



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

**CONSTRUÇÃO DE BIOELETRODO PARA DETECÇÃO DA BACTÉRIA
*NEISSERIA MENINGITIDIS***

Aluno: Ana Cristina Honorato de Castro

Orientadora: Prof. Dra. Ana Graci Brito Madurro

Co-Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Uberlândia-MG

2012



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

**CONSTRUÇÃO DE BIOELETRODO PARA DETECÇÃO DA BACTÉRIA
*NEISSERIA MENINGITIDIS***

Aluno: Ana Cristina Honorato de Castro

Orientadora: Prof. Dra. Ana Graci Brito Madurro

Co-Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

**Dissertação apresentada à Uni-
versidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Bioquímica (Área Bi-
oquímica)**

Uberlândia-MG

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C355c Castro, Ana Cristina Honorato de, 1985-
2 Construção de bioeletrodo para detecção da bactéria *Neisseria*
012 *meningitidis* / Ana Cristina Honorato de Castro. -- 2012.
70 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. Meningite cerebrospinal - Teses.
3. *Neisseria meningitidis* - Teses. 4. Biossensores - Teses. I. Ma-
durro, Ana Graci Brito. II. Madurro, João Marcos. III. Universi-
dade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ge-
nética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

Palavras Chaves: Meningite, *Neisseria Meningitidis*, biossensores



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

**CONSTRUÇÃO DE BIOELETRODO PARA DETECÇÃO DA BACTÉRIA
*NEISSERIA MENINGITIDIS***

ALUNA: Ana Cristina Honorato de Castro

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Examinadores: Prof. Dr. Frank Nelson Crespilho

Prof. Dr. Nilson Penha Silva

Data da Defesa: 20 /07/2012

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas do PPGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Ana Graci Brito Madurro

"O passado é história, o futuro é mistério, o agora é uma dádiva e por isso se chama presente."

Autor desconhecido

Agradecimentos

Acredito que as palavras colocadas aqui nunca conseguirão expressar minha gratidão e carinho a todas as pessoas que me acompanharam ao longo desta jornada em busca de sonhos que são meus, porém é o mínimo que posso oferecer neste momento.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por conceder a oportunidade de viver cada segundo da minha vida intensamente, por permitir que pessoas boas estejam ao meu redor, e principalmente por me dar força para continuar mesmo quanto julguei não conseguir. Obrigada por todos os meus dias, Senhor!

A minha família que sempre acreditou em meu potencial e esteve ao meu lado apoiando minhas decisões, e por isso espero ser digna desta confiança para que eles possam sentir orgulho de mim.

Agradeço principalmente aos meus pais, Heli e Celma, que foram responsáveis pela formação do meu ser, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida, não tanto quanto eles queriam, mas o suficiente para me sentir amada. Eles me deram as asas necessárias para que pudesse voar sozinha, com segurança. Muito obrigada pela confiança, compreensão e respeito.

Aos meus irmãos, Larissa Carulina e Hedy Henrique, que juntamente com meus pais formam o porto seguro da minha vida, me dando forças para querer voar mais alto, justamente porque sei que tenho para onde voltar. Agradeço-lhes pela paciência, apoio e carinho.

A faculdade me deu de presente uma irmã, que com muito amor e carinho me acompanhou durante a minha jornada, me dando forças e coragem para encarar os desafios. Obrigada minha amiga, companheira, conselheira Erivânia Brasileiro.

Durante o meu tempo no laboratório conheci mais do que bons companheiros e ganhei mais do que conhecimento, pessoas que hoje tenho privilégio de chamar de meus amigos. A cumplicidade, o carinho, o companheirismo e a amizade que encontrei no grupo LAFIP e agregados não tem preço. Agradeço-lhes não só por contribuírem para a minha formação, mas também por serem meus amigos, por cuidarem de mim, por estarem presentes em minha vida, por me entender quando dizia que precisava assistir um anime, pelas tardes de diversão,

pelos sorrisos incontáveis... Muito obrigada a todos: Professor (a) Ana Graci, Professor João Marcos, Deusmaque, Heden, Lucas, Luciano, Renata, Vinícius, Jose Manuel, Erick, Lara, Diego, Sabrina, Leandro, Fellipy, Felipe, Lidia, Bruno, Richard, Marina, Alberth, Rodrigo, Drielly...

Agradeço de forma especial também à professor (a) Ana Graci e ao Professor João Marcos pelo convite feito a mim para que eu pudesse desenvolver este trabalho. Eles são a alma do grupo de pesquisa do LAFIP e sem eles nada disso seria possível. Com o jeito calmo eles conduzem seus orientados com muito carinho e respeito, e por isso o grupo conseguiu se desenvolver e dele nasceu uma grande família. Fico extremamente feliz por fazer parte disso 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.

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.

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.

Índice de figuras e tabelas

Capítulo 1:

Figura 1. Figura representativa das meninges classificadas como: dura-máter, aracnóide e pia-máter.....	5
Tabela 1. Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação- Sinan Net	9
Figura 2. Punção lombar.....	13
Figura 3. Reação de eletrooxidação do 4-aminofenol.....	17
Figura 4. Esquema representativo de um biossensor	19
Figura 5. Esquema de dupla fita de DNA	20
Figura 6. Esquema de hibridização	21
Figura 7. Esquema de um biossensor de DNA	21
Figura 8. Técnica de imobilização de biomolécula (B) para desenvolvimento de biossensores: Adsorção física	23
Figura 9. Técnica de imobilização de biomolécula (B) para desenvolvimento de biossensores: Aprisionamento	24
Figura 10. Técnica de imobilização de biomolécula (B) para desenvolvimento de biossensores: Ligação cruzada	25
Figura 11. Técnica de imobilização de biomolécula (B) para desenvolvimento de biossensores: Ligação covalente	25
Figura 12. (A) Estrutura da estrutura do BE; (B) Esquema de como acontece a intercalação do BE no DNA.....	26
Figura 13. Esquema da intercalação do AM ao DNA junto com sua estrutura.....	27

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 (NM1): before hybridization (a) and after 15 minutes of incubation with complementary target (NM2) (b). Electrolyte: phosphate buffer (0.10 mol L⁻¹), pH 7.4. Modulation amplitude: 0.05mV. Pulse interval: 0.2s; 5mVs⁻¹ 45

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 NM1/probe: before (a) or after (b) hybridization complementary target NM2/target Electrolyte: phosphate buffer (0.10 mol.L⁻¹), pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2s; 5mVs⁻¹ 47

Figure 3. Differential pulse voltammograms of ethidium bromide onto graphite electrode modified with poly (4-aminophenol) containing NM1/probe: (A) - before hybridization (a) and after hybridization with non-complementary DNA (NonNM1) (b). (B) before hybridization (a) or after hybridization with negative target (DNA₂₇₇ pb) (b) and positive target (MEN₇₁₀ pb) (c). Electrolyte: phosphate buffer (0.10 mol.L⁻¹), pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2s; 5mVs⁻¹48

Figure 4. Differential pulse voltammogram of ethidium bromide onto graphite electrode/poly(4-AMP)/Men1 in detection of the target complement in absence (a) or presence of interferents. ascorbic acid 3.6 mg.dL⁻¹ (b); glucose 1 mM (c); glutamate 1 mM (d); alanine 1 mM (e) end uric acid mg.dL⁻¹ (f). Electrolyte: phosphate buffer (0.10 mol.L⁻¹), pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2s; 5mVs⁻¹. Inset: Selectivity Coefficient of Bioelectrode49

Figure 5. Stability study of the biological to oligonucleotide specific for *Neisseria meningitidis*..... 50

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 (NM1) before or after hybridization with concentrations different of DNA target (NM2). Electrolyte: phosphate buffer (0.10

mol.L⁻¹), pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2s; 5 mVs⁻¹. (B)
Calibration data for the oxidation signal of ethidium bromide obtained after hybridization of modified electrode containing the probe with complementary target
.....51

Lista de abreviaturas

HSV - herpes simplex vírus
MB - meningites bacterianas
Hib - Haemophilus influenzae b
Sp - Streptococcus pneumoniae
Nm - Neisseria meningitidis
MP - meningite pneumocócica
MM - meningite meningocócica
Sinan Net - Sistema de Informação de Agravos de Notificação
DATASUS - Banco de dados do Sistema Único de Saúde
LCR - líquido cefalorraquideo
PL - punção lombar
PIC - pressão intracraniana
TC - tomografia computadorizada
RM - ressonância magnética
SIADH - síndrome da secreção inapropriada do hormônio antidiurético
EQM - eletrodo quimicamente modificado
DNA – *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
PCR - Reação em cadeia da polimerase
HIV - vírus da imunodeficiência adquirida
HPV - vírus do papiloma humano
BE - brometo de etídeo
AM - azul de metileno
NM1 – DNA sonda - Oligonucleotídeo sintético específico para a meningite
NM2- DNA alvo - Oligonucleotídeo sintético específico para a meningite
Non NM1 – Alvo não complementar – Oligonucleotídeo sintético
MEN₇₁₀ – produto de PCR específico da meningite contendo 710 pb

DNA₂₇₇ – produto de PCR contendo 277 pares de bases

dsDNA- double-strand – dupla fita de DNA

ssDNA – single-strand- simples fita de DNA

BSA – albumina de soro bovina

SSC – saline-sodium citrate buffer (tampão citrato de sódio salino)

poly(4-AMP)- Poli (4-aminofenol)

EB- Ethidium bromide (Brometo de etideo)

UA- uric acid (ácido úrico)

Glut- glutamate (Glutamato)

Glu- glucose (Glicose),

AL- alanine (alanina)

AA- ascorbic acid (Ácido ascórbico)

USA – *United States of America* (Estados Unidos da América)

Sumário

Apresentação	1
Capítulo 1: Fundamentação Teórica	3
1. Meningite.....	4
1.1. Meningite Bacteriana.....	6
1.2. Meningite Meningocócica	8
1.3. Fisiopatologia.....	10
2. Sintomas	11
3. Diagnóstico.....	12
4. Eletrodos Modificados	14
5. Filmes Poliméricos	15
6. Biossensores.....	17
7. Transdutores Eletroquímicos.....	22
8. Procedimentos convencionais de imobilização das biomoléculas.....	22
9. Mediadores usados para detecção indireta.....	26
Referências Bibliográficas.....	27
Capitulo 2: A novel biosensor to detection of bacterial meningitis, based on immobilization of specific DNA sequencie onto poly(4-aminophenol)	36
Abstract.....	38
Resumo.....	38
1. Introduction.....	39
2. Experimental	41
2.1 Materials.....	41
2.2 Apparatus	42
2.3 Preparation of poly(4-aminophenol)	43
2.4 Probes immobilization on graphite electrode modified with poly(4-aminophenol).....	43
2.5. Hybridization detection	43
2.6. Detection of PCR productcs	44

2.7. Stability study	44
2.8. Interference studies	44
3. Results and discussion.....	45
3.1. Direct detection	45
3.2. Indirect detection	46
3.3. Specificity of biosensor	47
3.4. Interference study.....	48
3.5. Eletrochemical biosensor stability.....	50
3.6. Calibration curve	51
4. Conclusions.....	52
Acknowledgments	52
References	53

APRESENTAÇÃO

A Meningite é a inflamação das membranas que recobrem o sistema nervoso central, as meninges, e é comumente causada por agentes infecciosos. A forma bacteriana é grave, podendo resultar em danos ao cérebro, perda de audição ou dificuldade de aprendizagem, com altas taxas de mortalidade e morbidade, principalmente em crianças. Os agentes etiológicos mais importantes causadores destas enfermidades são: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* b, sendo que a *Neisseria meningitidis* provoca a meningite “meningocócica” que possui um quadro clínico grave, de rápida evolução e pode causar surtos ou epidemias.

Os testes disponíveis para o diagnóstico das meningites nos hospitais são demorados, caros e não-confirmativos, são feitos por dosagens, no líquido, de glicose e proteínas, contagem diferencial de leucócitos, bacterioscopia e aglutinação em látex.

Uma tecnologia bastante utilizada para fins de diagnóstico é a produção de biossensores, que são dispositivos capazes de fornecer informação analítica quantitativa ou qualitativa em uma determinada amostra, usando materiais biológicos para detectar o analito correspondente. Tais dispositivos são importantes ferramentas usadas para diagnóstico clínico. Apresentam diversas vantagens sobre os métodos existentes, tais como: baixo custo, pode passar por um processo de miniaturização, tem elevada seletividade e sensibilidade, capacidade de detecção em tempo real usando pouco volume de amostra e são de resposta rápida.

Este trabalho visou à construção de um bioeletrodo, utilizando oligonucleotídeos sintéticos específicos ao agente etiológico da meningite, a bactéria *Neisseria meningitidis* em eletrodos de grafite modificados eletroquimicamente com poli(4-aminofenol). Voltametria de pulso diferencial foi usada para análise de eletrodos modificados contendo sonda NM1 antes e após hibridização com o alvo complementar NM2. O Bioeletrodo construído para análise do agente etiológico da meningite é específico, seletivo, estável e sensível, apresentando um limite de detecção de 1.4×10^{-10} mol.L⁻¹. No estudo de interferentes o bioeletrodo não sofre significativamente o que representa uma característica interessante para diagnóstico em amostras reais.

