



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

*Detecção do gene do vírus da hepatite B e antígeno CA125 para o tumor  
do ovário: uma plataforma específica para diagnóstico point-of-care.*

**Aluno: Ana Cristina Honorato de Castro**

**Orientador: Professora Dra Ana Graci Brito Madurro**

**Co-Orientador: Professor Dr João Marcos Madurro**

**UBERLÂNDIA – MG  
2016**



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

*Detecção do gene do vírus da hepatite B e antígeno CA125 para o tumor do ovário: uma plataforma específica para diagnóstico point-of-care.*

**Aluno: Ana Cristina Honorato de Castro**

**Orientador: Professora Dra Ana Graci Brito Madurro**

**Co-Orientador: Professor Dr João Marcos Madurro**

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

UBERLÂNDIA - MG  
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

- C355d  
2016      Castro, Ana Cristina Honorato de, 1985  
Detecção do gene do vírus da hepatite B e antígeno CA125 para o tumor do ovário: uma plataforma específica para diagnóstico point-of-care / Ana Cristina Honorato de Castro. - 2016.  
107 f. : il.
- Orientadora: Ana Graci Brito Madurro.  
Coorientador: João Marcos Madurro.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.
1. Bioquímica - Teses. 2. Hepatite B - Teses. 3. Ovários- Câncer - Teses. 4. Biossensores - Teses. I. Brito-Madurro, Ana Graci. II. Madurro, João Marcos. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

---

CDU: 577.1







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

*Detecção do gene do vírus da hepatite B e antígeno CA125 para o tumor  
do ovário: uma plataforma específica para diagnóstico point-of-care.*

**ALUNO:** Ana Cristina Honorato da Castro

#### **COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Graci Brito Madurro

**Examinadores:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Del Pilar Taboada-Sotomayor  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosa Amalia Fireman Dutra  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Massako Takeuchi  
Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva

**Data da Defesa:** 29/07/2016.

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

---

(ANA GRACI BRITO MADURRO)

UBERLÂNDIA - MG  
2016

*"A vida só pode ser comprendida, olhando-se para trás; mas só pode ser vivida, olhando-se para frente. "*

*Soren Kierkegaard*

## *Agradecimentos*

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

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.

Agradeço, em especial ao meu namorado Leandro Toshio Kochi que sempre esteve ao meu lado, nos dias bons e ruins. Com paciência, respeito e muito carinho compartilhamos momentos especiais. Obrigada meu amor! Por ser meu porto seguro e me compreende melhor do que ninguém.

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 e conselheira Erivânia Brasileiro.

Durante o meu tempo no laboratório conheci bons companheiros e ganhei mais do que conhecimento, pessoas que hoje tenho privilégio de chamar

de amigos. A cumplicidade, o carinho, o companheirismo e a amizade que encontrei no grupo LAFIP/BIOSENS 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, pelas tardes de diversão, pelos sorrisos incontáveis... A todos os membros do grupo LAFIP/BIOSENS e agregados, muito obrigada! Principalmente a prof.<sup>a</sup>. Ana Graci, prof. João Marcos, Danielle, Fábio, Héden, Heliane, João Afonso, José Manuel, Jussara, Kênia, Laíse, Leandro, Lívia, Marcos, Mônica, Priscila, Rafael, Rafaela, Sandro, Vinícius, Felipe, Erick, Lucas, Diego e Drielly.

Agradeço de forma especial também à prof. <sup>a</sup> Ana Graci Brito Madurro e ao prof. João Marcos pelo convite feito a mim para que eu pudesse desenvolver este trabalho. Eles são a alma do grupo de pesquisa do LAFIP/BIOSENS 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 e pela confiança.

Agradeço aos membros da banca por aceitarem o convite para fazer parte da comissão examinadora. É uma grande honra poder contar com vocês na neste momento importante 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

TABELA 1: Valores estimados de novos casos de cânceres no Brasil em 2016 .....	5
FIGURA 1: Esquema representativo indicando o ovário normal, ovário com câncer e o CA 125 circundante. ....	6
FIGURA 2: Casos de hepatite B por idade e região geográfica, Brasil, 2004-2014. ....	10
FIGURA 3: Aparência de um fígado doente com Hepatite B crônica, evolução a cirrose e o carcinoma hepatocelular. ....	11
FIGURA 4: Esquema representativo de um sensor biológico .....	14
FIGURA 5: Esquema representativo dos tipos mais comuns de imobilização de biomoléculas (B), sendo (A) adsorção física, (B) Aprisionamento, (C) ligação cruzada e (D) ligação covalente .....	16
FIGURA 6: Esquema representativo da estrutura molecular do DNA após intercalação do brometo de etídio. ....	21
FIGURA 7: Estrutura de um antígeno (MUC 16) destacando os aminoácidos oxidáveis. ....	23
FIGURA 8: Mecanismos de reação das diferentes gerações de biossensores enzimáticos amperométricos. A- Biossensores de primeira geração onde coproduto é utilizado como um indicador redox. B- Biossensores de segunda geração, onde um mediador redox artificial é usado para retransmitir os elétrons. C- Biossensores de terceira geração onde a transferência eletrônica direta entre a enzima e o eletrodo é estabelecida para gerar a resposta.....	25
FIGURA 9: Mecanismo proposto para a polimerização do poli (3-HFA) .....	28
FIGURA 10: Reação de eletrooxidação do 4-AMF.....	29

### Capítulo 2

Figure 1: Steps used for the immunosensor construction .....	50
Figure 2: (A): Cyclic voltammogram of the electrodeposition of poly (3-HPA) over the screen-printed electrode using 3-hydroxyphenylacetic acid solution (2.5 mmol L <sup>-1</sup> ). (B): Cyclic voltammograms of screen-printed electrode (a) and the	

screen-printed electrode after modification with poly(3-HPA). Supporting electrolyte: modification with poly (3-HPA) (b). Supporting electrolyte: perchloric acid ( $\text{HClO}_4$ ) $0.5 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 0.4, scan rate: $50 \text{ mV s}^{-1}$ .....	53
Figure 3 (A). Differential pulse voltammograms (DPV) of the direct detection of anti CA125 (a), negative control (b), and positive control (c), Electrolyte: phosphate buffer ( $0.10 \text{ mol L}^{-1}$ ), pH 7.4. (B) DPV of the indirect detection of anti CA125 (a), negative control (b), and positive control (c). Electrolyte: Potassium ferricyanide ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $5 \text{ mmol L}^{-1}$ )/potassium chloride ( $\text{KCl}$ $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ) solution. Amplitude modulation: $25 \text{ mV}$ , pulse interval: $0.2 \text{ s}$ ; scan rate (V): $20 \text{ mV s}^{-1}$ .....	55
Figure 4. Sensorgram indicating the various process steps: 1. washing of the gold disc with phosphate buffer followed by addition of phosphate buffer to stabilize the surface; 2. addition of $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of anti-CA125 for 30 min; 3. washing to remove non-binding molecules, followed by addition of phosphate buffer; 4. surface blocking with 0.5% BSA for 60 min; 5. washing with phosphate buffer to remove unbound BSA, followed by addition of the same buffer; 6. addition of CA125 ( $7 \text{ U mL}^{-1}$ ) for 30 min; 7. Washing followed by addition of phosphate buffer .....	57
Figure 5. AFM images of graphite electrode: bare (A), modified with poly (3-HPA) (B), poly (3-HPA)/anti CA125 probe (C), poly (3-HPA)/anti CA125 probe/CA125 target (D).....	58
Figure 6. (A) DPV of human serum enriched with CA125 ( $80 \text{ U mL}^{-1}$ ) (b) and phosphate buffer (a). (B) Bar graph comparing the charge values of serum samples in absence or presence of CA125. Electrolyte: $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ and $\text{KCl}$ $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , $0.25 \text{ mV}$ , $0.2 \text{ s}$ , $20 \text{ mV s}^{-1}$ , $N=3$ .....	59
Figure 7. Calibration curve for the CA125 target (5, 10, 25, 40, 60 and $80 \text{ U.mL}^{-1}$ ). Electrolyte: $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ and $\text{KCl}$ $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ . $25 \text{ mV}$ , $0.2 \text{ s}$ , $20 \text{ mV s}^{-1}$ , $N=3$ .....	60
Figure 8. Stability study of the biological immunosensor based on the interaction of anti-CA125 polyclonal antibody and antigen CA125 ( $60 \text{ U mL}^{-1}$ ). Using the techniques the VPD, monitoring the peak near $+ 0.03\text{V}$ , Electrolyte: $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ and $\text{KCl}$ $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , $25 \text{ mV}$ , $0.2 \text{ s}$ , $20 \text{ mVs}^{-1}$ , $N=2$ .....	61

### **Capítulo 3**

Tabela 1: Valores da concentração do DNA genômico usadas no trabalho ....	75
Figura 1 .....	86
Figura 2 .....	87
Figura 3 .....	88
Figura 4A.....	89
Figura 4B.....	89
Figura 5A.....	90
Figura 5B.....	90
Figura 6 .....	91
Figura 7A.....	92
Figura 7B.....	92
Figura 7C.....	92
Figura 7D.....	92
Figura 7E.....	92
Figura 7F .....	92

## Lista de abreviaturas

EUA - Estados Unidos da América

INCA - Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes de Silva

BRCA1 - *Breast cancer 1*

BRCA2 - *Breast cancer 2*

MUC 16 - Mucina 16

CA125 - *Cancer Antigen 125*

Anti-CA125 - *Anti-Cancer Antigen 125*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

VHB - Vírus da hepatite B

OMS - Organização mundial de saúde

Sinan - Sistema de informação de agravos de notificação

HBsAg - Antígeno de superfície do vírus da hepatite B

Anti-HBs - Anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B

HIV/AIDS - Vírus da imunodeficiência humana/ síndrome da imunodeficiência adquirida

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

PCR - *Polymerase chain reaction*

ALT - Alanina Aminotransferase

AST - Aspartato Transferase

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

SPR - *Surface plasmon resonance*

BE - Brometo de etídio

Ag/AgCl - Prata/Cloreto de prata

Ig - Imunoglobulina

Ac - Anticorpo

Ag - Antígeno

AcAg - Imunocomplexo Anticorpo-Antígeno

Ka - Constante de afinidade

EQMs - Eletrodos quimicamente modificados

3-HFA - Ácido 3-hidroxifenilacético

-OH - Hidroxila



-COOH - Ácido carboxílico

4-AMF - 4-Aminofenol

-NH<sub>2</sub> – Amina

HEP1 - Oligonucleotídeo específico para o vírus da hepatite B, cuja sequência é 5'-GAGGAGTTGGGGGAGCACATT-3'

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - Fosfato dissódico

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Fosfato monossódico

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

HClO<sub>4</sub> - Ácido perclórico

EIE - Espectroscopia de impedância eletroquímica

SSC - Tampão de citrato de sódio-cloreto de sódio

## RESUMO

O câncer do ovário é um tipo de câncer ginecológico que se origina nos órgãos reprodutores femininos. Geralmente o diagnóstico é realizado tardiamente, quando a doença já está em um estágio avançado, e que reflete na alta taxa de mortalidade. É uma doença silenciosa, assim como a Hepatite B, doença causada pelo vírus da hepatite B (VHB), altamente infecciosa e de difícil tratamento devido à inflamação no fígado. Realizar o diagnóstico precoce e o monitoramento é de extrema importância uma vez que ambas as doenças levam à morte inúmeras pessoas anualmente. Contudo, os diagnósticos tradicionais são caros, demorados e não confirmativos, e, portanto, o desenvolvimento de novas estratégias de detecção e monitoramento é interesse para a Saúde Pública. Uma das melhores alternativas são os biossensores, que são sensores químicos cujo sistema de reconhecimento é dotado de biomoléculas que realizam reações bioquímicas. Apresentam vantagens sobre os métodos existentes, como o baixo custo, elevada seletividade e sensibilidade, detecção em tempo real e resposta rápida. Avaliando a gravidade dos casos de cânceres de ovários e as altas taxas de infecção da hepatite B, este trabalho teve como objetivo desenvolver dois biossensores eletroquímicos com características únicas e inovadoras. Para a detecção do CA 125 (antígeno carboidrato 125), marcador tumoral usado no diagnóstico e monitoramento do câncer de ovário, foi construído um imunossensor eletroquímico empregando eletrodos *screen-printed* funcionalizados com o poli (3-hidroxifenilacético) e solução de ferrocianeto de potássio. O sensor demonstrou ser uma plataforma versátil, com alta seletividade e interessante para diagnóstico e monitoramento do câncer. Para a análise de Hepatite B foi construído um genossensor tendo como plataforma eletrodos de grafite funcionalizados com poli (4-aminofenol) e brometo de etídio como indicador eletroquímico de hibridização. A plataforma desenvolvida teve características únicas e inovadoras, apresentando vantagens inerentes à sua aplicabilidade em amostras de plasma, importante no diagnóstico precoce da doença.

**PALAVRAS CHAVE:** Câncer de ovário, Hepatite B, poli(3-hidroxifenilacético), poli(4-aminofenol), biossensores.

## ABSTRACT

The ovarian cancer is a gynecologic cancer that originates in the female reproductive organs. Usually the diagnosis is made late, when the disease is already at an advanced stage, which reflects in the high rate of mortality. It is a silent disease, such as hepatitis B disease caused by hepatitis B virus (HBV), highly infectious and difficult to treat due to liver inflammation. Perform early diagnosis and monitoring is extremely important since both diseases lead to death numerous people annually. However, traditional diagnostic tests are expensive, time consuming and not confirmatory, and therefore the development of new detection and monitoring strategies is relevant to public health. One of the best alternatives are biosensors, chemical sensors which are recognition system is provided with biomolecules performing biochemical reactions. They have advantages over existing methods, such as low cost, high selectivity and sensitivity, real-time detection and immediate response. Assessing the severity of cases of ovarian cancer and high rates of hepatitis B infection, this study aimed to develop two electrochemical biosensors with unique and innovative features. To CA125 (carbohydrate antigen 125) detection, tumor marker used in the diagnosis and monitoring of ovarian cancer, was built an electrochemical immunosensor employing screen-printed electrodes functionalized with poly (3-hydroxyphenylacetic) and potassium ferrocyanide solution. The sensor has proven to be a versatile platform with high selectivity, interesting for diagnosis and monitoring of cancer. For the analysis of hepatitis B was built a genosensor using graphite electrodes functionalized with poly (4-aminophenol) as platform and ethidium bromide as electrochemical indicator of hybridization. The developed platform has unique and innovative features with advantages inherent to its applicability in plasma samples, important in the early diagnosis of the disease.

**KEYWORDS:** Ovarian cancer, hepatitis B, poly (3-hydroxyphenylacetic), poly (4-aminophenol), biosensors.

## Sumário

<b>Apresentação</b> .....	1
 <i>Capítulo 1: Fundamentação Teórica</i> .....	3
1. Câncer do ovário .....	4
2. Hepatite B.....	8
3. Biossensores.....	13
3.1. Classificação dos biossensores de acordo com os transdutores .....	16
3.1.1. Biossensores eletroquímicos.....	16
3.1.2. Biossensores ópticos .....	17
3.1.3. Biossensores pizoelétricos .....	18
3.1.4. Biossensores calorimétricos .....	18
3.1.5 biossensores impedimetricos .....	19
3.2. Classificação de acordo com o elemento biológico de reconhecimento .....	19
3.2.1. Genossensores .....	19
3.2.2. Imunossensores .....	21
3.2.3. Sensores enzimáticos .....	24
4. Polímeros aplicados a biossensores .....	26
4.1. Poli (3-hidroxifenilacético) .....	27
4.2. Poli (4-aminofenol) .....	29
5. Referências .....	30
 <i>Capítulo 2: Electrochemical immunosensor for detection of oncomarker CA125: a new platform for ovarian cancer diagnosis in serum</i> .....	44
 Abstract .....	46
Keywords.....	46
1. Introduction .....	46
2. Experimental .....	48
2.1. Materials.....	48

2.2. Apparatus .....	49
2.3. Preparation of the electrochemical immunosensor.....	49
2.4. Electrosynthesis of the polymer.....	50
2.5. Probe immobilization onto modified electrode .....	50
2.6. Detection CA125 antigen.....	51
2.7. Studies from the response to the anti-CA125 target by SPR sensor.....	51
2.8. Analysis of selectivity, stability and sensibility of the CA125 immunosensor.....	51
2.9. Study with human serum .....	52
3. Results and discussion.....	52
3.1. Electrodeposition of poly (3-HPA) .....	52
3.2. Response of the immobilization of anti-CA125 probe and detection of the CA125 target .....	54
3.3 Response to the anti-CA125 target by SPR sensor .....	56
3.4. AFM analysis .....	57
3.5. Serum tests .....	59
3.6. Calibration curve .....	59
3.7. Stability.....	60
4. Conclusion.....	61
Acknowledgments .....	62
Reference.....	62

<i>Capítulo 3: Metodologia de construção de um genossensor para o diagnóstico molecular da hepatite B.....</i>	<i>69</i>
--	-----------

Campo da invenção .....	70
Estado da técnica.....	70
Descrição e detalhamento dos componentes da invenção .....	75
Descrição das figuras.....	75
Exemplos de construção do genossensor.....	79
Exemplo 1: Preparo do sensor biológico .....	79
Exemplo 2: Detecção do DNA genômico da hepatite B .....	81
Exemplo 3: Curva de calibração.....	82

Exemplo 4: Confirmação da interação do bioeletrodo:DNA genômico por espectroscopia de impedância eletroquímica.....	82
Exemplo 5: Validação do genossensor com amostras reais .....	83
Exemplo 6: Estud de microscopia eletrônica de varredura.....	83
REIVINDICAÇÕES.....	84
Figura 1 .....	86
Figura 2 .....	87
Figura 3 .....	88
Figura 4A.....	89
Figura 4B.....	89
Figura 5A.....	90
Figura 5B.....	90
Figura 6 .....	91
Figura 7A.....	92
Figura 7B.....	92
Figura 7C.....	92
Figura 7D.....	92
Figura 7E.....	92
Figura 7F .....	92

# ***APRESENTAÇÃO***

O câncer do ovário é a sexta neoplasia ginecológica mais comum no mundo e devido à morosidade do diagnóstico as taxas de mortalidade são altas. Já a hepatite B é uma das infecções virais mais comuns que causa irritação e inflamação do fígado, é infecciosa e de difícil tratamento, podendo evoluir para quadros mais graves, levando a morte.

O diagnóstico e o acompanhamento dessas doenças utilizam equipamentos e reagentes onerosos, são demorados, necessitam de profissionais qualificados, invasivos e muitas vezes inconclusivos. Portanto, é essencial o desenvolvimento de métodos de diagnóstico rápidos, de fácil manuseio, acessíveis, sensíveis, seletivos e de baixo custo para a detecção precoce e o monitoramento destas doenças, características estas obtidas pelos biossensores.

Neste trabalho, é relatada a construção de um imunossensor eletroquímico para a detecção de antígeno carboidrato 125 (CA125) para o diagnóstico e acompanhamento de câncer do ovário. Foi desenvolvido por meio de eletrodos impressos de grafite modificados com poli (3-hidroxifenilacético), funcionalizados com o anti-CA125 e solução de ferrocianeto de potássio. Avaliamos a interação antígeno-anticorpo utilizando técnicas eletroquímica, SPR e AFM. O sensor apresentou uma faixa linear de resposta contra o CA125, de 5 a 80 U mL<sup>-1</sup> (S/D=3, R=0,998), com limite de detecção de 1,45 U mL<sup>-1</sup>, mostrando-se mais sensível do que a técnica usada no diagnóstico atuais. É uma plataforma versátil, com alta seletividade e interessante para diagnóstico e monitoramento do câncer.

O sensor eletroquímico para o diagnóstico molecular do vírus da Hepatite B em plasma também foi desenvolvido, baseando-se em eletrodos de grafite sensibilizados com poli (4-aminofenol), funcionalizados com nucleotídeos específicos e o mediador eletroquímico brometo de etídio (BE). Técnicas eletroquímicas e MEV foram empregadas para o reconhecimento dos alvos complementares. O genossensor foi eficiente na detecção do DNA genômico, com uma faixa linear entre 1.18 a 4.82 µg mL<sup>-1</sup> e limite de detecção de 129,96 ng mL<sup>-1</sup> (S/D=3, R=0,998), monitorando o pico de oxidação do BE. A plataforma desenvolvida tem vantagens inerentes à sua aplicabilidade em amostras de plasma, importante no diagnóstico precoce da doença.



# ***CAPÍTULO 1:***

## ***FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA***

## 1 Câncer do ovário

O câncer do ovário é um tipo de câncer ginecológico que se origina nos órgãos reprodutores femininos. É a sexta neoplasia ginecológica mais comum, com uma taxa de incidência que aumenta com a idade e no estado de pós-menopausa (PATEL *et al.*, 2010). Os sintomas são frequentemente muito sutis no início e podem incluir: inchaço, dor pélvica, dificuldade de comer e micção frequente, e são facilmente confundidos com outras doenças.

A maioria é detectada numa fase tardia e, devido à morosidade do diagnóstico as taxas de mortalidade são altas (PRAESTEGAARD *et al.*, 2016). Com isso, cerca de 75% das mulheres com câncer do ovário apresentam-se com doença avançada no momento do diagnóstico. Estas mulheres apresentam uma taxa de sobrevida de cinco anos de 15 – 20 %, enquanto que pacientes que foram diagnosticadas com a doença no início tem uma taxa de 90 % (PAL; RASHID; BISHT, 2015).

Em 2013, nos EUA foram diagnosticadas 20.000 mulheres com o tumor, sendo que destas 15.000 vieram a óbito (JERNIGAN *et al.*, 2013). Nos demais países, cerca de 238.000 mulheres desenvolveram o câncer de ovário, causando o óbito de aproximadamente 152.000 pacientes (ROMAGNOLO *et al.*, 2016). No Brasil, em 2013, foram diagnosticadas 5.600 casos de mulheres com o tumor, sendo que 3.283 vieram a óbito (INCA, 2013).

O risco de desenvolver a doença durante a vida é de cerca de 1 em cada 69 mulheres e a incidência de carcinoma de ovário é de 15,7 por cada 100.000 mulheres entre 40 e 44 anos, elevando-se para 35 após os 50 anos, com um pico de 54 entre os 75 e 79 anos. Para 2016, estima-se que 6150 novos casos de câncer de ovário ocorrerão no Brasil, representando quase 3,0% do total de cânceres desenvolvidos neste ano, de acordo com INCA (Figura 1).


	Localização Primária	Casos	%
<b>Mulheres</b> 	Mama feminina	57.960	28,1%
	Cólon e Reto	17.620	8,6%
	Colo do útero	16.340	7,9%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
	Estômago	7.600	3,7%
	Corpo do útero	6.950	3,4%
	Ovário	6.150	3,0%
	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

TABELA 1: Valores estimados de novos casos de cânceres no Brasil em 2016 (INCA, 2015.)

Os principais fatores de risco associados ao câncer são: o histórico ginecológico, no qual mulheres que nunca engravidaram têm mais chance de desenvolver esse tipo de câncer; a faixa etária, na qual as mulheres mais velhas apresentam maior risco; o histórico familiar, cujas mulheres em que a mãe, irmã ou filha tiveram câncer de ovário; Mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, que são genes relacionados com a síndrome de câncer de mama e ovário hereditário e o uso de medicações que mulheres utilizam para melhorar quadros de infertilidade. Mulheres que se encaixam nos grupos de risco são aconselhadas a realizarem testes preventivos anualmente (POOLE; KONSTANTINOPOULOS; TERRY, 2016).

Devido às diferenças consideráveis nas taxas de sobrevida entre o câncer diagnosticado no estágio inicial e avançado, métodos de rastreamento para detecção prematura do câncer de ovário estão sendo investigados. As evidências clínicas sugerem que a fase pré-clínica para o câncer de ovário pode ser de menos de dois anos. Este padrão rápido de crescimento implica em dificuldades para a detecção precoce desses tumores.

Os exames fundamentais para estabelecer o diagnóstico da doença são realizados por meio de exames de imagens, tomografia computadorizada ou ressonância magnética da pelve e do abdome, ultrassonografia transvaginal, laparoscopia exploratória seguida de biópsia do tumor, que além de útil para

confirmar o diagnóstico, permite observar se há comprometimento de outras regiões e órgãos (BHATT *et al.*, 2016); e exames sanguíneos, como a contagem completa de células sanguíneas e a dosagem sérica do marcador tumoral CA 125 (antígeno de carboidrato 125).

O CA 125 é uma glicoproteína de elevado peso molecular (> 200 kDa) com aproximadamente 22.000 aminoácidos, também conhecido como mucina 16 (MUC 16) e é codificado pelo gene MUC16 (AL-MUSALHI *et al.*, 2015). Em seres humanos é mais comumente utilizado como biomarcador para diagnóstico de doenças malignas do ovário (JERNIGAN *et al.*, 2013).

Os marcadores são definidos como substâncias que podem ser medidas nos fluidos ou tecidos corporais, sendo o CA 125 o principal marcador tumoral aprovado para monitorar, além do diagnóstico, a progressão do câncer do ovário e a resposta ao tratamento (RUBINI *et al.*, 2014). O CA 125 é expresso em tumores ovarianos e células epiteliais normais de tecidos, que posteriormente são lançados no sistema circulatório e, por isso, são encontrados na corrente sanguínea (Figura 1), podendo ser detectado com anticorpo policlonal anti-CA 125 (SHARMA, S. K.; SURESH; WUEST, 2014).

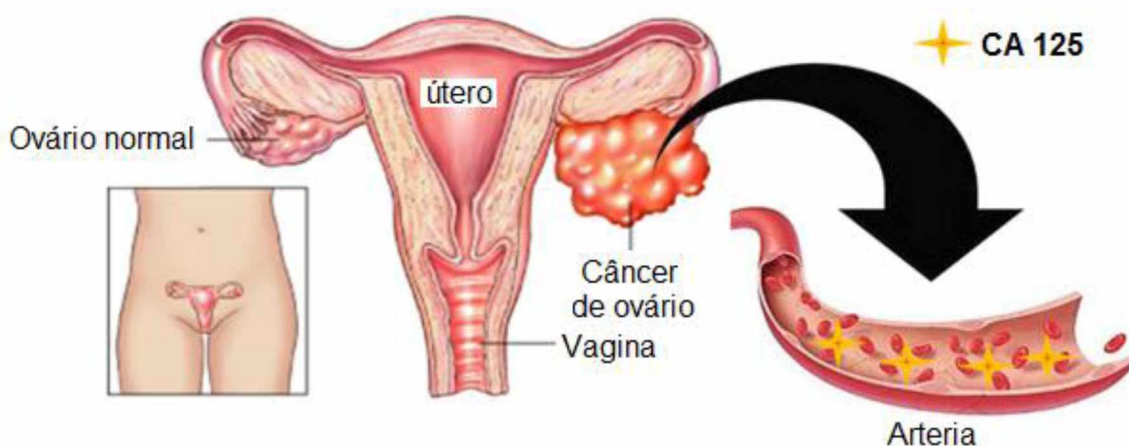


FIGURA 1: Esquema representativo indicando o ovário normal, ovário com câncer e o CA 125 circundante. (Modificado do arquivo acessado no dia 06/06/2016 <http://www.juciribeiro.com/2016/05/cancer-de-ovario-e-o-tumor-ginecologico.html>)

Outros marcadores tumorais podem estar relacionados com o câncer do ovário, como por exemplo o CEA (antígeno carcinoembrionário) e CA 15-3 (antígeno de carboidrato 15-3), porém na maioria dos casos eles são correlacionados com o câncer de mama devido a maior especificidade maior com esse tipo de neoplasia (ZENG, H. *et al.*, 2015).

