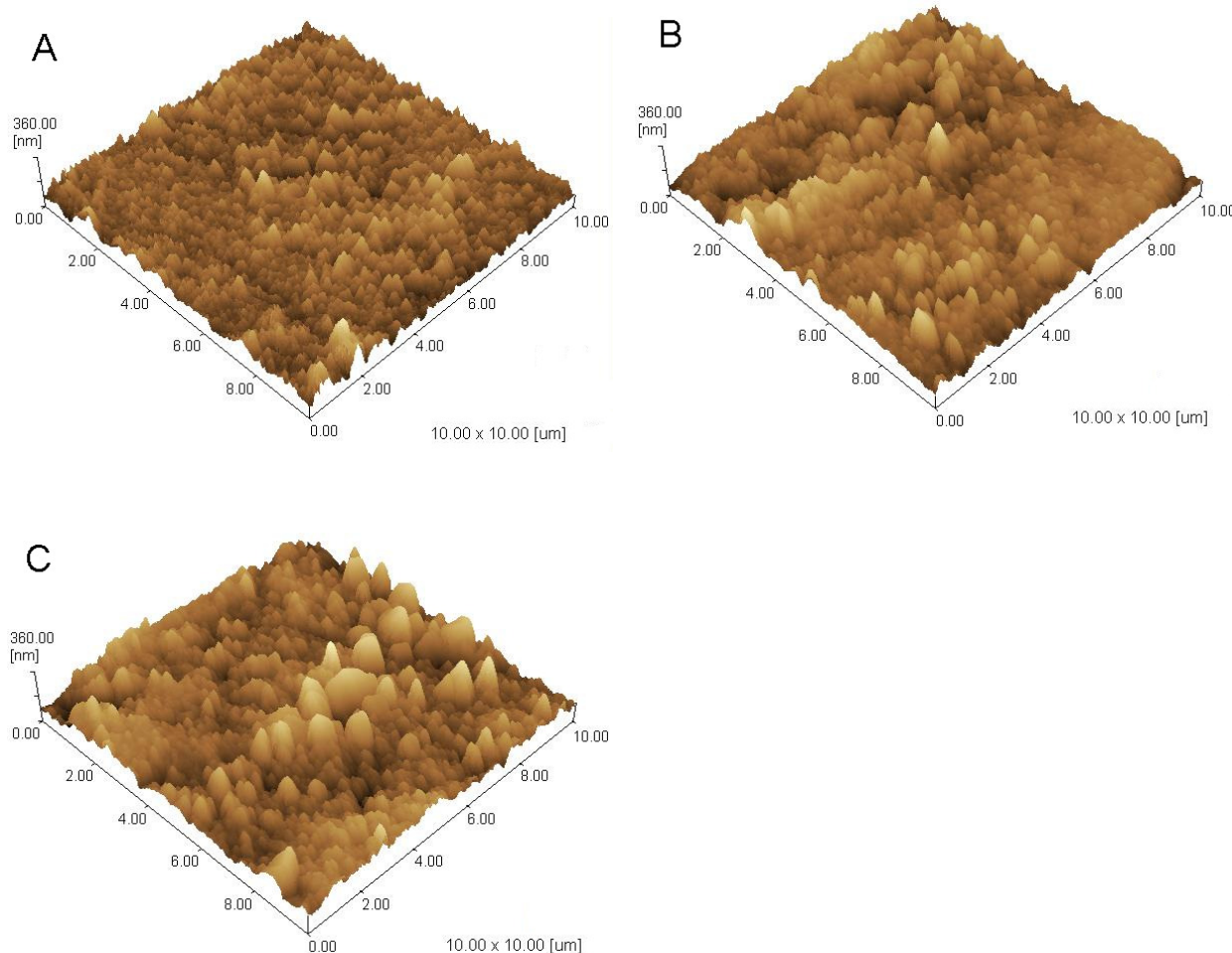


Figure 8. AFM topographical images of modified graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) without biomolecules (A); after immobilization with biomolecules: HepB1 (B); after hybridization of HepB1 with HepB2 (C).

After immobilization of HepB1 (Fig. 8B), it was observed increase of clusters, indicating that the oligonucleotide was successfully incorporated on the modified graphite electrode. Alterations were observed in the surface of the modified electrode, after introduction of complementary target. Both modified electrodes

containing poly(4-aminophenol)/HepB1 and poly(4-aminophenol)/HepB1:HepB2 showed topographies with globular aspect, but the latter is less homogenous, presenting larger clusters. These modifications in the surface electrode suggest a hybridization event, based on the fact that dsDNA molecules are more elongated and inflexible than ssDNA, and can form larger structures.