CAPÍTULO 1:
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1- Meningite

O cérebro e a medula espinhal têm uma resistência extraordinária às infecções, mas, quando se infectam, as consequências são habitualmente muito graves. A meningite é uma doença que consiste na inflamação das membranas que revestem o encéfalo e a medula espinhal, conhecidas como meninges, as quais são classificadas como: dura-máter, aracnóide e pia-máter (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

A Dura-máter é a meninge mais superficial, espessa e resistente, formada por tecido conjuntivo muito rico em fibras colágenas, contendo nervos e vasos. É formada por dois folhetos: um externo e um interno. O folheto externo adere intimamente aos ossos do crânio e se comporta como um periósteo destes ossos, mas sem capacidade osteogênica (nas fraturas cranianas dificulta a formação de um calo ósseo). Em virtude da aderência da dura-máter aos ossos do crânio, não existe, no crânio, um espaço epidural como na medula (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Aracnóide é uma membrana muito delgada, justaposta à dura-máter, da qual se separa por um espaço virtual, o espaço subdural, contendo uma pequena quantidade de líquido necessário à lubrificação das superfícies de contato das membranas. A aracnóide separa-se da pia-máter pelo espaço subaracnóideo que contém líquido, havendo grande comunicação entre os espaços subaracnóideos do encéfalo e da medula. Considera-se também como pertencendo a aracnóide as delicadas trabéculas que atravessam o espaço para se ligar à pia-máter, e que são denominados de trabéculas aracnóides. Estas trabéculas têm um aspecto de teias de aranha, donde vem o nome aracnóide (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Pia-máter é a mais interna das meninges, aderindo intimamente à superfície do encéfalo e da medula, cujos relevos e depressões acompanham até o fundo dos sulcos cerebrais. Sua porção mais profunda recebe numerosos prolongamentos dos astrócitos do tecido nervoso, constituindo assim a membrana pio-glial. A pia-máter dá resistência aos órgãos nervosos, pois o tecido nervoso é de consistência muito mole. A pia-máter acompanha os vasos que penetram no tecido nervoso a partir do espaço subaracnóideo, formando a parede externa dos espa-

ços perivascular. Neste espaço existem prolongamentos do espaço subaracnóideo, contendo líquido, que forma um manto protetor em torno dos vasos, muito importante para amortecer o efeito da pulsação das artérias sobre o tecido circunvizinho (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

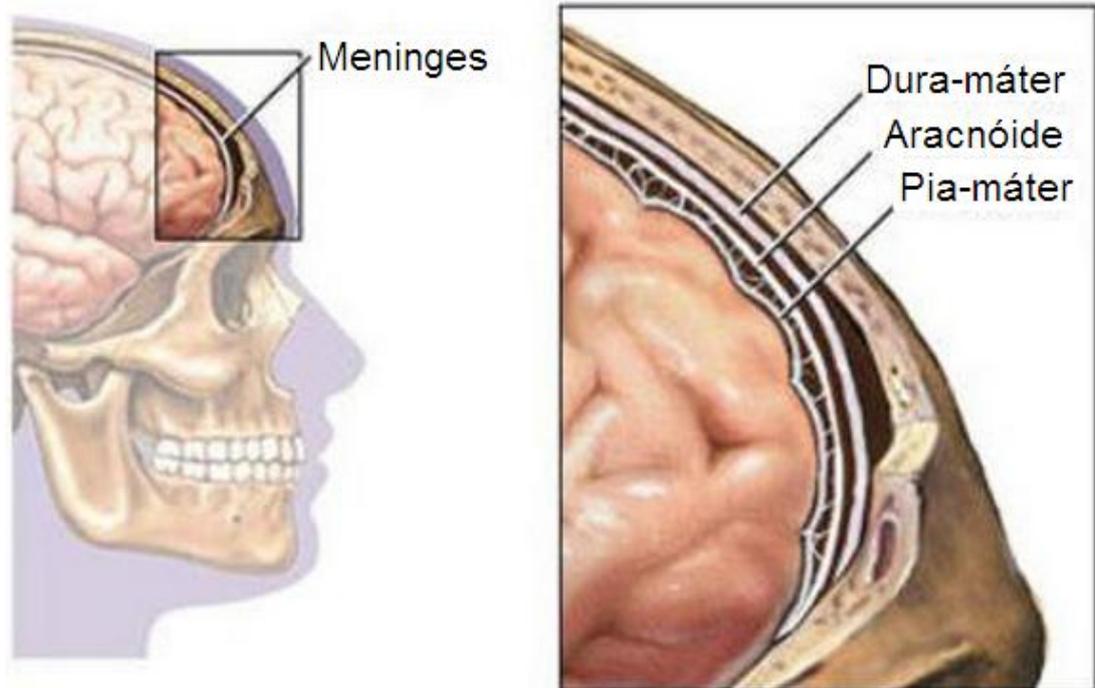


Figura 1: Figura representativa das meninges classificadas como: dura-máter, aracnóide e pia-máter.

Fonte: <http://www.auladeanatomia.com/neurologia/liquor.htm>, acessada dia 03/04/2012.

A meningite é uma doença que acomete as populações de distintas partes do mundo e é habitualmente causada por agentes infecciosos. São empregadas duas classificações: asséptica e bacteriana.

A forma asséptica geralmente é benigna e de curso autolimitado e raramente associado a um prognóstico ruim. Seus agentes mais comuns são os HSV (herpes simplex vírus) tipo 1 e 2, vírus Varicella-Zoster e enterovírus, principalmente os da família Picornaviridae (TRALLERO et al., 2000).

A forma bacteriana é grave, podendo resultar em danos ao cérebro, perda de audição ou dificuldade de aprendizagem (DAOUD et al., 2005).

As bactérias e os outros microrganismos infecciosos podem alcançar as

meninges e outras áreas do cérebro de diversas maneiras a partir de sítios distantes. Podem ser levadas pela corrente sanguínea ou podem entrar no cérebro por penetração direta devido a uma ferida ou a uma intervenção cirúrgica, por exemplo.

1.1- Meningite bacteriana

As meningites bacterianas (MB) ocupam um lugar de destaque em todo o mundo, devido a sua gravidade, sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade, principalmente em crianças (DAOUD et al., 2005). Na era pré-antibiótica, a letalidade era aproximadamente de 100%, e os poucos sobreviventes apresentavam graves sequelas neurológicas. As sequelas neurológicas ocorrem em 5% a 30% dos sobreviventes, e devem-se principalmente a morosidade no estabelecimento do diagnóstico e, conseqüentemente, no início do tratamento eficaz (TUNKEL et al.,1997). Hoje, cerca de 5% a 40% das crianças ainda morrem devido a MB.

Surtos epidêmicos ocorrem em todo o mundo, porém o Continente Africano é o mais afligido por estes surtos, principalmente em uma área conhecida como “cinturão da meningite” onde, na década de 50, foram registrados 340.000 casos, com 53.000 óbitos (TIKHOMIROV et al.,1997) e de acordo com a Organização Mundial de Saúde, 1º de janeiro a 11 de março de 2012 foram notificados 6.685 casos suspeitos com 639 óbitos. Nesta região, as MB têm um caráter tipicamente sazonal, observando-se um aumento dos casos endêmicos e epidêmicos na estação seca, período de dezembro a junho, com significativa redução após a chegada das chuvas. Nos países de clima temperado a maioria dos casos ocorre no inverno, época em que aumenta a incidência de infecções respiratórias e a convivência em ambientes fechados.

Encontram-se normalmente no ambiente que nos rodeia e podem inclusive viver, sem provocar qualquer dano, no nariz ou no aparelho respiratório de uma pessoa, sendo o ser humano o único hospedeiro natural destas bactérias. De maneira ocasional, estes organismos infectam o cérebro sem que se possa identificar a razão disso. Em outros casos, a infecção deve-se a uma ferida na cabeça ou é provocada por uma anomalia do sistema imunitário

(<http://www.manualmerck.net/?id=104&cn=932>, acessado dia 03/04/2012).

Os agentes etiológicos mais importantes causadores destas enfermidades são: *Haemophilus influenzae* b (Hib), *Streptococcus pneumoniae* (Sp) e *Neisseria meningitidis* (Nm), os quais são responsáveis por mais de 80% dos casos de meningites bacterianas fatais (TIKHOMIROV, et al., 1997).

O Hib pode causar meningite, sendo o tipo B o mais comum. A vacina contra o tipo B evita esta doença em bebês e crianças. Pessoas que tiveram contato íntimo com a saliva de pessoas com meningite causada por este tipo de bactéria podem necessitar de tratamento com antibiótico para não adoecer. A literatura revela que há pouco tempo atrás o Hib era o principal agente na causa da meningite bacteriana endêmica fatal, em crianças de diversas partes do mundo (RICHARDSON, 1996). Com a introdução da vacina, este quadro mudou bastante, em diversos países tais como, Estados Unidos e Inglaterra. E com isso houve uma redução de 94% no número de casos de Meningite provocada pela Hib, e, conseqüentemente, uma queda de 55% no total de meningites bacterianas.

O Sp causa infecções nos pulmões e no ouvido, mas também pode causar a meningite “pneumocócica”. Existem vários sorotipos de pneumococos. Indivíduos com problemas crônicos de saúde ou com o sistema imune enfraquecido têm risco aumentado de apresentar meningite pneumocócica. A meningite causada pelo *Streptococcus pneumoniae* não é transmitida de pessoa para pessoa, aquelas que tiveram contato próximo com alguém que tenha meningite pneumocócica (MP) não precisam tomar antibióticos preventivamente.

A vacina para a MP possui uma eficácia avaliada em torno de 56 e 57% e é recomendada, em alguns países, para grupos de risco, além de menores de 2 anos e maiores de 65 anos. Cabe ressaltar que a resposta de crianças menores de 2 anos a esta vacina é imprevisível, tendo sido relatados muitos casos de infecções graves e, até fatais, em crianças previamente vacinadas (SANTOS, et al., 2009).

A *Neisseria meningitidis* pode causar doença em pessoas de todas as idades. É altamente contagiosa e geralmente grave. A transmissão ocorre pelo contato da saliva ou gotículas de saliva da pessoa doente com os órgãos respiratórios do indivíduo saudável, levando a bactéria para o sistema circulatório aproximadamente cinco dias após contágio. Pode ocorrer por meio do beijo, do compar-

tilhamento de alimentos, de bebidas ou de cigarros, assim como por contato próximo a pessoas infectadas que estejam tossindo ou espirrando. As pessoas que tiveram contato íntimo com a saliva de alguém com meningite causada por este tipo de bactéria podem necessitar de tratamento preventivo com antibiótico para não adoecer. A meningite causada por estas bactérias é chamada “meningocócica”, e tem grande importância devido à gravidade do quadro clínico, rápida evolução e pela possibilidade de causar surtos ou epidemias.

1.2- Meningite Meningocócica

A meningite meningocócica (MM) é uma enfermidade bacteriana aguda, causada pela *Neisseria meningitidis* (meningococo), de ocorrência mundial, com variações sazonais e epidêmicas localizadas, representando de 10% a 40% das meningites bacterianas.

É a única, dentre estas, que se apresenta de forma epidêmica (EBRAHIM, 1997).

É importante ressaltar, entretanto, que a MM está altamente associada a fatores sócio-econômicos, podendo, em países desenvolvidos, se encontrar taxas de incidência em torno de 1 a 5 casos por 100.000 habitantes, enquanto que, nos países em desenvolvimento, esta taxa varia de 10 a 20 por 100.000. Também, nos países desenvolvidos, 50 a 60% dos casos ocorrem em crianças de 3 meses a 5 anos de idade, podendo ocorrer, ainda, em adolescentes e adultos jovens, com menos de 25 ou 30 anos de idade (TIKHOMIROV et al., 1997).

Tabela 1: Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net



MENINGITE - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net

Casos confirmados por Mes 1º Sintoma(s) segundo UF Notificação

Período: 2011

UF Notificação	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Total
TOTAL	1.555	1.409	1.570	1.632	1.670	1.685	1.692	1.598	1.823	1.861	1.709	1.462	19.666
Rondonia	5	3	5	9	12	8	6	2	4	2	6	2	64
Acre	2	1	3	4	-	3	1	-	3	-	-	2	19
Amazonas	13	10	13	9	12	4	11	9	15	14	8	8	126
Roraima	-	1	2	2	1	2	-	-	3	1	3	-	15
Para	32	27	34	30	40	38	32	43	30	30	33	15	384
Amapa	2	3	1	2	3	1	-	3	-	-	-	-	15
Tocantins	3	4	6	11	5	3	5	2	10	4	5	8	66
Maranhao	13	10	16	12	16	8	6	15	9	2	10	8	125
Piaui	35	38	45	45	39	26	24	30	25	24	30	8	369
Ceara	27	31	52	41	56	53	56	41	24	30	25	11	447
Rio Grande do Norte	13	16	10	15	15	17	31	12	22	13	8	10	182
Paraiba	7	7	8	2	11	15	21	21	17	13	7	5	134
Pernambuco	75	73	90	80	70	85	61	102	115	137	149	98	1.135
Alagoas	15	14	14	4	9	12	17	17	9	9	6	8	134
Sergipe	2	1	4	2	5	2	5	8	15	7	5	7	63
Bahia	113	76	94	82	107	103	95	114	144	151	122	140	1.341
Minas Gerais	83	71	92	83	104	96	108	98	114	122	114	134	1.219
Espirito Santo	13	11	16	27	23	18	19	22	23	21	17	13	223
Rio de Janeiro	82	84	67	87	97	94	123	105	144	116	119	112	1.230
Sao Paulo	584	551	633	693	670	728	719	586	689	735	653	537	7.778
Parana	130	121	123	155	142	136	88	116	139	120	121	116	1.507
Santa Catarina	66	53	62	52	51	57	73	63	77	98	69	43	764
Rio Grande do Sul	138	134	103	88	90	99	118	123	129	165	113	106	1.406
Mato Grosso do Sul	25	15	20	19	17	20	22	16	16	11	25	15	221
Mato Grosso	20	11	14	14	15	18	9	15	23	13	21	12	185
Goiias	40	31	31	49	45	27	20	17	7	14	25	28	334
Distrito Federal	17	12	12	15	15	12	22	18	17	9	15	16	180

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net

Notas:

- 1) Excluídos casos não residentes no Brasil.
- 2) Períodos Disponíveis ou período - Corresponde aos anos de notificação dos casos.
- 3) Para tabular dados epidemiológicos de um determinado ano selecione na linha a variável de interesse, na Coluna Ano dos 1ºs sintomas; em Períodos Disponíveis assinala o ano inicial da série e todos os posteriores até o ano atual (p/ incluir casos notificados com atraso) e em Seleções Disponíveis assinala os anos dos 1ºs sintomas (ex: nº de casos com início de sintomas 2007: selecione na linha UF de residência, na Coluna Ano de 1ºs sintomas, em Períodos disponíveis 2007 até o ano atual e em Seleções assinala Ano de 1ºs sintomas 2007).
- 4) Para cálculo da incidência utilize locais de residência.
- 5) Dados de 2008 atualizados em 27/03/2010.

dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinanweb/meningite/bases/meninbmet.def

Fonte: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>, acessada dia 30/03/2012.