O exame para a dosagem do CA 125 é útil no diagnóstico desde que seja associado à outras técnicas (ROMAGNOLO *et al.*, 2016), visto que se encontra elevado também em outras doenças como miomas uterinos ou tumorações não cancerosas do útero, endometriose, doença inflamatória pélvica, câncer do endométrio e das trompas (HSU *et al.*, 2014; SAID *et al.*, 2013; SHARMA, S. *et al.*, 2016).

Este marcador está elevado no soro em 85% mulheres diagnosticadas com câncer do ovário, especialmente em pacientes com doença avançada. A produção e liberação do CA 125 para o meio extracelular estão relacionadas com a progressão do câncer, logo uma diminuição indica uma resposta positiva à terapia (FADER *et al.*, 2014).

O exame para dosagem do CA 125 é geralmente solicitado para avaliar a progressão do câncer de ovário (LAMBERTI *et al.*, 2016). Os níveis basais de CA 125 são dosados antes do início do tratamento do câncer de ovário. Uma queda dos níveis de CA 125, durante e após o tratamento, indica regressão da doença e o aumento dos níveis de CA 125 após o tratamento pode indicar recidiva da doença.

Após o tratamento para câncer do ovário, o exame do CA 125 é utilizado por vários anos para acompanhar o sucesso do tratamento. Geralmente, o exame é solicitado a cada dois a quatro meses, nos primeiros dois anos, após o final do tratamento do câncer. Após esse período, o exame é solicitado a cada seis meses por três anos e então anualmente (PETRILLO *et al.*, 2013). Níveis sanguíneos normais são geralmente menores ou iguais a 35 U/mL<sup>-1</sup> (FADER *et al.*, 2014).

O fato é que valores alterados do CA 125 no sangue indicam que algo está errado no organismo, e a quantificação deste antígeno pode ajudar os profissionais da área da saúde na escolha dos melhores métodos para o tratamento da doença. Ensaios deste tipo configuram parte do algoritmo para

uma triagem criteriosa, partindo do princípio que devem ser o mais específico possível. Quando vários resultados de exames estiverem disponíveis e forem positivos, estabelece-se uma ordem de prioridade, por especificidade.

Por se tratar de um teste de grande importância para o diagnóstico na fase inicial da doença, monitoramento e principalmente o diagnóstico de recidivas, além de aumentar as chances de sucesso do tratamento, os testes com o CA 125 existentes hoje no mercado são caros, utilizam equipamentos e reagentes onerosos, demorados, necessitam de profissionais qualificados, invasivos e alguns casos não conclusivos. Deste modo, desenvolver uma metodologia inovadora que contorne todas estas adversidades apresenta uma grande importância na saúde e economia.

Técnicas eletroquímicas vêm sendo aplicadas ao diagnóstico do CA125 com sucesso. Ravalli et al. descreveram um biossensor impedimétrico livre de marcação baseado em nanopartículas de ouro sobre eletrodo impresso de grafite, apresentando um limite de detecção de  $6,7 \text{ U mL}^{-1}$  para a detecção do CA 125 (RAVALLI *et al.*, 2013). Enquanto que Johari-Ahar et al. descrevem um biossensor eletroquímico usando eletrodos de ouro, ácido mercaptopropiônico, sílica revestida com nanopartículas de ouro e pontos quânticos, obtendo um limite de detecção próximo de  $0,0016 \text{ U mL}^{-1}$  (JOHARI-AHAR *et al.*, 2015). Esses resultados indicam que uma plataforma eletroquímica pode ser um sistema promissor no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos.

## **2 Hepatite B**

A hepatite B é uma das infecções virais mais comum que causa irritação e inflamação do fígado. Ela é altamente infecciosa e de difícil tratamento. É provocada pelo vírus da hepatite B (VHB), da família dos *hepadnaviridae*, com o material genético bicatenar de 3,2 kb (NASSAL; RIEGER, 1993), sendo o único vírus causador de hepatite que possui DNA como material genético. Tem tamanho de 42 nm e formato esférico, e a sua estrutura básica consiste num envelope bilipídico. O VHB foi identificado no ano de 1970 no soro de pacientes por Dane (DANE; CAMERON; BRIGGS, 1970) e a confirmação da natureza viral destas partículas foi realizada por meio da detecção de um DNA endógeno

dependente da DNA polimerase que se encontrava no seu interior (KAPLAN *et al.*, 1973). A descoberta desta polimerase permitiu a caracterização do genoma do VHB por Robinson (ROBINSON; GREENMAN, 1974).

Uma vez dentro do organismo, o vírus ataca os hepatócitos e se multiplica provocando a inflamação do fígado, podendo evoluir para um quadro clínico mais grave e a morte. O VHB é muito resistente e consegue sobreviver por até sete dias fora do organismo. Ele está presente no sangue, na saliva, no leite materno, no sêmen e na secreção vaginal de pessoas infectadas, por isso é considerada uma doença sexualmente transmissível (JIN *et al.*, 2016). Sabe-se de duas formas de transmissão da doença, a horizontal, por contato sexual e pelo compartilhamento de materiais cortantes e/ou perfurantes contaminados, e vertical, que é transmitido pela mãe portadora do vírus para o bebê (FRANCOIS-SOUQUIERE *et al.*, 2016).

Existem, em todo o mundo, dois bilhões de pessoas infectadas pelo VHB, sendo que a forma crônica da doença afeta mais de 200 milhões mundialmente (CASTRO *et al.*, 2014). A OMS estima que em média dois milhões de pessoas por ano morrem devido a complicações da hepatite B.

A distribuição da doença pelo mundo é heterogênea, sendo que África, sudoeste asiático, China, bacia amazônica, Alasca e Groenlândia são endêmicas, onde 8 a 20% da população é portadora da infecção, e 70 a 90% teve contato com o vírus (MATTHEWS *et al.*, 2014).

No Brasil, 15% da população já foi contaminada, e o total de casos segundo idade e região geográfica, reportadas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan entre 2004-2014 são mostrados na Figura 2. Pode-se observar que as regiões sudeste e sul do país apresentam o maior número de casos diagnosticados, enquanto que as regiões norte, nordeste e centro-oeste apresentam números similares de casos. Contudo, esses valores menores podem ser atribuídos a uma deficiência no sistema de vigilância, onde muitos casos não foram reportados. Analisando a faixa etária, observa-se que adultos entre 20 e 40 anos apresentam maiores chances de contaminação (Boletim epidemiológico – hepatites virais, SINAN, 2015).

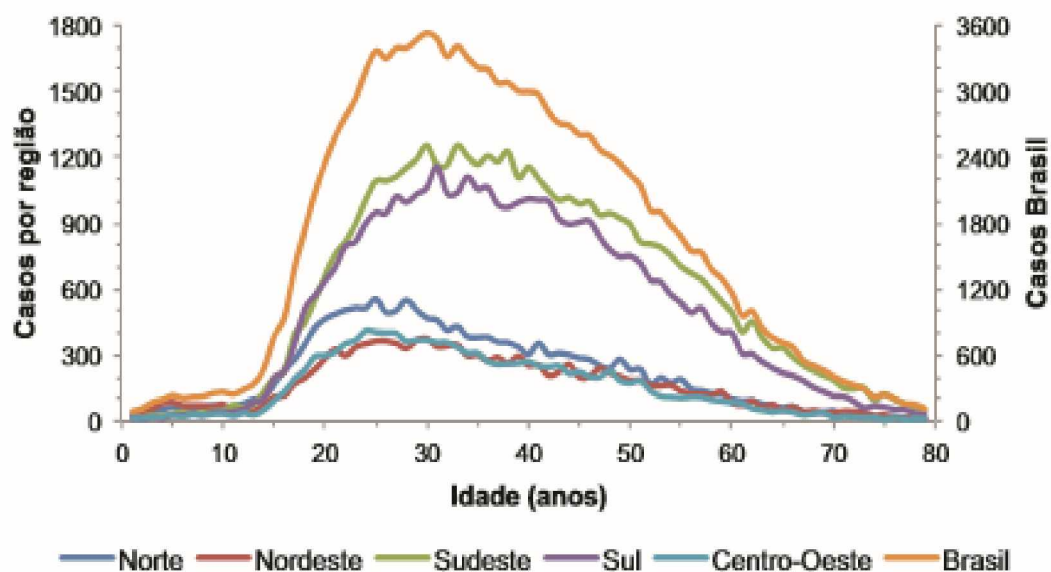


FIGURA 2: Casos de hepatite B por idade e região geográfica, Brasil, 2004-2014. (Boletim epidemiológico – hepatites virais, SiNAN, 2015)

Devido ao fato da hepatite B ser uma doença silenciosa e em muitos casos assintomática, existe uma dificuldade no levantamento preciso dos casos existentes. Apenas alguns pacientes apresentam sintomas, que ainda pode levar meses para surgir. Estes sintomas incluem icterícia, febre, tontura, dor abdominal, cansaço ou fadiga, perda de apetite ou náusea, dor nas articulações, urina escurecida e fezes claras. Deve ser ressaltado que pacientes que não apresentam sintomas podem transmitir o VHB para outras pessoas.

A hepatite B apresenta-se nas fases aguda e crônica. Na fase aguda ou inicial da doença, os sintomas são inespecíficos podendo ser confundida com um quadro gripal. Nesta fase, o sistema imunológico de alguns indivíduos consegue combater a infecção e a recuperação acontece em poucos meses. Entretanto, de 0,5 a 1,0 % dos casos agudos pode ocorrer uma resposta imunológica exacerbada do organismo, causando a hepatite fulminante, caracterizada pela destruição maciça dos hepatócitos, podendo ser fatal (LIU *et al.*, 2015).

Em cerca de 5 a 10% dos casos, o corpo não consegue combater o vírus, permanecendo com infecção ativa por mais de seis meses, o que caracteriza a forma crônica da doença, podendo evoluir para problemas mais



graves no fígado, como a cirrose e o câncer (LIN; KAO, 2016), ilustrado na Figura 3.

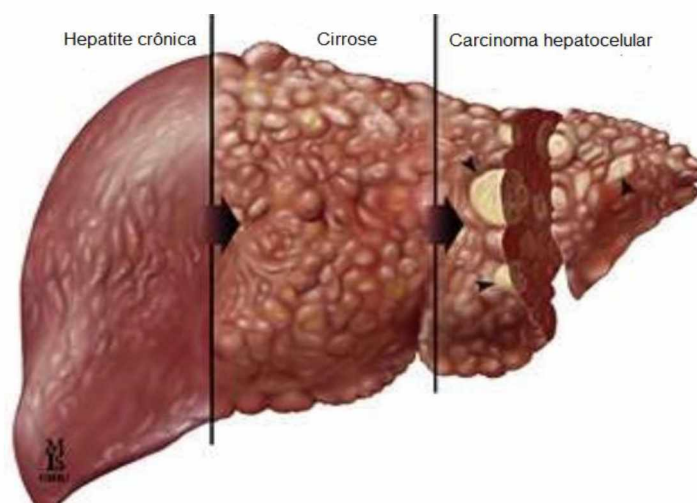


FIGURA 3: Aparência de um fígado doente com Hepatite B crônica, evolução a cirrose e o carcinoma hepatocelular. (Disponível em <http://www.medthical.com/hepatitis-b.html>, acessado 08/06/2016)

Muitas pessoas não apresentam os sintomas visíveis, tanto na fase aguda quanto na fase crônica, porém o fígado sofre uma destruição silenciosa e progressiva. Quando o diagnóstico é finalmente realizado, o paciente apresenta quadro clínico avançado e o tratamento torna-se mais difícil. Portanto, o diagnóstico precoce da doença hepática crônica auxilia os médicos a tomarem as decisões para a melhor terapêutica e controle da progressão da doença (XIAO *et al.*, 2016).

Apesar do número expressivo de casos registrados em todo mundo, a hepatite B pode ser evitada por vacinação com o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) (RIEDEL *et al.*, 2016). Contudo, para atingir uma proteção efetiva a dose da vacina deve ser administrada em 3 aplicações, sendo a segunda com 30 dias e a última com 180 dias após a primeira. Apesar dos reforços, nem todos vacinados (10 a 15%) conseguem desenvolver os anticorpos anti-HBs, não obtendo a proteção desejável (BERAN *et al.*, 2016). Em adição, a negligência e a falta de informação ainda são problemas que inviabilizam a vacinação e a proteção contra a doença.

No Brasil, desde os anos 1990 a vacinação em recém-nascidos é obrigatória e o governo oferece gratuitamente vacinação para todos os jovens com até 19 anos de idade e para pessoas consideradas como grupo de risco, tais como médicos, enfermeiros, profissionais do sexo ou com múltiplos parceiros sexuais, laboratoristas, infectados com HIV/AIDS ou hepatite C, pacientes em hemodiálises ou quaisquer outros que se enquadre em situações de risco de contaminação (DA SILVA *et al.*, 2016; MIRALHA *et al.*, 2013). Estas vacinas são encontradas em todos os postos de saúde e unidades de atenção básica, mas infelizmente não são todos os brasileiros que tomam as doses necessárias, justificando os grandes números de casos registrados.

Atualmente os métodos tradicionais no diagnóstico de hepatite B na fase inicial e na evolução da doença são realizados por meio de testes sorológicos por ELISA, porém o método existente apresenta baixa sensibilidade e pode apresentar falsos positivos; e testes de PCR, usada para a detecção do material genético do vírus e quantificação da carga viral (YANG *et al.*, 2014). Estes métodos ainda podem ser associados aos marcadores de lesão hepatocelular (alanina aminotransferase (ALT) e aspartato transferase (AST)) e biópsia do fígado (CHOU *et al.*, 2016).

Sabe-se que todos os indivíduos infectados com VHB, possuem antígenos HBsAg circulantes detectáveis no soro, e aqueles que desenvolveram uma resposta imunológica proveniente da vacinação desenvolvem anticorpos contra este antígeno (BERAN *et al.*, 2016). Na infecção aguda os antígenos são detectáveis no soro, algumas semanas após a infecção, coincidindo com o aparecimento dos sintomas da doença e, também podem ser detectados pela elevada taxa de replicação viral observada neste tipo de infecção.

A possibilidade de detectar o DNA do VHB por técnicas de biologia molecular, como por exemplo a PCR (Reação em cadeia da polimerase), permitiu a detecção específica de replicação viral, a quantificação do material genético em circulação (carga viral) e a melhora da avaliação da eficiência do tratamento para o paciente contaminado.

A sequência de oligonucleotídeos 5'-GAGGAGTTGGGGGAGCACATT-3' tem sido descrita na literatura como uma boa sequência na identificação do

VHB (CASTRO *et al.*, 2014), sendo isolada de uma região conservada do DNA genômico do vírus.

A persistência do DNA específico no soro por mais de doze semanas indica a evolução da doença para uma hepatite crônica. Por outro lado, se o DNA desaparecer duas semanas após o início do tratamento e mantiver os níveis séricos constantes, pode-se dizer que a intervenção médica foi eficiente (YANG *et al.*, 2014). Sabe-se que 95% dos pacientes com hepatite B aguda que tiveram o diagnóstico precoce apresentaram uma boa recuperação. Já durante a fase crônica, a doença necessita ser monitorada, uma vez que previne o desenvolvimento de doenças mais graves, evitando a morte (MAO *et al.*, 2016).

É importante salientar que o ensaio sorológico requer o uso de reagentes em quantidade elevada, mão de obra qualificada, equipamentos dispendiosos e manutenção de alto custo, demorados, itens que inviabilizam a aplicação destes. Além de serem testes invasivos e desconfortáveis para os pacientes. Portanto, é essencial o desenvolvimento de métodos rápidos, de fácil compreensão, acessíveis, sensíveis, seletivos e de baixo custo para a detecção precoce e o monitoramento da doença em tempo real. Destacando que a detecção do VHB no plasma pode auxiliar o médico no sucesso do tratamento.

Sensores biológicos ou biossensores tem chamado muita à atenção devido às suas características como sensibilidade, baixo tempo de resposta e baixo custo sendo aplicados nas indústrias farmacêuticas (PHAM *et al.*, 2015), monitoramento ambiental (BELKHAMSSA *et al.*, 2016), indústria de alimentos (ROTARIU *et al.*, 2016) e detecção de doenças (CASTRO *et al.*, 2014).

### **3 Biossensores**

Os sensores biológicos, ou biossensores, são dispositivos analíticos que incorporam algum componente biológico capaz de reconhecer analiticamente alvos específicos e produzir um sinal mensurável relacionado com a concentração do analito de interesse (KIMMEL *et al.*, 2012). De acordo com a IUPAC, os sensores químicos cujo sistema de reconhecimento seja dotado de

moléculas que apresentam reações bioquímicas, são classificados como biossensores (THEVENOT *et al.*, 2001).

Estes dispositivos são dotados basicamente de um elemento de reconhecimento (sonda), que reconhece o alvo no meio de detecção, um transdutor físico-químico que determina a presença, atividade e concentração do analito de interesse e converte esse estímulo em um sinal mensurável e o sistema de processamento de dados, que envolve ampliar o sinal e exibí-los de forma apropriada (PERUMAL; HASHIM, 2014). Um esquema ilustrativo do funcionamento dos biossensores é mostrado na figura 4.

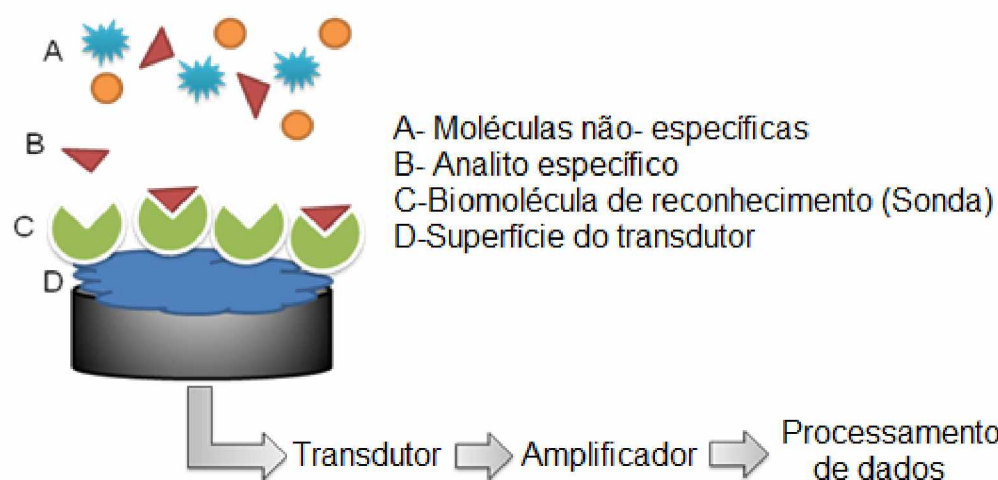


FIGURA 4: Esquema representativo de um sensor biológico (Elaborada pelo autor)

No século passado, o primeiro sensor que monitorava a reação enzimática da oxidação da glicose foi desenvolvido. Para construção deste sensor, a enzima glicose oxidase foi usada em um eletrodo que media o  $pO_2$  (pressão parcial de oxigênio). Nesta reação havia um consumo de oxigênio proporcional a concentração do substrato. Desta forma, a partir da variação do  $pO_2$  foi possível determinar a quantidade de glicose nas amostras (CLARK; LYONS, 1962).

Os biossensores têm se mostrado muito promissores como alternativas às tecnologias analíticas tradicionais por apresentarem vantagens em diversas áreas, dentre estas, a clínica, ao detectar biomarcadores específicos para doenças (TARASOV *et al.*, 2016), indústria alimentícia, ao identificar patógenos em alimentos (VAISOCHEROVA-LISALOVA *et al.*, 2016) e controle ambiental

de detritos e poluentes (BIDMANOVA *et al.*, 2016), vislumbrando importantes perspectivas futuras de um aumento na qualidade de vida populacional e reduzindo gastos por se tratar de uma metodologia seletiva e precisa.

Na construção e validação de biossensores, determinadas características analíticas são sempre almejadas, sendo estas:

- Tempo de análise: respostas em “tempo real”;
- Sensibilidade: sistema que responda frente ao incremento de pequenas concentrações do analito;
- Seletividade: sistema que consiga discriminar alvos específicos de outras espécies presentes na mesma amostra;
- Reprodutibilidade: respostas reprodutíveis fornecendo uma análise mais confiável;
- Precisão: um sistema que consiga minimizar os efeitos de falsos positivos ou falsos negativos;
- Robustez: O dispositivo desenvolvido não sofra alterações quando exposto a variações do ambiente;
- Custo unitário e operacional: sistemas de baixo custo, para aumentar a sua aplicabilidade no mercado;
- Tamanho e peso: uma característica muito importante, pois a miniaturização do sistema permite a aplicação dos biossensores *in house*;
- Interface com o usuário: é desejável que os biossensores sejam de fácil manuseio e que não exijam mão de obra qualificada, permitindo a utilização por qualquer pessoa (GRIFFIN, G.; STRATIS-CULLUM, 2009)

Estes dispositivos são importantes ferramentas analíticas usadas para diagnóstico clínico. Apresentam diversas vantagens sobre os métodos existentes, como o baixo custo, elevada seletividade e sensibilidade, pode passar por um processo de miniaturização, (NAMBIAR; YEOW, 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 (JENSEN *et al.*, 2013).

Uma parte importante no desenvolvimento de um biossensor é o processo de imobilização das biomoléculas sobre a superfície do eletrodo de trabalho. As técnicas mais comumente usadas são adsorção física, aprisionamento, ligação cruzada e ligação covalente. A escolha do método de imobilização é importante visto que pode afetar a estabilidade, tempo de resposta, reprodutibilidade e a sensibilidade do biossensor (PUNDIR; DEVI, 2014). Um esquema representativo é mostrado na figura 5.

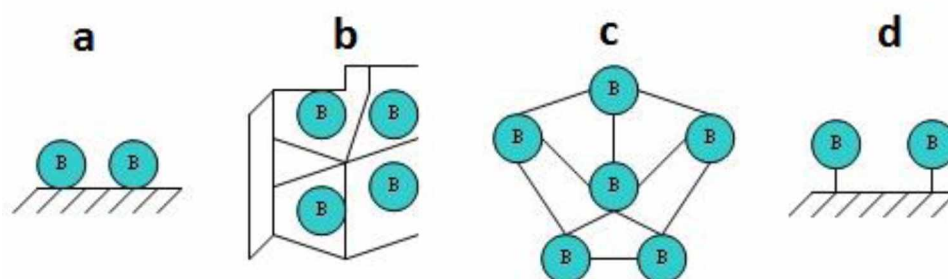


FIGURA 5: Esquema representativo dos tipos mais comuns de imobilização de biomoléculas (B), sendo (A) adsorção física, (B) Aprisionamento, (C) ligação cruzada e (D) ligação covalente (PUNDIR; DEVI, 2014)

Os biossensores recebem vários tipos de classificações e as mais usuais são de acordo com os métodos de transdução do sinal, que determina a sensibilidade do dispositivo, e de acordo com o elemento biológico de reconhecimento, que determina a seletividade ou especificidade (MEHTA *et al.*, 2016; RAPP; GRUHL; LANGE, 2010).

### 3.1 Classificação dos biossensores de acordo com os transdutores

Os biossensores podem ser classificados de acordo com os métodos de detecção utilizados. Alguns destes são citados nas próximas subseções.

#### 3.1.1 Biossensores eletroquímicos

Os biossensores eletroquímicos convertem o evento de bio-reconhecimento em um sinal útil. São frequentemente usados na literatura devido a características como: serem simples, sensíveis, confiáveis e de resposta

rápida além de necessitarem de instrumentação de baixo custo. Alguns sistemas podem operar em condições na qual não é necessário o pré-tratamento da amostra e permitem determinações em uma ampla faixa de concentração.

São divididos em potenciométricos (monitoram o potencial elétrico) (TARASOV *et al.*, 2016), amperométricos (monitoram a corrente elétrica) (SOLDATKIN *et al.*, 2015) ou impedimétricos (monitoram a impedância elétrica e seus componentes: resistência e capacitância) (HUSHEGYI *et al.*, 2016).

O princípio de funcionamento de um biossensor amperométrico é a medida da corrente produzida por uma reação química entre espécies eletroativas. A corrente gerada está relacionada com a espécie em solução dada a um potencial determinado, sendo que a corrente gerada pela reação redox é proporcional à concentração do analito eletroativo. (THÉVENOT *et al.*, 2001).

O sucesso da associação entre as técnicas eletroquímicas e as biomoléculas específicas possibilitou o desenvolvimento de tecnologias de reconhecimento molecular sensível e seletivo, com aplicações em diversas áreas, incluindo a análise de marcadores de doenças (ARDUINI *et al.*, 2016).

### **3.1.2 Biossensores ópticos**

Nos sensores ópticos, a luz é responsável em determinar a medida da reação bioquímica que acontece na superfície do eletrodo. Ele pode analisar a luz que é absorvida ou emitida, ou sua refração devida a reação biológica entre a sonda e analito alvo (PAHURKAR *et al.*, 2015).

Uma técnica que vem sendo muito aplicada é a ressonância plasmônica de superfície (SPR) que se trata de uma interação entre os fótons incidentes e os plásmons de superfície, sendo a proposta de Kretschmann-Raether e Otto a mais utilizada até hoje. Para isso, utilizam um prisma óptico para acoplar os feixes luminosos de entrada à interface metal dielétrico (CHOI, Y.-H. *et al.*, 2015).

