



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

**Desenvolvimento de plataformas nanotecnológicas para a
construção de biossensores: diagnóstico molecular de doenças
infecciosas e inflamatórias**

Aluna: Danielle Alves de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Ana Graci Brito Madurro

Co-Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Uberlândia, MG

2017



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

**Desenvolvimento de plataformas nanotecnológicas para a
construção de biossensores: diagnóstico molecular de doenças
infecciosas e inflamatórias**

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

Aluna: Danielle Alves de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Ana Graci Brito Madurro

Co-Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Uberlândia, MG

2017

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

O48d
2017 Oliveira, Danielle Alves de, 1978
Desenvolvimento de plataformas nanotecnológicas para a construção de biossensores: diagnóstico molecular de doenças infecciosas e inflamatórias / Danielle Alves de Oliveira. - 2017.
146 p. : 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. Biossensores - Teses. 3. Hepatite B - Teses. 4. Hepatite C - Teses. 5. Doenças infecciosas – Teses. I. Madurro, Ana Graci Brito. II. Madurro, João Marcos. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1



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

**Desenvolvimento de plataformas nanotecnológicas para a
construção de biossensores: diagnóstico molecular de doenças
infecciosas e inflamatórias**

Aluna: Danielle Alves de Oliveira

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra. Graci Brito Madurro

Examinadores:

Profa. Dra. Karen Wohnrath

Prof. Dr. Arnaldo Cesar Pereira

Profa. Dra. Paula Dechichi

Prof. Dr. Nilson Penha Silva

Data da Defesa: 28/07/2017

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

Profa. Dra. Ana Graci Brito Madurro

"Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça."

Geraldo Eustáquio de Souza

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos Espíritos de Luz pelas bênçãos e sabedoria;

Aos meus pais Teodorak Neto e Elizabeth, aos meus irmãos Emanuelle, Gisele, Teodorak e a minha sobrinha Monalisa, com vocês a jornada é repleta de Amor;

A meu namorado Rafael pelo apoio incondicional e aos meus cunhados Anderson, Bruno e Nayara pela presença sempre amiga;

A minha orientadora Profa. Dra. Ana Graci Brito Madurro e ao meu co-orientador Prof. Dr. João Marcos Madurro, pela amizade, orientação e aprendizagem;

Aos meus queridos amigos, Cristiane, Juliano, Flávia, Daniela, Roberto, Luiz Fernando, Anderson, Marli, Gabriela e Mariana sem os quais seria difícil seguir em frente;

Aos meus amigos e colegas do BIOSENS/LAFIP, Sandro, Vinícius, Lívia, José Manuel, Jussara, Mônica, Heliane, Laíse, Rafaela, Bárbara, Rafael, Hédén, Priscila Ana Cristina, Bárbara, João Afonso, Fábio e Drielly, que de diversas maneiras contribuíram com este trabalho;

Aos parceiros neste projeto, Galber Araújo, Emília Rezende Vaz, professor Carlos Ueira Vieira, Márcia Soares que disponibilizaram as amostras;

À Agência Intelecto, representada pelas pessoas Fabiana e Letícia pela solicitude, rapidez e orientações sobre a patente depositada.

Ao Guilherme, pela paciência, solicitude e auxílio na aquisição e interpretação das imagens de microscopia de força atômica.

À Heliane e ao Magayver pela solicitude e aquisição das imagens de microscopia eletrônica de varredura.

À Janaína, pela paciência e auxílio em todas as questões formais e a todos do Programa de Pós- Graduação em Genética e Bioquímica (PPGGB-UFU).

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós-Graduação em de Genética e Bioquímica pela oportunidade de realizar esta tese;

Aos órgãos de fomento (CNPq, CAPES, FAPEMIG) e à Universidade Federal de Uberlândia, por garantirem as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

3-HBA: *3-Hidroxybenzoic Acid* (ácido 3-hidroxibenzóico)

AFM: microscopia de força atômica (*atomic force microscopy*)

Anti-CAIII: anticorpo Anti-Anidrase Carbônica III

Anti-HBs: anticorpo contra antígeno de superfície do vírus da hepatite B

Anti-HCV: anticorpo contra o vírus da hepatite C

Au/OG: eletrodo de ouro modificado com óxido de grafeno

Au/OGr: eletrodo de ouro modificado com óxido de grafeno reduzido

Au: eletrodo de ouro

AuNPs: nanopartículas de ouro

BE: brometo de etídio

BIOSENS: Laboratório de Biossensores

BSA: albumina de soro bovino (*bovine serum albumin*)

DNA: ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

dsDNA: DNA dupla fita (*double-stranded DNA*)

E: potencial elétrico

EG: eletrodo de grafite

EIS: espectroscopia de impedância eletroquímica (*electrochemical impedance spectroscopy*)

ELISA: ensaio de imunoadsorção enzimática (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

EQM: eletrodo quimicamente modificado

HBcAg: antígeno central C do vírus da hepatite B

HBeAg: antígeno central E do vírus da hepatite B

HBsAg: antígeno de superfície do vírus da hepatite B

HBV: vírus da hepatite B

HC: *healthy control* (amostra de soro de indivíduos saudáveis)

HCV: vírus hepatite C

HCV-RNA: genoma viral vírus da hepatite C

HEPB1S: oligonucleotídeo específico VHB, cuja sequência é 5'-(HS)-GAGGAGTTGGGGGAGCACATT-3'

i: corrente elétrica

LAFIP: Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia

M12: peptídeo cuja sequência: CNVNSKSPVERITGGGS, com amidação C-terminal e conjugação BSA em cisteína

MEV: microscopia eletrônica de varredura (*scanning electron microscopy*)

NC: amostras negativas (*negative control*)

OG: óxido de grafeno

OGR: óxido de grafeno reduzido

PC: amostras positivas (*positive control*)

PCR: reação em cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction*)

poli(3-HBA): poli(ácido 3-hidroxibenzóico)

RCT: resistência à transferência de carga (*charge transfer resistance*)

RNA: ácido ribonucleico (ribonucleic acid)

Rq: rugosidade média quadrática

RS: resistência da solução

SPR: ressonância plasmônica de superfície (*surface plasmon resonance*)

ssDNA: DNA simples fita (*single-stranded DNA*)