De acordo com os dados obtidos no banco virtual de notificações de doenças federal do Brasil, o DataSUS, em 2009, a Bahia viveu um surto da doença, com 1.511 casos e 152 mortes. Durante 2010, 3.173 pessoas foram internadas no país por infecção meningocócica e em 2011 foram confirmados 2.749 casos, sendo que destes, 576 vieram a óbito.

Ainda em consulta a estes dados, a tabela acima mostra a distribuição da doença, no Brasil em 2011, sendo que os estados mais acometidos pela doença são: São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Bahia, Rio de Janeiro e Minas Gerais (DataSUS, <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>, acessado dia 30/03/2012).

1.3- Fisiopatologia

Na meningite bacteriana, as bactérias atingem as meninges por uma das duas vias principais: corrente sanguínea ou contato direto entre as meninges e a cavidade nasal ou a pele. Uma vez que as bactérias entraram na corrente sanguínea, elas entram no espaço subaracnóideo em lugares onde a barreira cérebro-sangue é vulnerável, como o plexo coróide. A meningite ocorre em 25% dos recém-nascidos com infecções da corrente sanguínea; este fenômeno é menos comum em adultos. A contaminação direta do líquido cefalorraquidiano pode surgir a partir de dispositivos de longa permanência, fraturas de crânio, ou infecções da nasofaringe ou nasais; ocasionalmente, defeitos congênitos da dura-máter podem ser identificados (KRENTZ *et al.*, 2005).

A inflamação em grande escala que ocorre no espaço subaracnóide durante a meningite não é um resultado direto de uma infecção bacteriana, mas pode ser largamente atribuída à resposta do sistema imunitário à entrada de bactérias no sistema nervoso central. Quando os componentes da membrana celular bacteriana são identificados pelas células do sistema imunológico do cérebro (astrócitos e microglia), eles respondem com liberação de grandes quantidades de citocinas, agentes mediadores que recrutam outras células do sistema imunológico e estimulam outros tecidos para participar em uma resposta imune .

A barreira sangue-cérebro se torna mais permeável, levando ao edema "vasogênico" cerebral (inchaço do cérebro devido a uma fuga de líquido

dos vasos sanguíneos). Um grande número de células brancas do sangue entram no líquido cefalorraquidiano, o que provoca inflamação das meninges e leva ao edema "intersticial" (inchaço devido ao fluido entre as células). Além disso, as paredes dos próprios vasos sanguíneos ficam inflamadas (vasculite cerebral), o que leva a uma diminuição do fluxo sanguíneo e a um terceiro tipo de edema, o edema "citotóxico". As três formas de edema cerebral conduzem a um aumento da pressão intracraniana, juntamente com a baixa pressão arterial, frequentemente encontrada na infecção aguda, torna mais difícil para o sangue entrar no cérebro, de tal forma que as células do cérebro são privadas de oxigênio e sofrem apoptose (FOCACCIA et al.; 2002).

2- Sintomas

Os sintomas mais comuns são: febre, pescoço dolorido, dor de garganta, pequenas manchas vermelhas na pele, vômito e convulsões. Em adultos, a dor de cabeça ocorre em quase 90% dos casos de meningite bacteriana, seguida pela rigidez de nuca (incapacidade de flexionar o pescoço para a frente de forma passiva, devido ao aumento do tônus muscular e rigidez). Outros sinais comumente associados à meningite incluem fotofobia, intolerância à luz, fonofobia, e intolerância a ruídos altos. Nas crianças com menos de 2 anos, a meningite causa habitualmente febre, vômitos, irritabilidade, convulsões, problemas para comer e choro de um tom muito agudo. A pele sobre a fontanela (a zona mole entre os ossos do crânio) fica tensa e a fontanela pode fazer saliência. O fluxo de líquido à volta do cérebro pode ver-se bloqueado, fazendo com que o crânio aumente (hidrocefalia). Ao contrário da criança mais velha ou do adulto, uma criança com menos de 1 ano pode não apresentar rigidez do pescoço (rigidez da nuca).

A meningite meningocócica pode ser diferenciada de um outro tipo de meningite pela presença de erupções irregulares ou manchas vermelhas (petéquias) no tronco, extremidades inferiores, membranas das mucosas conjuntiva e nas palmas das mãos ou solas dos pés. A erupção cutânea é geralmente não-branqueável: o vermelho não desaparece quando pressionado com um dedo ou um copo de vidro. Embora estas erupções não estejam

necessariamente presente na meningite meningocócica, elas são relativamente específicas para a doença, mas, no entanto, ocorrem ocasionalmente em meningite causada por outras bactérias.

A síndrome de Waterhouse-Friderichsen, uma infecção de evolução rápida e catastrófica, é causada pela *Neisseria meningitidis*; produz diarreia grave, vômitos, convulsões, hemorragias internas, hipotensão, choque e, frequentemente, a morte.

3- Diagnóstico

Considerando o fato de que a meningite bacteriana (principalmente quando provocada pela *Neisseria meningitidis*) pode levar a morte em poucas horas, se faz necessária a atenção médica imediata. A observação do paciente e o exame físico, principalmente se este apresentar febre inexplicável, se estiver irritable ou mais sonolento que de costume (no caso de crianças com até 2 anos), se recusar a alimentação, tiver vômitos, convulsões e apresentar rigidez da nuca ou a presença de erupções cutâneas, é de extrema importância. Se o médico suspeitar de que se possa tratar de uma meningite bacteriana, o paciente é geralmente tratado com antibióticos inclusive antes de se ter os resultados da análise.

Sendo assim, quando se estabelece a suspeita da meningite deve-se determinar rapidamente qual o tipo do agente etiológico que pode estar provocando a infecção. São muitas as causas possíveis e o tratamento é diferente para cada uma delas (SCHELD et al., 1999; GRAY et al., 1992).

O diagnóstico definitivo da doença meningocócica é estabelecido pelo isolamento bacteriológico e identificação de *N. meningitidis* de líquidos biológicos habitualmente estéreis, como sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR) e outros, como o líquido sinovial, pleural ou pericárdico. O LCR e o sangue constituem-se nas principais fontes de cultivo positivo para meningococo, desde que coletados antes da administração de antibióticos.

Com isso, o teste mais importante para identificar ou descartar a meningite é a análise do líquido cefalorraquidiano por meio de punção lombar (PL). O teste é realizado inserido uma agulha fina entre duas vértebras na parte inferior da coluna vertebral para recolher uma amostra de líquido cefalorraquidiano da zona

exatamente abaixo da medula espinhal. Depois se examina o líquido ao microscópio para a sua cultura e identificação. A cultura de bactérias pode ser avaliada frente à susceptibilidade a diferentes antibióticos (antibiograma). A dosagem de carboidratos, proteínas e glóbulos brancos no líquido cefalorraquidiano pode contribuir para a determinação do tipo de infecção.



Figura 2: Punção lombar

Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Meningite>, acessada no dia 06/04/2012.

No entanto, a punção lombar está contra-indicada se houver uma massa no cérebro (tumor ou abscesso) ou elevação na pressão intracraniana (PIC), pois pode levar a uma herniação cerebral. Se o risco ocorrer, uma tomografia computadorizada (TC) ou uma ressonância magnética (RM) podem ser recomendadas antes da punção lombar. Isto aplica-se a 45% dos casos entre os adultos. Se a TC ou a RM é necessária antes da PL, ou a PL se revelar difícil, orientações profissionais sugerem que antibióticos devem ser administrados primeiro para evitar atrasos no tratamento (SOTOLONGO, 1995; GRAY et al., 1992).

Nas formas graves de meningite, a monitorização dos eletrólitos no sangue pode ser importante. A hiponatremia é comum na meningite bacteriana, devido a uma combinação de fatores, incluindo a desidratação, a excreção inadequada do hormônio antidiurético (SIADH), ou administração excessivamente agressiva de fluidos intravenosos.

Os testes realizados para diagnóstico da meningite são evasivos, caros e demorados, levando em consideração a gravidade da doença.

Muitos estudos são voltados para o desenvolvimento dos eletrodos quimicamente modificados com filmes poliméricos, visando o desenvolvimento

dos biossensores eletroquímicos para diagnóstico de doenças.

4- Eletrodos Modificados

O termo eletrodo quimicamente modificado (EQM) surge em 1975 com Murray e colaboradores, sendo que esta modificação da superfície objetiva pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução, como forma de alterar sua reatividade e seletividade, ampliando o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações (PEREIRA *et al.*, 2002). Há várias vantagens para os EQM's, entre estas se destacam:

- As interações seletivas e pré-concentração de um analito na camada modificadora;
- Eletrocatalise de reações redox de um analito com transferência lenta de elétrons sobre o eletrodo base;
- Permissividade com uso de membranas para inibir interferentes eletroativos;
- Detecção eletroquímica de analitos iônicos não-redox;
- A incorporação de biomoléculas, oligonucleotídeos, produtos de PCR, enzimas, antígenos ou anticorpos, para a construção de biossensores.

Com a utilização de EQM a sensibilidade e seletividade de uma determinação analítica devem aumentar, justificando seu emprego (GOTHEIF 2000, FINOT *et al.*, 2000).

A escolha do material que sofrerá a modificação, o eletrodo de trabalho ou base, é um aspecto muito importante para preparação de um EQM. Esta matriz deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequada para o método de imobilização selecionado. Entre os materiais convencionais podemos citar ouro, platina, carbono vítreo e mercúrio, na forma de filmes, fibras de carbono, pasta de carbono, carbono grafite, carbono reticulado, material plástico condutor e vidros condutores (GALLI *et al.*, 2006).

5- Filmes Poliméricos

Polímeros são compostos de origem natural ou sintética com alta massa molar, formados pela repetição de um grande número de unidades químicas chamadas monômeras (AKCELRUD, 2007). Eles atuam como agentes modificadores da superfície do eletrodo, alterando a reatividade, seletividade e sensibilidade, parâmetros que os tornam muito atrativos a amplas aplicações, especialmente na área de produção de novos materiais.

Polímeros contendo elétrons π apresentam propriedades eletrônicas não usuais tais como condutividade elétrica, baixa energia de transição óptica, baixo potencial de ionização e elevada afinidade eletrônica. Estes polímeros podem ser chamados de “metais sintéticos”, pois são polímeros policonjugados com propriedades eletrônicas (magnéticas, condutoras e ópticas) similares às dos metais, mas mantêm as propriedades convencionais dos polímeros orgânicos. No começo dos anos 70, Shirakawa e Ikeda (1974) demonstraram a possibilidade de preparar filmes auto-suportados de poliacetileno pela polimerização direta do acetileno, mas somente em 1977, quando Shirakawa e colaboradores (SHIRAKAWA *et al.*, 1977) descobriram que, tratando o poliacetileno com ácido ou base de Lewis, era possível aumentar a condutividade em até 13 ordens de grandeza. Esses processos envolviam a remoção ou adição de elétrons da cadeia polimérica (dopagem). A 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). Em ambos os casos a dopagem é aleatória e não altera a estrutura do material. A interação impureza-cadeia gera deformações e “defeitos carregados” localizados, responsáveis pelo aumento na condutividade (GENES *et al.*, 1987).

Desde a publicação do trabalho de Shirakawa e colaboradores (SHIRAKAWA *et al.*, 1977), houve um crescimento significativo da pesquisa sobre estruturas poliméricas conjugadas, levando ao desenvolvimento de novas classes de polímeros condutores. Polímeros condutores como a polianilina, poliacetileno e polipirrol foram extensamente estudados. Há relatos de que um octâmero de ani-

lina foi produzido por Letheby em 1862 (SHIRAKAWA *et al.*, 1977, FROMER & CHANCE, 1986). Sendo suas aplicações diversas, tais como: recobrimento de metais, sensores eletroquímicos, polímeros emissores de luz, telas de aparelhos eletrônicos, músculos artificiais, etc.

A preparação de polímeros por meio de métodos eletroquímicos hoje é muito utilizada, pois apresenta grande reprodutibilidade e metodologia simples, podendo ser realizada à temperatura ambiente. A espessura do filme pode ser controlada pela variação de potencial ou corrente versus tempo ou por meio da variação do número e/ou velocidade de varreduras de potencial (MOSCONE *et al.*, 1992).

Existe uma grande variedade de materiais utilizados na construção dos filmes poliméricos e estes permitem a imobilização de espécies ativas, bloqueando interferentes e aumentando a transferência de elétrons e a seletividade.

Os aminofenóis são compostos promissores em estudos eletroquímicos, uma vez que esses compostos apresentam dois grupos substituintes diferentes no anel aromático, os quais são química e eletroquimicamente ativos ($-NH_2$ e $-OH$), portanto, podem apresentar comportamento eletroquímico semelhante ao da anilina ou do fenol (YANG *et al.*, 1992, GATTRELL *et al.*, 1992). Durante o processo de síntese 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). Hawley e Adams (HAWLEY *et al.*, 1965) sugeriram que a eletrooxidação do 4-aminofenol envolve a saída de dois elétrons e dois prótons, produzindo a quinoneimina, e em uma próxima etapa ocorre hidrólise produzindo a 4-benzoquinona. Os autores sugerem também que uma segunda reação química entre a 4-benzoquinona e 4-aminofenol se torna importante à medida que o valor de pH aumenta, tornando possível a ocorrência de reação de acoplamento 1,4 e a geração de filme sobre a superfície do eletrodo (MENEZES *et al.*, 2006).