Quando um feixe luminoso incide no substrato óptico com um ângulo  $\theta$ , ocorre o fenômeno de reflexão interna total. Numa situação ideal, a energia



luminosa incidente deveria ser totalmente refletida. Todavia, conforme foi comprovado por Kretschmann-Raether e Otto, parte ou toda a energia luminosa é absorvida pela interface metal-dielétrico. Nessa situação, o campo elétrico evanescente, surge e a energia luminosa transmitida interage com as ondas de plásmons de superfície.

Essa situação corresponde ao fenômeno SPR e a refletividade (parâmetro que indica a quantidade de luz que é refletida) do feixe luminoso de entrada é reduzida. Em outras palavras, um mínimo de refletividade pode ser observado no detector óptico. Nesta condição ocorre a ressonância dos plásmons de superfície.

A penetração das ondas de plásmons de superfície excitadas é limitada a centenas de nanômetros, conforme o comprimento da onda luminosa incidente. Assim, modificações nas propriedades físico-químicas do dielétrico alteram a quantidade de energia luminosa incidente que é absorvida ou transmitida. Essa alta sensibilidade superficial é um dos grandes atrativos do fenômeno SPR, especialmente para aplicações biológicas (CHOI, Y. H. *et al.*, 2014; SHRIVASTAV; USHA; GUPTA, 2016; TABASSUM; KAUR; GUPTA, 2016).

### **3.1.3 Biossensores piezoelétrico**

Os biossensores piezoelétricos conseguem realizar a detecção da mudança da quantidade de massa depositada sobre a superfície do cristal de quartzo oscilante (SU *et al.*, 2013).

### **3.1.4 Biossensores calorimétricos**

Estes sensores biológicos partem do princípio que toda reação biológica envolve uma diferença de entalpia e, a partir deste fato é possível determinar alterações em um meio por meio da dosagem de temperatura (ZHAO; FENG; GO, 2004).



### **3.1.5 Biossensores impedimétricos**

A impedância eletroquímica é considerada um transdutor eficaz, barata e não-destrutiva para detecção do evento bioquímico na superfície do eletrodo. Os valores de impedância são dados pelas alterações na resistência elétrica. O evento pode ser detectado na superfície, através das propriedades interfaciais eletrodo-solução, ou na solução do eletrólito, através do monitoramento dos metabólicos produzidos nos eventos biológicos.

São sistemas que operam livres de marcadores, possibilitando a detecção direta das reações, a automação, medidas elétricas simples e a redução de interferentes da matriz, e por isso tem atraído a atenção dos pesquisadores (CHENG *et al.*, 2015; HUSHEGYI *et al.*, 2016; JOHARI-AHAR *et al.*, 2015; LÓPEZ RODRIGUEZ *et al.*, 2015).

## **3.2 Classificação de acordo com o elemento biológico de reconhecimento**

### **3.2.1 Genossensores**

O DNA, ou ácido desoxirribonucleico, é um polímero orgânico constituído por várias unidades de nucleotídeos cuja função é o armazenamento e a transmissão de informação biológica. Os biossensores baseados nessas biomoléculas (fragmentos de DNA, produto de PCR, oligonucleotídeos ou DNA genômico) são chamados de genossensores e podem detectar a presença de genes específicos associados a doenças humanas como por exemplo os diversos tipos de câncer, analisar sequências de genes e identificar mutações.

São considerados métodos analíticos rápidos, sensíveis, simples e conseguem detectar uma sequência de um gene específico em reduzidos volumes de amostras e, por isso, têm atraído grande interesse para aplicações em diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas e detecção de microrganismos patogênicos (HELI *et al.*, 2016).

Métodos convencionais para análise de sequências gênicas específicas baseiam-se tanto no sequenciamento direto quanto na hibridização do DNA.

Devido a sua simplicidade, a 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. Na hibridização do DNA o reconhecimento da fita complementar é altamente eficiente e específico na presença de uma mistura de diferentes ácidos nucleicos não complementares (HUANG *et al.*, 2014).

Em 1988, Palecek e colaboradores (PALECEK *et al.* 1988) demonstraram que a presença dos ácidos nucleicos na superfície de um eletrodo pode ser avaliada por técnicas eletroquímicas. Desde então, têm sido propostos vários métodos polarográficos e voltamétricos para a quantificação direta de ácidos nucleicos, para a detecção de hibridação e para a avaliação dos danos no DNA (GAYATHRI *et al.*, 2015).

Sensores eletroquímicos de DNA são promissores para análise de ácidos nucleicos, por causa de sua rapidez de resposta, alta sensibilidade e baixo custo. Destacando-se que a detecção pode ocorrer de forma direta, convertendo diretamente a hibridização em sinal elétrico ou indireta, com o uso de compostos eletroativos que interagem com o DNA, possibilitando a detecção da sequência específica ou monitoramento da integridade do DNA (BENVIDI *et al.*, 2015).

Um dos indicadores mais utilizados é o brometo de etídio (BE), que é um composto eletroativo derivado da fenantridina, muito utilizado em biologia molecular, devido à interação hidrofóbica na qual uma molécula aromática é levada ao ambiente hidrofóbico dos pares de bases do DNA a partir do meio hidrofílico (Figura 6).

A sua popularidade é devido ao fato de ser um reagente de baixo custo, apresentar um aumento da intensidade de fluorescência quando intercalado entre os pares de base da estrutura da dupla hélice do DNA e ser eletroquimicamente ativo. Estudos eletroquímicos indicam que o BE gera um pico anódico em +0,67 V vs. Ag / AgCl, usando eletrodos de grafite como trabalho (CASTRO *et al.*, 2014).

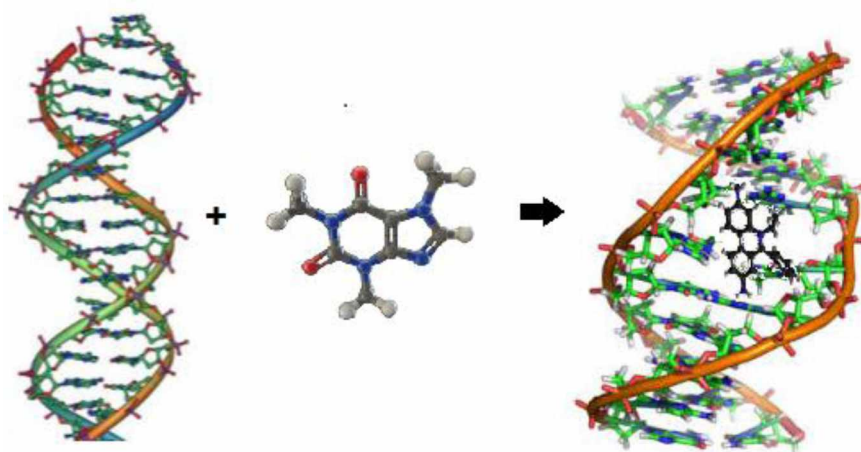


FIGURA 6: Esquema representativo da estrutura molecular do DNA após intercalação do brometo de etídio. Modificado de (MANDAL *et al.*, 2016)

### 3.2.2 Imunossensores

O uso de anticorpos em imunossistemas só foi possível em 1975 com o trabalho de Kohler e Milstein (KOHLER; MILSTEIN, 1975), que descobriram uma forma de produzir anticorpos monoclonais usando uma técnica de imortalização celular.

Os imunossensores baseiam-se na especificidade do sítio combinatório do anticorpo que interage com o antígeno, formando um complexo anticorpo-antígeno, representada por uma estreita relação de complementaridade entre as estruturas tridimensionais das duas moléculas (PANDIARAJ *et al.*, 2014) sendo que tanto o anticorpo quanto o antígeno podem ser imobilizados na superfície do transdutor com o intuito de reconhecer o alvo (DMITRIEV *et al.*, 2002).

Esta complementaridade permite a aproximação máxima do antígeno aos sítios de ligação das moléculas de anticorpo. Essas interações geralmente são de natureza não covalente, portanto, reversíveis. São mantidas por forças intermoleculares (ligações de hidrogênio, ligações de van der Waals, forças eletrodinâmicas e hidrofóbicas) que embora, individualmente sejam fracas, a somatória delas implica em uma forte coesão entre o antígeno e anticorpo.

Os anticorpos pertencem à família das glicoproteínas denominada imunoglobulinas (Ig) e são produzidos pelo organismo em resposta à presença de substâncias exógenas, denominados de antígenos ou imunógenos podem,

ainda, serem produzidos em doenças autoimunes, onde o sistema imunológico passa a produzir anticorpos contra componentes do próprio organismo confundindo suas proteínas com agentes invasores.

As imunoglobulinas têm sua estrutura tridimensional composta por duas cadeias pesadas, e ligadas a elas por pontes dissulfeto outras duas cadeias leves. A porção C-terminal das imunoglobulinas é também denominada Fc e é constante entre este tipo de molécula. Já a região N-terminal é variável, e esta característica é responsável pela especificidade do anticorpo no processo de reconhecimento do antígeno.

Para o desenvolvimento de um imunossensor é necessário que um anticorpo reconheça o antígeno de forma adequada formando um complexo conforme a Equação 1. Essa interação é especificada pela constante de afinidade,  $K_a$ , definida pela concentração do complexo (AgAc), concentração dos antígenos livres [Ag] e dos anticorpos livres [Ac] no equilíbrio da reação, de acordo com a Equação 2. Os valores das constantes de afinidade variam entre  $10^4$  e  $10^{12} \text{ molL}^{-1}$  resultando em ensaios com alta sensibilidade.



$$K_a = \frac{[AgAc]}{[Ag].[Ac]} \quad \text{Equação 2}$$

A interação entre antígeno-anticorpo pode ser avaliada eletroquimicamente de duas formas: direta, pelo monitoramento os picos de oxidação de alguns resíduos de aminoácidos, ou indireta, usando um indicador redox.

A detecção direta baseia-se na transferência de elétrons da biomolécula para os eletrodos por um processo oxidativo ou redutor. O monitoramento do sinal eletroquímico dos resíduos de aminoácidos depende da orientação favorável das proteínas, sendo que os aminoácidos tirosina, triptofano, histidina, cisteína e metionina são eletroativos e possibilitam a aplicação desta técnica (Figura 7) (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2013).

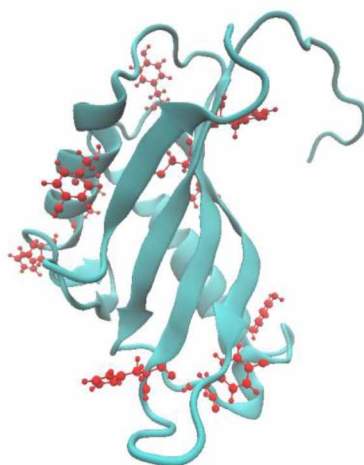


FIGURA 7: Estrutura de um antígeno (MUC 16) destacando os aminoácidos oxidáveis. Adaptado do (MAEDA *et al.*, 2004).

Outra forma de avaliar as modificações realizadas pelos antígenos e anticorpos sobre a superfície do eletrodo é a detecção indireta, a partir de moléculas ou compostos que podem reagir na presença desses materiais biológicos. Podem constituir sistemas com marcação do anticorpo, cuja resposta analítica é parecida com o método ELISA, onde há a formação de um imunocomplexo entre o antígeno e uma segunda molécula de anticorpo marcada com uma sonda redox ou uma enzima, ou sistemas não marcados, onde a resposta analítica é proveniente de uma sonda redox imobilizada no eletrodo de trabalho ou dissolvida em solução (LIANG *et al.*, 2011).

Estas sondas contêm espécies eletroquimicamente ativas e possuem a capacidade de sofrer reações de oxidação/redução, em sua maioria de forma reversível (RICCI *et al.*, 2012). As sondas redox comumente utilizadas constituem-se de moléculas com atividade redox bem estabelecida, como por exemplo, ferrocianeto de potássio (FENG *et al.*, 2016), ferroceno (JIN *et al.*, 2016), azul de metileno (WANG *et al.*, 2016), vermelho de alizarina (ZHANG; DING, 2016), tionina (GAYATHRI *et al.*, 2015) e assim por diante. Os marcadores enzimáticos mais usados são a peroxidase e a fosfatase alcalina (MEHRVAR e ABDI, 2004; YOO e LEE, 2010).

Contudo, a construção dos imunossensores apresenta suas dificuldades, como assegurar que os sítios de ligação do anticorpo estejam expostos para interagir com os antígenos.

Os anticorpos podem ser utilizados no diagnóstico e/ou no prognóstico de várias doenças epidemiológicas, doenças autoimunes, alergias, dentre outras. O desenvolvimento de imunossensores pode ter grandes impactos sobre a saúde humana, uma vez que os testes são mais rápidos e de baixo custo, estreitando a demora do diagnóstico e tratamento (WEI *et al.*, 2016).

### **3.2.3 Sensores enzimáticos**

As enzimas constituem um grupo de biomoléculas com elevada atividade catalítica, seletividade e especificidade. Em organismos vivos, enzimas atuam como catalisadores extremamente eficazes para milhares de reações específicas e são indispensáveis para a manutenção da vida (AN *et al.*, 2015).

A maioria dos sensores enzimáticos baseiam-se em sistemas eletroquímicos amperométrico. Os biossensores enzimáticos podem ser divididos em três gerações de acordo com o método de reconhecimento do analito e do processamento do sinal gerado.

Os biossensores de primeira geração são baseados no monitoramento do produto da reação enzimática ou na eletroatividade do substrato. Porém podem sofrer interferência devido à necessidade de potenciais mais elevados.

Os biossensores de segunda geração surgiram na tentativa de diminuir estes potenciais e, para isso, utilizavam mediadores de elétrons que atuavam como transportadores de elétrons entre a enzima e o eletrodo (PUNDIR; DEVI, 2014).

Por fim, biossensores de terceira geração concentram-se na transferência direta de elétrons entre enzima e eletrodo na ausência de mediadores, promovendo uma maior seletividade por trabalharem em potenciais mais próximos ao da própria enzima, diminuindo as reações interferentes, assim como, dispensam o uso de outros reagentes na sequência das reações enzimáticas (Figura 8). Um dos grandes desafios dos

biossensores de terceira geração é obter o transporte de elétrons eficiente entre o centro ativo das enzimas e os eletrodos (ZENG, X. D. *et al.*, 2009).

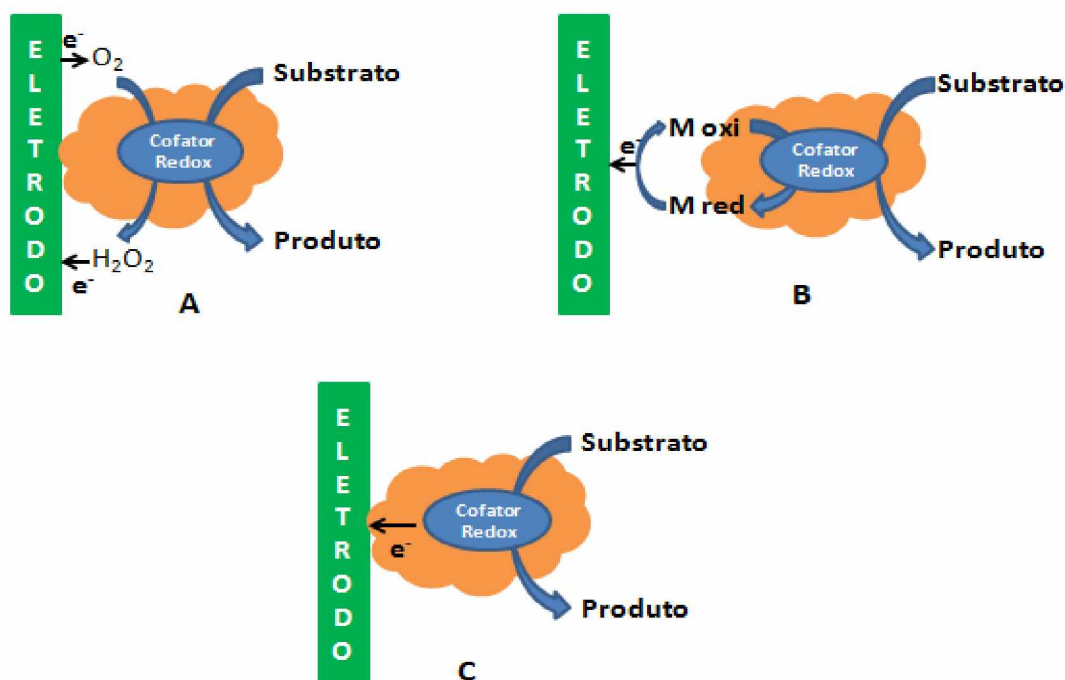


FIGURA 8: Mecanismos de reação das diferentes gerações de biossensores enzimáticos amperométricos. A- Biossensores de primeira geração onde coproduto é utilizado como um indicador redox. B- Biossensores de segunda geração, onde um mediador redox artificial é usado para retransmitir os elétrons. C- Biossensores de terceira geração onde a transferência eletrônica direta entre a enzima e o eletrodo é estabelecida para gerar a resposta (Elaborada pelo autor).

A imobilização e estabilização das biomoléculas sobre a superfície da matriz é uma das etapas fundamentais para a construção de um sensor. Diversos tipos de polímeros têm sido descritos na literatura por apresentarem boa estabilidade e interação com diferentes classes de biomoléculas como DNA (BALVEDI *et al.*, 2014), anticorpos (ARAUJO *et al.*, 2016) e enzimas (ZENG, X. D. *et al.*, 2009).

#### 4 Polímeros aplicados em biossensores

Na construção de dispositivos eletroquímicos de análise é de grande importância a escolha do material utilizado na formação dos eletrodos, os mais utilizados são: grafite, ouro, carbono vítreo e eletrodos impressos, ou *screen-printed*.

Os eletrodos de grafite apresentam características únicas, como preço acessível, pureza elevada, é de fácil aquisição e possui potencial para miniaturização.

Os eletrodos *screen-printed* geralmente são constituídos por um eletrodo de trabalho feito a partir de uma tinta de grafite, um eletrodo de referência contendo uma tinta de prata e uma tinta de grafite como contra eletrodo, impressos sobre um suporte de cerâmica, o que possibilita a produção em larga escala e a um baixo custo (MOHAMED, 2016). Devido sua área reduzida, este tipo de eletrodo utiliza volume muito pequeno de amostra para o diagnóstico além de serem descartáveis. Possuem também inércia química, relativa rugosidade, potencial para a incorporação de biomoléculas e baixo custo, se mostrando eficiente na construção do sensor (ARDUINI *et al.*, 2016).

Os eletrodos podem ser modificados com materiais nanotecnológicos, dentre eles filmes poliméricos, nanotubos de carbono, pontos quânticos e nanopartículas metálicas, e recebem a nomenclatura de eletrodos quimicamente modificados (EQMs) (MOSES; WIER; MURRAY, 1975). O objetivo desta modificação é pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução possibilitando alterar sua reatividade, melhorar a condutividade, seletividade, a incorporação de biomoléculas, melhorando os sinais eletroquímicos (RODRIGUES *et al.*, 2015).

Estas características são importantes para o desenvolvimento de biossensores, que para um bom funcionamento necessita de uma membrana para fixação do biomaterial ou polímero que seja capaz de transmitir ao transdutor o potencial produzido pela reação bioquímica, garantir a reprodutibilidade e amplificar o sinal (SILVA *et al.*, 2008).

Os polímeros contendo elétrons  $\pi$  entre carbonos conjugados apresentam propriedades eletrônicas não usuais 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 similares às dos metais, mas mantêm as propriedades convencionais dos polímeros orgânicos (DE CASTRO *et al.*, 2008).

A preparação de polímeros por meio de métodos eletroquímicos apresenta alta reprodutibilidade, de simples execução e pode ser realizada em temperatura ambiente. A técnica mais comum para a obtenção dos polímeros condutores é a polimerização eletroquímica por voltametria cíclica, que consiste em delimitar uma faixa de potencial de varredura a qual contém o potencial de oxidação do monômero, em uma determinada velocidade de varredura (FERREIRA, L. F. *et al.*, 2011). A espessura do filme polimérico 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.

Polímeros não-condutores também podem ser utilizados como matriz suporte para a construção de biossensores por apresentar características como uma excelente permeabilidade, seletividade, alta reprodutibilidade, tempo de resposta rápido, além de permitir a imobilização de biomoléculas. Também podem ser preparados por eletropolimerização cujo crescimento é auto-limitada e os filmes formados são mais finos atingindo uma espessura de 10 a 100 nanômetros (NAKABAYASHI *et al.*, 2000).

Existem uma grande variedade de materiais utilizados na construção dos filmes poliméricos que possibilitam a imobilização de espécies ativas, bloqueando interferentes e aumentando a transferência de elétrons, como o poli (3-hidroxifenilacético) e o poli (4-aminofenol), que apresentam excelente reprodutibilidade e boa estabilidade (PARAISO *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2015), e apresentam potencial para aplicação em biossensores.

#### **4.1 Poli (3-hidroxifenilacético)**

O ácido 3-hidroxifenilacético (3-HFA) é um material eletroquimicamente ativo que apresenta em sua estrutura dois grupos funcionais, uma hidroxila fenólica (-OH) e uma carboxila (-COOH), o que o torna atrativo no

desenvolvimento de filmes poliméricos com o intuito de interagir com biomoléculas, principalmente aquelas cuja carga líquida total seja positiva. Ferreira e colaboradores (FERREIRA, D. C. *et al.*, 2014) sugeriram um mecanismo de formação do poli (3HFA) no qual acreditam ocorrer de forma radicalar.

Em suas pesquisas eles demonstraram que o meio ácido é mais conveniente para a reação, onde as espécies protonadas devem oxidar, perdendo um elétron para o eletrodo e um próton para o meio, e propagando a formação de cadeias de poliéter do 3-HFA, uma vez que a carboxila ligada no carbono  $sp^3$  é retiradora de elétrons, favorecendo a perda do hidrogênio fenólico, que se torna radicalar. O carbono 6 deve ser atacado pois é o átomo que tende a aumentar a carga com a substituição de um elétron. A reação se propaga, quando a região de carga menos negativa dos anéis aromáticos do dímero se desloca para o carbono orto em relação ao grupo acético, que deve ser atacado por outro radical. A Figura 9 ilustra o mecanismo proposto.

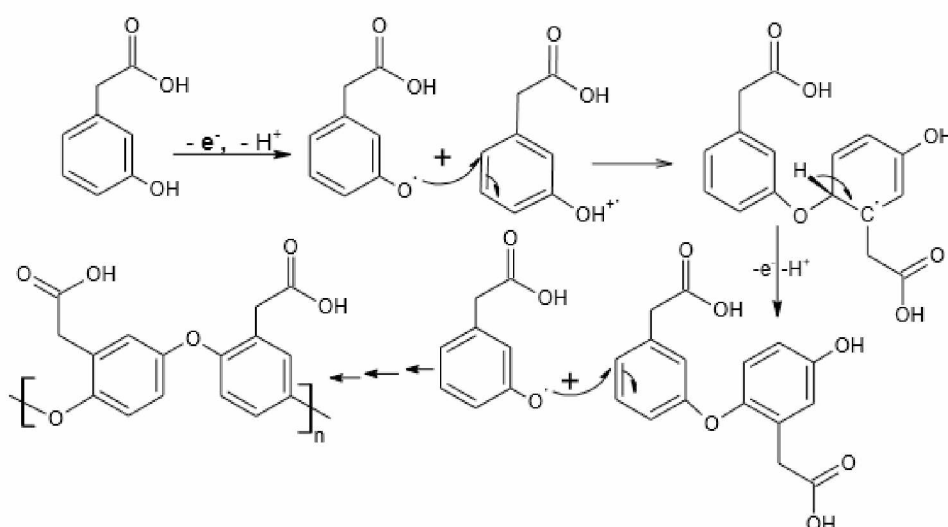


FIGURA 9: Mecanismo proposto para a polimerização do poli (3-HFA) (FERREIRA, D. C. *et al.*, 2014)

O poli (3-HFA) apresenta características importantes para o desenvolvimento de biossensores, uma vez que os testes sugerem que a carga líquida na superfície do eletrodo é negativa, o que é muito importante na interação com anticorpos e antígenos, que dependendo do pH do meio pode apresentar carga líquida favorável a adsorção, estabilizada por ligações de

hidrogênio. Na literatura existem alguns trabalhos que se beneficiam deste tipo de interação para a construção de plataformas versáteis usada em biossensores, como o sensor para a detecção da amilase salivar (SANTOS *et al.*, 2012).

## 4.2 Poli (4-aminofenol)

Os aminofenóis (AMF) 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 ( $\text{-NH}_2$  e  $\text{-OH}$ ) e, portanto, podem apresentar comportamento eletroquímico semelhante ao de polímeros condutores como a anilina (SALAVAGIONE *et al.*, 2004).

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.*, 2009). Hawley e Adams (HAWLEY *et al.*, 1965) sugeriram que a eletrooxidação do 4-AFM envolve a saída de dois elétrons e dois prótons, produzindo a quinoneimina, seguido pela hidrólise produzindo a 4-benzoquinona (Figura 10). Os autores sugerem também que uma segunda reação química entre 4-benzoquinona e 4-AMF se torna importante à medida que o valor de pH aumenta, fazendo possível a ocorrência reação de acoplamento 1,4 e a geração de filme sobre a superfície do eletrodo.

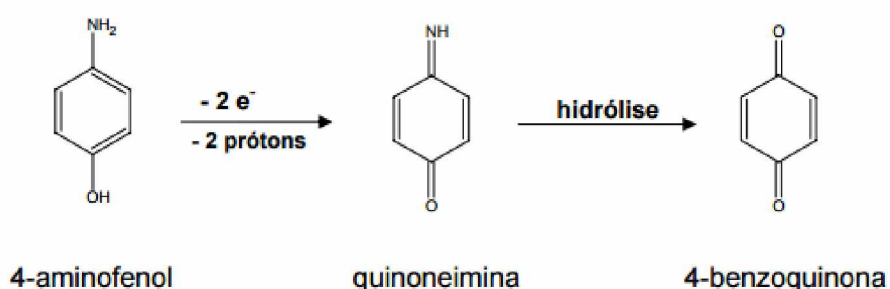


FIGURA 10: Reação de eletrooxidação do poli (4-AMF).

Um fator interessante relatado sobre alguns polímeros eletroativos é a

influência drástica do meio reacional em sua resposta eletroquímica, devido a diferença na protonação dos grupos –OH e –NH<sub>2</sub> influenciado pelo pH, podendo ser obtidos diferentes filmes poliméricos na superfície do eletrodo. Castro e colaboradoras demonstraram que o polímero formado em meio ácido é eficiente na imobilização e detecção de material genético, sugerindo uma plataforma para a construção de biossensores de DNA (CASTRO *et al.*, 2014).