UTR regiões não traduzidas nas extremidades 5' e 3' do genoma viral

VC: voltametria cíclica

VPD: voltametria de pulso diferencial

W: impedância de Warburg

Z': parte real da impedância

Z'': parte imaginária da impedância

Δi_p : variação da corrente de pico

$\Delta\theta_{SPR}$: variação do ângulo de SPR

θ_{SPR} : ângulo de ressonância de plásmons de superfície (ângulo de SPR crítico)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição dos óbitos associados às hepatites virais segundo agente etiológico no Brasil, de 2000 a 2014.....	2
Figura 2: Gráfico do perfil epidemiológico de hepatite C nas diferentes regiões do Brasil (autoria própria).	5
Figura 3: Morfologia do Vírus da Hepatite C. Disponível em: https://people.rit.edu/japfaa/infectious.html . [Acesso em: 06 julho. 2017].	7
Figura 4: Representação esquemática da estrutura do genoma do HCV (autoria própria).	7
Figura 5: Gráfico do perfil epidemiológico de hepatite B nas diferentes regiões do Brasil (autoria própria).	8
Figura 6: Estrutura do vírus da hepatite B. Disponível em: https://people.rit.edu/japfaa/infectious.html . [Acesso em: 06 julho. 2017].	9
Figura 7: Esquema de uma articulação com e sem artrite reumatoide. Destaque para a presença da CAIII na membrana sinovial, e do aparecimento do Anti-CAIII nos indivíduos acometidos com AR (autoria própria).....	14
Figura 8: Representação esquemática do biossensor (autoria própria).....	1
Figura 9: Esquema ilustrativo das nanopartículas de ouro: (a) solução coloidal de cor vermelha referente as AuNPs estabilizadas pelos íons citrato ou pela presença da sonda; (b) solução coloidal de cor roxa referente as AuNPs agregadas devido a interação sonda-analito (autoria própria).	20

Figura 10: Esquema representativo do genossensor: (a) imobilização da sonda; (b) adição de amostra do analito; (c) hibridização entre sonda:analito alvo; (d) detecção eletroquímica (autoria própria).22

Figura 11: Representação esquemática de cada etapa de preparação dos eletrodos de grafite: (a) montagem artesanal do grafite no suporte rosqueável; (b) eletrodo de grafite pronto e base de latão; (c) eletrodo de grafite inserido na base de latão (autoria própria).....24

Figura 12: Representação esquemática do eletrodo de ouro (autoria própria)...25

Figura 13: Representação do biossensor mimético construído sobre um eletrodo de grafite modificado com filme polimérico condutor: (a) eletrodo de grafite; (b) gráfico da eletropolimerização; (c) EQM com filme polimérico (cor roxa) e grupos carboxílicos expostos; (d) imobilização do peptídeo (autoria própria).28

Figura 14: Representação do mecanismo de polimerização do ácido 3-hidroxibenzóico) proposto por Ferreira et al., 2011.29

Figura 15: Representação eletrodo de Au (amarelo) com nanomaterial OG (marron) Au-GO: (a) ativação do OG; (b) disponibilização de grupos aminos na superfície do Au-OG (autoria própria).....30

Figura 16: Esquema representativo do mecanismo de ativação de superfícies carboxiladas por adição de EDC-NHS.....30

Figura 17: Imagem fotográfica do potenciostato CH Instruments modelo 760C (a) e potenciostato/galvanostato Autolab modelo PGSTAT302N (b) (autoria própria).. 31

Figura 18: Esquema de uma célula eletroquímica de 3 eletrodos. Da esquerda para a direita, em cada compartimento: (1) eletrodo auxiliar, (2) eletrodo de trabalho e (3) eletrodo de referência. O detalhe indicado pela seta é um capilar de Luggin,

cuja finalidade é a aproximação dos eletrodos de trabalho e referência visando diminuir a resistência ôhmica. (Fonte: Rodovalho, 2014).32

Figura 19: Representações gráficas da voltametria cíclica. (a) Voltamograma cíclico, com a corrente elétrica (i) em função do potencial (E); (b) Gráfico de potencial em função do tempo: em cada ciclo o potencial é variado de E_i a E_f , em seguida retornando a E_i . (Adaptado de KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).33

Figura 20: Representações gráficas da voltametria de pulso diferencial: A) Gráfico de potencial em função do tempo: são aplicados pulsos periódicos de potencial. Os pontos destacados representam a amostragem de corrente para um pulso. B) Voltamograma de pulso diferencial, com a corrente elétrica em função do potencial. Neste exemplo, é possível observar um pico de oxidação. E : potencial elétrico; i : corrente elétrica; ΔE_p : variação de potencial de pulso; ΔE_s : variação de potencial de amostragem; t_p : período de pulso; Δi_p : variação de corrente de pico. (Adaptado de KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).35

Figura 21: Espectroscopia de impedância eletroquímica: A) Diagrama de Nyquist, destacando as regiões de altas e baixas frequências, além dos cálculos de componentes da impedância. B) Circuito equivalente que serve de modelo para explicar os dados experimentais. R_S : resistência da solução; R_{CT} : resistência à transferência de carga; W : impedância de Warburg; CDL : capacitância (Adaptado de BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008).36

Figura 22: Imagem fotográfica: (a) eletrodo de ouro (24 quilates, $\varnothing = 3$ mm); (b) eletrodo de grafite ($\varnothing = 6$ mm).36

Figura 23: Imagem fotográfica do equipamento MEV: (a) Modelo Tescan modelo Vega3 LMU; (b) revestidor de pulverização Quorum 150 R.37

Figura 24: Imagem fotográfica AFM Shimadzu modelo SPM 9600.39

Figura 25: Representação esquemática da configuração de Kretschmann para SPR. O dielétrico em contato com o metal possibilita a transferência ressonante de energia da onda incidente para a OPS; (b) Curvas de refletância na ausência (θ_{SPR1}) e presença (θ_{SPR2}) de espécies na superfície do filme metálico; (c) Sensorgrama esquemático representativo da relação entre o θ_{SPR} (dado em mDA - miligraus de ângulo) e tempo durante a interação de espécies com a superfície do filme metálico (Adaptado de DAMOS *et al.*, 2004).....40

Figura 26: Imagem fotográfica do equipamento SPR. (a) Fotografia de um espectrômetro de SPR, modelo AUTOLAB SPRINGLE; (b) imagem do prisma acoplado ao equipamento; (c) imagem do prisma sendo possível visualizar a local de inserção do disco; (d) imagem do disco de vidro com filme de ouro (autoria própria).42

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Resumo etiopatológico das hepatites virais (autoria própria).....	3
---	---