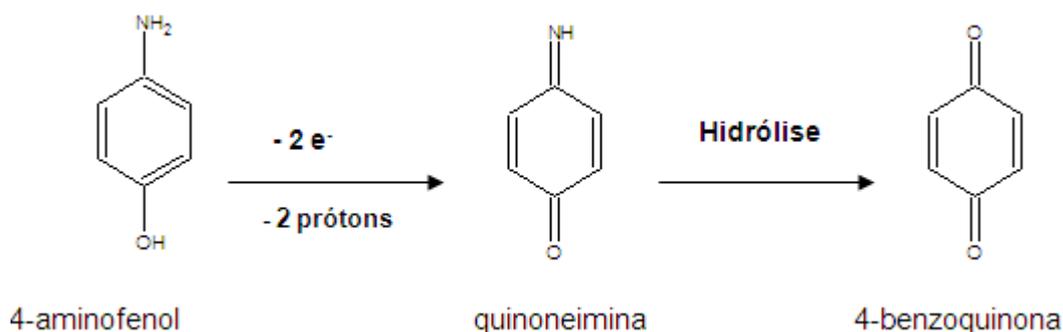


Figura 3: Reação de eletrooxidação do 4-aminofenol

Os eletrodos quimicamente modificados com polímeros podem ser usados em interações seletivas, pré-concentração, eletrocatalise e incorporação de biomoléculas, visando o desenvolvimento de biossensores, permissividade, detecção eletroquímica e incorporação de monocamadas, contribuindo para o aumento da sensibilidade e seletividade de medidas analíticas (GOTHELF 2000; FINOT *et al.*, 2000).

Derivados de monômeros aromáticos eletrodepositados em eletrodos condutores têm sido descritos na literatura. Dentre eles estão o estudo de eletropolimerização dos filmes poliméricos derivados dos monômeros 4-aminofenol (VIEIRA *et al.*, 2006) e 3-aminofenol (FRANCO *et al.*, 2008), a imobilização de bases nitrogenadas do DNA sobre os aminofenóis (FRANCO *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2008), e 4-metoxi-fenilamida (SILVA *et al.*, 2008), estudo da eletropolimerização e imobilização de estruturas de DNA utilizando 4-hidroxi-fenilacético (SILVA *et al.*, 2009) e 3-hidroxi-fenilacético (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Filmes poliméricos derivados do monômero 4-aminofenol eletrodepositados sobre a superfície de grafite apresentam características favoráveis no desenvolvimento de biossensores.

6- Biossensores

Os biossensores, ou sensores biológicos, são dispositivos capazes de reconhecer analiticamente elementos de origem biológica. Estes dispositivos são

dotados de uma sonda (uma biomolécula de reconhecimento) 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).

Assim um biossensor pode ser definido como um dispositivo capaz de fornecer informação analítica quantitativa ou qualitativa em uma determinada amostra, usando materiais biológicos (antígenos, anticorpos, enzimas, lipossomos, ácidos nucleicos, células ou tecidos e organelas, entre outros) para detectar o analito correspondente (espécie química ou biológica). O elemento biológico é fixado (imobilizado) a um elemento de transdução, que converte o sinal da reação biológica ou bioquímica em um sinal elétrico passível de ser quantificado. Este sinal pode ser resultante de alterações na concentração de prótons, liberação ou captação de gases, calor, massa, absorvância, condutância ou transferência de elétrons (TARLEY *et al.*, 2005).

Tais dispositivos são importantes ferramentas analíticas usadas para diagnóstico clínico (NAMBIAR *et al.*, 2011), na detecção de fármacos, resíduos ambientais (SANVICENS *et al.*, 2011), controle e qualidade de água e alimentos (COSNIER, 2003), controle de doenças, indústria de bebidas, dentre outras (CASTILHO *et al.*, 2004). Apresentam diversas vantagens sobre os métodos existentes, tais como: baixo custo, elevada seletividade e sensibilidade, pode passar por um processo de miniaturização, (NAMBIAR *et al.*, 2011) e capacidade de detecção em tempo real, o que é desejado na análise clínica e biomédica, realizando testes próximos aos pacientes, usando pouco volume de amostra e de resposta rápida (TYMECKI *et al.*, 2006, CHEN *et al.*, 2005).

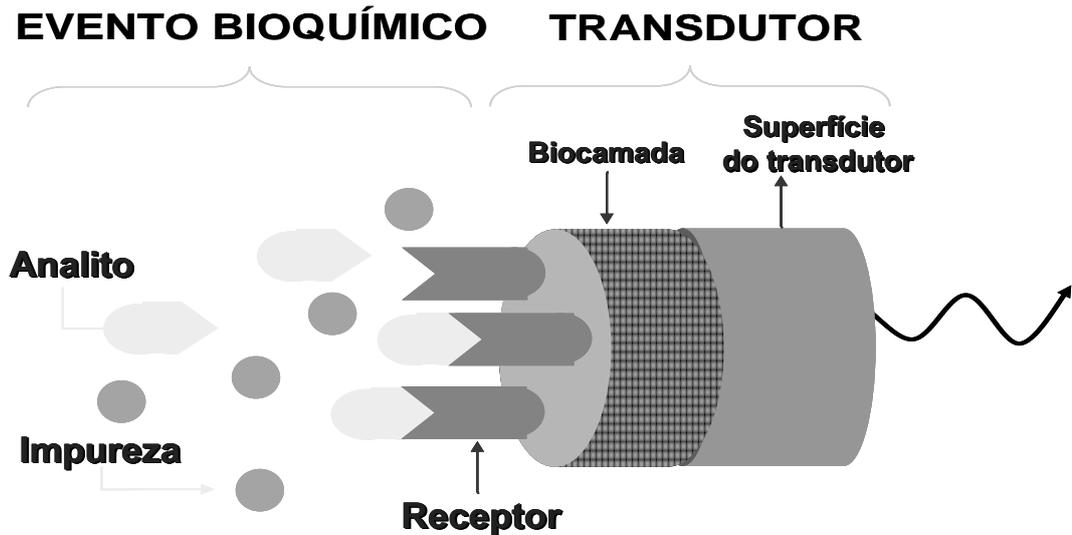


Figura 4: Esquema representativo de um biossensor.

Os biossensores são classificados de acordo com o analito a ser detectado. Biossensores baseados em DNA recebem a classificação de genossensores, e são dispositivos constituídos de oligonucleotídeos, produtos de PCR ou DNA imobilizados na superfície e conectados a um transdutor. Esse tipo de biossensor pode detectar a presença de genes específicos ou genes mutantes associados a doenças humanas hereditárias (MURPHY, 2006).

O comportamento eletroquímico do DNA e os efeitos de sua adsorção sobre diversos tipos de eletrodos vêm sendo pesquisados há quase 40 anos.

Métodos convencionais para análise de sequências gênicas específicas são baseados tanto no sequenciamento direto quanto na hibridização do DNA. Por causa da sua simplicidade, a técnica de hibridização é a mais comumente usada nos diagnósticos laboratoriais em relação ao método de sequenciamento direto.

Na hibridização do DNA, a sequência gênica alvo é identificada por uma sonda de DNA complementar. Sondas de DNA são fragmentos de DNA, produtos de PCR ou oligonucleotídeos. Na hibridização do DNA o reconhecimento da fita complementar (Figura 5) é altamente eficiente e específico na presença de uma mistura de diferentes ácidos nucleicos não-complementares.

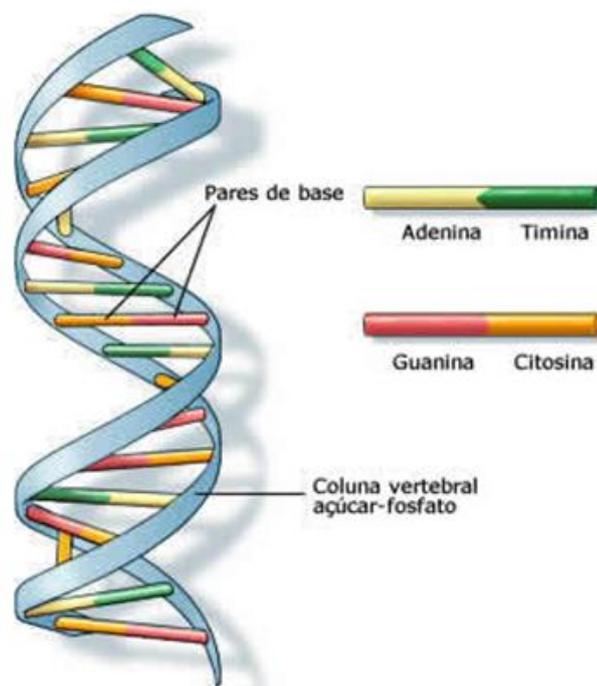


Figura 5: Esquema de dupla fita de DNA.

Fonte: <http://www.biologando.com.br/corpo-humano/estrutura-do-dna/>, acessada dia 12/04/2012.

Sensores eletroquímicos de DNA são promissores para análise de ácidos nucléicos, por causa de sua rapidez de resposta, alta sensibilidade e baixo custo. Esta técnica utiliza sequências de DNA imobilizada na superfície do sensor como elemento de reconhecimento e sequências de hibridização específicas podem ser monitorados e analisados (SILVA *et al.*, 2008).

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

Os sensores usados na detecção de material genético do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (NIU *et al.*, 2006), do vírus do papiloma humano (HPV) (NASIRIZADEH *et al.*, 2011) e também da bactéria, *M. leprae*, causadora da hanseníase (AFONSO *et al.*, 2010), são alguns genossensores encontrados na literatura.

tura, os quais utilizam métodos de transdução eletroquímica.

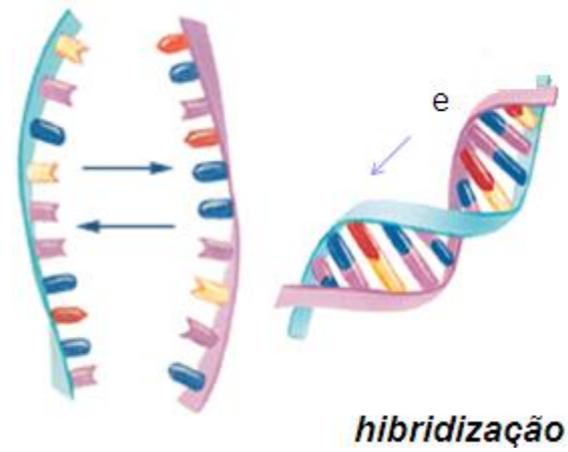


Figura 6: Esquema de hibridização

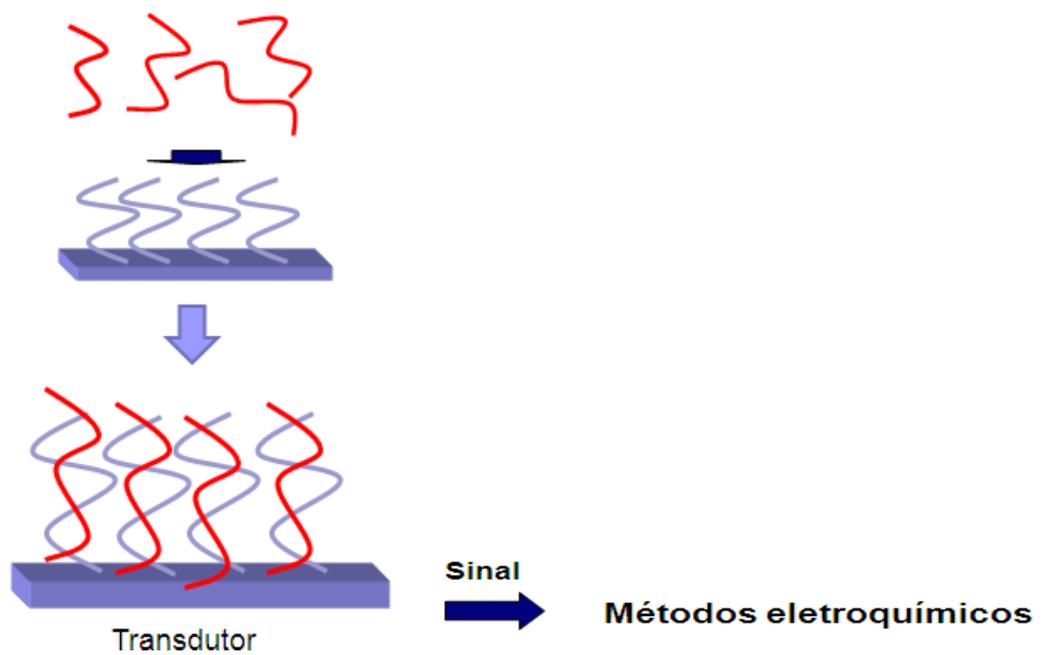


Figura 7: Esquema de um Biossensor de DNA

7- Transdutores Eletroquímicos

Os transdutores eletroquímicos são os mais frequentemente usados em biossensores e se baseiam no fato de que durante o processo de bio-interação, espécies eletroquímicas (elétrons) são consumidas ou geradas, produzindo um sinal eletroquímico, e o modo de transdução desse sinal torna importante o conhecimento da técnica a ser usada (GERARD *et al.*, 2002).

Estudos de processos de oxidação e redução em vários meios, de adsorção em superfícies e de mecanismo de transferência de elétrons, inclusive com a utilização de eletrodos modificados, exemplificam algumas das numerosas aplicações atuais das chamadas técnicas eletroanalíticas. Uma de suas mais importantes características relaciona-se ao fato destas técnicas possibilitarem o estabelecimento de relações diretas entre a concentração do analito e alguma propriedade elétrica como corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga (TURNER *et al.*, 1987).

8- Procedimentos convencionais de imobilização das biomoléculas

O sensor biológico se integra ao transdutor de três formas:

- Preso a uma membrana que é fixada na superfície do transdutor;
- Adsorvido na superfície do transdutor (adsorção física e aprisionamento),
- Ligado por meio de ligações covalentes diretamente ao transdutor (ligação cruzada e ligação covalente) (LEI *et al.*, 2006).