4. Conclusions

The combination of electrode modified with poly(4-aminophenol) and immobilization of DNA probes is a promising strategy for the detection of biological recognition elements for hepatitis B virus and other DNA sequences, since that oligonucleotides give a pronounced electrochemical response on electrodes modified with this polymer and hybridization experiments can be followed by differential pulse voltammetry. It was possible to detect with successful the hybridization by direct oxidation of guanosine and adenosine bases or by indirect process using ethidium bromide as hybridization indicator. Based on the response of the indicator, the complementary DNA sequence produced a increase in the current signal, in agreement with the literature, pointing promising results in the application of poly(4-aminophenol) for production of bioelectrodes useful for application in diagnosis of hepatitis B and other diseases, based on recognition of DNA sequences.

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

L.A. Lesmana, N. W.-Y. Leung, V. Mahachai, P.H. Phiet, D.J. Suh, G.B. Yao, Hepatitis B: overview of the burden of disease in the Asia–Pacific region, *Liver Int.* 26 (2006) 3-10.

G. L. Armstrong, A. Wasley, E. P. Simard, G. M. McQuillan, W. L. Kuhnert, M. J. Alter, The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002, *Ann. Intern. Med.* 144 (2006) 705-714.

C. Trepo, P. Pradat, Hepatitis C virus infection in Western Europe, *J. Hepatol.* 31 (1999) 80-83.

M. Kane, Global program for control of hepatitis B infection, *Vaccine* 13 (1995) 47-49.

R. Franchis, A. Hadengue, G. Lau, D. Lavanchy, A. Lok, N. McIntyre, EASL international consensus conference on hepatitis B, 13–14 September 2002,

Geneva, Switzerland. Consensus statement (long version), J. Hepatol. 39 (2003) 3-25.

S.-M.R. Jafri, A.S.-F. Lok, Antiviral therapy for chronic hepatitis B, Clin. Liver Dis. 14 (2010) 425–438.

H. Peng, L. Zhang, C. Soeller, J. Travas-Sejdic, Conducting polymers for electrochemical DNA sensing, Biomaterials 30 (2009) 2132–2148.

F.R.R. Teles, L.P. Fonseca. Trends in DNA biosensors, Talanta 77 (2008) 606.

J.E.N. Dolatabadi, O. Mashinchian, B. Ayoubi, A.A. Jamali, A. Mobed, D. Losic, Y. Omid, M. Guardia, Optical and electrochemical DNA nanobiosensors, Trend. Anal. Chem. 30 (2011) 459-472.

Z.-W. Chen, A. Balamurugan, S.-M. Chen, Detection of DNA by using bio-conducting polymer-Nile blue composite electrode; Nile blue as an indicator, Bioelectrochemistry 75 (2009) 13-18.

S. Niu, M. Zhao, L. Hu, S. Zhang, Carbon nanotube-enhanced DNA biosensor for DNA hybridization detection using rutin-Mn as electrochemical indicator, Sensor. Actuat. B-Chem. 135 (2008) 200-205.

L. Liu, B. Shen, J. Shi, F. Liu, G.-Y. Lu, J.-J. Zhu, A novel mediator-free biosensor based on co-intercalation of DNA and hemoglobin in the interlayer galleries of [alpha]-zirconium phosphate, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 2627-2632.

J. Wang, G. Rivas, J.R. Fernandes, J.L.L. Paz, M. Jiang, R. Waymire, Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor, *Anal. Chim. Acta.* 375 (1998) 197-203.

N. Nasirizadeh, H.R. Zare, M. H. Pournaghi-Azar, M. S. Hejazi, Introduction of hematoxylin as an electroactive label for DNA biosensors and its employment in detection of target DNA sequence and single-base mismatch in human papilloma virus corresponding to oligonucleotide, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 2638–2644.

D. Dell'Atti, M. Zavaglia, S. Tombelli, G. Bertacca, A.O. Cavazzana, G. Bevilacqua, M. Minunni, M. Mascini, Development of combined DNA-based piezoelectric biosensors for the simultaneous detection and genotyping of high risk Human Papilloma Virus strains, *Clin. Chim. Acta.* 383 (2007) 140-146.

S. Niu, S.-S. Zhang, L. Wang, X-M. LI, Hybridization biosensor using di(1,10-phenanthroline) (imidazo[f]1,10-phenanthroline)cobalt(II) as electrochemical indicator for detection of human immunodeficiency virus DNA, *J. Electroanal. Chem.* 597 (2006) 111-118.

D. Zhang, Y. Peng, H. Qi, Q. Gao, C. Zhang, Label-free electrochemical DNA biosensor array for simultaneous detection of the HIV-1 and HIV-2 oligonucleotides incorporating different hairpin-DNA probes and redox indicator, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 1088-1094.

T. Ahuja, I.A. Mir, D. Kumar, Rajesh. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications, *Biomaterials* 28 (2007) 791-805.

N.K. Guimard, N. Gomez, C.E. Schmidt, Conducting polymers in biomedical engineering, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 876-921.