RESUMO

Na presente tese foram desenvolvidas três plataformas para a construção de biossensores visando o diagnóstico molecular da hepatite C, hepatite B e artrite reumatoide, por técnicas eletroquímicas, ópticas e microscópicas, usando amostras reais. Os genossensores para hepatites C e B foram desenvolvidos sobre a superfície de um eletrodo de ouro modificado com nanomateriais, sendo esses o óxido de grafeno e o óxido de grafeno reduzido, respectivamente. Em todos os biossensores propostos a interação da sonda com o alvo foi efetivamente verificada pelas diferentes técnicas. No caso do genossensor para hepatite C, o óxido de grafeno foi modificado quimicamente com etilenodiamina e apresentou limites de detecção e quantificação de 1:483 (v/v) e 1:145 (v/v), respectivamente, usando amostras de soro de pacientes positivos. A interação da sonda específica do HCV: gRNA causou uma redução na amplitude de resposta de corrente de cerca de 2,9 vezes quando comparada ao controle negativo, usando a VPD. O genossensor para a hepatite B a sonda foi imobilizada sobre eletrodo de ouro contendo óxido de grafeno reduzido, ouro descoberto e nanopartículas de ouro. A análise usando VPD indica que a adição de DNA genômico de HBV provocou um aumento de cerca de 1,4 vezes na amplitude de corrente de pico quando comparado ao controle negativo. Em adição, análises de SPR mostraram que as amostras positivas de HBV resultaram em uma alteração de cerca de 15 vezes em comparação com as amostras negativas. No biossensor desenvolvido para o diagnóstico da artrite reumatoide foi utilizado um eletrodo de grafite modificado com um filme poli(3-hidroxibenzoico), no qual foi imobilizado um peptídeo mimético que reconhece o anticorpo anti-CAIII. O sensor mimético desenvolvido permitiu a distinção entre amostras positivas e negativas para a artrite reumatóide, uma vez que apresentou uma diminuição expressiva no sinal de corrente de cerca de 2,2 vezes, quando comparado ao soro negativo. Assim, foi possível desenvolver plataformas analíticas, seletivas e específicas fornecendo novas abordagens para o diagnóstico clínico e aplicações *point-of-care* para o monitoramento de doenças inflamatórias e infecciosas.

Palavras-chave: hepatite B, hepatite C, artrite reumatoide, biossensor, óxido de grafeno, peptídeo mimético, genossensor, nanopartícula de ouro.

ABSTRACT

In the present thesis, three biosensing platforms aiming the molecular diagnosis of hepatitis C, hepatitis B and rheumatoid arthritis were developed by electrochemical, optical and microscopic techniques using real samples. The genosensors for the diagnosis of hepatitis C and B were developed on a gold electrode modified with nanomaterials, being these graphene oxide and reduced graphene oxide, respectively. In all proposed biosensors the interaction of the probe with the target was effectively verified by the different techniques. In the case of the genossensor for hepatitis C, graphene oxide was chemically modified with ethylenediamine and showed limits of detection and quantification of 1:483 (v/v) and 1:145 (v/v), respectively, using serum samples from positive patients. The interaction of the HCV probe and the gRNA caused a reduction in current response amplitude of about 2.9 fold as compared to the negative control, using the DPV. The genossensor for hepatitis B probe was immobilized on a gold electrode containing reduced graphene oxide, gold disks and gold nanoparticles. Analysis using DPV indicates that the addition of HBV gDNA caused an increase of about 1.4 times in peak current amplitude, when compared to the negative control. In addition, SPR analyzes showed that positive samples of HBV resulted in a change of about 15-fold compared to negative samples. In the biosensor developed for the diagnosis of rheumatoid arthritis, a graphite electrode modified with a poly (3-hydroxybenzoic) film was used, in which a mimetic peptide that recognizes the anti-CAIII antibody was immobilized. The developed mimetic sensor allowed the distinction between positive and negative samples for rheumatoid arthritis, since it presented an decrease in the current signal of about 2.2 times, when compared to the negative serum. Thus, it was possible to develop analytical, selective and specific platforms, providing new approaches for clinical diagnosis and point-of-care applications, for the monitoring of inflammatory and infectious diseases.

Keywords: hepatitis B, hepatitis C, rheumatoid arthritis, biosensor, graphene oxide, peptide mimetic, genosensor, gold nanoparticle.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Hepatites virais.....	2
1.2. Hepatite C	4
1.3. Hepatite B	8
1.4. Doenças autoimunes	11
1.5. Artrite Reumatoide	12
2. BIOCENSORES	15
2.1. Classificação de acordo com o transdutor	17
2.1.1. Biossensores eletroquímicos	17
2.1.2. Biossensores ópticos.....	18
2.2. Classificação de acordo com o elemento de reconhecimento	20
2.2.1. Biossensores baseados em ácidos nucleicos	21
2.2.2. Biossensores baseados em peptídeos	22
3. ELETRODOS DE TRABALHO E SUA CARACTERIZAÇÃO	23
3.1. Eletrodo de trabalho	23
3.2. Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM)	25
3.3. Preparação dos eletrodos e da célula eletroquímica	30
4. TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS	32
4.1. Voltametria cíclica	32
4.2. Voltametria de pulso diferencial	34
4.3. Espectroscopia de impedância eletroquímica	35
5. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS	36
5.1. Microscopia eletrônica de varredura	37
5.2. Microscopia de força atômica.....	37
6. TÉCNICAS ÓPTICAS.....	39
6.1. Ressonância de plásmon de superfície (SPR).....	39
6.2. Colorimétrica - Nanopartículas de ouro.....	42
6.3. Espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV/VIS).....	43
REFERÊNCIAS	44
8. MANUSCRITOS	67

8.1. Carbon nanomaterial as a platform for genosensors: a system for the diagnosis of the hepatitis C in real sample	67
8.2. Application of nanomaterials for the electrical and optical detection of the genomic DNA of hepatitis B virus.....	92
8.3. Serological electro detection of rheumatoid arthritis using mimetic peptide	114

CAPÍTULO I – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país continental, cuja diversidade geográfica, cultural e socioeconômica, torna-o complexo do ponto de vista epidemiológico, o que impossibilita uma estratégia única de atuação frente aos problemas de saúde pública. Na ambientação de políticas públicas de saúde, há de se pensar no desenvolvimento de novas técnicas, sob a ótica da ciência e da previsibilidade, acessíveis à população residente em áreas urbanas e remotas, a fim de consagrar o direito universal à saúde, previsto na Constituição brasileira de 1988 em seu artigo 196.