O reconhecimento de moléculas incorporadas apresenta um elevado nível de seletividade, mas é vulnerável a condições extremas de variação de temperatura, pH e força iônica. Moléculas biológicas tais como enzimas, anticorpos, DNA, etc., podem ser fixadas em uma matriz. A atividade de moléculas imobilizadas depende da área superficial, porosidade, caráter hidrofílico da matriz imobilizada, condições de reação e metodologia escolhida para a imobilização.

As técnicas de imobilização de materiais mais utilizadas para desenho e desenvolvimento de biossensores são: adsorção física, aprisionamento, ligação

cruzada e ligação covalente, descritas abaixo:

Adsorção física: Técnica que retém a biomolécula que se deseja imobilizar nas proximidades da superfície do transdutor, usando para isto membranas, tais como: sílica gel, celulose, polímeros, etc. As forças de ligação são principalmente devidas a ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e formação de sítios complexos de transferência de elétrons (SHARMA, *et al.*, 2003).

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, existe a possibilidade de se escolher o melhor polímero para adequar a interação biomolécula/polímero e propiciar uma interação física. As vantagens desta técnica são: ausência de modificação da biomolécula (RAMANATHAN *et al.*, 1996), baixo custo e possibilidade de regeneração da matriz. Entretanto, como desvantagem deste processo, a força de interação biomolécula/polímero é susceptível a mudança de pH, temperatura e força iônica do meio (DESHPANDE *et al.*, 1993, RAMANATHAN *et al.*, 2000).



Figura 8: Técnica de imobilização de biomolécula (B) para desenvolvimento de biossensores: Adsorção física.

Aprisionamento ou oclusão: Método que envolve a polimerização concomitante à imobilização da biomolécula, ou seja, aplicação de um potencial apropriado no eletrodo de trabalho, imerso em uma solução aquosa contendo moléculas do material biológico de interesse e do monômero. O material biológico presente nas vizinhanças da superfície do eletrodo é então incorporado durante o crescimento do polímero. Na adição, o “aprisionamento” ocorre sem reação química que possa afetar a atividade do material (AHUJA *et al.*, 2007).

A vantagem da polimerização eletroquímica é que o filme pode ser preparado facilmente em um rápido procedimento. Neste método é possível controlar a espessura da camada polimérica com base na medida de carga elétrica durante a

polimerização eletroquímica. A interação polímero/biomolécula é máxima e a biomolécula se localiza muito próxima ao transdutor (GAMBHIR *et al.*, 2001). Outra vantagem é a possibilidade de gerar um polímero cobrindo parte da superfície de um eletrodo de geometria complexa, apresentando um baixo custo. Como desvantagem, esta técnica apresenta uma alta barreira de difusão, dificultando a aproximação do analito e a interação com a sonda (YING-SING *et al.*, 2000, COSNIER *et al.*, 1999).

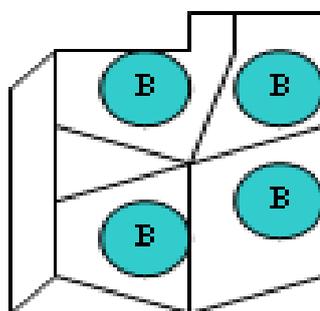


Figura 9: Técnica de imobilização de biomolécula (B) para desenvolvimento de biossensores: Aprisionamento

Ligação cruzada: Técnica onde se usa um reagente bifuncional, como glutaraldeído, ou multi-funcional, como hexametileno di-isocianato, para imobilização da molécula em vários tipos de suportes sólidos (GIL *et al.*, 1999). Ao usar esta técnica é necessário que haja preocupação com a acessibilidade ao componente bioativo.

A vantagem de seu uso é que a perda do componente biológico é mínima, uma vez que a escolha do agente bifuncional se apoia na afinidade deste com os grupamentos da biomolécula. O custo envolvido é relativamente moderado (NIKOLELIS *et al.*, 1998; WILSON *et al.*, 1992). Como são utilizados materiais reativos, existe risco de que a biomolécula se torne inativa, sendo esta sua desvantagem (CHAUBEY *et al.*, 2000).

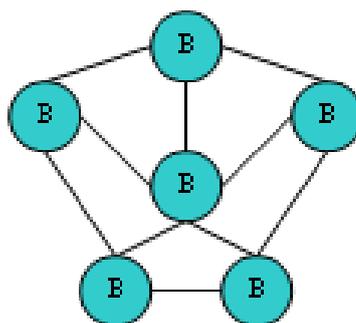


Figura 10: Técnica de imobilização de biomolécula (B) para desenvolvimento de biossensores: Ligação cruzada.

Ligação Covalente: Esta técnica é efetuada através da ligação entre grupos funcionais da molécula biológica de interesse, e uma matriz de suporte. (SHARMA *et al.*, 2003) Como matriz de suporte é comum usar filmes poliméricos, os quais podem ser eletropolimerizados sob condições (solvente orgânico, altos valores de potenciais para o processo de polimerização) que normalmente causariam danos às biomoléculas. Além disso, a ligação covalente entre a biomolécula e o polímero funcionalizado pode ser feita em solução tampão aquosa contendo aditivos e estabilizadores, os quais preservam a atividade catalítica e/ou as propriedades de reconhecimento das biomoléculas (COSNIER *et al.*, 1999).

Esta técnica apresenta como vantagem a baixa resistência difusional e a maior estabilidade do sensor, ao passo que a desvantagem vem do fato de que a matriz de suporte não é regenerável (GERARD *et al.* 2002; BARTLETT *et al.* 1993).

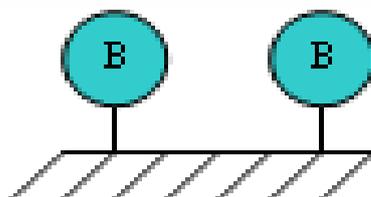


Figura 11: Técnica de imobilização de biomolécula (B) para desenvolvimento de biossensores: Ligação covalente.

9- Mediadores utilizados para detecção indireta.

As técnicas de detecção do alvo complementar podem ser diretas ou indiretas. Nas técnicas indiretas são utilizados mediadores ou intercaladores eletroquimicamente ativos no intuito de melhorar a seletividade e a sensibilidade de tais sensores.

O brometo de etídeo (BE) é um composto derivado da fenantridina, e muito utilizado em laboratórios de biologia molecular para corar ácidos nucleicos, pois quando intercalado à estrutura de DNA, se torna fluorescente sob luz ultravioleta, além de aumentar a resposta de corrente em análises eletroanalíticas. Desta maneira, este composto pode ser usado como mediador, apesar de apresentar um elevado potencial mutagênico e carcinogênico.

O BE é capaz de ligar com oligonucleotídeos após a hibridização por intercalações entre os pares de base da estrutura da dupla hélice do DNA. Estudos de voltametria cíclica do BE em tampão fosfato geraram uma onda anódica em 0,67 V (vs. Ag / AgCl) (WANG *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

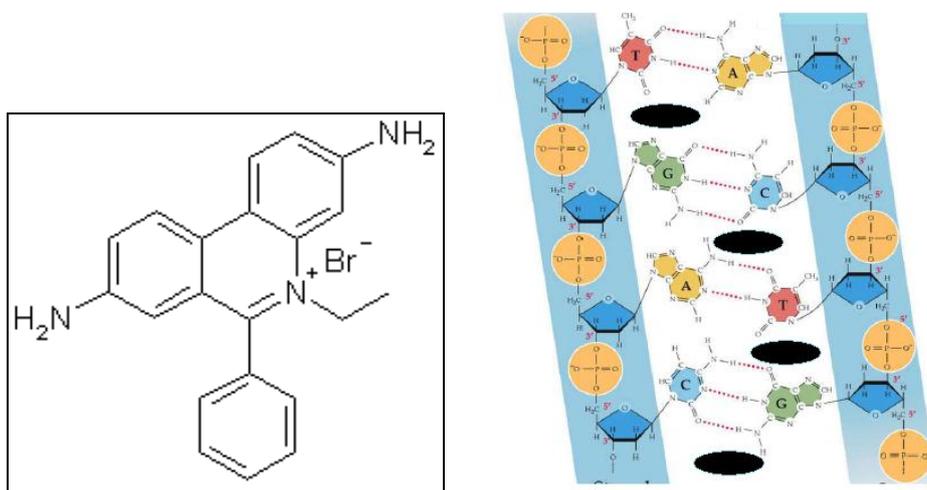


Figura 12: (A) Estrutura da estrutura do BE; (B) Esquema de como acontece a intercalação do BE no DNA.

Fonte: LIFE: THE SCIENCE OF BIOLOGY, Seventh Edition, Figure 11.7 Base Pairing in DNA is Complementary, 2004, Dinaver Associates, Inc. and W.H. Freeman e Co.

O azul de metileno (AM) é um corante orgânico redox fenotiazínico descoberto por Heinrich Caro em 1876, que inicialmente ganhou prestígio como corante citológico e como indicador de óxido-redução. Devido às suas propriedades fotoquímicas, têm sido desenvolvidos estudos visando sua aplicação na inativação de bactérias e vírus, em células fotogalvânicas e, mais recentemente, na preparação de eletrodos quimicamente modificados (SCOTTI *et al*, 2006; OLIVEIRA *et al*, 2010).

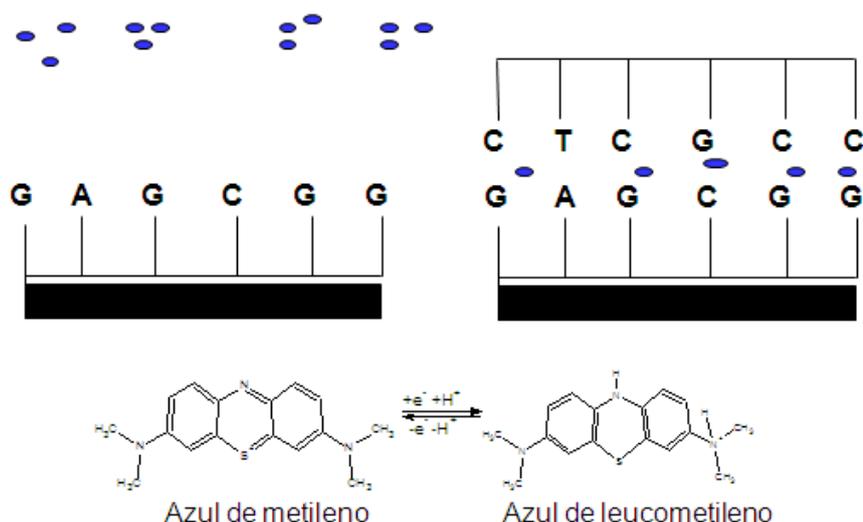


Figura 13: Esquema da intercalação do AM ao DNA, juntamente com sua estrutura.

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.; RAJES, H. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. *Biomaterials*, v. 28, p. 791-805, 2007.

ATKINS, P.; JONES, L. *Princípios de Química, Questionando a vida moderna e o*

meio ambiente. 3ª ed., Porto Alegre, Bookman, 2006.

BARTLETT, P. N.; BIRKIN, P. R. The application of conducting polymers in biosensors; *Synthetic Metals*. v. 61, p 15-21, 1993.

CASTILHO, J.; GASPAR, S.; LETH, S.; NICULESCU, M.; MORTARI, A.; BONTIDEAN, I.; SOUKHAREV, V.; DORNEANU, S. A.; RYABOV, A. D.; CSOREGI, E. Biosensor for life quality design, development and applications. *Sensors and Actuators B*, v. 102, p 179-194, 2004.

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, J. C.; CHUNG, H. H.; HSU, C. T.; TSAI, D. M.; KUMAR, A. S.; ZEN, J. M. A disposable single-use electrochemical sensor for detection of uric acid in human whole blood. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 110, p. 364-369, 2005.

COSNIER, S.; Biosensor based on electropolymerized films: new trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 377, p 507-520, 2003.

COSNIER, S.; Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review, *Biosensor and bioelectronics*; v 14, p 443; 1999.

DAOUD, A. S.; AL-SHEYYAB, M.; BATCHOUN, R. G.; RAWASHDEH, M. O.; NUSSAIR, M. M.; PUGH, R. N. H.; Bacteria meningitis: still a cause of high mortality and severe neurological morbidity in childhood. *Journal of Tropical Pediatrics*; v.41 (5), p 308-310, 2005.

DESHPANDE, M. V.; AMALNERKAR, D. P. Biosensors prepared from electrochemically-synthesized conducting polymers. *Progress in Polymer Science*.; v.18,p 623, 1993.

EBRAHIM, G. J.; Meningococcal meningitis. *Journal of Tropical Pediatrics*; v.43, p 126-127, 1997.

FERREIRA, L. F.; BOODTS, J.F.C.; BRITO-MADURRO, A.G. MADURRO, J. M.; Gold electrodes modified with poly (4-aminophenol): incorporation of nitrogenated base and an oligonucleotide. *Polymer International*, v. 57, p 644-650, 2008.

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

FINOT, M. O.; MCDERMOTT, M. T.; Characterization of n-alkanethiolate monolayers adsorbed to electrochemically deposited gold nanocrystals on glassy carbon electrodes. *Journal Electroanalytical Chemistry*. v. 488, p 125; 2000.

FOCACCIA, R. Meningites bacterianas - etioepidemiologia e meningites agudas vol. 1, cap.66.1; 827-843. in: Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de Infectologia*, 2ª ed., Atheneu , São Paulo, 2002.

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.

FRANCO,D. L.; AFONSO, S.S.; VIEIRA, S. N. FERREIRA, L. F.; GONCALVES, R. A.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J.M.; Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electropolymerization properties. *Materials Chemistry and Physics*. v. 107, p 404-409, 2008.

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

GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.;

AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S.; Electroanalytical techniques for the determination of pesticides in foods. *Química nova*, v. 29, p 105, 2006.

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.