## 5 Referências

AL-MUSALHI, K.; AL-KINDI, M.; RAMADHAN, F.; AL-RAWAHI, T.; AL-HATALI, K.; MULA-ABED, W. A. Validity of Cancer Antigen-125 (CA-125) and Risk of Malignancy Index (RMI) in the Diagnosis of Ovarian Cancer. **Oman Med J**, v. 30, n. 6, p. 428-34, 2015.

AN, N.; ZHOU, C. H.; ZHUANG, X. Y.; TONG, D. S.; YU, W. H. Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors. **Applied Clay Science**, v. 114, p. 283-296, 2015.

ARAUJO, G. R.; FUJIMURA, P. T.; VAZ, E. R.; SILVA, T. A.; RODOVALHO, V. R.; BRITTO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M.; FONSECA, J. E.; SILVA, C. H. M.; SANTOS, P. S.; MOURAO, A. F.; CANHAO, H.; GOULART, L. R.; GONCALVES, J.; UEIRA-VIEIRA, C. A novel reactive epitope-based antigen targeted by serum autoantibodies in oligoarticular and polyarticular juvenile idiopathic arthritis and development of an electrochemical biosensor. **Immunobiology**, v. 224, n. 5, p. 634-640, 2016.

ARDUINI, F.; MICHELI, L.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G.; PIERMARINI, S.; RICCI, F.; VOLPE, G. Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 114-126, 2016.

BALVEDI, R. P. A.; CASTRO, A. C. H.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. Detection of a Specific Biomarker for Epstein-Barr Virus Using a Polymer-

Based Genosensor. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 9051-9066, 2014.

BELKHAMSSA, N.; DA COSTA, J. P.; JUSTINO, C. I. L.; SANTOS, P. S. M.; CARDOSO, S.; DUARTE, A. C.; ROCHA-SANTOS, T.; KSIBI, M. Development of an electrochemical biosensor for alkylphenol detection. **Talanta**, v. 158, p. 30-34, 2016.

BENVIDI, A.; DEGHANI FIROUZABADI, A.; DEGHAN TEZERJANI, M.; MOSHTAGHIUN, S. M.; MAZLOUM-ARDAKANI, M.; ANSARIN, A. A highly sensitive and selective electrochemical DNA biosensor to diagnose breast cancer. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 750, p. 57-64, 2015.

BERAN, J.; VAN DER MEEREN, O.; LEYSSEN, M.; D'SILVA, P. Immunity to hepatitis A and B persists for at least 15 years after immunisation of adolescents with a combined hepatitis A and B vaccine. **Vaccine**, v. 34, n. 24, p. 2686-91, 2016.

BHATT, P.; VHORA, I.; PATIL, S.; AMRUTIYA, J.; BHATTACHARYA, C.; MISRA, A.; MASHRU, R. Role of antibodies in diagnosis and treatment of ovarian cancer: Basic approach and clinical status. **J Control Release**, v. 226, p. 148-67, 2016.

BIDMANOVA, S.; KOTLANOVA, M.; RATAJ, T.; DAMBORSKY, J.; TRTILEK, M.; PROKOP, Z. Fluorescence-based biosensor for monitoring of environmental pollutants: From concept to field application. **Biosens Bioelectron**, v. 84, p. 97-105, 2016.

CASTRO, A. C. H.; FRANCA, E. G.; DE PAULA, L. F.; SOARES, M. M. C. N.; GOULART, L. R.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the hepatitis B virus. **Applied Surface Science**, v. 314, p. 273-279, 2014.

CHENG, M. S.; LAU, S. H.; CHAN, K. P.; TOH, C. S.; CHOW, V. T. Impedimetric cell-based biosensor for real-time monitoring of cytopathic effects induced by dengue viruses. **Biosens Bioelectron**, v. 70, p. 74-80, 2015.

CHOI, Y.-H.; KO, H.; LEE, G.-Y.; CHANG, S.-Y.; CHANG, Y. W.; KANG, M.-J.; PYUN, J.-C. Development of a sensitive SPR biosensor for C-reactive protein (CRP) using plasma-treated parylene-N film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 207, p. 133-138, 2015.

CHOI, Y. H.; LEE, G. Y.; KO, H.; CHANG, Y. W.; KANG, M. J.; PYUN, J. C. Development of SPR biosensor for the detection of human hepatitis B virus using plasma-treated parylene-N film. **Biosens Bioelectron**, v. 56, p. 286-94, 2014.

CHOU, S. L.; CHOU, M. Y.; WANG, Y. H.; KUO, F. C.; KAO, W. F. The impact of chronic carrier of hepatitis B virus on liver function in a 7-day ultramarathon race. **J Chin Med Assoc**, v. 79, n. 4, p. 179-84, 2016.

CLARK, L. C., JR.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Ann N Y Acad Sci**, v. 102, p. 29-45, 1962.

DA SILVA, L. N.; DA SILVA FRANCA, D. D.; DEL-RIO, N. H.; DOS SANTOS CARNEIRO, M. A.; MARTINS, R. M.; GUIMARAES, R. A.; PINHEIRO, R. S.; JUNQUEIRA, A. L.; CAETANO, K. A.; TELES, S. A. Low prevalence, low immunization and low adherence to full hepatitis B vaccine scheme and high-risk behaviors among crack cocaine users in central Brazil. **J Infect Public Health**, 2016.

DANE, D. S.; CAMERON, C. H.; BRIGGS, M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. **Lancet**, v. 1, n. 7649, p. 695-8, 1970.

DE CASTRO, C. M.; VIEIRA, S. N.; GONCALVES, R. A.; BRITO-MADURRO,

A. G.; MADURRO, J. M. Electrochemical and morphologic studies of nickel incorporation on graphite electrodes modified with polytyramine. **Journal of Materials Science**, v. 43, n. 2, p. 475-482, 2008.

DMITRIEV, D. A.; MASSINO, Y. S.; SEGAL, O. L.; SMIRNOVA, M. B.; PAVLOVA, E. V.; GUREVICH, K. G.; GNEDENKO, O. V.; IVANOV, Y. D.; KOLYASKINA, G. I.; ARCHAKOV, A. I.; OSIPOV, A. P.; DMITRIEV, A. D.; EGOROV, A. M. Analysis of the binding of bispecific monoclonal antibodies with immobilized antigens (human IgG and horseradish peroxidase) using a resonant mirror biosensor. **J Immunol Methods**, v. 261, n. 1-2, p. 103-18, 2002.

ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Peptide methionine sulfoxide reductase A (MsrA): direct electrochemical oxidation on carbon electrodes. **Bioelectrochemistry**, v. 89, p. 11-8, 2013.

FADER, A. N.; JAVA, J.; KRIVAK, T. C.; BRISTOW, R. E.; TERGAS, A. I.; BOOKMAN, M. A.; ARMSTRONG, D. K.; TANNER, E. J.; GERSHENSON, D. M. The prognostic significance of pre- and post-treatment CA-125 in grade 1 serous ovarian carcinoma: a gynecologic Oncology Group study. **Gynecol Oncol**, v. 132, n. 3, p. 560-5, 2014.

FENG, T.; QIAO, X.; WANG, H.; SUN, Z.; HONG, C. A sandwich-type electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen based on signal amplification strategy of optimized ferrocene functionalized Fe(3)O(4)@SiO(2) as labels. **Biosens Bioelectron**, v. 79, p. 48-54, 2016.

FERREIRA, D. C.; RODRIGUES, L. P.; MADURRO, J. M.; MADURRO, A. G. B.; DE OLIVEIRA, R. T. S.; ABRAHAO, O. Graphite Electrodes Modified with poly(3-hydroxybenzoic acid) for Oligonucleotides Sensors. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, n. 11, p. 6246-6257, 2014.

FERREIRA, L. F.; SOUZA, L. M.; FRANCO, D. L.; CASTRO, A. C. H.;

OLIVEIRA, A. A.; BOODTS, J. F. C.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Formation of novel polymeric films derived from 4-hydroxybenzoic acid. **Materials Chemistry and Physics**, v. 129, n. 1-2, p. 46-52, 2011.

FRANCOIS-SOUQUIERE, S.; MAKUWA, M.; BISVIGOU, U.; KAZANJI, M. Epidemiological and molecular features of hepatitis B and hepatitis delta virus transmission in a remote rural community in central Africa. **Infect Genet Evol**, v. 39, p. 12-21, 2016.

GAYATHRI, S. B.; KAMARAJ, P.; ARTHANAREESWARI, M.; DEVIKALA, S. DNA nanostructures based biosensor for the determination of aromatic compounds. **Biosens Bioelectron**, v. 72, p. 191-6, 2015.

HELI, H.; SATTARAHMADY, N.; HATAM, G. R.; REISI, F.; VAIS, R. D. An electrochemical genosensor for Leishmania major detection based on dual effect of immobilization and electrocatalysis of cobalt-zinc ferrite quantum dots. **Talanta**, v. 156-157, p. 172-9, 2016.

HSU, P.-Y.; CHOU, P.-Y.; CHENG, Y.-M.; STRONG, C.; CHEN, Y.-Y.; HUANG, M.-F.; WU, M.-H. Relationship between urinary 6-sulfatoxymelatonin excretion and cancer antigen 125 in women with endometriosis. **Gynecology and Minimally Invasive Therapy**, v. 3, n. 4, p. 105-108, 2014.

HUANG, K. J.; LIU, Y. J.; WANG, H. B.; WANG, Y. Y.; LIU, Y. M. Sub-femtomolar DNA detection based on layered molybdenum disulfide/multi-walled carbon nanotube composites, Au nanoparticle and enzyme multiple signal amplification. **Biosens Bioelectron**, v. 55, p. 195-202, 2014.

HUSHEGYI, A.; PIHIKOVA, D.; BERTOK, T.; ADAM, V.; KIZEK, R.; TKAC, J. Ultrasensitive detection of influenza viruses with a glycan-based impedimetric biosensor. **Biosens Bioelectron**, v. 79, p. 644-9, 2016.

JENSEN, P. W.; FALCONI, M.; KRISTOFFERSEN, E. L.; SIMONSEN, A. T.;



CIFUENTES, J. B.; MARCUSSEN, L. B.; FROHLICH, R.; VAGNER, J.; HARMSSEN, C.; JUUL, S.; HO, Y. P.; WITHERS, M. A.; LUPSKI, J. R.; KOCH, J.; DESIDERI, A.; KNUDSEN, B. R.; STOUGAARD, M. Real-time detection of TDP1 activity using a fluorophore-quencher coupled DNA-biosensor. **Biosens Bioelectron**, v. 48, p. 230-237, 2013.

JERNIGAN, A. M.; FADER, A. N.; NUTTER, B.; ROSE, P.; TSENG, J. H.; ESCOBAR, P. F. Ovarian carcinosarcoma: effects of cytoreductive status and platinum-based chemotherapy on survival. **Obstet Gynecol Int**, v. 2013, p. 490508, 2013.

JIN, L.; NIE, R.; LI, Y.; XIAO, N.; ZHU, L.; ZHU, G. Hepatitis B surface antigen in oocytes and embryos may not result in vertical transmission to offspring of hepatitis B virus carriers. **Fertil Steril**, v. 105, n. 4, p. 1010-3, 2016.

JOHARI-AHAR, M.; RASHIDI, M. R.; BARAR, J.; AGHAIE, M.; MOHAMMADNEJAD, D.; RAMAZANI, A.; KARAMI, P.; COUKOS, G.; OMIDI, Y. An ultra-sensitive impedimetric immunosensor for detection of the serum oncomarker CA-125 in ovarian cancer patients. **Nanoscale**, v. 7, n. 8, p. 3768-79, 2015.

KAPLAN, P. M.; GREENMAN, R. L.; GERIN, J. L.; PURCELL, R. H.; ROBINSON, W. S. DNA-Polymerase Associated with Human Hepatitis-B Antigen. **Journal of Virology**, v. 12, n. 5, p. 995-1005, 1973.

KIMMEL, D. W.; LEBLANC, G.; MESCHIEVITZ, M. E.; CLIFFEL, D. E. Electrochemical sensors and biosensors. **Anal Chem**, v. 84, n. 2, p. 685-707, 2012.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495-7, 1975.

LAMBERTI, I.; SCARANO, S.; ESPOSITO, C. L.; ANTOCCIA, A.; ANTONINI,

G.; TANZARELLA, C.; DE FRANCISCIS, V.; MINUNNI, M. In vitro selection of RNA aptamers against CA125 tumor marker in ovarian cancer and its study by optical biosensing. **Methods**, v. 97, p. 58-68, 2016.

LIN, C. L.; KAO, J. H. Review article: novel therapies for hepatitis B virus cure - advances and perspectives. **Aliment Pharmacol Ther**, 2016.

LIU, J.; TAN, Y.; ZHANG, J.; ZOU, L.; DENG, G.; XU, X.; WANG, F.; MA, Z.; ZHANG, J.; ZHAO, T.; LIU, Y.; LI, Y.; ZHU, B.; GUO, B. C5aR, TNF- $\alpha$ , and FGL2 contribute to coagulation and complement activation in virus-induced fulminant hepatitis. **J Hepatol**, v. 62, n. 2, p. 354-62, 2015.

LÓPEZ RODRIGUEZ, M. L.; BENIMELI, C.; MADRID, R. E.; GIACOMELLI, C. E. A simple Streptomyces spore-based impedimetric biosensor to detect lindane pesticide. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 207, p. 447-454, 2015.

MAEDA, T.; INOUE, M.; KOSHIBA, S.; YABUKI, T.; AOKI, M.; NUNOKAWA, E.; SEKI, E.; MATSUDA, T.; MOTODA, Y.; KOBAYASHI, A.; HIROYASU, F.; SHIROUZU, M.; TERADA, T.; HAYAMI, N.; ISHIZUKA, Y.; SHINYA, N.; TATSUGUCHI, A.; YOSHIDA, M.; HIROTA, H.; MATSUO, Y.; TANI, K.; ARAKAWA, T.; CARNINCI, P.; KAWAI, J.; HAYASHIZAKI, Y.; KIGAWA, T.; YOKOYAMA, S. Solution structure of the SEA domain from the murine homologue of ovarian cancer antigen CA125 (MUC16). **J Biol Chem**, v. 279, n. 13, p. 13174-82, 2004.

MANDAL, P. K.; COLLIE, G. W.; SRIVASTAVA, S. C.; KAUFFMANN, B.; HUC, I. Structure elucidation of the Pribnow box consensus promoter sequence by racemic DNA crystallography. **Nucleic Acids Res**, 2016.

MAO, X.; LIU, S.; YANG, C.; LIU, F.; WANG, K.; CHEN, G. Colorimetric detection of hepatitis B virus (HBV) DNA based on DNA-templated copper nanoclusters. **Anal Chim Acta**, v. 909, p. 101-8, 2016.

MATTHEWS, P. C.; GERETTI, A. M.; GOULDER, P. J.; KLENERMAN, P. Epidemiology and impact of HIV coinfection with hepatitis B and hepatitis C viruses in Sub-Saharan Africa. **J Clin Virol**, v. 61, n. 1, p. 20-33, 2014.

MEHTA, J.; VINAYAK, P.; TUTEJA, S. K.; CHHABRA, V. A.; BHARDWAJ, N.; PAUL, A. K.; KIM, K. H.; DEEP, A. Graphene modified screen printed immunosensor for highly sensitive detection of parathion. **Biosens Bioelectron**, v. 83, p. 339-46, 2016.

MIRALHA, A. L.; MALHEIRO, A.; MIRANDA, A. E.; RUTHERFORD, G. W.; ALECRIM, M. Response to the complete hepatitis B vaccine regimen in infants under 12 months of age: a case series. **Braz J Infect Dis**, v. 17, n. 1, p. 82-5, 2013.

MOHAMED, H. M. Screen-printed disposable electrodes: Pharmaceutical applications and recent developments. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 1-11, 2016.

MOSES, P. R.; WIER, L.; MURRAY, R. W. Chemically Modified Tin Oxide Electrode. **Anal Chem**, v. 47, n. 12, p. 1882-1886, 1975.

NAMBIAR, S.; YEOW, J. T. W. Conductive polymer-based sensors for biomedical applications. **Biosens Bioelectron**, v. 26, n. 5, p. 1825-1832, 2011.

NASSAL, M.; RIEGER, A. An Intramolecular Disulfide Bridge between Cys-7 and Cys61 Determines the Structure of the Secretory Core Gene-Product (E-Antigen) of Hepatitis-B Virus. **Journal of Virology**, v. 67, n. 7, p. 4307-4315, 1993.

PAHURKAR, V. G.; TAMGADGE, Y. S.; GAMBHIRE, A. B.; MULEY, G. G. Glucose oxidase immobilized PANI cladding modified fiber optic intrinsic biosensor for detection of glucose. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v.

210, p. 362-368, 2015.

PAL, M. K.; RASHID, M.; BISHT, M. Multiplexed magnetic nanoparticle-antibody conjugates (MNPs-ABS) based prognostic detection of ovarian cancer biomarkers, CA-125, beta-2M and ApoA1 using fluorescence spectroscopy with comparison of surface plasmon resonance (SPR) analysis. **Biosens Bioelectron**, v. 73, p. 146-52, 2015.

PANDIARAJ, M.; SETHY, N. K.; BHARGAVA, K.; KAMESWARARAO, V.; KARUNAKARAN, C. Designing label-free electrochemical immunosensors for cytochrome c using nanocomposites functionalized screen printed electrodes. **Biosens Bioelectron**, v. 54, p. 115-21, 2014.

PARAISO, L. F.; DE PAULA, L. F.; FRANCO, D. L.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. Bioelectrochemical Detection of Alanine Aminotransferase for Molecular Diagnostic of the Liver Disease. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, n. 3, p. 1286-1297, 2014.

PATEL, M. K.; SOLANKI, P. R.; KUMAR, A.; KHARE, S.; GUPTA, S.; MALHOTRA, B. D. Electrochemical DNA sensor for Neisseria meningitidis detection. **Biosens Bioelectron**, v. 25, n. 12, p. 2586-91, 2010.

PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2014.

PETRILLO, M.; FAGOTTI, A.; FERRANDINA, G.; FANFANI, F.; COSTANTINI, B.; VIZZIELLI, G.; PEDONE ANCHORA, L.; NERO, C.; MARGARITI, P. A.; SCAMBIA, G. Ovarian cancer patients with localized relapse: clinical outcome and prognostic factors. **Gynecol Oncol**, v. 131, n. 1, p. 36-41, 2013.

PHAM, H. T. M.; GIERBERG, M.; GEHRMANN, L.; HETTER, K.; TUERK, J.; UHLIG, S.; HANKE, G.; WEISSWANGE, P.; SIMON, K.; BARONIAN, K.; KUNZE, G. The determination of pharmaceuticals in wastewater using a

recombinant *Arxula adeninivorans* whole cell biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 211, p. 439-448, 2015.

POOLE, E. M.; KONSTANTINOPOULOS, P. A.; TERRY, K. L. Prognostic implications of reproductive and lifestyle factors in ovarian cancer. **Gynecol Oncol**, 2016.

PRAESTEGAARD, C.; KJAER, S. K.; NIELSEN, T. S.; JENSEN, S. M.; WEBB, P. M.; NAGLE, C. M.; HOGDALL, E.; RISCH, H. A.; ROSSING, M. A.; DOHERTY, J. A.; WICKLUND, K. G.; GOODMAN, M. T.; MODUGNO, F.; MOYSICH, K.; NESS, R. B.; EDWARDS, R. P.; GOODE, E. L.; WINHAM, S. J.; FRIDLEY, B. L.; CRAMER, D. W.; TERRY, K. L.; SCHILDKRAUT, J. M.; BERCHUCK, A.; BANDERA, E. V.; PADDOCK, L.; KIEMENEY, L. A.; MASSUGER, L. F.; WENTZENSEN, N.; PHAROAH, P.; SONG, H.; WHITTEMORE, A. S.; MCGUIRE, V.; SIEH, W.; ROTHSTEIN, J.; ANTON-CULVER, H.; ZIOGAS, A.; MENON, U.; GAYTHER, S. A.; RAMUS, S. J.; GENTRY-MAHARAJ, A.; WU, A. H.; PEARCE, C. L.; PIKE, M. C.; LEE, A. W.; CHANG-CLAUDE, J.; JENSEN, A.; OVARIAN CANCER ASSOCIATION, C. The association between socioeconomic status and tumour stage at diagnosis of ovarian cancer: A pooled analysis of 18 case-control studies. **Cancer Epidemiol**, v. 41, p. 71-9, 2016.

PUNDIR, C. S.; DEVI, R. Biosensing methods for xanthine determination: a review. **Enzyme Microb Technol**, v. 57, p. 55-62, 2014.

RAPP, B. E.; GRUHL, F. J.; LANGE, K. Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 6, p. 2403-2412, 2010.

RAVALLI, A.; DOS SANTOS, G. P.; FERRONI, M.; FAGLIA, G.; YAMANAKA, H.; MARRAZZA, G. New label free CA125 detection based on gold nanostructured screen-printed electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 179, p. 194-200, 2013.

RIEDEL, T.; SURMAN, F.; HAGENEDER, S.; POP-GEORGIEVSKI, O.; NOEHAMMER, C.; HOFNER, M.; BRYNDA, E.; RODRIGUEZ-EMMENEGGER, C.; DOSTALEK, J. Hepatitis B plasmonic biosensor for the analysis of clinical serum samples. **Biosens Bioelectron**, v. 85, p. 272-279, 2016.

ROBINSON, W. S.; GREENMAN, R. L. DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. **Journal of Virology**, v. 13, n. 6, p. 1231-6, 1974.

RODRIGUES, L. P.; FERREIRA, D. C.; FERREIRA, L. F.; CUADROS-ORELLANA, S.; DE OLIVEIRA, G. C.; BRITO-MADURRO, A. G.; DE OLIVEIRA, R. J.; ABRAHÃO, O.; MADURRO, J. M. Electropolymerization of hydroxyphenylacetic acid isomers and the development of a bioelectrode for the diagnosis of bacterial meningitis. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 45, n. 12, p. 1277-1287, 2015.

ROMAGNOLO, C.; LEON, A. E.; FABRICIO, A. S.; TABORELLI, M.; POLESEL, J.; DEL PUP, L.; STEFFAN, A.; CERVO, S.; RAVAGGI, A.; ZANOTTI, L.; BANDIERA, E.; ODICINO, F. E.; SCATTOLO, N.; SQUARCINA, E.; PAPADAKIS, C.; MAGGINO, T.; GION, M. HE4, CA125 and risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) as diagnostic tools for ovarian cancer in patients with a pelvic mass: An Italian multicenter study. **Gynecol Oncol**, v. 141, n. 2, p. 303-11, 2016.

ROTARIU, L.; LAGARDE, F.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; BALA, C. Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants – trends and perspective. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 80-87, 2016.

RUBINI, G.; ALTINI, C.; NOTARISTEFANO, A.; MERENDA, N.; RUBINI, D.; IANORA, A. A. S.; ASABELLA, A. N. Role of 18F-FDG PET/CT in diagnosing peritoneal carcinomatosis in the restaging of patient with ovarian cancer as compared to contrast enhanced CT and tumor marker Ca-125. **Revista**

**Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular (English Edition)**, v. 33, n. 1, p. 22-27, 2014.

SAID, A. F.; MOHAMED, B. I.; EL-SHARKAWY, E.; AL-SHERIF, M. Role of cancer antigen 125 in active pulmonary tuberculosis. **Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis**, v. 62, n. 3, p. 419-424, 2013.

SALAVAGIONE, H. J.; ARIAS, J.; GARCÉS, P.; MORALLÓN, E.; BARBERO, C.; VÁZQUEZ, J. L. Spectroelectrochemical study of the oxidation of aminophenols on platinum electrode in acid medium. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 565, n. 2, p. 375-383, 2004.

SANTOS, T. V. D.; TEIXEIRA, R. R.; FRANCO, D. L.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G.; ESPINDOLA, F. S. Bioelectrode for detection of human salivary amylase. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 32, n. 3, p. 530-535, 2012.

SHARMA, S.; RAGHAV, R.; O'KENNEDY, R.; SRIVASTAVA, S. Advances in ovarian cancer diagnosis: A journey from immunoassays to immunosensors. **Enzyme Microb Technol**, v. 89, p. 15-30, 2016.

SHARMA, S. K.; SURESH, M. R.; WUEST, F. R. Improved soluble expression of a single-chain antibody fragment in *E. coli* for targeting CA125 in epithelial ovarian cancer. **Protein Expr Purif**, v. 102, p. 27-37, 2014.

SHRIVASTAV, A. M.; USHA, S. P.; GUPTA, B. D. A localized and propagating SPR, and molecular imprinting based fiber-optic ascorbic acid sensor using an in situ polymerized polyaniline-Ag nanocomposite. **Nanotechnology**, v. 27, n. 34, p. 345501, 2016.

SILVA, F. B.; VIEIRA, S. N.; GOULART, L. R.; BOODTS, J. F. C.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Electrochemical investigation of oligonucleotide-DNA hybridization on poly(4-methoxyphenethylamine).

**International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 7, p. 1173-1187, 2008.

SOLDATKIN, O.; NAZAROVA, A.; KRISANOVA, N.; BORYSOV, A.; KUCHERENKO, D.; KUCHERENKO, I.; POZDNYAKOVA, N.; SOLDATKIN, A.; BORISOVA, T. Monitoring of the velocity of high-affinity glutamate uptake by isolated brain nerve terminals using amperometric glutamate biosensor. **Talanta**, v. 135, p. 67-74, 2015.

SU, L.; ZOU, L.; FONG, C. C.; WONG, W. L.; WEI, F.; WONG, K. Y.; WU, R. S. S.; YANG, M. S. Detection of cancer biomarkers by piezoelectric biosensor using PZT ceramic resonator as the transducer. **Biosens Bioelectron**, v. 46, p. 155-161, 2013.

TABASSUM, R.; KAUR, P.; GUPTA, B. D. Tuning the field distribution and fabrication of an Al@ZnO core-shell nanostructure for a SPR-based fiber optic phenyl hydrazine sensor. **Nanotechnology**, v. 27, n. 21, p. 215501, 2016.

TARASOV, A.; GRAY, D. W.; TSAI, M. Y.; SHIELDS, N.; MONTROSE, A.; CREEDON, N.; LOVERA, P.; O'RIORDAN, A.; MOONEY, M. H.; VOGEL, E. M. A potentiometric biosensor for rapid on-site disease diagnostics. **Biosens Bioelectron**, v. 79, p. 669-78, 2016.

THEVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosens Bioelectron**, v. 16, n. 1-2, p. 121-31, 2001.