A crescente demanda de políticas preventivas visa assegurar a eficácia de diagnósticos rápidos e seguros para os cidadãos. Dessa forma, o avanço tecnológico no campo laboratorial e clínico é notório com desenvolvimento de metodologias de detecção de marcadores sorológicos que superem as técnicas de diagnóstico convencionais em agilidade, custo, disponibilidade, quantidade de amostra, procedimentos menos invasivos e detecções mais sensíveis e precisas, independentemente de infraestrutura laboratorial.

No projeto de pesquisa desta tese, foi proposto a elaboração de plataformas nanotecnológicas analíticas para o diagnóstico e monitoramento de doenças infecciosas e inflamatórias, objetivando a construção de dispositivos de detecção portáteis e miniaturizados. É consensual o entendimento de que a detecção precoce de uma doença tem impacto direto com o prognóstico, com as possibilidades terapêuticas, a sobrevida e com custos que oneram o sistema de saúde pública, haja vista que doenças crônicas implicam em complexas e diversas necessidades à saúde/tratamento do indivíduo.

Em meio aos obstáculos enfrentados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), como as limitações de recursos orçamentários, desvios de verbas públicas, escassez de medicamentos entre outros, o SUS, ainda configura-se como o único recurso para milhares de cidadãos brasileiros. Com isto, o trabalho exsurge, com uma proposta promissora, com a finalidade de atender com cuidado e inovação uma parcela de indivíduos que necessitam de um dispositivo

de diagnóstico precoce e monitoramento da Hepatite C, Hepatite B e Artrite Reumatoide.

1.1. Hepatites virais

As hepatites virais constituem atualmente uma relevante questão de saúde pública no Brasil (Figura 1), atingindo vários segmentos da população e causando grande impacto de morbidade e mortalidade em sistemas de saúde como o SUS (BRASIL, 2016).

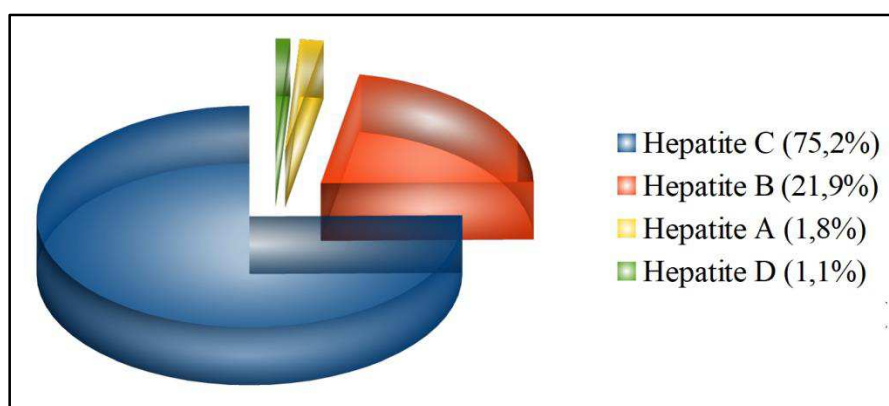


Figura 1: Distribuição dos óbitos associados às hepatites virais segundo agente etiológico no Brasil, de 2000 a 2014 (BRASIL, 2016).

As hepatites virais agudas e crônicas são doenças provocadas por diferentes agentes etiológicos (Tabela 1), com tropismo primário pelo tecido hepático, apresentando características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais semelhantes, porém com importantes particularidades (STRAUSS, 2017; MINSTERIO DA SAÚDE, 2016; MCCLARY et al 2000).

A doença tem um amplo espectro clínico, que varia desde formas assintomáticas, anictéricas e ictéricas típicas, até a insuficiência hepática aguda grave (fulminante) (BRASIL, 2016). Os sintomas prondrômicos das hepatites virais agudas são sistêmicos e muito variáveis semelhantes a uma infecção viral inespecífica, caracterizados por fadiga, mal-estar, náuseas, dor abdominal, anorexia, icterícia, e aumento dos níveis séricos das aminotransferases. A hepatite crônica, em geral, ocorre de maneira assintomática. As manifestações

clínicas aparecem quando a doença está em estágio avançado, na qual podem estar presentes a fadiga e cirrose hepática (HEIAT; RANJBAR; ALAVIAN, 2014).

Hepatites	Agente etiológico	Material genético	Via transmissão	Período de incubação (máximo)	Vacina
Hepatite A	HAV	RNA	oral-fecal; alimentos; água contaminada	42 dias	SIM
Hepatite B	HBV	DNA	Sangue contaminado; relações sexuais desprotegidas	45 dias	SIM
Hepatite C	HCV	RNA	Sangue contaminado	150 dias	NÃO
Hepatite D	HDV	RNA	Sangue contaminado	35 dias	NÃO

Tabela 1: Resumo etiopatológico das hepatites virais (autoria própria).

O diagnóstico, de notificação compulsória, inclui a realização de exames em ambiente laboratorial e testes rápidos, a fim de caracterizar a doença e sua gravidade (BRASIL, 2016). É baseado na detecção dos marcadores presentes no sangue, soro, plasma ou fluido oral da pessoa infectada, por meio de imunoenaios, e/ou na detecção do ácido nucleico (NAT) viral, empregando técnicas de biologia molecular, sendo esse último uma alternativa para a detecção cada vez mais precoce da infecção pelo vírus das hepatites (HEIAT; RANJBAR; ALAVIAN, 2014).

As técnicas de imunoensaio empregados (ensaio imunoenzimático (ELISA) e ensaios luminescentes) são baseadas na detecção do antígeno viral e/ou anticorpos específicos. As imunoglobulinas da classe M (IgM), quando detectadas caracterizam uma infecção aguda, e as imunoglobulinas da classe G (IgG) são marcadores de infecção passada ou de resposta vacinal. Outro imunoensaio realizado são os testes rápidos compreendidos pelos imunoenaios cromatográficos (SCALIONI *et al.*, 2014) que apresentam sensibilidade analítica menor que a dos imunoenaios laboratoriais, implicando a não indicação do seu uso como testes de triagem em bancos de sangue (SCHEIBLAUER *et al.*, 2010). As vantagens são simplicidade de execução e resultados imediatos (HEIAT; RANJBAR; ALAVIAN, 2014). Os testes rápidos para hepatite B detectam a presença do antígeno de superfície do HBV (HBsAg) e para diagnóstico da hepatite C detecta o anticorpo anti-HCV. Os testes moleculares são

representados pelo teste da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) realizados para obtenção do diagnóstico e quantificação da carga viral. Tanto os testes imunoensaio quanto o NAT são realizados utilizando amostras de soro, plasma ou sangue total (BRASIL, 2016).