A.G. Brito-Madurro, L.F. Ferreira, S.N. Vieira, L.R.G. Filho, J.M. Madurro, Immobilization of purine bases in poly-4-aminophenol matrix, *J. Mater. Sci.* 42 (2007) 3238-3243.

R.M.L. Oliveira, S.N. Vieira, H.C. Alves, E.G. França, D.L. Franco, L.F. Ferreira, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro, Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: a new matrix for oligonucleotide hybridization, *J. Mater. Sci.* 45 (2010) 475-482.

T.A.R. Silva, L.F. Ferreira, L.M. Souza, L.R.G. Filho, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro, New approach to immobilization and specific-sequence detection of nucleic acids based on poly(4-hydroxyphenylacetic acid), *Mat. Sci. Eng.* 29 (2009) 539-545.

S.N. Vieira, L.F. Ferreira, D.L. Franco, A.S. Afonso, R.A. Goncalves, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro, Electrochemical modification of graphite electrodes with poly(4-aminophenol), *Macromol. Symp.* 245-246 (2006) 236-242.

L.F. Ferreira, J.F.C. Boodts, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro, Gold electrodes modified with poly(4-aminophenol): incorporation of nitrogenated bases and an oligonucleotide, *Polym. Int.* 57 (2008) 644-650.

D.L. Franco, A.S. Afonso, L.F. Ferreira, R.A. Goncalves, J.F.C. Boodts, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro, Electrodes modified with polyaminophenols: immobilization of purines and pyrimidines, *Polym. Eng. Sci.* 48 (2008) 2043-2050.

A.S. Afonso L.R. Goulart, I.M.B. Goulart, A.E.H. Machado, J.M. Madurro, A.G. Brito-Madurro, A promising bioelectrode based on gene of *mycobacterium leprae* immobilized onto poly(4-aminophenol), *J. Appl. Polym. Sci.* 118 (2010) 2921–2928.

A.M. Oliveira-Brett, J.A. Piedade, L.A. Silva, V.C. Diculescu, Voltammetric determination of all DNA nucleotides, *Anal. Biochem.* 332 (2004) 321-329.

M. Yang, M.E. McGovern, M. Thompson, Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry, *Anal. Chim. Acta* 346 (1997) 259-275.

M.A. La-Scalea, S.H.P. Serrano, I.G.R. Gutz, Eletrodos modificados com DNA: uma nova alternativa em eletroanálise, Quím. Nova 22 (1999) 417-424.

K. Nakamoto, M. Tsuboi and G.D. Strahan, Drug–DNA Interactions: Structures and Spectra, John Wiley & Sons, New Jersey (2008).

H.-L. Chen, D.-Y. Liu, B. Yang, J. L and G. Wang A new hybrid method based on local fisher discriminant analysis and support vector machines for hepatitis disease diagnosis. Expert Systems with Applications. 38 (2011) 11796-11803.

U. Elewa, A. M. Sandri, W. R. Kim, F. C. Fervenza. Treatment of Hepatitis B Virus-Associated Nephropathy. Nephron. Clin. Pract. 119 (2011) c41–c49.

H.Y. Xie, J. Cheng, C.Y. Xing, J.J. Wang, R. Su, X.Y. Wei, L. Zhou, S.S. Zheng Evaluation of hepatitis B viral replication and proteomic analysis of HepG2.2.15 cell line after knockdown of HBx. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 10 (2011) 295-302.

Scarano S., M. Mascini, A. P. F. Turner , M. Minunni: Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors. Biosens Bioelectron 25(2010), 957-966.

F. Lucarelli., S. Tombelli, M. Minunni, G. Marrazza, M. Mascini: Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection. Anal. Chim. Acta 609(2008) 139-159.

Sadik O. A., A. O. Aluoch, A. Zhou: Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2749-2765.

P. Skládal, C. S. Riccardi, H. Yamanaka, P. I. C. Piezoelectric biosensors for real-time monitoring of hybridization and detection of hepatitis C virus. *J. Virol. Meth.* 117 (2004) 145–151.

R. M. Iost, W.C Silva, J.M. Madurro, A.G. Brito-Madurro, L.F.Ferreira, F.N. Crespilho. Recent advances in nano-based electrochemical biosensors: application in diagnosis and monitoring of diseases. *Front. Biosci.* 3 (2011) 663-689.

T.A.R. Silva, L. F. Ferreira, J. F.C. Boodts, S. P.Eiras, J. M. Madurro, Brito-Madurro, A. G. Poly(4-hydroxyphenylacetic acid): A new material for immobilization of biomolecules. *Pol. Eng. Sci.* 48 (2008) 1963-1970.

L. F. Ferreira, L. M. Souza, A.C.H. Castro, A.A.Oliveira, J.F.C. Boodts, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro. Formation of novel polymeric films derived from 4-hydroxybenzoic acid. *Mater. Chem. Phys.* 129 (2011) 46-52.