VAISOCHEROVA-LISALOVA, H.; VISOVA, I.; ERMINI, M. L.; SPRINGER, T.; SONG, X. C.; MRAZEK, J.; LAMACOVA, J.; SCOTT LYNN, N., JR.; SEDIVAK, P.; HOMOLA, J. Low-fouling surface plasmon resonance biosensor for multi-step detection of foodborne bacterial pathogens in complex food samples. **Biosens Bioelectron**, v. 80, p. 84-90, 2016.

WANG, Q.; GAN, X.; ZANG, R.; CHAI, Y.; YUAN, Y.; YUAN, R. An amplified



electrochemical proximity immunoassay for the total protein of *Nosema bombycis* based on the catalytic activity of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>NPs towards methylene blue. **Biosens Bioelectron**, v. 81, p. 382-7, 2016.

WEI, T.; DAI, Z.; LIN, Y.; DU, D. Electrochemical Immunoassays Based on Graphene: A Review. **Electroanalysis**, v. 28, n. 1, p. 4-12, 2016.

XIAO, G.; ZHU, F.; WANG, M.; ZHANG, H.; YE, D.; YANG, J.; JIANG, L.; LIU, C.; YAN, L.; QIN, R. Diagnostic Accuracy of APRI and FIB-4 for Predicting Hepatitis B Virus-related Liver Fibrosis Accompanied with Hepatocellular Carcinoma. **Digestive and Liver Disease**, 2016.

YANG, L.; DU, F.; CHEN, G.; YASMEEN, A.; TANG, Z. A novel colorimetric PCR-based biosensor for detection and quantification of hepatitis B virus. **Anal Chim Acta**, v. 840, p. 75-81, 2014.

ZENG, H.; AGYAPONG, D. A. Y.; LI, C.; ZHAO, R.; YANG, H.; WU, C.; JIANG, Y.; LIU, Y. A carcinoembryonic antigen optoelectronic immunosensor based on thiol-derivative-nanogold labeled anti-CEA antibody nanomaterial and gold modified ITO. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 221, p. 22-27, 2015.

ZENG, X. D.; LI, X. F.; LIU, X. Y.; LIU, Y.; LUO, S. L.; KONG, B.; YANG, S. L.; WEI, W. Z. A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized on DNA functionalized carbon nanotubes. **Biosens Bioelectron**, v. 25, n. 4, p. 896-900, 2009.

ZHANG, B.; DING, C. Displacement-type amperometric immunosensing platform for sensitive determination of tumour markers. **Biosens Bioelectron**, v. 82, p. 112-8, 2016.

ZHAO, L.; FENG, S. S.; GO, M. L. Investigation of molecular interactions between paclitaxel and DPPC by Langmuir film balance and differential scanning calorimetry. **J Pharm Sci**, v. 93, n. 1, p. 86-98, 2004.

## ***CAPÍTULO 2:***

### ***ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSOR FOR DETECTION OF ONCOMARKER CA125: A NEW PLATFORM FOR OVARIAN CANCER DIAGNOSIS IN SERUM***

O capítulo II está de acordo com as normas da revista Bioelectrochemistry

([http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/504080/description#description](http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/504080/description#description))

Electrochemical immunosensor for detection of oncomarker CA125: a new platform for ovarian cancer diagnosis in serum

Ana Cristina Honorato de Castro<sup>1</sup>, Livia Maria Alves <sup>1</sup>, João Marcos Madurro<sup>2</sup>,  
Ana Graci Brito-Madurro<sup>1\*</sup>

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

\*Corresponding author. Tel.: +55 34 32182203; fax: +55 34 32182203  
E-mail address: agbrito@iqufu.ufu.br (A.G. Brito-Madurro).

## Abstract

This paper reports the construction of a new electrochemical immunosensor for detection of carbohydrate antigen 125 (CA125) for diagnosis and monitoring of ovarian cancer. It was developed using modified screen-printed carbon electrodes with poly (3-hydroxyphenylacetic) acid. This platform was used for immobilization of the anti-CA125 probe and evaluation of the antigen-antibody interaction using electrochemical technique, SPR and AFM. Differential pulse voltammetry detected a linear range of CA125 target, from 5 to 80 U mL<sup>-1</sup>, with detection limit of 1,45 U mL<sup>-1</sup>. This sensor technology is versatile, easily integrated to the point of care, being efficient in serum, with high selectivity, discriminating non-specific targets, and showing to be an interesting platform to ovarian cancer diagnose.

**Keywords:** carbohydrate antigen 125, immunosensor, ovarian cancer, poli (3-HPA).

## Resumo

Este artigo relata a construção de um novo imunossensor eletroquímico para a detecção de antígeno de carboidrato 125 (CA125) para o diagnóstico e acompanhamento de câncer de ovário. Ele foi desenvolvido por meio de eletrodos de carbono impresso modificado com ácido poli (3-hidroxifenilacético). Esta plataforma foi usada para a imobilização da sonda anti-CA125 e avaliação da interação antígeno-anticorpo utilizando técnica eletroquímica, SPR e AFM. Pela voltametria de pulso diferencial detectamos um intervalo linear do alvo CA125, de 5 a 80 U mL<sup>-1</sup>, com limite de detecção de 1,45 U mL<sup>-1</sup>. Esta tecnologia de sensor é versátil, facilmente integrado ao ponto de atendimento, sendo eficiente no soro, com alta seletividade, discriminar alvos não-específicas, e mostrando ser uma plataforma interessante para diagnosticar o câncer de ovário.

**Palavras chaves:** antígeno carboidrato 125, imunossensor, cancer do ovario, poli(3-HFA)

## 1. Introduction

Ovarian cancer is the fifth most common gynecological cancer, with an incidence rate that increases with age and is found predominantly in postmenopausal (PRAESTEGAARD *et al.*, 2016). This is the most fatal malignancy in the female reproductive system, accounting for over 140,000 deaths annually worldwide (LEE *et al.*, 2016). The symptoms are often very subtle at first, and may include swelling, pelvic pain, difficulty to eat and frequent urination. It is easily confused with other diseases because of these symptoms, and in most cases the diagnosis occurs only during late stages of the disease, resulting in high mortality rates (LOWE *et al.*, 2013).

CA125 is a high molecular weight protein and more commonly used as biomarker for diagnosis and monitoring of ovarian cancer. Moreover, this is the only approved marker for follow the progression of cancer and the response to the treatment (FERRARO *et al.*, 2013). CA125 is present in ovarian tumor cell surface and can be detected using polyclonal antibodies such as anti-CA125 (SHARMA, S. K.; SURESH; WUEST, 2014). The production and release into the extracellular medium of CA125 is related to cell growth, and consequently the decrease of its concentration in serum indicates a response to therapy (RAVALLI *et al.*, 2013).

The tests for establishing the diagnosis of this disease are carried out by quantifying of the CA125 biomarker by ELISA, complete blood cell count, pelvic ultrasound, computerized tomography scan or Magnetic resonance imaging of the pelvis and abdomen and exploratory laparoscopy followed by tumor biopsy (BHATT *et al.*, 2016; SHARMA, S. *et al.*, 2016). Importantly, these assays require the use of reagents in high quantity, specialized labor, expensive equipment and maintenance which impede the application of these techniques outside of the laboratory or hospital, in addition to being invasive and/or uncomfortable for patients (ROMAGNOLO *et al.*, 2016).

Considering the severity of the disease and the difficulty to diagnosis, it is essential to develop rapid, affordable, sensitive, selective and cost-effective methods for early detection and monitoring of ovarian cancer (WAN *et al.*, 2013),

since also its early detection greatly increases the chances of success of treatment (DIACONU *et al.*, 2013).

Electrochemical techniques have been applied to the diagnosis of success with CA125. Ravalli and collaborators described a biosensor impedimetric free of marking based on gold nanoparticles and screen printed graphite electrode, with a detection limit of 6.7 Uml-1 to CA 125 detection (RAVALLI *et al.*, 2013). While Johari-Ahar describe an electrochemical biosensor using gold electrodes, mercaptopropionic acid, silica coated with gold nanoparticles and quantum dots, obtaining a detection limit around 0.0016 Uml-1 (JOHARI-AHAR *et al.*, 2015). These results indicate that an electrochemical platform may be a promising system in the development of electrochemical biosensors.

Thus, the electrochemical immunosensors are devices that have many suitable characteristics for usage in disease diagnosis (BURCU BAHADIR; KEMAL SEZGINTURK, 2015). This technology offers the promise to streamline laboratory testing, thereby improving productivity of health care systems by minimizing costs and the analysis time (RUBIN; KONSTANTINOV, 2016).

The screen-printed electrodes are composed of different layers of printing ink on a miniature inert plastic or ceramic substrate (PEREZ-RAFOLS *et al.*, 2016). Furthermore, they are easily mass-produced at low cost while retaining the characteristics and superior quality in comparison with classical electronic materials (ARDUINI *et al.*, 2016; TSAI *et al.*, 2016).

Polymers containing  $\pi$  electrons conjugate exhibit unusual electronic properties such as electrical conductivity, low optical transition energy consumption, low ionization potential and high electron affinity (OLIVEIRA *et al.*, 2010). These polymers can be called "synthetic metals", because they are conjugated polymers that exhibit electronic properties (magnetic, conductive and optical) similar to those metals, but retain conventional properties of organic polymers (FRANCO *et al.*, 2008).

The preparation of polymers via electrochemical methods is relatively simple, highly reproducible and can be performed at room temperature (FERREIRA *et al.*, 2011). A wide variety of materials may be used for the synthesis of polymeric films, which allow the immobilization of biomolecules,

prevents binding molecules that might interfere in the reaction, increases the selectivity and electron transfer (SILVA, T. A. R. *et al.*, 2009).

In this research, the construction of an immunosensor was based on the interaction of anti-CA125 polyclonal antibody and CA125 antigen using the screen-printed carbon electrodes functionalized with poly (3-hydroxyphenylacetic acid). This work provides a biosensing platform novel for the detection of ovarium cancer-related disease using human serum.

## 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 solutions. The screen-printed carbon electrodes DS110 was purchased from DropSens. The monomer 3-hydroxyphenylacetic acid (3-HPA) and perchloric acid ( $\text{HClO}_4$ , 70 %) were obtained from Sigma-Aldrich Chemical.

Potassium ferricyanide ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , 5 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) in potassium chloride ( $\text{KCl}$  0.1 mol  $\text{L}^{-1}$ ) solution was used as electrochemical mediator.

The biomolecules used in this work were polyclonal antibody (anti-CA125), Cancer Antigen 125 (CA125) and C-reactive protein (CRP) purchased from Sigma-Aldrich Life Science. The CA-125 antibody (2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) was diluted in deionized water. CA125 (cancer antigen 125) to 5, 10, 25, 40, 60, 80 U  $\text{mL}^{-1}$  in phosphate buffer 0.1 mol  $\text{L}^{-1}$ . The CRP 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  was prepared in phosphate buffer 0.1 mol  $\text{L}^{-1}$ . Bovine serum albumin (BSA 0.5%) was used as blocking solution.

Serum samples from healthy patients were obtained of the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia.

### 2.2. Apparatus

The electrochemical studies were performed in a potentiostat CH Instruments 760 C using DRP-DSC connector, analysis of the surface by the

plasmon resonance (SPR) using an Autolab SPR Springle and analysis of the surface morphology (tapping mode) using an atomic force microscopy (AFM) by Shimadzu SPM 9600.

### 2.3. Preparation of the electrochemical immunosensor

The construction of the electrochemical immunosensor was carried out using the steps following: poly(3-HPA) deposition, anti-CA125 probe immobilization, BSA blocking, CA125 target antigen detection and electrochemical transduction (Fig. 1).

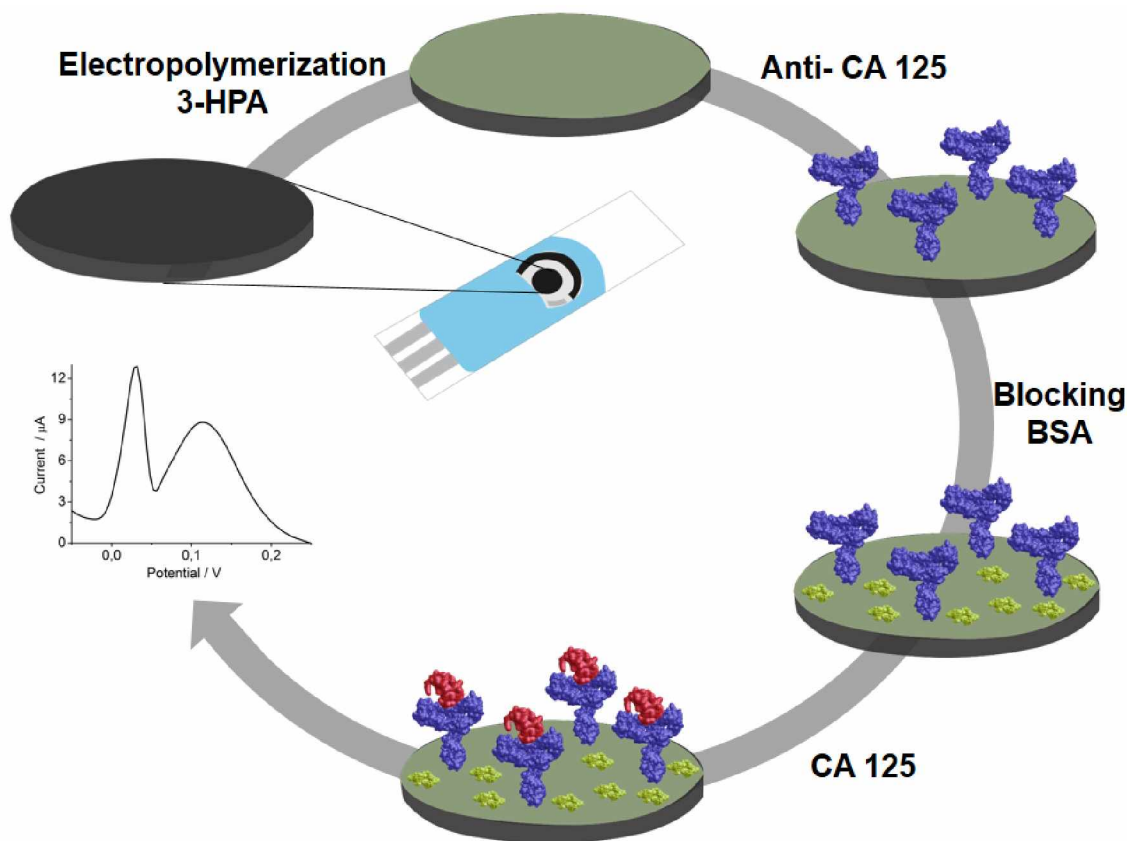


Figure 1. Steps used for the immunosensor construction.

### 2.4. Electrosynthesis of the polymer

100  $\mu\text{L}$  of 3-hydroxyphenylacetic acid monomer solution was dripped onto the electrochemical cell (2.5 mmol  $\text{L}^{-1}$  in perchloric acid 0.5 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH acid) and



deaerated with ultra-pure nitrogen for 45 minutes. The polymerization was carried out by cyclic voltammetry, 50 scans, in the potential range of -0.70 to +1.20 V and scan rate of 50 mV s<sup>-1</sup>. The resulting material was preconditioned electrochemically with three potential scans in perchloric acid solution 0.5 mol L<sup>-1</sup>. After electropolymerization of the poly(3-HPA), the modified electrode was rinsed with deionized water to remove unreacted monomers.

#### *2.5. Probe Immobilization onto modified electrode*

4 µL of the anti-CA125 (2 µg mL<sup>-1</sup>) solution were dripped on the modified graphite electrode. The solvent was evaporated at room temperature, for 30 minutes, and then washed with phosphate buffer. After, the electrode was immersed in blocking solution (BSA, bovine serum albumin 0,5%) for 1 hour, at 8 °C, and washed with phosphate buffer.

The amount of the immobilized probe (anti CA-125) onto the modified electrode was investigated by mean of absorbance of the non-immobilized protein and estimated on the Bradford standart curve (BRADFORD, 1976) using BSA, from 0,01 mg mL<sup>-1</sup> – 0,12 mg mL<sup>-1</sup>. The calculus of the amount of immobilized antibody probe was determined by difference between the total protein added onto surface and the unbound amount, collected after washing (1 mL).

#### *2.6. Detection CA 125 antigen*

4 µL of the CA125 antigen (80 U mL<sup>-1</sup>) in phosphate buffer 0.1 mol L<sup>-1</sup> was dripped on the immunosensor and maintained at 30 °C, during 30 minutes, to promote interaction between the antigen probe and antibody target. After this period, the electrode was rinsed in phosphate buffer, under agitation, to remove the unbound material. Then, he was dried at room temperature. The detection was performed using 100 µL of potassium ferrocyanide solution (5,00 mmol L<sup>-1</sup>) in KCl (0.1 mol L<sup>-1</sup>). The current signal was measurement using differential pulse voltammetry, - 0.10 to +0.30 V.

## *2.7. Studies from the response to the anti CA-125 target by SPR sensor*

SPR analysis was carried out for confirmation of immunoreactions between an antigen and antibody. The analysis was performed in an Autolab SPR using gold disk as a platform for the biomolecule immobilization. Measurements were made in phosphate buffer ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7.4) at room temperature.

## *2.8. Analysis of selectivity, stability and sensibility of the CA-125 immunosensor*

To the selectivity study,  $4 \text{ }\mu\text{L}$  of negative control (C-reactive protein,  $20 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) was dripped onto the immunosensor containing anti-CA125, at  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  for 30 minutes. The washing was made under stirring, for 6 seconds, with phosphate buffer to remove any adsorbed antigen.  $100 \text{ }\mu\text{L}$  of potassium ferrocyanide solution  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl was used for the detection. The current signal reading was made using differential pulse voltammetry.

The calibration curve was constructed using potassium ferrocyanide as electrolyte, anti-CA125 probe ( $2 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ) and concentrations different of CA125 target (5, 10, 25, 40, 60,  $80 \text{ U mL}^{-1}$ ) to determined the sensibility and the detection limit.

To evaluate the biosensor stability, two electrodes were tested at 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 days over a 30-day period using solution of antigen CA 125 ( $60 \text{ U mL}^{-1}$ ). The modified electrodes containing probe (anti-CA125) were stored at  $8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , protected from light and oxygen during 30 days. The reproductibility was evaluated using 2 diferent modified electrodes for the stability and selectivity assays.

## *2.9. Study with human serum*

Serum samples from healthy patients were obtained of the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia and enriched with CA125 antigen solution ( $80 \text{ U mL}^{-1}$ ) to evaluate the applicability of the system in real samples of the patients with ovarian cancer.

The samples (4  $\mu\text{L}$ ) were applied to the immunosensor at 30  $^{\circ}\text{C}$ , for 30 minutes. After the binding of the target, the electrodes were rinsed by immersion in phosphate buffer for 5 s under agitation. Phosphate buffer pH 7.4 was used as eletrolyte for the detection assay.

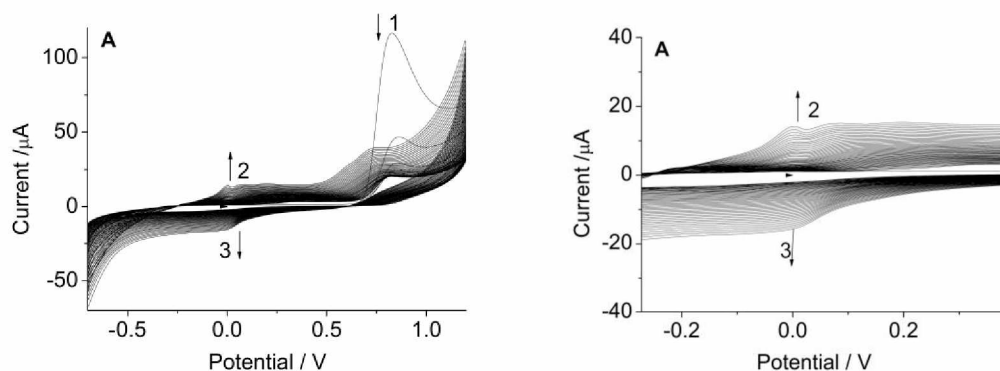
Since the blood samples exhibit other components besides of the target molecule of interest that may interferences with antigen-antibody interaction, the study was carried out using human serum, which was mixed with CA125 antigen solution (80  $\text{U ml}^{-1}$ ) to simulate a sample from a person with ovarian cancer.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Electrodeposition of poly (3-HPA)

The polymeric film changes the reactivity, selectivity and sensitivity making very attractive to large applications, especially in the manufacture of new biosensors (SILVA, F. B. *et al.*, 2008).

The electrodeposition of 3-HPA monomer onto bare graphite electrodes and the electrochemical behavior of the electrodes modified with poly(3-HPA) are shown in Figures 2 (A) and 2(B), respectively.



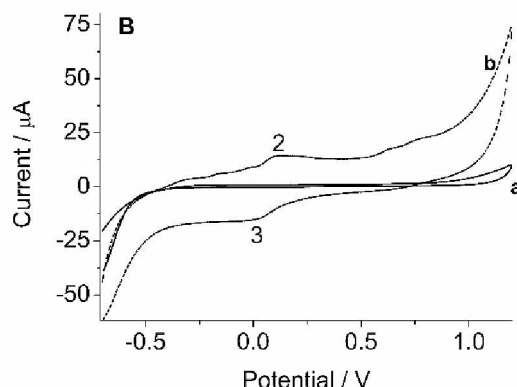


Figure 2. (A): Cyclic voltammograms of the electrodeposition of poly (3-HPA) over the screen-printed electrode using 3-hydroxyphenylacetic acid solution ( $2.5 \text{ mmol L}^{-1}$ ). (B): Cyclic voltammograms of screen-printed electrode (a) and the screen-printed electrode after modification with poly(3-HPA) (b). Supporting electrolyte: perchloric acid ( $\text{HClO}_4$ )  $0.5 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 0.4, scan rate:  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

It is observed a decrease in the oxidation current values close to  $+0.80 \text{ V}$  due to the monomer consumption (Figure 2A). During continuous potential cycling a gradual decrease of current is observed (1). In (2) and (3) an increase in the current values between  $-0.12$  to  $+0.06 \text{ V}$  and  $-0.10$  and  $+0.12 \text{ V}$ , were observed indicating the electrodeposition of the polymer onto screen printed electrode, respectively. Of according to the literature (RODRIGUES *et al.*, 2015), these results indicate the electrodeposition of the polymer.

The screen-printed electrode modified with poly (3-HPA) causes an increase in the electrochemical response when compared with the electrode without film and confirmed the presence of the polymer onto the graphite surface, and indicating higher conductivity of the electrode as expected (Figure 2B).

### 3.2. Response of the immobilization of anti-CA125 probe and detection of the CA125 target

An important step in the development of a biosensor is the immobilization of the probe biomolecule onto the working electrode surface. The techniques more used are physical adsorption, entrapment, crosslinking and covalent bond.

This step can affect the stability, response time, reproducibility and sensitivity of the biosensor (PUNDIR; DEVI, 2014).

The amount of immobilized probe (anti-CA 125) on the surface was determined using the Bradford standard curve, described previously (section 2.5). The results obtained indicate that 87 % of anti-CA 125 was immobilized on the working electrode.

After probe immobilization, the immunointeraction was evaluated directly (Figure 3 A) and indirect (Figure 3 B).

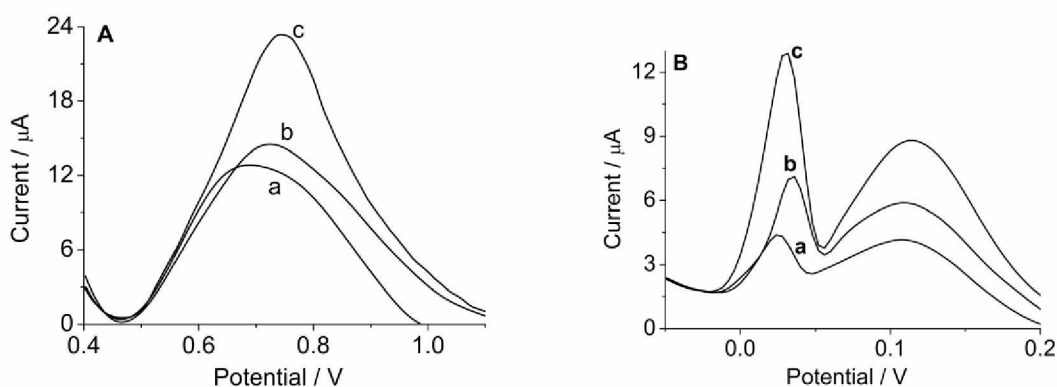


Figure 3 (A). Differential pulse voltammograms (DPV) of the direct detection of anti CA125 (a), negative control (b), and positive control (c), Electrolyte: phosphate buffer ( $0.10 \text{ mol L}^{-1}$ ), pH 7.4. (B) DPV of the indirect detection of anti CA125 (a), negative control (b), and positive control (c). Electrolyte: Potassium ferricyanide ( $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6]$   $5 \text{ mmol L}^{-1}$ )/potassium chloride ( $\text{KCl}$   $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ) solution. Amplitude modulation:  $25 \text{ mV}$ , pulse interval:  $0.2 \text{ s}$ ; scan rate ( $\text{V}$ ):  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .

The immunosensors are based on the specificity of the active site of antibodies that bind to epitopes of the antigen to form an antibody-antigen complex (BELOGUROV *et al.*, 2012; PANDIARAJ *et al.*, 2014). This interaction is typically maintained by hydrogen bonds and hydrophobic electrodynamic forces (DMITRIEV; MASSINO; SEGAL, 2003).

Oliveira-Brett and collaborators (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2013) described that the amino acids phenylalanine, tyrosine, tryptophan and histidine have aromatic groups which are sensitive to the oxidation process, allowing the electrochemical analysis of amino acids directly depending on their locations in the tridimensional structure of the antibody or, indirectly, using electrochemical mediators. Iron organometallic derivatives compounds, like potassium ferricyanide used in this work, can be used as a mediator (REN *et al.*, 2015) due to its properties of increasing of the oxidation signal of amino acids.

The Figure 3 shows an oxidation peak observed in Figure 3A at + 0,75V attributed to the electro oxidizable amino acids of the anti CA125. The interaction between the probe and the specific target, Figure 3A (c), causes an increasing in the amplitude of signal current of the 2 times, in concordance with the increase in the amount of residues of amino acids onto the surface. In the presence of the negative control (PCR) it was observed a slight increase in the intensity of the current peak.

In Figure 3B it is observed two oxidation peaks, the first at +0.03 V, related to the oxidative process of the amino acids residues present in the biomolecules (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2013) and the second at +0.12 V related to the potassium ferrocyanide oxidation (ARAUJO *et al.*, 2016).