Os avanços tecnológicos em dispositivos diagnósticos impactam diretamente a qualidade de vida do indivíduo, sendo ainda um poderoso instrumento de prevenção de complicações mais frequentes como cirrose avançada e câncer hepático. Além disso, a realização de um diagnóstico seguro evita desperdícios de recursos públicos e privados. Assim, considerando-se a magnitude das hepatites virais no país e no mundo, bem como a necessidade de desenvolver estratégias de prevenção e controle dessas doenças infecciosas, na presente tese foi proposta a elaboração de plataformas analíticas cuja superfície modificada constitui-se de ouro modificado com nanomaterial para o diagnóstico rápido da hepatite C e hepatite B.

1.2. Hepatite C

Dentro do cenário das hepatites virais no mundo, a hepatite C destaca-se por ser uma doença com alto potencial deletério, cosmopolita (SAEED; WAHEED; ASHRAF, 2014), insidiosa, consistindo na causa mais frequente de doença hepática crônica (MUNIR *et al.*, 2010) sendo considerada uma das principais causas de transplante de fígado no mundo (DE MARTIN *et al.*, 2010). A cronificação ocorre de 70% a 85% dos casos, sendo que, em média um terço destes podem evoluir para formas histológicas graves, caso não haja intervenção terapêutica (BRASIL, 2016).

O vírus da hepatite C (HCV – *hepatite C virus*) tem uma distribuição mundial (GOWER *et al.*, 2014), e estima-se que haja 170 milhões de pessoas soropositivas, que aproximadamente 71 milhões têm infecção crônica e aproximadamente 399.000 pessoas morrem de hepatite C por ano (WHO, 2017), devido a doenças progressivas do fígado (MOHD HANAFIAH *et al.*, 2013).

No Brasil de 1999 a 2015, foram detectados 289.459 casos de anti-HCV ou HCV-RNA reagentes. Considerando os casos que possuíam ambos os marcadores anti-HCV e HCV-RNA reagentes, foram detectados 144.024 casos. A região sudeste apresentou a maior distribuição de casos (Figura 2), entretanto

problemas com relação à notificação de casos nas regiões Norte e Nordeste podem contribuir para subestimar esses números (BRASIL, 2016).

Compreender a patogênese, a complexidade diagnóstica e terapêutica relacionada à hepatite C implica em caracterizar a diversidade virológica, o padrão de transmissão, a evolução clínica da doença e vislumbrar os desafios em desenvolver estudos clínicos e pesquisa básica que levem a erradicação da doença.

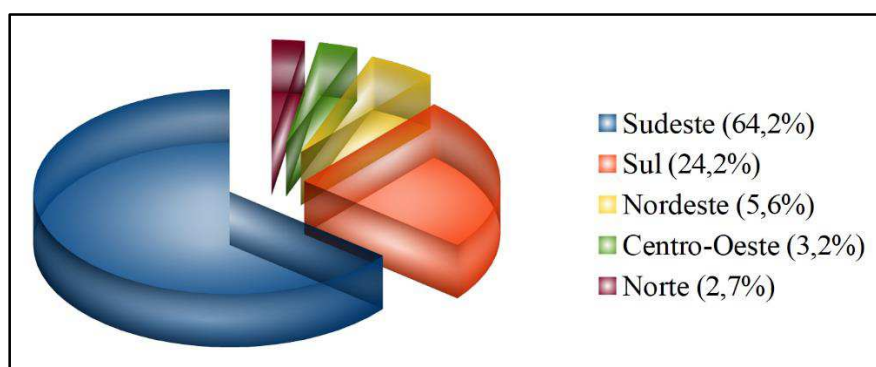


Figura 2: Gráfico do perfil epidemiológico da hepatite C nas diferentes regiões do Brasil (autoria própria) (BRASIL, 2016).

As hepatites virais até 1989 eram classificadas em hepatite A e hepatite B, dessa forma nas amostras negativas advindas de pacientes com hepatite pós-transfusional, a denominação utilizada era hepatite não A e não B (NANB). O HCV foi identificado por Choo e colaboradores (CHOO *et al.*, 1989) através de estudos de clonagem e sequenciamento genético de uma cepa do plasma de um chimpanzé cronicamente infectado com vírus NANB, sendo denominado vírus da hepatite C. Este vírus foi associado a cerca de 90% dos casos de hepatite NANB (CHOO *et al.*, 1990). Desde sua identificação, tornou-se evidente que um considerável número de pessoas está infectada cronicamente com este vírus. O HCV possui uma relação restrita de hospedeiros, sendo apenas o homem e o chimpanzé susceptíveis à infecção natural (BRASS; MORADPOUR; BLUM, 2007; STRAUSS, 2001).

A transmissão do HCV ocorre através do contato com sangue infectado, devido à exposição percutânea, transfusão de sangue ou hemoderivados e transplantes de doadores infectados (BRASIL, 2017). O HCV é o agente causal de 90% das hepatites pós-transfusionais. Outras formas parenterais de

contaminação incluem procedimentos médicos/odontológicos, acupuntura, tatuagem, alicate de manicura, lâmina de barbear, inalação de drogas e compartilhamento de equipamentos de uso ou mesmo escovas de dente compartilhadas (DE CARVALHO-MELLO *et al.*, 2010). Até o momento não existe uma vacina disponível contra a hepatite C, assim a eliminação dos comportamentos de risco é fundamental para que as taxas de incidência da infecção sejam reduzidas e, conseqüentemente, ocorra a diminuição dos casos de doença hepática (VILLAR *et al.*, 2015).

O fígado é o órgão alvo primário da infecção pelo HCV, que se replica no citoplasma dos hepatócitos, sendo que 85% dos pacientes podem evoluir para hepatite crônica assintomática e desses 20% evolui para cirrose e carcinoma hepatocelular. Após esta exposição viral é possível identificar a viremia, sendo que esta surge duas semanas antes da produção de anticorpos anti-HCV (ULIANA; RICCARDI; YAMANAKA, 2014). Assim, é possível obter um diagnóstico precoce através da detecção do RNA viral.

Na suspeita de infecção pelo HCV, inicialmente é realizado o teste sorológico para detecção de anti-HCV, através de ensaio imunoenzimático (ELISA). O resultado positivo desse marcador deverá ser confirmado por testes moleculares para detecção de ácidos nucleicos do HCV (BRASIL, 2015), permitindo diferenciar indivíduos com infecção ativa dos não-virêmicos, através da detecção do RNA do HCV (FREIMAN *et al.*, 2016). Testes rápidos vêm sendo introduzidos como uma ferramenta alternativa e prática aos testes sorológicos convencionais, tais como WAMA Imuno-Rápido HCV (WAMA Diagnóstica), Bioeasy HCV Rapid Test (Bioeasy Diagnóstica Ltda), teste rápido Oraquick HCV (Orasure), que identificam o anti-HCV em amostras de soro e saliva (CRUZ *et al.*, 2017; SCALIONI *et al.*, 2014).