GRAY, L.D.; FEDORKO, D.P.; Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. *Clinical Microbiology Reviews*, AMERICAN SOCIETY OF MICROBIOLOGY, v.5, n.2, p.130-145, 1992.

GATTRELL, M.; KIRK, D. W. Fourier transform infrared spectroscopy study of the passive film produced during aqueous acidic phenol electro-oxidation. *Electrochemical Society*, v. 139, p 2736, 1992.

GENES, E.M. and LAPKOWSHI, M.; Spectroelectrochemical study of polyaniline versus potential in the equilibrium state. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 220, p. 67-82, 1987.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHORTA, B. D.; Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensor and bioelectronics.*, v. 17, p 345, 2002.

GIL, E. S.; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I.; Some aspects of immunoassays applied to analytical chemistry. *Química Nova*; v. 22, p 874, 1999.

GOTHELF, K. V.; “Self-assembled monolayers of long-chain xanthic acids on gold studied by voltammetry”. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 494, p 147, 2000.

HAWLEY, D.; ADAMS, R. N.; Homogeneous chemical reactions in electrode processes Measurement of rates of follow-up chemical reactions. *Journal of Electroanalytical Chemistry* , v. 10, p 376, 1965.

<http://www.auladeanatomia.com/neurologia/liquor.htm>, acessada dia 03/04/2012.

<http://www.manualmerck.net/?id=104&cn=932>, acessado dia 03/04/2012.

<http://pt.wikipedia.org/wiki/Meningite>, acessada dia 06/04/2012.

<http://www.biologando.com.br/corpo-humano/estrutura-do-dna/>, acessada dia 12/04/2012.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J.; Histologia básica. Editora Guanabara koogan S.A. (10° Ed), 2004.

LEI, Y.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A.; Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode. *Analytica Chimica Acta*. v. 568, p 200; 2006.

LIFE: THE SCIENCE OF BIOLOGY, Seventh Edition, Figure 11.7 Base Pairing in DNA is Complementary, 2004, Dinaver Associates, Inc. and W.H. Freeman e Co

MENEZES, H. A.; MAIA, G.; Films formed by the electrooxidation of p-aminophenol (p-APh) in aqueous medium: What do they look like? *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 39, p. 586, 2006.

MOSCONI, D.; PASINI, M.; MASCINI, M.; Subcutaneous microdialysis probe coupled with glucose biosensor for in vivo continuous monitoring. *Talanta*, v. 39, p 1039, 1992.

MURPHY, L.; Biosensors and bioelectrochemistry. *Current Opinion in Chemical Biology*; v. 10, p 177-184; 2006.

NAMBIAR, S.; YEOW, J. T. W.; Conductive polymer-based sensor for biomedical applications. *Biosensor and bioelectronics*, v. 26, p 1825-1832, 2011.

NASIRIZADEH, N.; ZARE, H. R.; POURNAGHI-AZAR, M. H.; HEJAZI, M. S. In-

roduction 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.

NIKOLELIS, D.; KRULL, U.; WANG, J.; MASCINI, M.; *Biosensors for Direct Monitoring of Environmental Pollutants in Field*; Kluwer Academic, London, 1998.

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.

PENG, H.; ZHANG, L.; SOELLER, C.; TRAVAS-SEJDIC, J. Conducting polymers for electrochemical DNA sensing. *Biomaterials*, v. 30, p. 2132–2148, 2008.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T.; Tendências em modificações de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Quimica Nova*; v.25, p 1012, 2002.

RAMANATHAN, K.; PANDEY, S.S.; KUMAR, R.; GULATI, A.; MRUTHY, A.S.N.; MALHOTRA, B.D.; Covalent Immobilization of Glucose Oxidase to Poly(OAmino Benzoic Acid) for Application to Glucose Biosensor.; *Journal of Applied Polymer Science* .v.78, p 662, 2000.

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.

RICHARDSON, N. M.; Bacterial meningitis. *British Journal of Hospital Medicine*. V.55: 685-688, 1996

SANTOS, B. R. L.; CREUTZBERG, M.; CARDOSO, R. F. M. L.; LIMA, S. F.; GUSTAVO, A.S.; VIEGAS, K.; WELFER, M.; SOUZA, A. C. Situação vacinal e associação com a qualidade de vida, a funcionalidade e a motivação para o autocuidado em idosos. *Revista brasileira de Epidemiologia*, São Paulo, v.12, p. 533-540. 2009.

SANVICENS, N.; MANNEILLI, L.; SALVADOR, J-P.; VALERA, E. MARCO, M-P.; Biosensor for pharmaceuticals based on novel technology. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 30:(3), P 541-553.

SÁFADI, M. A. P.; BARROS, A. P.; Meningococcal conjugate vaccines: efficacy and new combination (Vacinas meningocócicas conjugadas: eficácia e novas combinações). *Jornal de Pediatria*; v.82, p.35-44, 2006.

SCHELD, W. M.; WENGER, J. D.; SOUZA, A. Q. Meningococcal infections. In: GUENAUT, R.L.; WALTER, D.H.; WELLER, P.F. *Tropical infectious diseases principles, pathogens and practice*. USA: Churchill Livingstone, v.1, cap.30, p.365-380, 1999.

SCOTTI, R.; LIMA, E. C.; BENVENUTTI, E. V.; PIATNICK, C. M. S.; DIAS, S. L. P., GUSHIKEM, Y.; KUBOTA L. T.; Methylene blue immobilized in cellulose/TiO₂ and SiO₂/TiO₂: electrochemical properties and factorial design. *Química nova*; v. 29, 2006.

SHARMA, S. K.; SEHGAL, N.; KUMAR, A.; Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Current Applied Physics*. v 3, p 307; 2003.

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.

SHIRAKAWA, H. AND IKEDA, S.; Cyclotrimerization of acetylene by the tris(acetylacetonat)titanium(III)-diethylaluminum chloride system. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry. v.12, p 929-937, 1974.

SILVA, T. A. R.; FERREIRA, L. F.; BOODTS, J. F. C.; EIRS, S. P.; BRITOMADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Poly(4-hydroxyphenylacetic acid): a new material for immobilization of biomolecules. Polymer Engineering and Science, v. 48, p 1963-1970, 2009.

SILVA, F. B.; VIEIRA, S. N.; GOULART, L. R.; BOODTS, J. F. C.; BRITOMADURRO, A. G.; MADURRO, J. M.; Electrochemical Investigation of Oligonucleotide-DNA Hybridization on Poly(4-Methoxyphenethylamine). International Journal of Molecular Sciences; v. 9, p 1173-1187, 2008

SOTOLONGO, F.P. Neisseria meningitidis: aspectos teórico-práctico sobre el diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune, Cuba: Finlay, 4.ed., 122p, 1995.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Biomimetic polymers in analytical chemistry. Part 2: applications of MIP (Molecularly Imprinted Polymers) in the development of chemical sensors. Quimica nova; v. 28, p 1087; 2005.

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.

TIKHOMIROV, E.; SANTAMARIA, M.; ESTEVES, K. Meningococcal disease: public health burden and control. World-Health-Stat., v.50:(3-4), p 170-177, 1997.

TRALLERO, G., CASAS, I., TENORIO, A., ECHEVARRIA, J. E., CASTELLANOS,

A., LOZANO, A., AND BRENA. P. P.; Enteroviruses in Spain: virological and epidemiological studies over 10 years (1988-97). *Epidemiology and Infection*, v 124, p. 497-506, 2000.

TUNKEL, A. R.; SCHELD, W. M.; Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Clinical Microbiology Reviews*; v. 6, p. 118-136, 1997.

TURNER, A. P. F., KARUBE, I.; WILSON, G. S., eds; *Biosensors: Fundamentals and applications*. Oxford: Oxford University Press, p. 165, 1987.

TYMECKI, L.; KONCKI, R. Thick-film potentiometric biosensor for bloodless monitoring of hemodialysis. *Sensor and Actuators B*; v. 113, p 782-786, 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.

WILSON, G. S.; KARUBE, I.; TURNER, A. P. F. *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Mir Publishers, Moscow, 1992.

YANG, H.; BARD, A. J. The application of fast scan cyclic voltammetry. Mechanistic study of the initial stage of electropolymerization of aniline in aqueous solutions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 339, p. 423, 1992.

YING-SING, F.; SHI-HUI, S.; DE-RONG, Z.; Piezoelectric crystal for sensing bacteria by immobilizing antibodies on divinylsulphone activated poly-m-aminophenol film. *Talanta*; v 51, p 151; 2000.

CAPÍTULO 2:

A novel biosensor for the detection of bacterial meningitis, based on immobilization of specific DNA sequence onto poly(4-aminophenol)

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

A novel biosensor to detection of bacterial meningitis based on immobilization of specific DNA sequence onto poly(4-aminophenol)

Ana C. H. Castro¹, Renata P. A. Balvedi¹, Roney S. Coimbra², S. Cuadros-Orellana², Guilherme C. Oliveira², João M. Madurro³, Ana G. Brito-Madurro^{1,*}

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

2. Center for Excellence in Bioinformatics, FIOCRUZ-Minas, MG, Brazil.

4. 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

Abstract

A novel DNA electrochemical biosensor to detection of bacterial meningitis, a worldwide endemic human disease, was investigated and is reported in this paper. This device is based in the use as molecular probe of specific DNA fragments of the genome of the bacteria *Neisseria meningitidis*, incorporated onto graphite electrode modified with poly(4-aminophenol). In this device, the presence of a complementary specific DNA sequence was evaluated monitoring the DNA hybridization reaction by differential pulse voltammetry, using an electroactive intercalator ethidium bromide as hybridization indicator. The proposed DNA biosensor showed that complementary oligonucleotide (NM2) could be quantified with a low detection limit ($1.4 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$, S/N=3) and good linearity (R=0.995). In addition, the biosensor showed high selectivity, discriminating non-specific targets and retaining more than 90% of its original activity, after 120 days of storage.

Resumo

Um novo biossensor eletroquímico de DNA para a detecção da meningite bacteriana, doença esta endêmica em todo mundo, foi investigado e é relatado neste artigo. Este dispositivo baseia-se na utilização de fragmentos específicos de DNA do genoma da bactéria *Neisseria meningitidis* como sonda, incorporados em eletrodos de grafite modificada com poli (4-aminofenol). Neste dispositivo foi avaliado a presença de uma sequência de DNA complementar específica, monitorizando a reação de hibridação do DNA por voltametria de pulso diferencial, utilizando o intercalador eletroativo brometo de etídio como indicador de hibridação. O biossensor de DNA mostrou que o oligonucleótido complementar (NM2) pode ser quantificado com um baixo limite de detecção ($1,4 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$, S/N = 3) com uma boa linearidade (R = 0,995). Além disso, o biossensor mostrou uma elevada seletividade, discriminando alvos não específicos e retendo mais do que 90% da sua atividade original, após 120 dias de armazenamento.

Keywords: biosensor, meningitidis, modified electrode, poly(4-aminophenol)

1. Introduction

Recent studies have pointed out that human meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, has been characterized as a worldwide endemic disease, which has shown significant numbers of severe clinical cases with potential to cause large epidemics and devastating septicemia (Serruto et al., 2012, Daoud et al., 2005).

Sáfadi and collaborators (Sáfadi et al., 2006) noted that about 500,000 cases of invasive meningococcal disease occur each year, taking about 60,000 patients with permanent sequelae, resulting in over 50,000 deaths. It is known that many of these serious cases could be prevented by prior diagnosis, given that the treatment in latent stages has shown encouraging results.

Infection of the meninges in humans has the main etiological agent bacteria *N. meningitidis*, mostly found in the naso-oropharyngeal mucosa, which can be transmitted by direct contact or by droplets (Patel et al., 2010). During transmission, the bacteria reach the meninges by two different ways: through the bloodstream, or by direct contact between the meninges and the nasal cavity or the skin. Since the bacteria enter the bloodstream, they enter the subarachnoid space in the places where the blood-brain barrier is vulnerable. Inflammation occurs in large scale in the subarachnoid space and is not a direct result of a bacterial infection but can be largely attributed to the immune response to bacteria from entering the central nervous system (Krentz et al., 2005). Some of the determinants of invasiveness of the bacteria include nasopharyngeal mucosal damage in colonized individuals, virulence of the strains, absence of bactericidal antibodies, and deficiencies of the complement system (Almeida-González et al., 2004).

Meningitis is diagnosed using a technique called lumbar puncture, which involves inserting a needle into the spinal column to extract a sample of cerebrospinal fluid that envelops the brain and spinal cord. Meningitis can also be diagnosed by latex agglutination, test X-ray, computed tomography, magnetic resonance, staining immunological Gram, biochemical tests, polymerase chain reaction and others (Surinder et al., 2007, Richardson et al., 2003; Atobe et al., 2000; Bennett et al., 2004; Gray and Fedorko, 1992).

The detection of DNA using biosensors has great value in the diagnosis of

several viral diseases, bacterial and even cancer. Thus, researches on genosensors have great significance in development of technologies that perform diagnostics rapid, precise and simplified (Teles et al, 2008). An electrochemical sensor for DNA or genosensor is a promising technique for nucleic acid analysis because of its fast response, high sensitivity and low cost. This technique uses DNA sequences immobilized on the sensor surface as a recognition factor and sequence specific hybridization can be monitored and analyzed (Silva et al., 2008). This signal can be direct, produced by nucleotides oxidation of DNA probe (Liu et al., 2010) 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) , dengue virus (Silva et al., 2009), Hansen bacillus (Afonso et al., 2010), and others.

The use of conducting polymeric films has several advantages like modification of electrode surfaces with a material that can bind with biomolecules through functionalizations (Silva, et al, 2009). The aminophenols are promising compounds for the electrochemical studies since such compounds show two different substituents on the aromatic ring which are chemically and electrochemically active (-NH₂ and -OH). Functionalization of carbon electrodes has been reported in the literature, including electropolymerization studies of polymer films derived from monomer 4-aminophenol (Vieira et al., 2006) and 3-aminophenol (Franco et al., 2008), immobilization of nitrogenous bases of DNA on aminophenols (Ferreira et al., 2008) and 4-methoxy-fenitilamina (Silva et al., 2008), study of the electropolymerization and immobilization of DNA structures using 4-hydroxy-phenylacetic acid (Silva et al., 2008; Silva et al., 2009) and 3-hydroxy-phenylacetic acid (Oliveira et al., 2010).