The results in Figure 3B show a 4-fold increase in electric charge values after addition of CA125 when monitoring the oxidation peak at + 0.03V. This increase is according to the presence of a higher amount of electrooxidable amino acids residues onto the surface of the screen-printed electrode, resulting of the immunointeraction. Moreover, in the presence of non-specific target, the increase was only 1 times.

The results indicate an efficient probe immobilization, CA125 target detection and excellent specificity of immunosensor for CA125, evidenced by the ability to discriminate the positive control from negative control.

### 3.3. Response to the CA-125 target by SPR sensor

Surface plasmon resonance (SPR) sensing has been an exceedingly powerful and quantitative probe of the interactions of a variety of biopolymers with

various ligands including protein-ligand, protein-protein, protein-DNA and others (CHOI *et al.*, 2014; POLLET *et al.*, 2009; RITZEFELD; SEWALD, 2012; WANG *et al.*, 2004).

In this work, the SPR technique was used as a proof-of-concept of probe immobilization and recognition of the target by immunosensor (anti A125:CA125), Figure 4.

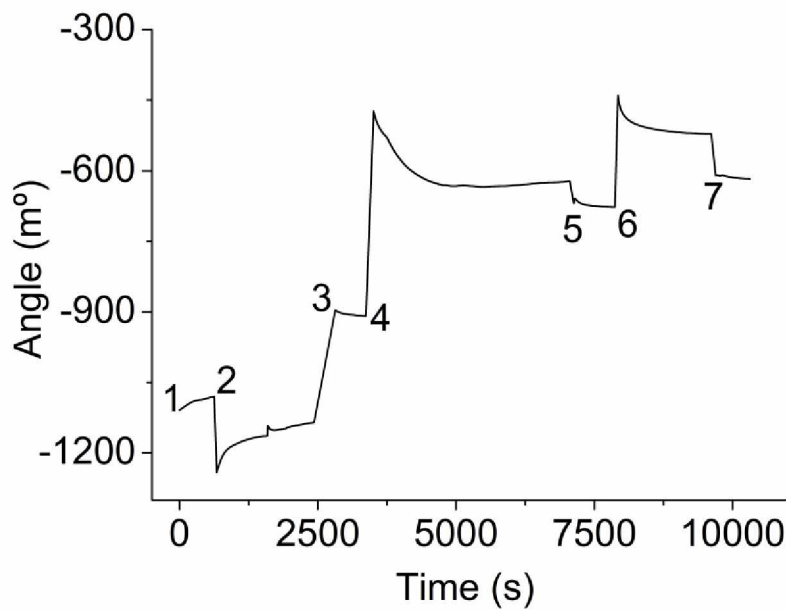


Figure 4. Sensorgram indicating the various process steps: 1. washing of the gold disc with phosphate buffer followed by addition of phosphate buffer to stabilize the surface; 2. addition of  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  of anti-CA125 for 30 min; 3. washing to remove non-binding molecules, followed by addition of phosphate buffer; 4. surface blocking with 0.5% BSA for 60 min; 5. washing with phosphate buffer to remove unbound BSA, followed by addition of the same buffer; 6. addition of CA125 ( $7 \text{ U mL}^{-1}$ ) for 30 min; 7. Washing followed by addition of phosphate buffer.

The angular displacement is used as a milidegrees response unit to quantify the binding of macromolecules on the sensor surface that is converted to mass, following the relationship:  $120 \text{ m}^\circ = 1 \text{ ng/mm}^2$  (Stenberg *et al.* 1991). We can affirm that  $1.5 \text{ ng/mm}^2$  of the anti CA125 was immobilized onto the gold disc. The immunosensor detected  $0.6 \text{ ng/mm}^2$  of the CA125 target using SPR analysis.



### 3.4. AFM analysis

AFM images were used to study the surface of the modified screen printed electrode in the absence or presence of anti-CA125 and CA125: anti-CA125 (Figure 5).

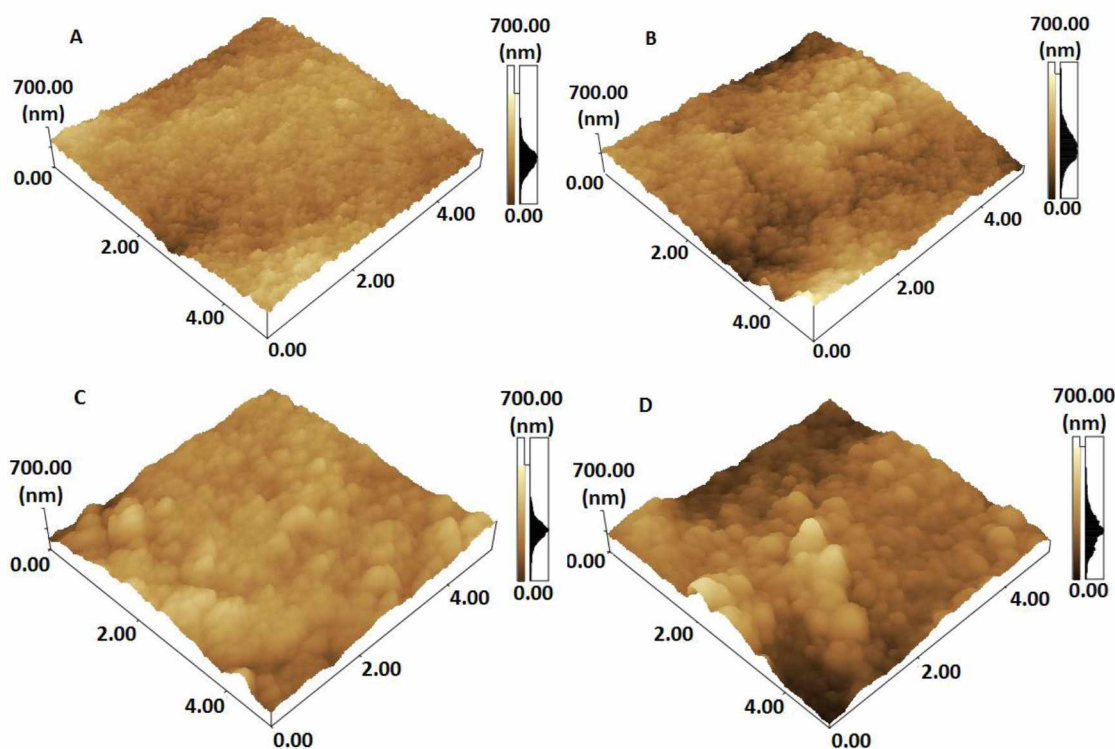


Figure 5. AFM images of graphite electrode: bare (A), modified with poly (3-HPA) (B), poly (3-HPA)/anti-CA125 probe (C), poly (3-HPA)/anti-CA125 probe/CA125 target (D).

After electropolymerization of the poly (3HPA), the surface becomes rougher indicating that occurs modification of the surface with the polymer (see figures 5 A and B).

When added the biomolecule on the surface, the roughness obtained with the formation of electrodeposited material undergoes a decline in values, this occurs because the antibodies can fill gaps and cover the surface of the electrode assuming a more homogeneous topography (Figure 5 C) and presence of the



globular structures. The immunointeraction result in the formation larger clusters in specific regions. The roughness values obtained by AFM were:  $50 \pm 9$  (A),  $84 \pm 4$  (B),  $56 \pm 3$  (C),  $84 \pm 1$  (D). These results are in consonance whit electrochemical experiments and the SPR, previously presented.

### 3.5. Serum tests

The proposed immunosensor was applied to the determination of CA125 in serum samples (Figure 6). This analysis is very important, since biological fluids have very compounds able to interfere in the sensor performance (PARAISO *et al.*, 2014).

In order to evaluate the immunosensor using real samples, the human serum was enriched with a solution of the cancer antigen 125, CA125 (positive control) or phosphate buffer (negative control).

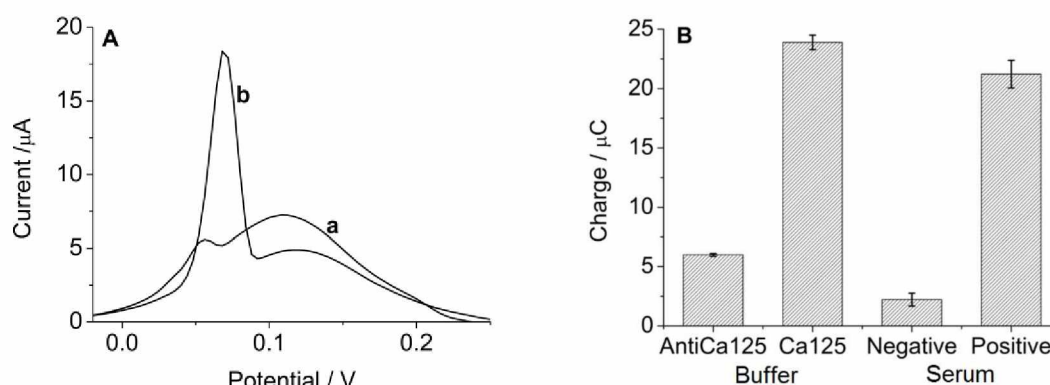


Figure 6. (A) DPV of human serum enriched with CA125 ( $80 \text{ U mL}^{-1}$ ) (b) and phosphate buffer (a). (B) Bar graph comparing the charge values of serum samples in absence or presence of CA125. Electrolyte:  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$   $5 \text{ mmol L}^{-1}$  and  $\text{KCl}$   $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $0.25 \text{ mV}$ ,  $0.2 \text{ s}$ ,  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .  $N = 3$ .

The immunosensor was able to discriminate real samples with successful, whereas the interference caused by serum was only 10 % when compared to the

CA125 antigen alone, indicating the high selectivity and ability to discriminate interfering substances.

### 3.6. Calibration curve

The calibration curves of the immunosensor is indicated in Figure 7 for 0 - 80 U mL<sup>-1</sup> and used to determine the immunosensor linear range, sensitivity and limit of detection using differential pulse voltammetry technique.

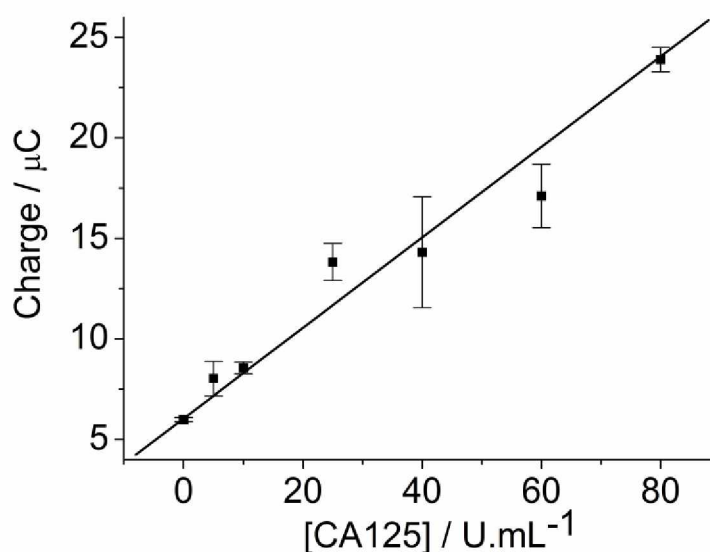


Figure 7. Calibration curve for the CA125 target (5, 10, 25, 40, 60 and 80 U mL<sup>-1</sup>). Electrolyte: K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 5 mmol L<sup>-1</sup> and KCl 0.1 mol L<sup>-1</sup>. 25 mV, 0.2 s, 20 mV s<sup>-1</sup>. N=3.

The normal reference value of the CA125 is up to 35 U mL<sup>-1</sup> (FADER *et al.*, 2014). Increased values of CA125 may indicate the presence of cancer (LAMBERTI *et al.*, 2016). The sensibility of the development immunosensor was 0.225 μC/ U mL<sup>-1</sup>, linear range of response was 5 to 80 U mL<sup>-1</sup> and detection limit of 1,45 U mL<sup>-1</sup> (r: 0.995, N: 3). These results indicate that the immunosensor is able to detect CA125 in concentrations below of the reference value and reach the linear range for the sick patients.

### 3.7. Stability

Operational stability may be defined as the retention of activity of biomolecules used in the construction of the biosensor, which must be viable at the moment of use (WU, N. Y. *et al.*, 2013). The stability study was indicated in the Figure 8.

For this study, the immunosensor were conditioned in a temperature of 8°C for 30 days. During this time, the detection was performed, as described previously, using solutions of potassium ferricyanide as electrolyte.

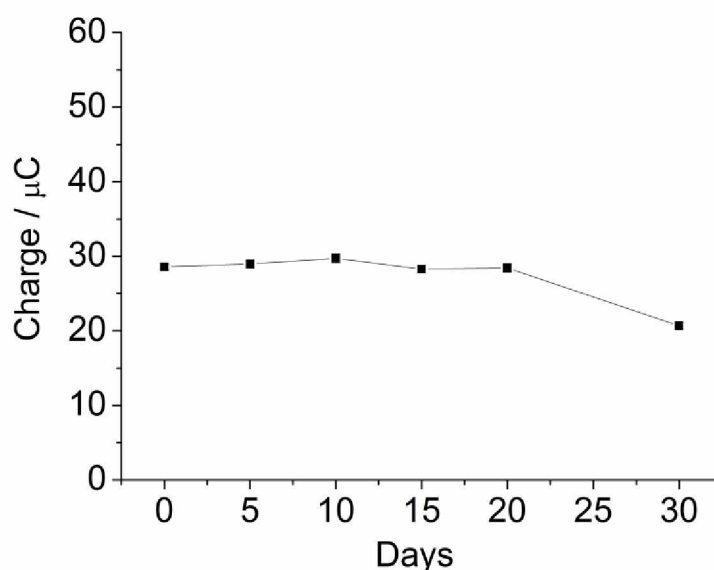


Figure 8. Stability study of the biological immunosensor based on the interaction of anti-CA125 polyclonal antibody and antigen CA125 ( $60 \text{ U mL}^{-1}$ ). Using the techniques the VPD, monitoring the peak near  $+0.03 \text{ V}$ , Electrolyte:  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$   $5 \text{ mmol L}^{-1}$  and  $\text{KCl } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $25 \text{ mV}$ ,  $0.2 \text{ s}$ ,  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .  $N=2$ .

These data indicate that the sensor presents a good stability when compared to other sensors used to the CA125 detection (DAI *et al.*, 2003; RAGHAV; SRIVASTAVA, 2015; WU, L. *et al.*, 2006).

#### 4. Conclusion

This is the first report of an immunosensor constructed onto screen-printed modified with poly(3-HPA) for diagnosis of the ovarium cancer, using CA125 as oncomarker.

The interaction of antibody-antigen could be also confirmed by SPR and AFM.

The developed immunosensor presents a good sensibility of 0.225  $\mu\text{C}/\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  and detection limit of 1,45  $\text{U mL}^{-1}$ . Indicating that the immunosensor is able to detect CA125 in concentrations below of the reference value and reach the linear range for the sick patients. In addition, the presented detection limit is comparable 5  $\text{U mL}^{-1}$  is significantly faster than to ELISA method (30 min). The reponse time of the sensor is a very important for successful disease intervention.

The immunosensor was able to discriminate real samples successfully, since that the interference caused by serum was only 10 %.

Taking into account the difficulties in the current methods used to detect this disease, the results shown on this study suggest that the immunosensor may be a promising tool for ovarian cancer diagnosis, opening new doors for other 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).

## **References**

ARAUJO, G. R.; FUJIMURA, P. T.; VAZ, E. R.; SILVA, T. A.; RODOVALHO, V. R.; BRITTO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M.; FONSECA, J. E.; SILVA, C. H. M.; SANTOS, P. S.; MOURAO, A. F.; CANHAO, H.; GOULART, L. R.; GONCALVES, J.; UEIRA-VIEIRA, C. A novel reactive epitope-based antigen targeted by serum autoantibodies in oligoarticular and polyarticular juvenile idiopathic arthritis and development of an electrochemical biosensor. **Immunobiology**, v. 224, n. 5, p. 634-640, 2016.

ARDUINI, F.; MICHELI, L.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G.; PIERMARINI, S.; RICCI, F.; VOLPE, G. Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 114-126, 2016.

BELOGUROV, A., JR.; SMIRNOV, I.; PONOMARENKO, N.; GABIBOV, A. Antibody-antigen pair probed by combinatorial approach and rational design: bringing together structural insights, directed evolution, and novel functionality. **FEBS Lett**, v. 586, n. 18, p. 2966-73, 2012.

BHATT, P.; VHORA, I.; PATIL, S.; AMRUTIYA, J.; BHATTACHARYA, C.; MISRA, A.; MASHRU, R. Role of antibodies in diagnosis and treatment of ovarian cancer: Basic approach and clinical status. **J Control Release**, v. 226, p. 148-67, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BURCU BAHADIR, E.; KEMAL SEZGINTURK, M. Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics. **Talanta**, v. 132, p. 162-74, 2015.

CHOI, Y. H.; LEE, G. Y.; KO, H.; CHANG, Y. W.; KANG, M. J.; PYUN, J. C. Development of SPR biosensor for the detection of human hepatitis B virus using plasma-treated parylene-N film. **Biosens Bioelectron**, v. 56, p. 286-94, 2014.

DAI, Z.; YAN, F.; CHEN, J.; JU, H. Reagentless amperometric immunosensors based on direct electrochemistry of horseradish peroxidase for determination of carcinoma antigen-125. **Anal Chem**, v. 75, n. 20, p. 5429-34, 2003.

DIACONU, I.; CRISTEA, C.; HARCEAGA, V.; MARRAZZA, G.; BERINDAN-NEAGOE, I.; SANDULESCU, R. Electrochemical immunosensors in breast and ovarian cancer. **Clin Chim Acta**, v. 425, p. 128-38, 2013.

DMITRIEV, D. A.; MASSINO, Y. S.; SEGAL, O. L. Kinetic analysis of interactions between bispecific monoclonal antibodies and immobilized antigens using a resonant mirror biosensor. **J Immunol Methods**, v. 280, n. 1-2, p. 183-202, 2003.

ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Peptide methionine sulfoxide reductase A (MsrA): direct electrochemical oxidation on carbon electrodes. **Bioelectrochemistry**, v. 89, p. 11-8, 2013.

FADER, A. N.; JAVA, J.; KRIVAK, T. C.; BRISTOW, R. E.; TERGAS, A. I.; BOOKMAN, M. A.; ARMSTRONG, D. K.; TANNER, E. J.; GERSHENSON, D. M. The prognostic significance of pre- and post-treatment CA-125 in grade 1 serous ovarian carcinoma: a gynecologic Oncology Group study. **Gynecol Oncol**, v. 132, n. 3, p. 560-5, 2014.

FERRARO, S.; BRAGA, F.; LANZONI, M.; BORACCHI, P.; BIGANZOLI, E. M.; PANTEGHINI, M. Serum human epididymis protein 4 vs carbohydrate antigen 125 for ovarian cancer diagnosis: a systematic review. **J Clin Pathol**, v. 66, n. 4, p. 273-81, 2013.

FERREIRA, L. F.; SOUZA, L. M.; FRANCO, D. L.; CASTRO, A. C. H.; OLIVEIRA, A. A.; BOODTS, J. F. C.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Formation of novel polymeric films derived from 4-hydroxybenzoic acid. **Materials Chemistry and Physics**, v. 129, n. 1-2, p. 46-52, 2011.

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, n. 10, p. 2043-2050, 2008.

JOHARI-AHAR, M.; RASHIDI, M. R.; BARAR, J.; AGHAIE, M.; MOHAMMADNEJAD, D.; RAMAZANI, A.; KARAMI, P.; COUKOS, G.; OMIDI, Y. An ultra-sensitive impedimetric immunosensor for detection of the serum

oncomarker CA-125 in ovarian cancer patients. **Nanoscale**, v. 7, n. 8, p. 3768-79, 2015.

LAMBERTI, I.; SCARANO, S.; ESPOSITO, C. L.; ANTOCCIA, A.; ANTONINI, G.; TANZARELLA, C.; DE FRANCISCIS, V.; MINUNNI, M. In vitro selection of RNA aptamers against CA125 tumor marker in ovarian cancer and its study by optical biosensing. **Methods**, v. 97, p. 58-68, 2016.

LEE, A. W.; TEMPLEMAN, C.; STRAM, D. A.; BEESLEY, J.; TYRER, J.; BERCHUCK, A.; PHAROAH, P. P.; CHENEVIX-TRENCH, G.; PEARCE, C. L.; OVARIAN CANCER ASSOCIATION, C. Evidence of a genetic link between endometriosis and ovarian cancer. **Fertil Steril**, v. 105, n. 1, p. 35-43 e1-10, 2016.

LOWE, K. A.; ANDERSEN, M. R.; KANE, J. C.; ROBERTSON, M. D.; GOFF, B. A. Effects of Demographics and OTC Analgesics on Ovarian Cancer Symptoms. **J Nurse Pract**, v. 9, n. 1, p. 28-33, 2013.

OLIVEIRA, R. M. L.; VIEIRA, S. N.; ALVES, H. C.; FRANCA, 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, n. 2, p. 475-482, 2010.

PANDIARAJ, M.; SETHY, N. K.; BHARGAVA, K.; KAMESWARARAO, V.; KARUNAKARAN, C. Designing label-free electrochemical immunosensors for cytochrome c using nanocomposites functionalized screen printed electrodes. **Biosens Bioelectron**, v. 54, p. 115-21, 2014.

PARAISO, L. F.; DE PAULA, L. F.; FRANCO, D. L.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. Bioelectrochemical Detection of Alanine Aminotransferase for Molecular Diagnostic of the Liver Disease. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, n. 3, p. 1286-1297, 2014.

PEREZ-RAFOLS, C.; SERRANO, N.; DIAZ-CRUZ, J. M.; ARINO, C.; ESTEBAN, M. New approaches to antimony film screen-printed electrodes using carbon-based nanomaterials substrates. **Anal Chim Acta**, v. 916, p. 17-23, 2016.

POLLET, J.; DELPORT, F.; JANSSEN, K. P.; JANS, K.; MAES, G.; PFEIFFER, H.; WEVERS, M.; LAMMERTYN, J. Fiber optic SPR biosensing of DNA hybridization and DNA-protein interactions. **Biosens Bioelectron**, v. 25, n. 4, p. 864-9, 2009.

PRAESTEGAARD, C.; KJAER, S. K.; NIELSEN, T. S.; JENSEN, S. M.; WEBB, P. M.; NAGLE, C. M.; HOGDALL, E.; RISCH, H. A.; ROSSING, M. A.; DOHERTY, J. A.; WICKLUND, K. G.; GOODMAN, M. T.; MODUGNO, F.; MOYSICH, K.; NESS, R. B.; EDWARDS, R. P.; GOODE, E. L.; WINHAM, S. J.; FRIDLEY, B. L.; CRAMER, D. W.; TERRY, K. L.; SCHILDKRAUT, J. M.; BERCHUCK, A.; BANDERA, E. V.; PADDOCK, L.; KIEMENEY, L. A.; MASSUGER, L. F.; WENTZENSEN, N.; PHAROAH, P.; SONG, H.; WHITEMORE, A. S.; MCGUIRE, V.; SIEH, W.; ROTHSTEIN, J.; ANTON-CULVER, H.; ZIOGAS, A.; MENON, U.; GAYTHER, S. A.; RAMUS, S. J.; GENTRY-MAHARAJ, A.; WU, A. H.; PEARCE, C. L.; PIKE, M. C.; LEE, A. W.; CHANG-CLAUDE, J.; JENSEN, A.; OVARIAN CANCER ASSOCIATION, C. The association between socioeconomic status and tumour stage at diagnosis of ovarian cancer: A pooled analysis of 18 case-control studies. **Cancer Epidemiol**, v. 41, p. 71-9, 2016.

PUNDIR, C. S.; DEVI, R. Biosensing methods for xanthine determination: a review. **Enzyme Microb Technol**, v. 57, p. 55-62, 2014.

RAGHAV, R.; SRIVASTAVA, S. Core-shell gold-silver nanoparticles based impedimetric immunosensor for cancer antigen CA125. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 557-564, 2015.

RAVALLI, A.; DOS SANTOS, G. P.; FERRONI, M.; FAGLIA, G.; YAMANAKA, H.; MARRAZZA, G. New label free CA125 detection based on gold nanostructured



screen-printed electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 179, p. 194-200, 2013.

REN, X.; WANG, H.; WU, D.; FAN, D.; ZHANG, Y.; DU, B.; WEI, Q. Ultrasensitive immunoassay for CA125 detection using acid site compound as signal and enhancer. **Talanta**, v. 144, p. 535-41, 2015.

RITZEFELD, M.; SEWALD, N. Real-Time Analysis of Specific Protein-DNA Interactions with Surface Plasmon Resonance. **J Amino Acids**, v. 2012, p. 816032, 2012.

RODRIGUES, L. P.; FERREIRA, D. C.; FERREIRA, L. F.; CUADROS-ORELLANA, S.; DE OLIVEIRA, G. C.; BRITO-MADURRO, A. G.; DE OLIVEIRA, R. J.; ABRAHAO, O.; MADURRO, J. M. Electropolymerization of hydroxyphenylacetic acid isomers and the development of a bioelectrode for the diagnosis of bacterial meningitis. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 45, n. 12, p. 1277-1287, 2015.

ROMAGNOLO, C.; LEON, A. E.; FABRICIO, A. S.; TABORELLI, M.; POLESEL, J.; DEL PUP, L.; STEFFAN, A.; CERVO, S.; RAVAGGI, A.; ZANOTTI, L.; BANDIERA, E.; ODICINO, F. E.; SCATTOLO, N.; SQUARCINA, E.; PAPADAKIS, C.; MAGGINO, T.; GION, M. HE4, CA125 and risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) as diagnostic tools for ovarian cancer in patients with a pelvic mass: An Italian multicenter study. **Gynecol Oncol**, v. 141, n. 2, p. 303-11, 2016.

RUBIN, R. L.; KONSTANTINOV, K. N. Biosensor for total antinuclear antibody determination at the point-of-care. **Biosens Bioelectron**, v. 83, p. 306-11, 2016.

SHARMA, S.; RAGHAV, R.; O'KENNEDY, R.; SRIVASTAVA, S. Advances in ovarian cancer diagnosis: A journey from immunoassays to immunosensors. **Enzyme Microb Technol**, v. 89, p. 15-30, 2016.

SHARMA, S. K.; SURESH, M. R.; WUEST, F. R. Improved soluble expression of a single-chain antibody fragment in *E. coli* for targeting CA125 in epithelial ovarian cancer. **Protein Expr Purif**, v. 102, p. 27-37, 2014.