O HCV é um vírus RNA de fita simples com polaridade positiva pertencente à família flaviviridae (KUIKEN; SIMMONDS, 2009). A partícula viral mede aproximadamente 65 nm e é formada por um envelope viral derivado das membranas do hospedeiro, onde estão inseridas proteínas estruturais virais (E1 e E2), as proteínas do core que formam o capsídeo proteico e o genoma viral (Figura 3) (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007).

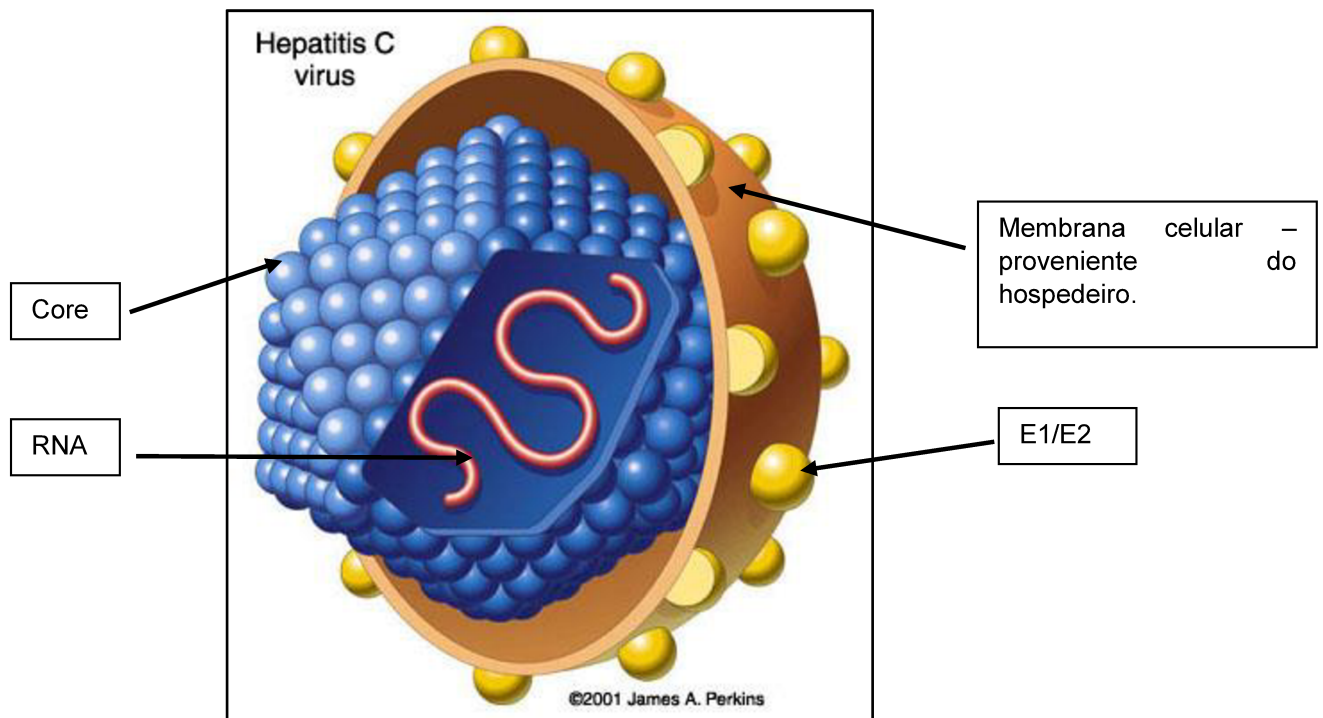


Figura 3: Morfologia do Vírus da Hepatite C. Disponível em: <https://people.rit.edu/japfaa/infectious.html>. [Acesso em: 06 julho. 2017].

O genoma do HCV possui 9,6 kb, sendo constituído de uma região 5'UTR altamente conservada (LYRA; FAN; DI BISCEGLIE, 2004), uma única fase aberta de leitura e uma região 3' UTR com pequena variação (MORADPOUR; BLUM, 2004) (Figura 4). As proteínas não estruturais: p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B são expressas nas células infectadas, mas não são incorporadas na partícula viral. Elas servem para coordenar os aspectos intracelulares da replicação do HCV (LINDENBACH; RICE, 2013).

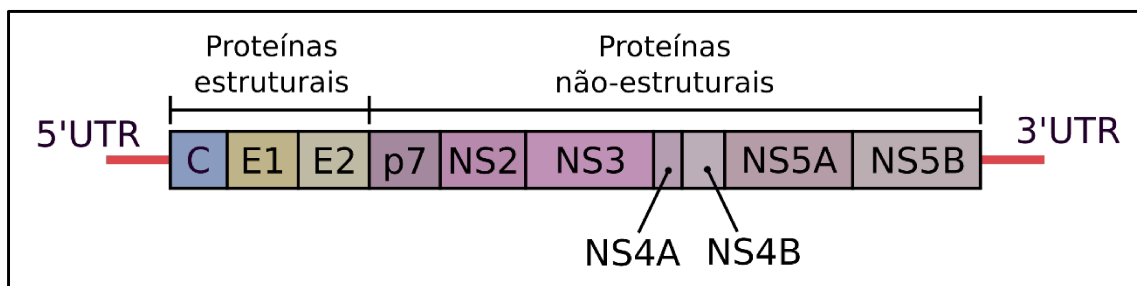


Figura 4: Representação esquemática da estrutura do genoma do HCV (autoria própria).