The electrochemical transducers are most commonly used in biosensors and are based on the fact that during the process of bio-interaction, electrochemical species are consumed or generated producing an electrochemical signal (Gerard et al., 2002). Electrochemical detection of nucleic acids has attracted interest because of the high sensitivity and using relatively inexpensive instruments

(lost et al., 2011).

The scope of this work is to develop a new biosensor for detection of specific DNA sequence to meningitis caused by the bacteria *Neisseria meningitidis* 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.

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.

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.

DNA fragments of the *Neisseria meningitidis* were synthesized by Alpha DNA (Canada). DNA fragments have the related sequences: DNA probe (NM1): 5'-TGTTGGGCAACCTGATTG-3'; DNA target (NM2): 5'-ACAACCCGTTGGACTAAC-3'; Non-complementary DNA: 5'-TCTTGTGTCCAGGCATCCCT-3'. The primers were selected based on conserved aligned regions.

Specific PCR products containing 710 mer (MEN₇₁₀) for the diagnosis of meningitis were used as positive control and the PCR product with 277 mer (DNA₂₇₇) as a negative control, both denatured at 98 °C (200 ng diluted in SSC buffer). The PCR product was visualized in agarose gel stained with ethidium bromide under UV light. Subsequently, the concentration of dsDNA was measured by the ultraviolet absorption at 260nm ($\epsilon=6600\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Amplicon – MEN₇₁₀ mer (positive control)

TGTTGGGCAACCTGATTGCTTGGTAGCGTAGCTAACGCGTGAAATTGACCGC
CTGGGGAGACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCA
CAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG
TCTTGACATGTACGGAATCCTCGGAGACGGAGGAGTGCCTTCGGGAGCCGTA
ACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACT
CTAATGAGACTGCCGGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGT
CCTCATGGCCCTTATGACCAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGTACAGA
GGGTAGCCAAGCCGCGAGGCGGAGCCAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCC
GGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAG
GTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCA
CACCATGGGAGTGGGGGATACCAGAAGTAGGTAGGATAACCGCAAGGAGTCC
GCTTACCACGGTATGCTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA
GGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTT

Amplicon – DNA₂₇₇ mer (negative control)

CCGAGGGAGACCAGGAAGATCTGCATGGTGGGAAGGACCTGATGATACAGA
GGTGAGAAATAAGAAAGGCTGCTGACTTTACCATCTGAGGCCACACATCTGC
TGAAATGGAGATAATTAACATCACTAGAAACAGCAAGATGACAATATAATGTC
TAAGTAGTGACATGTTTTTGCACATTTCCAGCCCCTTTAAATATCCACACACAC
AGGAAGCACAAAAGGAAGCACAGAGATCCCTGGGAGAAATGCCCGGCCGCC
ATCTTGGGTCATCGAT

2.2- Apparatus

The electrochemical studies were performed in a potentiostat from CH Instruments model 760C using three-compartment or one-compartment cells for electrodeposition or detection of biomolecules, respectively. 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.

2.3- Preparation of poly (4-aminophenol)

Prior to electropolymerization the working 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 45 minutes. The electropolymerization of the monomer 4-aminophenol on the surface of the graphite electrode happened according to Vieira and collaborators (Vieira et al., 2006). After, the modified electrode was rinsed with deionized water to remove non-reacting monomers.

2.4- Probe immobilization on graphite electrode modified with poly (4-aminophenol)

The probe immobilization was carried out by dropping of 18 μL of $0.063 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ of NM1/probe 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 10s in phosphate buffer and followed 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

The detection of complementary target (NM2) was performed directly by monitoring the oxidation peaks of the nitrogen bases or indirectly through the use of a mediator, which amplifies the signal response. For direct detection of the biological sensor was dropping of 18 μL of $0.189 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ NM2 solution and kept at 55°C for 15 minutes to promote hybridization. After this period the electrodes were washed in PBS, and dry and reserved. For indirect detection of the hybridization after adding an aliquot of 18 μL of a solution of ethidium bromide ($1.10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) for 5 minutes at room temperature, followed by washing with phosphate buffer. The choice of hybridization temperature was made using the software Gene Runner v3.05, Hastings on Hudson, NY, U.S.A.).

To verify the specificity of the probe 18 μL of non-complementary target was added to the surface of the sensor subjected to the same process of the complementary target. Detection of complementary target was not done indirectly through

the use of a mediator.

2.6- Detection of PCR products

The PCR products (MEN710 and DNA277) were denatured at 98 °C during 3 minutes. 15 µL of denatured sample ($3.93 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$) was added onto the surface of the modified electrode. The electrode was kept at 98°C for 3 minutes, to assure the maintenance of ssDNA. After that, the modified electrode containing the probe (ssDNA) was washed by immersion in phosphate buffer, pH 7.4 during 5 seconds and dried with ultra-pure N₂. 15 µL of complementary target (ssDNA) $3.93 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ was added onto the surface of the modified electrode containing the probe. The hybridization was carried out at 55°C, during 15 minutes. The detection of PCR products was performed using ethidium bromide as indicator.

2.7. Stability study

To evaluate the biosensor stability, the modified electrodes containing DNA probe (NM1) were stored at 8 °C, protected from light and oxygen during 120 days.

2.8- Interference studies

A common substances found in blood were studied for available the possible interfering effects. 1 mg/dL uric acid (UA), 1mM glutamate (Glut), 1mM glucose (Glu), 1mM alanine (AL), 3.6 mg/dL ascorbic acid (AA). For this study, was added to the solution of the interferer in the complementary target concentration normally found in blood, the concentration with respect to the target. All experiments were conducted at 55°C.

3. Results and discussion

3.1- Direct detection

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 (La-Scalea et al, 1999). Graphite electrodes functionalized with poly (4-aminophenol) present a versatile platform for the immobilization of nitrogen bases (Brito-Madurro et al., 2007).

Figure 1 shows a direct detection of the oligonucleotide for the meningitis using graphite electrode modified with poly(4-aminophenol), conducted in triplicate. The polymer was prepared according with Vieira and collaborators (Vieira et al., 2006).

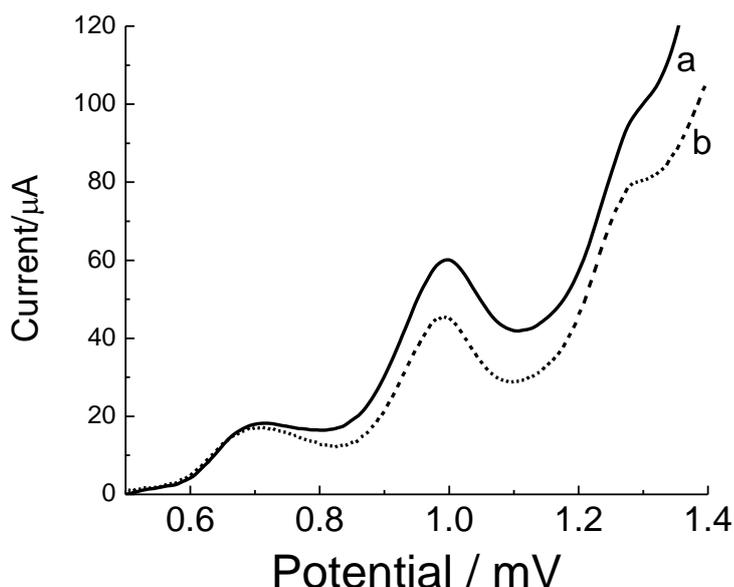


Figure 1. Differential pulse voltammograms of graphite electrode modified with poly (4-aminophenol) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans, containing (NM1): before hybridization (a) and after 15 minutes of incubation with complementary target (NM2) (b). Electrolyte: phosphate buffer (0.10 mol L⁻¹), pH 7.4. Modulation amplitude: 0.05mV. Pulse interval: 0.2s; 5mVs⁻¹.

The peak in +0.7V is described as intermediate state of oxidation of guanine, 8-oxoguanina (Oliveira-Brett et al. 2000). These intermediate generates a

complex mixture of products that have not been fully characterized. The 8-oxoguanine is more easily oxidized than guanine, which has a much higher oxidation potential for the same experimental conditions.

The peaks in +0.98 mV and +1.3 mV are attributed by guanosine and adenosine respectively. The peak currents of guanine and adenine gradually decreased after 15 minutes incubation in phosphate buffer, according to Oliveira Brett et al. (Oliveira-Brett et al., 2004) reported that during the hybridization of oligonucleotides, hydrogen bonds are formed between complementary sequences leading to a duplex, inside of which it is more difficult to oxidize the bases, reducing the peak current oxidation of adenosine and guanosine, after hybridization. Another reason for the higher current values obtained for single stranded DNA is that the latter has proximity and a greater degree of adsorption on the electrode surface, because of their, conformational flexibility, facilitating the transfer of charge between the electrode and the nitrogenous bases (La-Scala et al, 1999).

3.2- Indirect detection

Ethidium bromide (EB) [(3,8-diamino-5-ethyl-6-phenyl phenatridinium bromide)], is one of the best known intercalate agent, firstly synthesized in 1952 by Watkins and Woolfe (Watkins et al., 1952). Is largely used to visualize the nucleic acids through agarose gel electrophoresis, due to the formation of a fluorescent complex. There is no need of changes on DNA structure, it is a cheap product and the system can be easily constructed, the intercalation is immediate (Bugs et al., 2001).

Figure 2 shows a differential pulse voltammograms of indirect detection of specific oligonucleotide for the etiological agent of meningitis, using ethidium bromide as indicator.

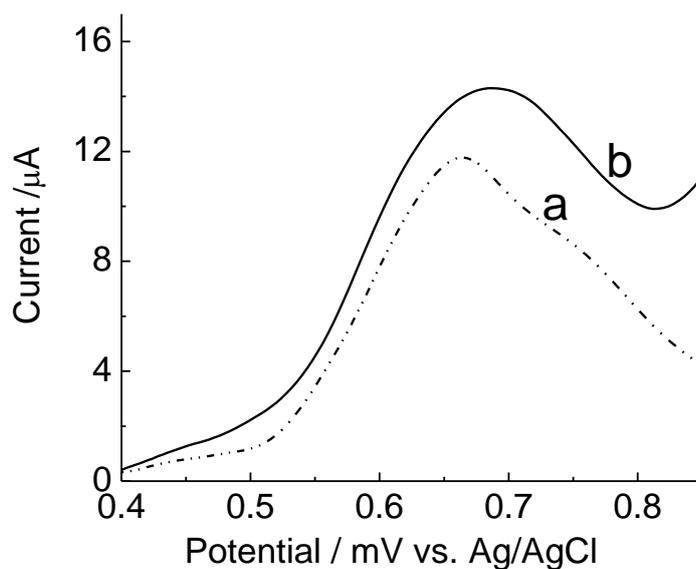


Figure 2. Differential pulse voltammograms of ethidium bromide onto graphite electrode modified with poly (4-aminophenol) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans. Containing NM1/probe: before (a) or after (b) hybridization complementary target NM2/target Electrolyte: phosphate buffer (0.10 mol.L⁻¹), pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2s; 5mVs⁻¹.

The results showed an increase in the amplitude current signal in the presence of complementary target, indicating the accumulation of ethidium bromide on the surface of modified electrode containing duplex. This accumulation indicates the occurrence of hybridization process that causes the intercalation of the mediator in the double-stranded DNA, where a hydrophobic aromatic molecule is attracted to hydrophobic environment nitrogenous bases pairs of DNA from the hydrophilic aqueous environment (Waring et al., 1974).

3.3- Specificity of biosensor

DNA hybridization is based on the ability of ssDNA to recognize its counterpart strand with a complementary nucleotide sequence. After modifying the surface of modified electrode with DNA probe (NM1), the specificity of the bioelectrode was studied by testing its response to oligonucleotides specific for *N. Meningitidis* as complementary target or control sequences, non-complementary.

Figure 3 shows a differential pulse voltammogram using target complementary sequences: oligonucleotide (NM2), PCR product (MEN₇₁₀ pb), as positive control or non-complementary target sequences: oligonucleotide (NonNM1), PCR product (DNA₂₇₇ pb), as negative control for the bacteria *Neisseria meningitidis*, in the presence of the ethidium bromide as intercalator.

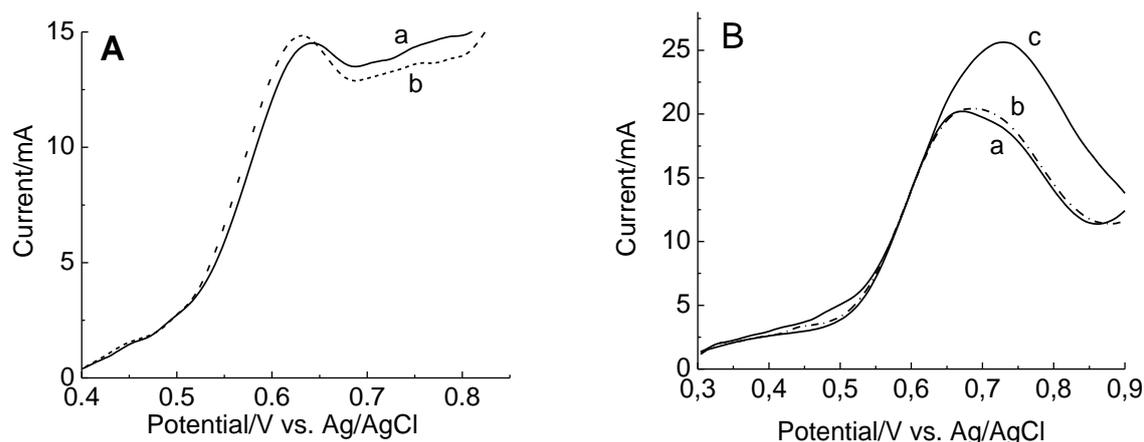


Figure 3. Differential pulse voltammograms of ethidium bromide onto graphite electrode modified with poly (4-aminophenol) containing NM1/probe: (A) before hybridization (a) and after hybridization with non-complementary DNA (NonNM1) (b). (B) Before hybridization (a) or after hybridization with negative target (DNA₂₇₇ pb) (b) and positive target (MEN₇₁₀ pb) (c). Electrolyte: phosphate buffer (0.10 mol.L⁻¹), pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2s; 5mVs⁻¹.