SILVA, F. B.; VIEIRA, S. N.; GOULART, L. R.; BOODTS, J. F. C.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Electrochemical investigation of oligonucleotide-DNA hybridization on poly(4-methoxyphenethylamine). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 7, p. 1173-1187, 2008.

SILVA, T. A. R.; FERREIRA, L. F.; SOUZA, L. M.; GOULART, L. R.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. New approach to immobilization and specific-sequence detection of nucleic acids based on poly(4-hydroxyphenylacetic acid). **Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems**, v. 29, n. 2, p. 539-545, 2009.

TSAI, J. Z.; CHEN, C. J.; SETTU, K.; LIN, Y. F.; CHEN, C. L.; LIU, J. T. Screen-printed carbon electrode-based electrochemical immunosensor for rapid detection of microalbuminuria. **Biosens Bioelectron**, v. 77, p. 1175-82, 2016.

WAN, Y.; SU, Y.; ZHU, X.; LIU, G.; FAN, C. Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. **Biosens Bioelectron**, v. 47, p. 1-11, 2013.

WANG, R.; MINUNNI, M.; TOMBELLI, S.; MASCINI, M. A new approach for the detection of DNA sequences in amplified nucleic acids by a surface plasmon resonance biosensor. **Biosens Bioelectron**, v. 20, n. 3, p. 598-605, 2004.

WU, L.; CHEN, J.; DU, D.; JU, H. Electrochemical immunoassay for CA125 based on cellulose acetate stabilized antigen/colloidal gold nanoparticles membrane. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 7, p. 1208-1214, 2006.

WU, N. Y.; GAO, W.; HE, X. L.; CHANG, Z.; XU, M. T. Direct electrochemical sensor for label-free DNA detection based on zero current potentiometry. **Biosens Bioelectron**, v. 39, n. 1, p. 210-214, 2013.

## ***CAPÍTULO 3:***

*METODOLOGIA DE CONSTRUÇÃO DE UM  
GENOSENSOR PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR  
DA HEPATITE B*

# METODOLOGIA DE CONSTRUÇÃO DE UM GENOSENSOR PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA HEPATITE B

## Campo da Invenção

O pedido de patente de invenção trata de uma metodologia de construção de um dispositivo eletroquímico para a detecção do vírus da hepatite B, utilizando de eletrodos de grafite sensibilizados com o poli (4-aminofenol), uma sequência específica de oligonucleotídeo para o vírus da hepatite B e as técnicas eletroquímicas para o diagnóstico da doença em plasma de portadores da hepatite B. A presente invenção apresenta vantagens inerentes à sua aplicabilidade em amostras reais, sensibilidade, seletividade, baixo custo, volume reduzido de amostra e análise em tempo real.

## Estado da Técnica

A hepatite B é uma das infecções virais mais comuns, altamente infecciosa, silenciosa e de difícil tratamento. É provocada por um vírus pertencente a família *hepadnavírus* (cujo material genético é um genoma circular de DNA de fita dupla), o vírus da hepatite B (HBV), que causa irritação e inflamação do fígado. É uma das principais causas de doença hepática crônica, cirrose e câncer primário do fígado. Já existem, em todo o mundo, 2 bilhões de pessoas infectadas pelo vírus HBV. Sendo que a forma crônica da doença afeta mais de 400 milhões mundialmente. No Brasil, 15% da população já foi contaminada em 2016.

O vírus HBV é muito resistente e está presente no sangue, no leite materno, na saliva, no sêmen e na secreção vaginal de pessoas infectadas, por isso é considerada uma doença sexualmente transmissível. Os sintomas, que podem levar vários meses até surgirem, incluem pele ou olhos amarelados (icterícia), cansaço ou fadiga, perda de apetite ou náusea, urina escurecida, fezes claras, febre e dor nas articulações. Os sintomas podem ir melhorando aos poucos, essa fase inicial com sintomas e com alteração dos exames de sangue é chamada de Hepatite Aguda. Nessa fase o sistema imunológico consegue combater o vírus e a recuperação acontece em poucos meses.

Porém, em cerca de 5 a 10% dos casos, o corpo não consegue combater o vírus, permanecendo com infecção ativa por mais de 6 meses, o que caracteriza a forma crônica da doença, podendo evoluir para problemas mais graves no fígado, como por exemplo a cirrose e o câncer do fígado.

Como se trata de uma doença grave e silenciosa, muitas pessoas não apresentam os sintomas na fase aguda, porém o fígado sofre uma destruição progressiva. Quando o diagnóstico é feito de forma tardia, muitas vezes o paciente já apresenta um quadro clínico grave e o tratamento fica muito mais difícil.

Atualmente, os métodos tradicionais no diagnóstico de hepatite B na fase inicial e na evolução da doença são realizados por meio de testes sorológicos tais como o ensaio imunoenzimático (ELISA) (Patente: WO2003099796-A; WO2003099796-A1), o western blot (Patente: WO2004046365-A2; AU2003297285-A1; US2004219131-A1), os métodos imunofluorescentes e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Patente: WO2004113370-A1, CN1510421-A, CN1588066).

Compreender o significado dos exames sorológicos pode provocar confusão entre pacientes e os profissionais da saúde. É importante salientar que estes ensaios requerem o uso de reagentes em quantidade elevada, mão de obra qualificada, equipamentos dispendiosos e manutenção de alto custo, itens que inviabilizam a aplicação destes em campo ou domicílio, além de serem testes desconfortáveis para os pacientes.

Sabe-se que 95% dos pacientes com hepatite B aguda que tiveram o diagnóstico precoce apresentaram uma boa recuperação. Por outro lado, na fase crônica, a doença necessita ser monitorada constantemente como forma de prevenção no desenvolvimento de doenças mais graves e evitando a morte do paciente.

Portanto, é essencial o desenvolvimento de métodos rápidos, de fácil compreensão, acessíveis, sensíveis, seletivos e de baixo custo para a detecção precoce e o monitoramento da doença em tempo real, destacando que a detecção do vírus HBV no plasma pode auxiliar o profissional da saúde no sucesso do tratamento.

Métodos com características de baixo custo, sensíveis, seletivos, estáveis e menos invasivos já existem, tais como o monitoramento de glicose

(U.S.:5.708.247, 5.951.836, 6.241.862, e 6.284.125); o monitoramento de oligonucleotídeos sintéticos específicos para a Hepatite B (BR1020120055562) e o diagnóstico da meningite meningocócica usando oligonucleotídeos sintéticos (BR102013031310). Estes modelos abriram espaço para o desenvolvimento de outras novas tecnologias aplicáveis no campo de diagnóstico. Contudo, a maioria destes métodos, como a patente BR1020120055562, não são aplicáveis em amostras reais.

Diante do exposto, estudos convergem para o desenvolvimento de um genossensor para o diagnóstico do vírus da hepatite B em amostras reais, sem a necessidade de purificação prévia da amostra, que venha contemplar e melhorar linhas de diagnósticos já existentes em áreas de interesse, que é objeto de reivindicação deste pedido de patente de invenção.

### **Descrição e detalhamento dos componentes da invenção**

Os testes realizados para o diagnóstico da hepatite B, são invasivos, caros e demorados. Levando em consideração a dificuldade do diagnóstico, faz-se necessário o desenvolvimento de tecnologias que consigam suprir essas necessidades. Como a quantidade de vírus no sangue é elevada, principalmente nos primeiros estágios da doença, a replicação viral acontece em taxas exacerbadas. Por isso é possível um diagnóstico precoce usando oligonucleotídeos específicos para uma região do DNA genômico do vírus no sangue.

Deste modo, genossensores eletroquímicos são dispositivos que apresentam as características mais adequadas para utilização no diagnóstico, uma vez que apresenta baixo custo de produção, rapidez de resposta, seletividade, alta sensibilidade para a detecção de doenças e a possibilidade do diagnóstico em amostras reais. Outra vantagem é o processo de miniaturização do sistema, o que resulta na utilização de pequenas quantidades de amostra sanguíneas, eliminando os desconfortos oriundos dos exames.

A presente invenção descreve a construção de um genossensor baseado na interação de um oligonucleotídeo sintético com o DNA genômico do VHB purificado e com amostras de plasma de pacientes com hepatite B.

Para esta finalidade, utilizamos uma metodologia que emprega eletrodos de grafite como material condutor, o filme polimérico poli (4-aminofenol) (poli(4AMF)), usado como sensibilizador da superfície, oligonucleotídeo sintético de sequência específica e complementar para o DNA genômico do vírus a ser utilizado como sonda (HEP1), DNA genômico viral, amostras de plasma de pacientes infectados e saudáveis como alvos, e o brometo de etídio como mediador eletroquímico.

Para que este sensor biológico atinja seu propósito, os eletrodos condutores utilizados na construção da plataforma devem preferencialmente apresentar condutividade e inércia eletroquímica na faixa entre 0,0 e +1,0 V, podendo ser de diversos materiais, como grafite, ouro, platina e carbono vítreo.

O eletrodo de grafite polido mostrou-se o material preferido na condução da presente invenção por apresentar baixo custo, inércia química e relativa rugosidade, adequado à incorporação de substratos em sua superfície. Estes podem ser modificados com materiais nanotecnológicos como filmes poliméricos, nanotubos de carbono, pontos quânticos e nanopartículas metálicas (ouro, platina, paládio e outros), com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução, e com isso alterar sua reatividade, aumentando a condutividade, seletividade e a incorporação de biomoléculas, melhorando os sinais eletroquímicos.

Polímeros contendo elétrons  $\pi$  conjugados apresentam propriedades eletrônicas não usuais: 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.

A preparação de polímeros por meio de métodos eletroquímicos é uma metodologia simples e apresenta grande reprodutibilidade, podendo ser realizada à temperatura ambiente. A técnica mais comum para se obter polímeros condutores é a polimerização eletroquímica por voltametria cíclica. 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.



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 como por exemplo a tiramina e os aminofenóis. Os polímeros condutores provenientes dos monômeros de aminofenóis, como o poli (4-aminofenol) ((poli(4-AMF))), exibem possibilidade de interação nos grupos  $-OH$  e  $-NH_2$ , e por essa razão são preferidos no escopo desta aplicação.

A biomolécula usada como sonda na construção do genossensor foi um oligonucleotídeo específico para a detecção do DNA viral (HEP1) imobilizado por adsorção, o qual possui a sequência: 5'-GAGGAGTTGGGGGAGCACATT-3'. Nos estudos de otimização foram utilizados um alvo complementar de sequência 5'-AATGTGCTCCCCCAACTCCTC-3'. Para a detecção, foram utilizadas amostras de DNA genômico viral e de plasma sanguíneo, fornecidos pelo Instituto Adolfo Lutz (Comitê de ética: 1.131.34). As amostras de DNA foram diluídas em tampão SSC (cloreto de sódio  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ , citrato de sódio  $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ ; pH: 7,3).

A seletividade e a sensibilidade do genossensor foram avaliadas monitorando o processo oxidativo do brometo de etídio por meio de técnicas eletroquímicas. Para fins de diagnóstico em amostras reais, amostras de plasma de 6 pacientes portadores da hepatite B e 1 paciente negativo para a doença foram utilizados. A solução de tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  ( $Na_2HPO_4$   $0,061 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $NaH_2PO_4$   $0,039 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 7,3 foi utilizada nas detecções eletroquímicas.

O DNA genômico foi extraído automaticamente pelo extrator m2000sp da ABBOTT. As concentrações das amostras foram determinadas considerando a carga viral pelo kit PROMEGA Corporation KIT ABBOTT mSample Preparation System DNA e pelo equipamento biodrop após diluições, apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Valores da concentração do DNA genômico usadas no trabalho:

DNA genômico	Carga viral (UI mL <sup>-1</sup> )	Concentração (µg mL <sup>-1</sup> )
A1	436	1,176
A2	14.697	2,175
A3	24.480	3,275
A4	38.000	3,950
A5	81.550.231	4,210
A6	1.000.000.000	4,825

Em complementação, análises da topografia das superfícies foram avaliadas usando a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

### Descrição das Figuras

Para compreender as características da presente invenção, acompanha esta, em anexo, um conjunto gráfico, onde de maneira exemplificada, se representou uma forma de produção do genossensor para diagnóstico em amostra real da hepatite B.

A FIGURA 1 apresenta um voltamograma de pulso diferencial do estudo de tempo de imobilização do oligonucleotídeo sobre a superfície funcionalizada com o poli(4AMF), cuja eletrodeposição foi realizada por voltametria cíclica com janela de potencial de 0,00 a +1,00 V e em solução de monômero de 4-aminofenol com concentração  $2,5 \cdot 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> (eletrólito suporte: HClO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>, pH 0,4; velocidade de varredura 50 mV s<sup>-1</sup>), monitorando a amplitude de sinal referente ao pico de oxidação da guanina. O eletrólito utilizado foi o tampão fosfato, pH 7,3, modulação de amplitude de 0,05 mV, intervalo de pulso 0,2 s e velocidade de varredura 20 mV s<sup>-1</sup>.

De acordo com a literatura (ALVES V. A. e BRETT C. M. A. "Characterisation of passive films formed on mild steels in bicarbonate solution by EIS". *Electrochim. Acta.* 47(13-14): 2081-2091, 2002; CASTRO A. C. H. e colaboradores "Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the hepatitis B virus". *Applied Surface Science.* 314 (273-279, 2014) o pico próximo de +0,92 mV é atribuído a oxidação dos resíduos de

guanina presentes no oligonucleotídeo, onde a intensidade do pico de oxidação é proporcional a quantidade de guaninas imobilizadas.

A imobilização do fragmento de DNA (HEP1) foi avaliada nos tempos de 5, 10, 20 e 30 minutos, onde observamos que a amplitude do sinal aumentava com o tempo de exposição da solução do oligonucleotídeo, sendo que o maior valor foi atingido com 30 minutos.

A FIGURA 2 representa um gráfico de barras construído a partir do estudo do tempo de hibridização, monitorando a corrente ( $\mu\text{A}$ ) obtida no processo de oxidação do intercalador de DNA, o brometo de etídio (BE), por voltametria de pulso diferencial. O eletrólito utilizado foi o tampão fosfato, pH 7,3; modulação de amplitude de 0,05 mV, intervalo de pulso 0,2 s e velocidade de varredura 20 mV s<sup>-1</sup>. Para tal estudo, o bioeletrodo contendo a sonda foi colocado em contato com um oligonucleotídeo complementar e deixado por 5, 10, 20 e 30 minutos e mantidos em um forno com temperatura controlada (55 °C) para promover a hibridização. Depois gotejou-se 15  $\mu\text{L}$  de BE (1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e deixados por 5 min a temperatura ambiente, lavados e levados à detecção.

O BE foi eficiente em demonstrar o processo de hibridização, uma vez que ele pode intercalar na molécula de DNA e por apresentar um pico de oxidação em torno de +0,70 V (QI H., LI X., CHEN P., ZANG C. Electrochemical detection of DNA hybridization based on polypyrrole/ss-DNA/multi-wall carbon nanotubes paste electrode. *Talanta*. 72:1030-1035, 2007). Além do BE existem outros mediadores eletroquímicos que contemplam as características necessárias para a construção do genossensor como o azul de metileno, Hoechst 33258, rodamina B, tetrametilbenzidina.

O valor da intensidade do pico de oxidação do BE é proporcional ao acúmulo na superfície relacionado ao processo de hibridização. Esta resposta ocorre pela intercalação de BE à dupla fita de DNA, que é considerado como resultado de uma interação hidrofóbica, onde uma molécula aromática hidrofóbica é atraída para um ambiente hidrofóbico de pares de bases nitrogenadas do DNA, a partir do ambiente hidrofílico aquoso (WARING M. J. Stabilization of two-stranded ribohomopolymer helix and destabilization of a three-stranded helix by ethidium bromide. *J. Mol. Biol.* 1143:483-486, 1974).

No teste com o BE, o eletrodo contendo somente a sonda apresentou sinal carga elétrica menor, em torno de 8  $\mu\text{A}$ . Ao observarmos a intensidade de

oxidação do BE após o processo de hidrização, podemos afirmar que houve um acúmulo proporcional a quantidade de material hibridizado, aumentando o sinal de carga elétrica, e que 30 minutos é suficiente para determinar o máximo de interação.

Uma vez determinados o tempo de imobilização e o tempo de hibridização e visando nos aproximar de teste em amostras reais, avaliamos a detecção do material genético obtido a partir do vírus. Os DNAs genômicos usados, controles positivo e negativo para o vírus da hepatite B, foram extraídos e purificados no Instituto Adolfo Lutz.

A FIGURA 3 mostra o estudo de especificidade do sistema, onde o sensor foi testado na presença e na ausência do DNA genômico do vírus da hepatite B. Os valores de potencial de oxidação do BE são: (a) bioeletrodo +0,69 V; (b) Controle negativo: +0,71 V; (c) Controle positivo: +0,76 V. O eletrólito utilizado foi o tampão fosfato, pH 7,3; amplitude de modulação de 0,05 mV, intervalo de pulso 0,2 s e velocidade de varredura 20 mV s<sup>-1</sup>. O bioeletrodo poli(4-AMF)/HEP1 discrimina o controle negativo do controle positivo, indicando seletividade para o sistema.

Observando os gráficos, pode-se notar que no controle negativo houve um pequeno deslocamento e um aumento sutil na intensidade do pico de oxidação do BE, e isso ocorre devido ao fato do controle negativo (b) conter outros DNAs genômicos que podem interagir de forma não específica com a superfície, conseguindo manter uma pequena quantidade de BE na superfície e aumentando a resistência, porém esse acúmulo não prejudica a leitura do sinal.

Já na presença do controle positivo (c) observa-se um pico intenso de oxidação do BE, indicando que a sonda genética foi eficiente em reconhecer e manter o DNA genômico sobre a superfície do eletrodo, acumulando o BE. Além disso, podemos observar que a presença do DNA genômico provocou um aumento na resistência da superfície, deslocando o pico de oxidação para potenciais mais anódicos indicando uma alta seletividade. Esse deslocamento de potencial é normal devido ao aumento da resistência sobre a superfície dos eletrodos ocasionada pelo acúmulo de material genético.

A FIGURA 4A apresenta os voltamogramas de pulso diferencial da detecção do DNA genômico do vírus da hepatite B, monitorando o pico de oxidação do brometo de etídeo e a FIGURA 4B mostra um curva de calibração

obtida a partir dos voltamogramas utilizando os valores de carga correspondente ao processo de oxidação. As FIGURAS 4A e 4B foram usadas para avaliar a sensibilidade do genossensor, aplicando diferentes concentrações do DNA genômico alvo, mostradas na Tabela 1, e monitorando o pico de oxidação do brometo de etídio por meio de voltametria de pulso diferencial. O experimento foi realizado em triplicata. O limite de detecção foi de  $130 \text{ ng mL}^{-1}$  (coeficiente de correlação  $r = 0,998$ ) e o limite de quantificação é de  $432 \text{ ng mL}^{-1}$ , obedecendo uma faixa linear de 1,20 a  $4,82 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Outro fato importante de se observar é o aumento da resistência provocada pelo acúmulo de material na superfície sendo caracterizado pelo deslocamento do pico de oxidação do BE, observado no voltamogramas.

Para comprovar a imobilização da sonda sobre a superfície do eletrodo de grafite funcionalizado e detecção do alvo complementar sobre esta superfície, a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foi utilizada. Ela fornece informações importantes sobre a impedância de processos superficiais, incluindo a detecção do processo de hibridização, sendo bastante eficiente ao se avaliar a taxa de transferência eletrônica nos eletrodos, na presença de espécies redox em solução.

Uma das possíveis representações dos dados é feita através do diagrama de Nyquist, em que a presença de semicírculos indica componentes resistivos nos sistemas. Esta técnica permite analisar diferenças entre o reconhecimento do alvo específico (plasma de paciente portador da hepatite B) e não específico (plasma de não portador da hepatite B), sem a necessidade de se adicionar um agente de identificação indireto.

Os diagramas de Nyquist da sonda e da interação HEP1 como DNA genômico são mostrados na FIGURA 5A juntamente com o gráfico de barras comparando os valores de resistência a transferência de carga de 6 pacientes na FIGURA 5B, onde os resultados comprovam a eficiência do bioeletrodo em identificar e quantificar quantidades diferentes do material genético sobre a superfície.

O sistema eletroquímico respondeu bem às variações da concentração DNA provenientes dos pacientes em amostras purificadas, monitorando o pico do BE por voltametria de pulso diferencial e também na espectroscopia de impedância eletroquímica.

Sendo assim testes com amostras reais foram realizados utilizando 5 pacientes, e mostrados sob a forma de um gráfico de barras, comparando os testes na presença e na ausência do plasma, FIGURA 6. No plasma humano existem vários componentes que podem interferir na leitura do sinal, e a análise em amostras reais é de extrema importância para verificar a veracidade do diagnóstico realizado pelo dispositivo apresentado.

Apartir desse gráfico (FIGURA 6) podemos verificar que o sistema consegue distinguir a quantidade de DNA genômico, na ausência e na presença do plasma sanguíneo, sendo que a resposta do biossensor não é afetada significativamente na presença do plasma, mostrando-se um dispositivo promissor para o diagnóstico de Hepatite B. O experimento foi realizado em triplicata.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica que permite a caracterização microestrutural de diferentes tipos de materiais, a partir de emissão e interação de feixes de elétrons sobre uma amostra, sendo possível caracterizá-los do ponto de vista de sua morfologia e sua organização estrutural. A FIGURA 7 apresenta um conjunto de imagens de MEV, indicando as etapas de modificações realizadas na superfície do eletrodo de grafite: A: Eletrodo de grafite; B: Após a modificação com filme polimérico poli(4-AMF); C: Com a sonda HEP1 imobilizado sobre o grafite modificado com o poli(4-AMF); D: Contendo o DNA genômico; E: Plasma negativo; F: Plasma positivo.

Podemos observar que em cada etapa no processo de construção do genossensor, a morfologia e a organização estrutural assumiram características diferentes indicando que o filme polimérico modificou a superfície do eletrodo de grafite (B) e foi eficiente em imobilizar o HEP1 (C). O HEP1 reconheceu o alvo complementar (D), mantendo o material genético na superfície e foi determinante em diferenciar o plasma negativo (E) do plasma positivo (F).

## **Exemplos de construção do genossensor**

### **Exemplo 1**

#### Preparo do sensor biológico

A polimerização eletroquímica e as medidas voltamétricas foram realizadas em células de um e três compartimentos, acopladas a um potenciostato CHInstruments 760 C. Um disco de grafite de 6 mm de diâmetro foi obtido a partir de um tubo de grafite de alta pureza (99,9995%) utilizado como eletrodo de trabalho. O eletrodo de trabalho foi polido mecanicamente em suspensão de alumina (Bueker, 0,3 micrômetros) para homogeneizar a superfície. Utilizou-se uma placa de platina de 1 cm<sup>2</sup> como contra eletrodo e como eletrodo de referência prata-cloreto de prata (Ag/AgCl (KCl 3 mol L<sup>-1</sup>)).

Os eletrodos foram imersos em uma célula eletroquímica contendo solução de monômero 4-aminofenol (2,5 m mol L<sup>-1</sup>) em ácido perclórico (0,5 mol L<sup>-1</sup>), efetuou-se a deaeração com nitrogênio ultra puro, e a polimerização foi conduzida por voltametria cíclica, sob 50 varreduras, na faixa de potencial de +0,00 à +1,00V, com velocidade de 50 mV s<sup>-1</sup>. O material resultante foi limpo eletroquimicamente com 6 varreduras realizadas no mesmo critério, efetuadas em solução de ácido perclórico 0,5 mol L<sup>-1</sup>.

Sobre a superfície modificada foram gotejados 18 µL de uma solução da sonda (63 µmol L<sup>-1</sup>) em tampão SSC. O solvente foi evaporado à temperatura ambiente (5, 10, 20 e 30 min), lavado em tampão fosfato e levado para a detecção para o estudo de otimização.

Definiu-se que o tempo necessário para a melhor incorporação da sonda sobre o bioeletrodo seria de 30 min. Assim sobre a superfície modificada foram gotejados 18 µL de sonda e deixados por 30 min a temperatura ambiente para evaporar o solvente. Após foi lavado com tampão fosfato e imerso em solução bloqueadora de BSA (albumina de soro bovino, 0,5%) por 1 h à 37 °C, e novamente lavado em tampão fosfato.

A partir do sensor biológico pronto, gotejou-se 18 µL do alvo complementar (189 µmol L<sup>-1</sup>) por 5, 10, 20 e 30 minutos à 55 °C para promover a hibridização. Após este período os eletrodos foram lavados em tampão fosfato, sob agitação, para retirar o material remanescente, secos e reservados.

A detecção do alvo complementar pode ser realizada de forma direta pelo monitoramento dos picos de oxidação das bases nitrogenadas ou indireta por meio do uso de um mediador, que amplifica o sinal de resposta. Neste caso

pode-se opcionalmente adicionar uma alíquota de 18  $\mu\text{L}$  de uma solução de brometo de etídeo ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) durante 5 minutos à temperatura ambiente, seguido de lavagem em tampão fosfato.

A leitura do sinal foi realizada por um potenciostato, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial. Como eletrólito empregou-se tampão fosfato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,3), eletrodo platina como contra eletrodo, eletrodo de prata-cloreto de prata como referência. A leitura foi realizada sob modulação da amplitude de 0,05 mV, intervalo de pulso 0,2 s, velocidade de varredura 20  $\text{mV.s}^{-1}$ . Para a detecção direta utilizou-se a faixa de potencial de +0,3 a +1,0 V, e +0,3 a +0,9 V, para a detecção indireta.

## Exemplo 2

### Detecção do DNA genômico da hepatite B

Os DNAs genômicos extraídos de pacientes portadores ou não da hepatite B, foram submetidos a uma etapa de desnaturação antes do processo de hibridização. Duas soluções foram preparadas e submetidas a uma temperatura de 98 °C por 3 minutos. Para evitar a renaturação e permitir que as fitas complementares e não complementares tivessem acesso a sonda, os eletrodos modificados com poli(4-AMF) contendo a sonda imobilizada (poli(4-AMF):HEP1), foram submetidos a uma temperatura de 98 °C por 3 minutos e imediatamente foi gotejado 18  $\mu\text{L}$  das soluções do DNA genômico sobre os eletrodos modificados com poli(4-AMF):HEP1. A seguir foram levados a estufa durante 20 minutos a 55 °C para promover a hibridização, após foram lavados com tampão fosfato, secos e reservados.

A detecção do DNA genômico foi realizada de forma indireta por meio do uso do mediador BE, que amplifica o sinal de resposta. Para isso, adicionou-se 18  $\mu\text{L}$  de uma solução de brometo de etídeo ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) sobre os eletrodos durante 5 minutos à temperatura ambiente, seguido de lavagem com a solução de tampão fosfato.