Através de análises filogenéticas estabeleceu-se a variabilidade genética do HCV. Existem 7 genótipos diferentes que são subdivididos e identificados por

letras minúsculas (a, b, c etc) (SIMMONDS, 2013; KUIKEN; SIMMONDS, 2009). Dentro do mesmo genótipo/subtipo podem ocorrer variantes virais distintas geneticamente, mas altamente relacionadas que são referidas como quasiespécies (FORTON *et al.*, 2004), porém a região 5'UTR ainda mantém-se como região de menor variabilidade no genoma do HCV. Dessa forma, é de extrema importância a confecção de marcadores genéticos que reconheçam regiões conservadas do genoma do HCV. Na presente tese, foi desenvolvido um genossensor capaz de detectar o HCV em amostras séricas, utilizando uma sonda de DNA complementar à região 5'UTR do genoma viral, possibilitando uma detecção de amplo espectro do HCV (SAEED; WAHEED; ASHRAF, 2014)

1.3. Hepatite B

A hepatite B é uma doença de elevada transmissibilidade (OTT *et al.*, 2012) e impacto significativo na saúde pública (DE ALMEIDA *et al.*, 2012; MASHHADIZADEH; TALEMI, 2016; SHAKOORI *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2015) com alta taxa de morbidade e mortalidade (LOZANO *et al.* 2012). Aproximadamente um terço da população mundial já se expôs ao vírus da hepatite B (HBV) (WHO, 2017), e estima-se que esta doença seja responsável por aproximadamente 780.000 óbitos ao ano no mundo (KANWAL; EL-SERAG; ROSS, 2015). No período de 1999 a 2015, foram notificados e confirmados 196.701 casos no Brasil, apesar dos esforços progressivos em imunização e prevenção propostos pelo SUS. A Figura 5 apresenta a distribuição geográfica da doença (BRASIL, 2017).

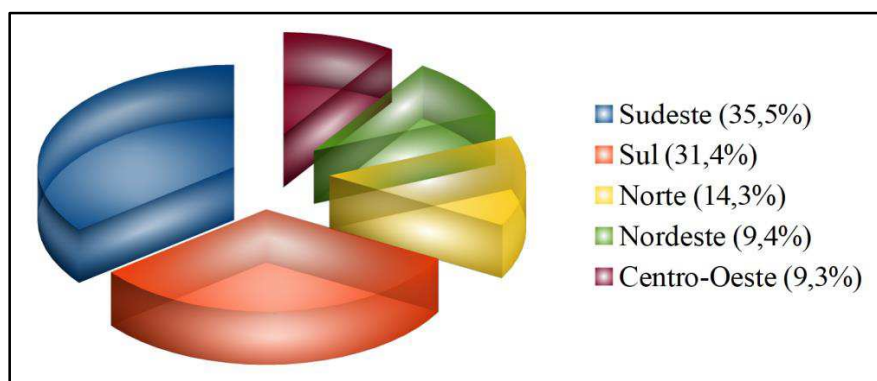


Figura 5: Gráfico do perfil epidemiológico da hepatite B nas diferentes regiões do Brasil (autoria própria) (BRASIL, 2017).

A hepatite B é uma doença com evolução silenciosa, com sinais e sintomas comuns a doenças crônicas do fígado, que se manifestam normalmente nas fases mais avançadas da doença (ASPINALL *et al.*, 2011; FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007). Uma característica que difere esta doença da hepatite C é o fato dessa evoluir para carcinoma hepatocelular diretamente sem o desenvolvimento inicial de cirrose (MANDELL *et al.*, 2010).

Esta patologia é causada por um vírus considerado oncogênico, pertencente à família hepadnaviridae capazes de infectar diferentes animais, cujo genoma é composto por um DNA circular parcialmente duplicado de 3,6 kb (TAKAHASHI *et al.*, 1976; FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007), sendo considerado um dos menores genomas de vírus que infectam o homem (GANEM; VERMUS 1987). Apresenta quatro fases abertas de leitura sobrepostas, que correspondem às regiões S, C, P e X (GANEM; VERMUS 1987). Apesar de ser um vírus de DNA, apresenta altas taxas de mutação, semelhantes às observadas em vírus de RNA (SIMMONDS *et al.*, 2013). A estrutura completa (partícula de Dane) possuem um diâmetro de 42 nm. A partícula viral é formado por envelope lipoproteico originado da última célula infectada pelo vírus e três formas do antígeno de superfície viral (HBsAg) (TAKAHASHI et al. 1976), constituido pelas proteínas S, M e L. O capsídeo é composto pelo antígeno central (HBcAg), o antígeno E (HBeAg) e em seu interior localiza-se o genoma viral juntamente com a DNA polimerase (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007) (Figura 6).

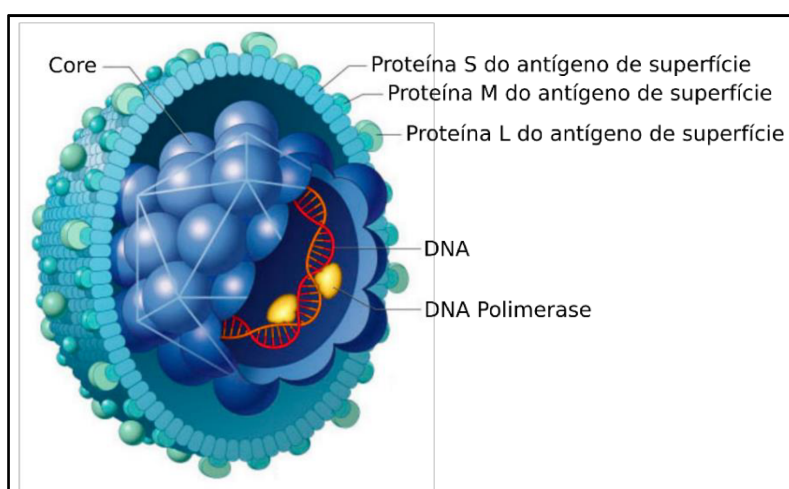


Figura 6: Estrutura do vírus da hepatite B. Disponível em: <https://people.rit.edu/japfaa/infectious.html>. [Acesso em: 06 julho. 2017].

A transmissão do agente infeccioso pode ocorrer por solução de continuidade, via parenteral (compartilhamento de agulhas, seringas, material de manicure e pedicure, lâminas de barbear e depilar, tatuagens, piercings, procedimentos nosocomial entre outros) e relações sexuais desprotegidas, sendo esta última a via predominante (JIN *et al.*, 2016). A transmissão vertical também é importante e ocasiona uma evolução desfavorável, com maior chance de evolução para uma doença crônica devido a imaturidade do sistema imunológico (FRANCOIS-SOUQUIERE *et al.*, 2016; RIEDEL *et al.*, 2016) sendo causa frequente de disseminação do HBV em regiões de alta endemicidade. Outros líquidos orgânicos, como sêmen, secreção vaginal e leite materno podem igualmente conter o vírus e constituir fontes de infecção (BRASIL, 2016). A infecção pelo HBV também é condicional para o desenvolvimento da hepatite Delta, doença resultante da infecção pelo HDV e de grande impacto na região Amazônica (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