The bioelectrode poly (4-AMF)/MN1 (probe) discriminate complementary targets to the non-complementary target, indicating selectivity for system, which eliminates the possibility of non-specific hybridization.

3.4- Interference study

The biological fluid is a complex solution formed by electroactive species such as ascorbic acid, uric acid, urea, albumin and other, which may interfere in the response of biosensor (Jamalet et al., 2009). The selectivity of proposed biosensor was examined for incubation time of 15 min, at the concentration usually found in the blood, to verified the effect of the same in hybridization process be-

tween NM1 (probe):NM2 (target), Fig. 4.

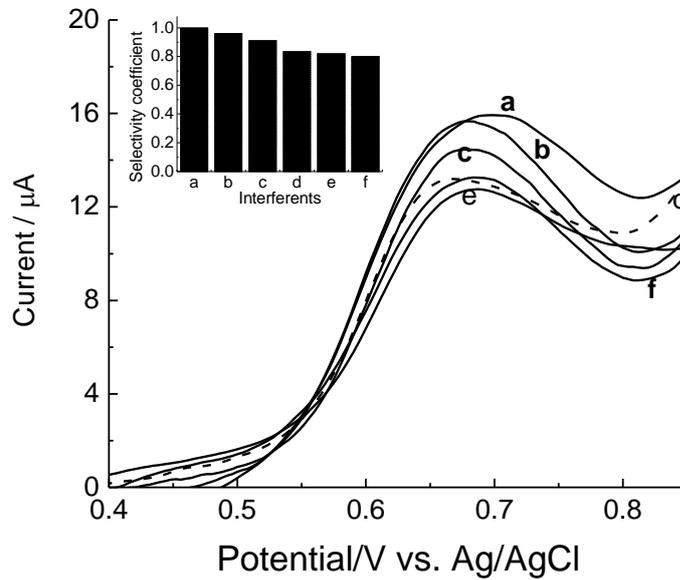


Figure 4. Differential pulse voltammogram of ethidium bromide onto graphite electrode/poly(4-AMP)/NM1 in detection of the target complement in absence (a) or presence of interferents. ascorbic acid 3.6 mg.dL^{-1} (b); glucose 1 mM (c); glutamate 1 mM (d); alanine 1 mM (e) and uric acid mg.dL^{-1} (f). Electrolyte: phosphate buffer (0.10 mol.L^{-1}), pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV . Pulse interval: $0.2\text{s}; 5\text{mVs}^{-1}$. Inset: Selectivity Coefficient of Bioelectrode.

The obtained results indicate that the response of bioelectrode is not significantly affected in the presence of interferents, indicating a high selectivity for the detection of meningitis (Figure 4) confirmed by mean selectivity coefficient (SC). Selectivity coefficient (SC) of the bioelectrode for each interferent was calculated using the equation $SC = I_{C+i}/I_C$, where I_{C+i} and I_C are the bioelectrode response for NM2 target, in the presence and absence of each interferent, respectively (Saxena et al., 2011).

3.5- Electrochemical biosensor stability

Operational stability may be defined as the retention of activity of biomolecules utilized when in use (Gibson, 1999). In order for commercialization of a biosensor to be feasible, it would 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 also helps decrease per measurement costs and presents a critical importance in pharmaceutical and industrial applications (Rubio-Retama et al., 2005).

The stability study of the biological sensor poly (4-AMF):NM1 is shown in figure 5. For this graph, the electrodes were allowed to a temperature of 8°C for 120 days. During this time, were performed assays using ethidium bromide.

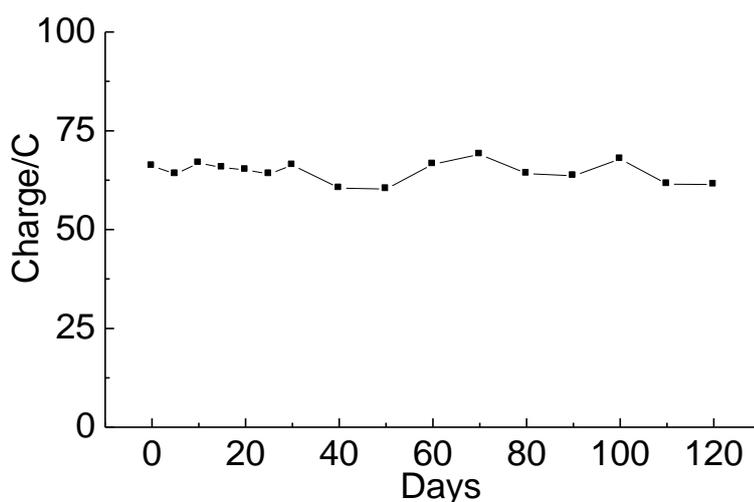


Figure 5. Stability study of the biological to oligonucleotide specific for *Neisseria meningitidis*.

The genosensor remained 93% its initial value after 120 days of storage, by indirect detection using ethidium bromide as an indicator of the hybridization process. The high operational stability of the produced biosensor makes the measure more reproductive and allows its commercial use.

3.6- Calibration curve

The sensitivity of genossensor was evaluated using different concentrations of complementary target (NM2) by differential pulse voltammetry, using ethidium bromide as indicator. The experiment was performed in triplicate. The calibration curve was constructed based on the analysis of the voltammograms for the oxidation of ethidium bromide, where the biological sensor remained with the concentration of the fixed probe ($0.063 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ in SSC buffer) varying the concentration of the complementary target ($0.378 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $0.189 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $0.189 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $0.189 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$). All experiments were carried out in triplicate (Figure 5).

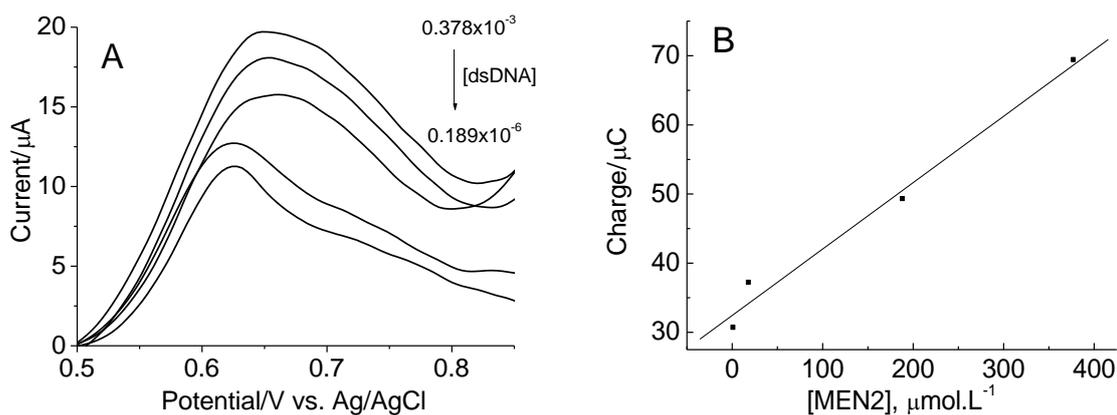


Figure 6. (A) Differential pulse voltammograms of ethidium bromide onto graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) prepared in pH 0.5 (baseline-corrected), 100 scans, containing ssDNA (NM1) before or after hybridization with concentrations different of DNA target (NM2). Electrolyte: phosphate buffer (0.10 mol.L^{-1}), pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2s; 5mVs^{-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 NM2 target concentration from $0.189 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ to $0.378 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, the response signal of ethidium bromide on the bioelectrode increased. The detection limit of NM2 (target) achieved was $1.4 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$,

with a correlation coefficient of 0.995.

4. Conclusion

A novel electrochemical DNA biosensor based onto graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) was constructed for detection of *Neisseria meningitidis* by using ethidium bromide as an electrochemical indicator. The preparation of the modified electrode was quite simple, and controllable.

The biosensor development for *Neisseria meningitidis* has been shown effective for detecting the hybridization process by direct or indirect detection using voltammetry differential pulse and poly(4-aminophenol) as polymeric matrix.

The produced biosensor was used for assay of the complementary sequence or non-complementary with satisfactory results and remained 93% of its initial value after 120 days of storage, indicating a good stability. The detection limit of NM2 (target) achieved was 1.4×10^{-10} mol.L⁻¹, with a correlation coefficient of 0.995.

Whereas tests for diagnosis of meningitis are invasive, expensive and time consuming, taking into account the severity of the disease, we can say that the results obtained in this work presents is a promising tool for the selective and inexpensive analysis of meningococcal meningitis caused by *Neisseria meningitidis* in practical application.

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

A. Krentz, Drew, Provan. Oxford Handbook of Clinical and Laboratory investigation. Oxford: Oxford University Press. (2005) ISBN 0198566638.

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.

A. M. Oliveira-Brett, J.A. Piedade, L. A., Serrano, S. H. P., Electrochemical Oxidation of 8-Oxoguanine, *Electroanalysis.* 12 (2000) 969-973.

A. S. Daoud, M. Al-Sheyyab, R .G. Batchoun, M.O. Rawashdeh, M. M. Nussair, R. N. H. Pugh. Bacterila meningitis: still a cause of high mortality and severe neurological morbidity in childhood. *J. Trop. Pediat.* 41 (2005) 308-310.

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.

Almeida-González L, Franco-Paredes C, Pérez LF, Santos-Preciado JI. Meningococcal disease caused by *Neisseria meningitidis*: epidemiological, clinical, and preventive perspectives]. *Salud Publica Mex*, 46 (2004):438-50.

D. C. Richardson, L. Louie, M. Louie, A. E. Simor. Evaluation of a Rapid PCR Assay for Diagnosis of Meningococcal Meningitis. *J. Clin. Microbiol.* 41(2003) 3851–3853.

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.

D. E. Bennett, R. M. Mulhall, M. T. Cafferkey, PCR-based assay for detection

of *Neisseria meningitidis* capsular serogroups 29E, X and Z. J. Clin. Microbiol. 42 (2004) 1764-1765.

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. Pol. Eng. Sci. 48 (2008) 2043-2050.

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.

F. B. Silva, S. N. Vieira, L. R. Goulart, J. F. C. Boodts, A. G. Brito-Madurro, J. M. Madurro. Electrochemical Investigation of Oligonucleotide-DNA Hybridization on Poly (4-Methoxyphenethylamine). Inter. J. Mol. Sci. 9 (2008) 1173-1187.

F.R.R. Teles, L.P. Fonseca. Trends in DNA biosensors, Talanta 77 (2008) 606-623.

J. H. Atobe, M. H. Hirata, S. H. Shimizu, M. R. Schmal, E. M. Mamizuka. One-step heminested PCR for amplification of *Neisseria meningitidis* DNA in cerebrospinal fluid. J. Clin. Lab. Anal. 14 (2000) 193–199.

J. Rubio-retama, E. Lopez-Cabarcos, B. Lopez-Ruiz. High stability amperometric biosensor based on enzyme entrapment in microgels. Talanta. 68 (2005) 99-107.

K. Surinder, K. Bineeta, M. Megha Latex particle agglutination test as an adjunct to the diagnosis of bacterial meningitis. Ind. J. Medical Microbiology. 25(2007) 395–397.

L. D. Gray, D. P. Fedorko. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. Clinical Microbiology Reviews, Amer. Soc. Microbiol. 5 (1992) 130-145.

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. *Pol. Internat.* 57 (2008) 644-650.

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 [α]-zirconium phosphate, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 2627-2632.

A. S. Afonso, 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. Pol. Sci.* 118 (2010) 2921–2928.

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.

M. A. P. Sáfiadi, A. P. Barros. Meningococcal conjugate vaccines: efficacy and new combination (Vacinas meningocócicas conjugadas: eficácia e novas combinações). *J. Ped.* 82 (2006) 35-44.

M. Gerard, A. Chaubey, B. D. Malhorta. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 17(2002) 345.

M. J. Waring, Stabilization of Two-Stranded Ribohomopolymer Helices and Destabilization of a Three-Stranded Helix by Ethidium Bromide. *J. Mol. Biol.* 1143 (1974) 483-486.

M. K. Patel, P. R. Solanki, A. Kumar, S. Khare, S. Gupta, B.D. Malhotra. Electrochemical DNA sensor for *Neisseria meningitidis* detection. *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 2586–2591.

M. R. Bugs, M. L. Cornélio. Analysis of the Ethidium Bromide Bound to DNA by Photoacoustic and FTIR Spectroscopy *Photochem. Photobiol.* 74 (2001) 512-520.

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.

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.

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.

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

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.

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.

Serruto D, Bottomley MJ, Ram S, Giuliani MM, Rappuoli R. The new multicomponent vaccine against meningococcal serogroup B, 4CMenB: Immunological, functional and structural characterization of the antigens. *Vaccine.* 2012, 30, B87-97.

T. D. Gibson. Biosensors: The Stability Problem. *Analisis*, 1999, 27, 7 630 – 638.

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). *Mater. Sci. Eng.* 29 (2009) 539-545.

T.I. Watkins, G. Woolfe. Effect of changing the quaternizing group on the trypanocidal activity of dimidium bromide. *Nature.* 169 (1952) 506-507.

U. Saxena, M. Chakraborty, P. Goswami. Covalente immobilization of cholesterol oxidase on self-assembled gold nanoparticles for highly sensitive amperometric detection of cholesterol in real samples. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 3037-3043.

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.