A leitura do sinal foi realizada por um potenciostato, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial. Como eletrólito empregou-se tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4, eletrodo de platina como contra eletrodo, eletrodo de prata-cloreto de prata como referência. A leitura foi realizada sob amplitude



de modulação de 0,05 mV, intervalo de pulso 0,2 s, velocidade de varredura 20 mV s<sup>-1</sup>. Para a detecção indireta utilizou-se a faixa de potencial de +0,3 a +0,9 V.

### Exemplo 3

#### Curva de calibração

A curva de calibração foi construída a partir da análise dos voltamogramas de oxidação do brometo de etídio, onde o genossensor manteve-se com a concentração da sonda específica/HEP1 (63 µmol L<sup>-1</sup> em tampão SSC) variando-se as concentrações do alvo complementar/DNA genômico (1,176 µg ml<sup>-1</sup>, 2,175 µg ml<sup>-1</sup>, 3,275 µg ml<sup>-1</sup>, 3,950 µg ml<sup>-1</sup>, 4,210 µg ml<sup>-1</sup>, 4,825 µg ml<sup>-1</sup>).

A leitura da amplitude do sinal de corrente foi realizada por um potenciostato, utilizando-se a técnica de voltametria de pulso diferencial. Como eletrólito empregou-se solução de tampão fosfato (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4), eletrodo de platina como contra eletrodo, eletrodo de prata-cloreto de prata como referência. Os parâmetros utilizados para a leitura foram: amplitude de modulação de 0,05 mV, intervalo de pulso 0,2 s, velocidade de varredura 20 mV s<sup>-1</sup>. Para a detecção indireta utilizou-se a faixa de potencial de +0,3 a +0,9 V.

### Exemplo 4

#### Confirmação da interação do bioeletrodo:DNA genômico por espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica do bioeletrodo com o DNA genômico foi realizada em um potenciostato Autolab PGSTAT 302N, usando o software NOVA 1.10. Os espectros de impedância eletroquímica foram obtidos em experimentos realizados em célula de 3 compartimentos utilizando solução de ferrocianeto de potássio K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 5,0 mmol.L<sup>-1</sup>, ferricianeto de potássio K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 5,0 mmol.L<sup>-1</sup> contendo cloreto de potássio KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Os eletrodos foram preparados de acordo com o exemplo 1, com exceção da etapa de adição do BE. A região de frequência avaliada foi de

100 KHz a 10 mHz, o valor de amplitude foi de 10 mV e o potencial aplicado de +0,23 V. As soluções foram daeradas por 45 minutos e as análises foram realizadas no potencial de circuito aberto.

#### Exemplo 5

##### Validação do genosensor com amostras reais

O estudo do plasma humano foi realizado, visto que estas amostras possuem outros componentes, além da biomolécula de interesse, e é muito importante validar o genossensor com amostras reais. Para tal as amostras de soro foram diluídas, mantendo as mesmas concentrações do DNA genômico, em tampão SSC. Foram usadas amostras reais de pacientes saudáveis e doentes. Todas as amostras passaram por um tratamento térmico para promover a abertura da dupla fita de DNA e seguimos os mesmas etapas do DNA genômico e avaliamos os picos de oxidação do BE ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

A leitura da amplitude do sinal de corrente foi realizada por um potenciostato, utilizando-se a técnica de voltametria de pulso diferencial. Como eletrólito empregou-se solução de tampão fosfato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4), eletrodo de platina como contra eletrodo, eletrodo de prata-cloreto de prata como referência. Os parâmetros utilizados para a leitura foram: amplitude de modulação de 0,05 mV, intervalo de pulso 0,2 s, velocidade de varredura  $20 \text{ mV s}^{-1}$ . Para a detecção indireta utilizou-se a faixa de potencial de +0,3 a +0,9 V.

#### Exemplo 6

##### Estudo de microscopia eletrônica de varredura

Imagens do MEV foram utilizadas para análise da superfície do eletrodo de grafite limpo (Grafite); funcionalizado com o filme polimérico poli(4AMF) (Filme); com a sonda HEP1 imobilizada sobre o eletrodo de grafite funcionalizado com poli(4-AMF) (HEP1); contendo grafite:poli(4-AMF): HEP1: DNA genômico complementar (DNA genômico); contendo grafite:poli(4-AMF): HEP1: plasma humano negativo para hepatite B (Plasma negativo), contendo

grafite:poli(4-AMF): HEP1: plasma humano positivo para hepatite B (Plasma positivo).

Micrograpias eletrônicas de varredura foram obtidas no Laboratório de multiusuários Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia. Para tal as amostras foram previamente inseridas em fita de carbono dupla face (1-10 nm de espessura) e avaliadas pelo microscópio, com ampliação de 17000X, sob uma tensão de aceleração de 2300kV, e escala de 2 µm.

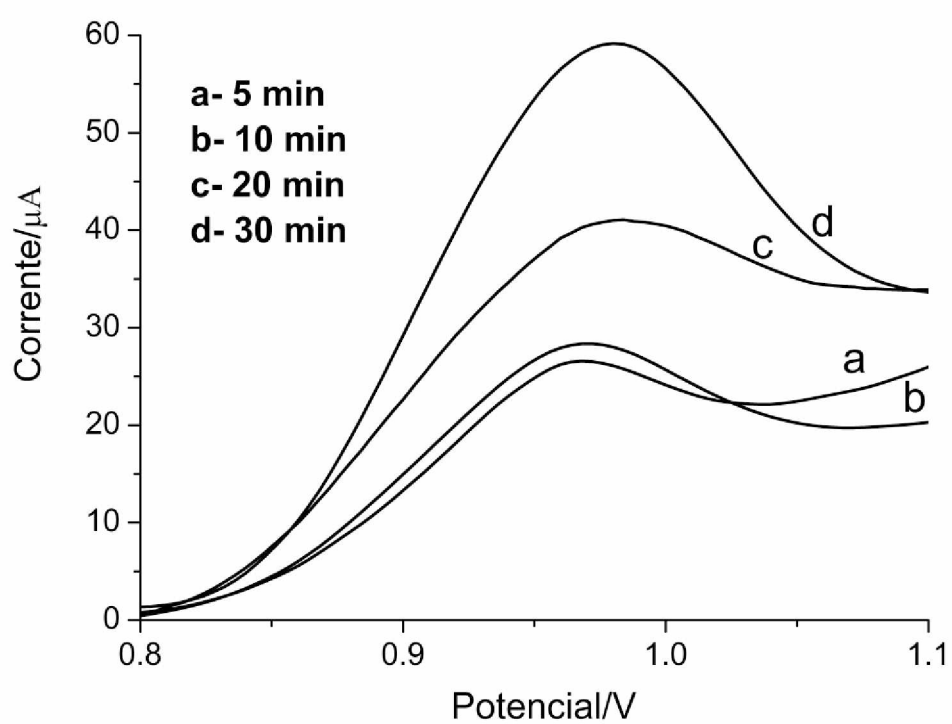
O objetivo do pedido de patente é apresentar a metodologia para a construção de um dispositivo eletroquímico usando eletrodos de grafite modificados com poli(4-AMF) e o oligonucleotídeo específico para o vírus da hepatite B, capaz de identificar o alvo genômico complementar em amostras reais de plasma humano. Esse genosensor apresenta como vantagens, baixo custo, sensibilidade, detecção em tempo real e características propícias para experimentos em amostras reais. Além de que todo sistema foi construído sobre uma plataforma capaz de ser miniaturizada utilizando tintas de grafite serigrafadas sobre uma placa de cerâmica.

## REIVINDICAÇÕES

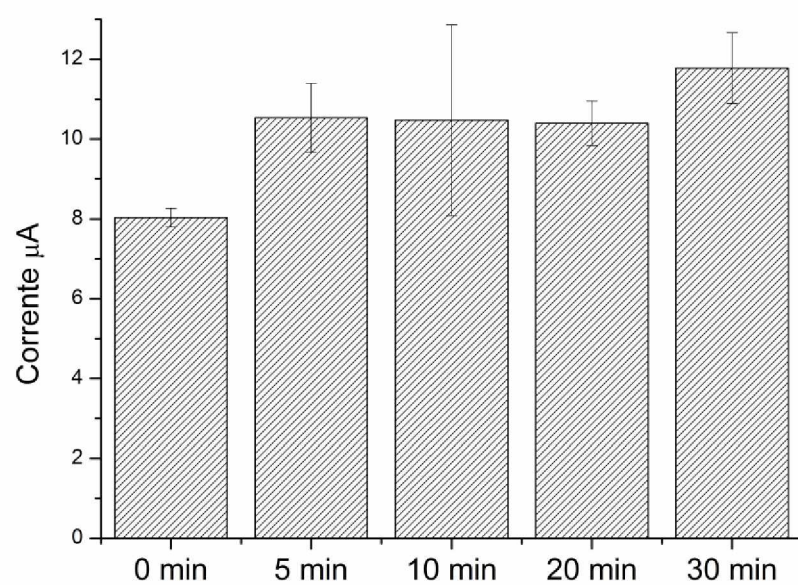
- 1) Método de construção da “**METODOLOGIA DE CONSTRUÇÃO DE UM GENOSENSOR PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA HEPATITE B**” utilizando eletrodos de grafite modificados com filme polimérico semi-condutor [poli(4-aminofenol)] produzido eletroquimicamente por eletropolimerização, é caracterizado por compreender as seguintes etapas:
  - a) Imobilização de oligonucleotídeo específico para a hepatite B com 21 pares de bases, o HEP1, por adsorção física.
  - b) Bloqueio da superfície não ocupada pelo material genético.
  - c) Detecção eletroquímica usando o brometo de etídio como mediador eletroquímico que pode ser usado na análise de DNA genômico ou em amostras de plasma de pacientes portadores de

hepatite B pela técnica de voltametria de pulso diferencial, atuando em em amostras reais.

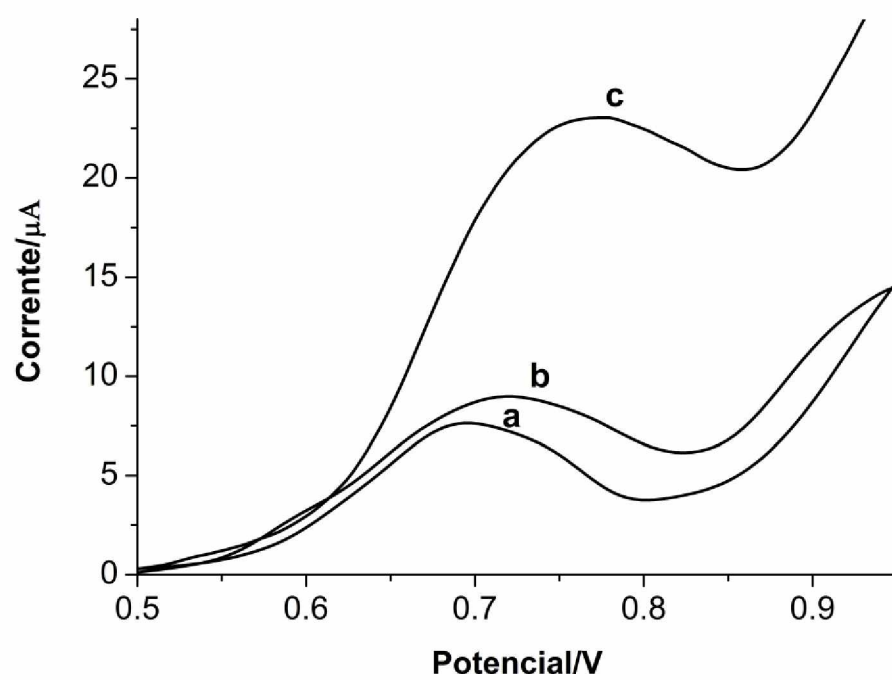
- 2) Método de construção da “**METODOLOGIA DE CONSTRUÇÃO DE UM GENOSENSOR PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA HEPATITE B**” de acordo com a reivindicação 1 é caracterizado por utilizar matrizes condutoras de eletrodos de grafite modificadas com poli(4-aminofenol) para a incorporação de alvos biológicos. O material polimérico poderá ser substituído pela tiramina.
- 3) Método de construção da “**METODOLOGIA DE CONSTRUÇÃO DE UM GENOSENSOR PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA HEPATITE B**” de acordo com a reivindicação 1 é caracterizado por utilizar o brometo de etídeo, podendo ser substituído por azul de metileno, Hoechst 33258, rodamina B e tetrametilbenzidina.
- 4) Método de construção da “**METODOLOGIA DE CONSTRUÇÃO DE UM GENOSENSOR PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA HEPATITE B**” de acordo com a reivindicação 1, o diagnóstico em tempo real foi realizado em plasma, mas poderá ser realizados em outros fluidos biológicos como o soro, sangue e saliva.



**FIGURA 1**



**FIGURA 2**



**FIGURA 3**

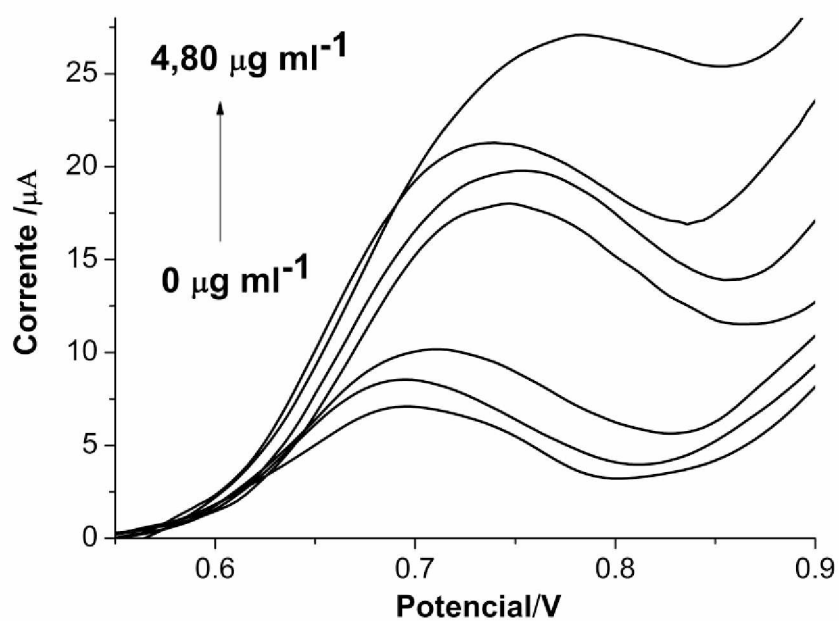


FIGURA 4A

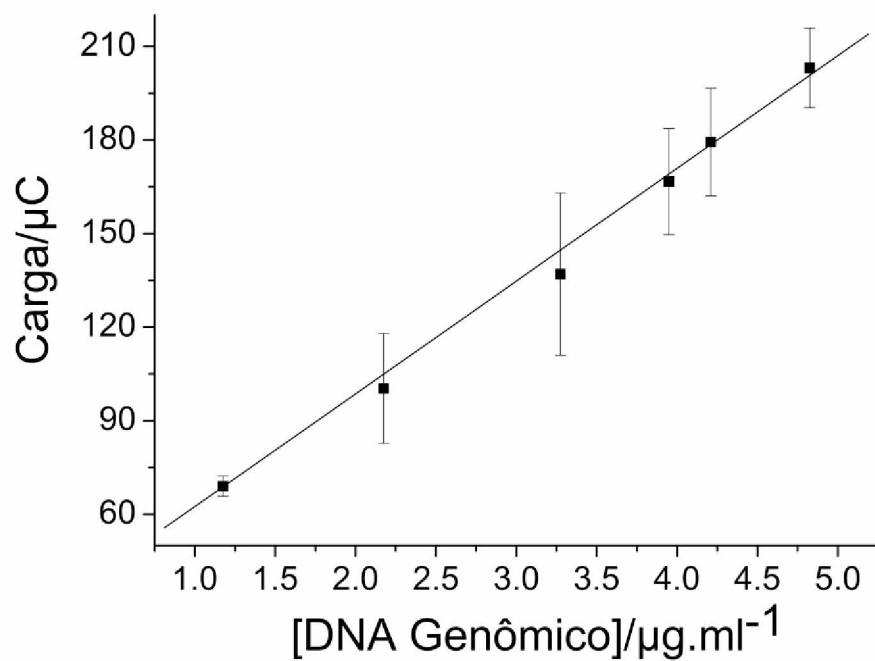


FIGURA 4B



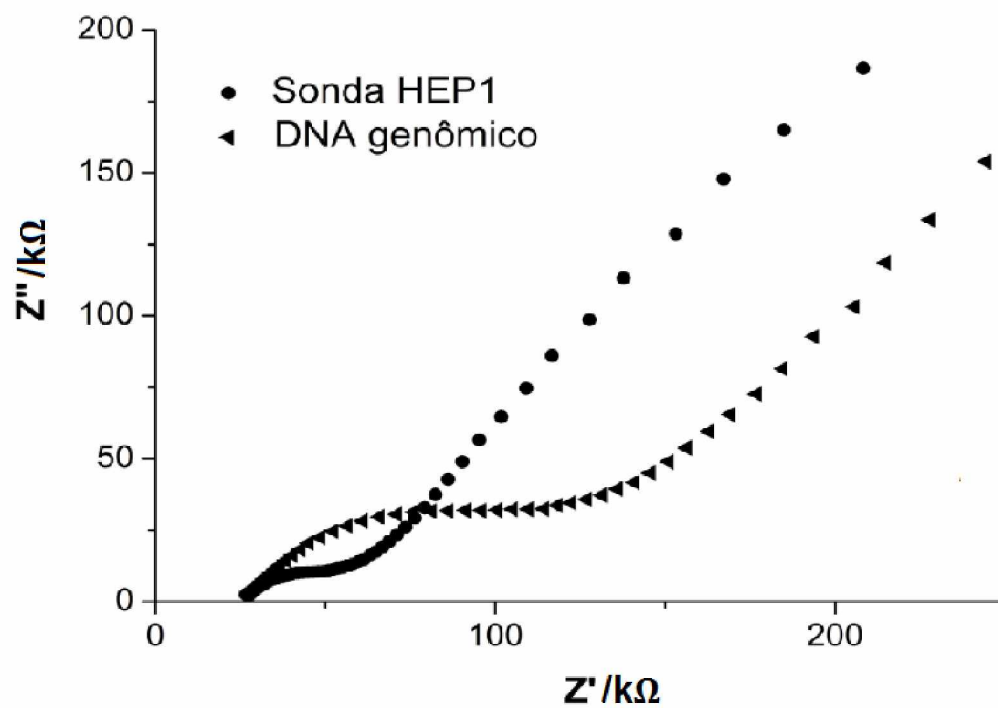


FIGURA 5A

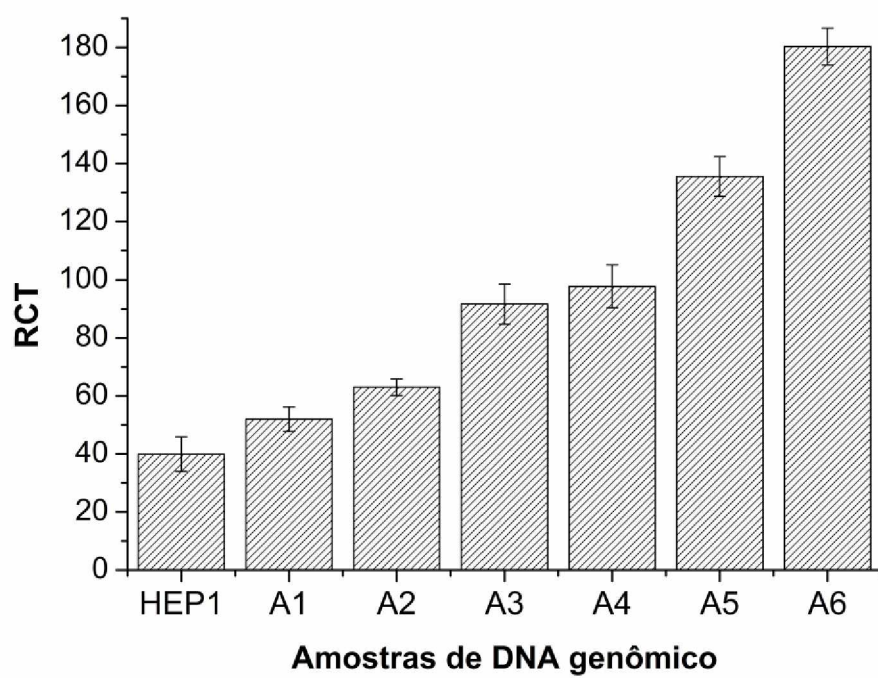
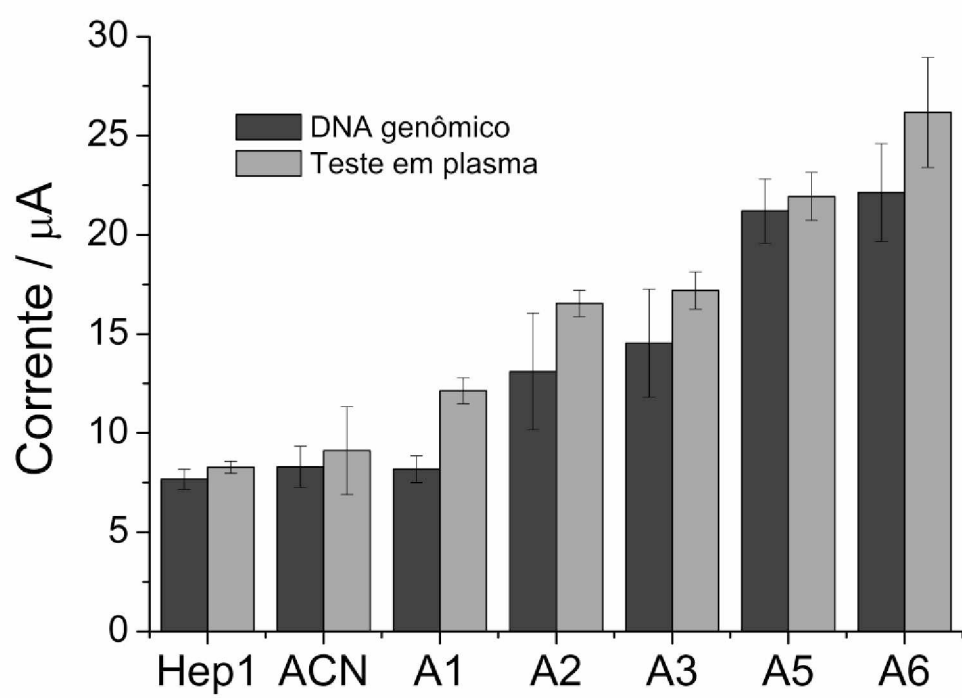
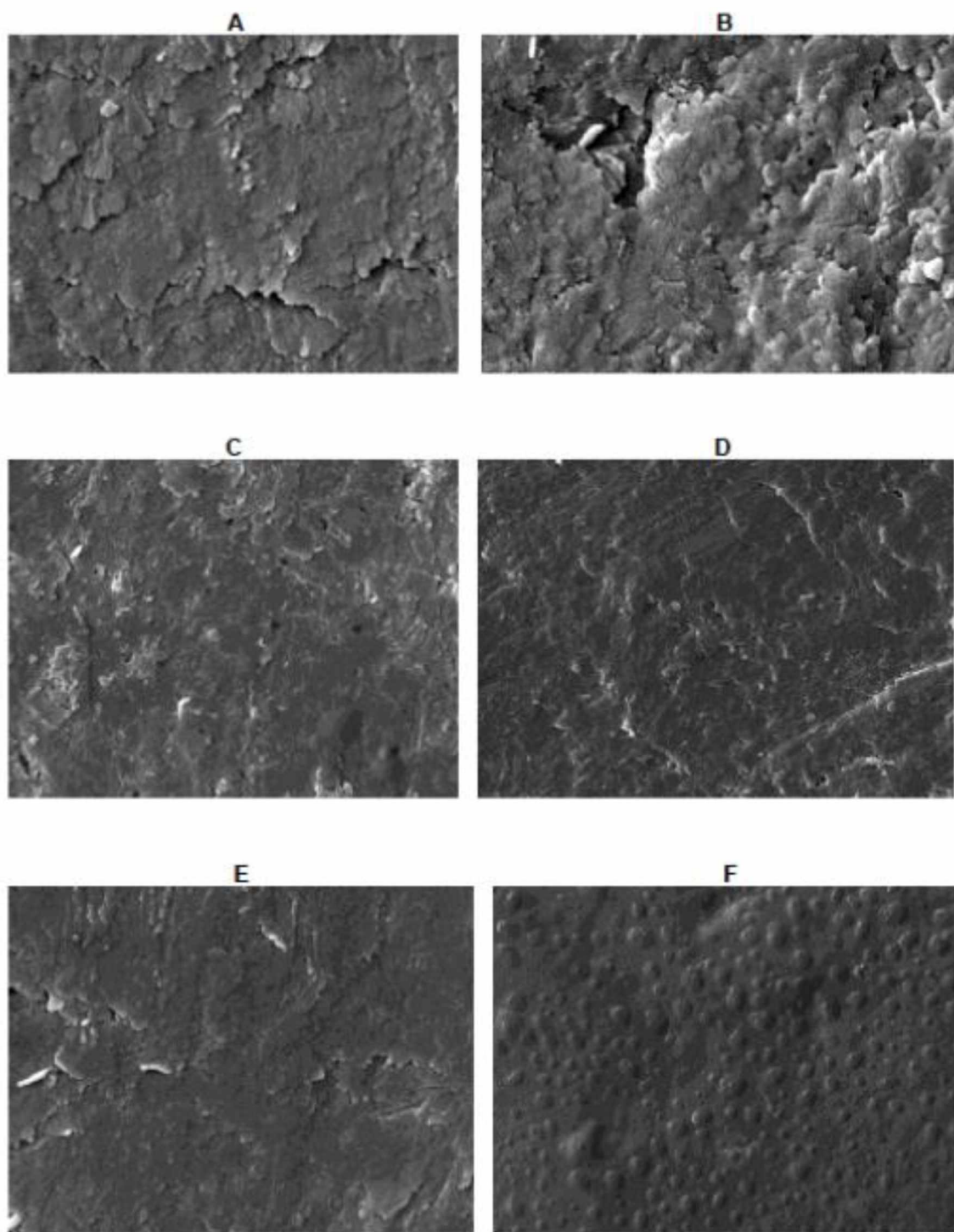


FIGURA 5B



**FIGURA 6**



**FIGURA 7**