O HBV é um vírus predominantemente hepatotrópico, realiza sua replicação no núcleo, constituindo novas partículas virais, além de produzir partículas imunogênicas (subvirais) destituídas de capsídeo e de DNA que contribuem um escape imunológico do HBV (CRUZ *et al.*, 2017). Essas partículas subvirais correspondem à maior parte do HBsAg detectados na corrente sanguínea dos indivíduos infectados (GERLICH, 2013; LEE; AHN, 2011). Diante disso, os genossensores surgem como alternativas eficientes, minimizando a possibilidade de resultados falso-negativos pela própria característica do dispositivo (CASTRO *et al.*, 2014; SHAKOORI *et al.*, 2015; YAO *et al.*, 2014) em que o reconhecimento biológico se dá pela interação da sonda com sequências específicas do DNA viral (RIEDEL *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2015). Para o acompanhamento da infecção, utilizam-se marcadores séricos de imunidade (anti-HBs), avaliação da presença do HBsAg e quantificação do vírus na corrente sanguínea (carga viral/HBV-DNA). O diagnóstico pode ser realizado através de testes rápidos tais como Vikia HBsAg (Biomérieux, França), HBsAg teste rápido (Dolles, Brasil), Wama (Brasil) entre outros (CRUZ *et al.*, 2015) que identificam antígenos de superfície em amostras de soro, ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e testes ácidos nucleicos (NAT) (YANG *et al.*, 2014).

Na hepatite B aguda, o DNA viral pode ser detectado na circulação durante um período de um mês a partir da infecção, diminuindo os níveis de

cópias de genoma viral por mililitro após período de seis semanas (BRASIL, 2017). Picos de detecção do DNA do HBV e dos antígenos virais (HBeAg e HBsAg) acontecem após esse período. A presença dos antígenos virais é variável e, dependendo da fase da doença, eles poderão não ser detectados (ASPINALL *et al.*, 2011). Técnicas moleculares modernas são capazes de detectar uma carga viral abaixo de 100 cópias de genomas virais por mililitro de sangue (SILVA *et al.*, 2004). A infecção crônica é definida pela presença persistente do HBsAg no soro de um indivíduo por um período de seis meses ou mais (ASPINALL *et al.*, 2011). A hepatite B é uma doença imunoprevenível, cuja vacina é altamente eficiente e é disponibilizada pelo governo em postos de saúde, fazendo parte do calendário de vacinações infantis (BRASIL, 2016).

O HBV é extremamente resistente, sendo capaz de resistir a temperaturas e umidades extremas, podendo sobreviver quando armazenado por 15 anos à temperatura de -20°C, por 24 meses à temperatura de -80°C, por seis meses à temperatura ambiente e por sete dias à temperatura de 44°C (LELIE; REESINK; LUCAS, 1989). Sua virulência é maior que a do HCV e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WHO, 2017), assim dispositivos de diagnóstico rápidos, precoces e sensíveis capazes de detectarem precocemente a infecção são requeridos, contribuindo para a instituição imediata da terapêutica e controle da progressão da doença (XIAO *et al.*, 2016). Com o exposto, a presente tese propôs o desenvolvimento de genossensor capaz de detectar o HBV em amostras séricas, visando um teste rápido e eficaz para o diagnóstico e monitoramento da hepatite B.

1.4. Doenças autoimunes

O sistema imune tem a capacidade de discriminar os antígenos próprios dos não-próprios, caracterizando-se pelo reconhecimento pelos linfócitos de antígenos estranhos e tolerância imunológica (não responsividade) dos autoantígenos. A perda persistente dos mecanismos de controle responsáveis pela manutenção dessa tolerância culmina no estabelecimento das doenças autoimunes (GOODNOW *et al.*, 2005)

As doenças autoimunes (DAI) são classificadas em sistêmicas ou órgão-específicas e também podem ser categorizadas pelo tipo de resposta imune

responsável pelo início da doença, em humoral (auto-anticorpos) ou celular (linfócitos T auto-reativos) (VINUESA; COOK 2007). As doenças reumáticas, como o lúpus eritematoso sistêmico (LES), a artrite reumatoide (AR), a artrite idiopática juvenil (JIA), a síndrome de Sjögren, a esclerose sistêmica e a dermatopolimiosite são exemplos de DAI sistêmica. A *miastenia gravis*, o pênfigo, a anemia hemolítica auto-imune e a púrpura trombocitopênica idiopática pertencem ao grupo das DAI órgão-específicas. Diversos fatores estão envolvidos no desencadeamento dessas doenças, como predisposição genética, fatores hormonais, fatores ambientais e alterações imunológicas (ABBAS, 2007).

Dentre as doenças supracitadas, é sabido que a AR é uma doença de alto impacto socioeconômico, pois com a progressão da doença os pacientes desenvolvem restrições para realizar atividades diárias básicas e profissionais interferindo diretamente na qualidade de vida desses indivíduos (KOBAYSHY, 2008).

1.5. Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune crônica, em que há falhas no mecanismo de distinção entre os constituintes do organismo e antígenos, deflagrando a produção de células inflamatórias. O processo atinge principalmente as membranas sinoviais de diversas articulações, embora outros órgãos internos como pulmão, coração e rins de indivíduos geneticamente predispostos podem ser acometidos (VIJ; DENTON; NOTH, 2015). Apesar de ser uma doença crônica, o comprometimento articular e a presença de erosões ósseas ocorrem no início da doença e muitas vezes são irreversíveis, podendo ser evitados quando o diagnóstico é realizado de forma rápida e precisa. Assim, o tratamento com drogas anti-reumáticas modificadoras da doença é estabelecido, culminando com um melhor prognóstico. A AR acomete duas vezes mais mulheres do que os homens entre 50 e 70 anos, sendo o fator hormonal a justificativa provável pela predileção do gênero, mas pode ocorrer em qualquer idade. Atualmente, afeta 1,0% da população adulta no mundo (RINDFLEISCH; MULLER, 2005).

Os sintomas iniciais podem ser insidiosos e comuns a outras enfermidades como lúpus eritematoso sistêmico, osteoartrite, artrite séptica,

espondilite anquilosante e febre reumática. Por não apresentar sinal patognômico, a doença pode evoluir para um envolvimento articular grave, que determina dano estrutural, perda da função e limitações nas tarefas diárias dos pacientes (LEDINGHAM, 2016). Alguns critérios são utilizados para nortear o diagnóstico da AR tais como: rigidez matinal, artrite de três ou mais áreas com sinais de inflamação, nódulos reumatoides, fator reumatoide sérico positivo, alterações radiográficas, entre outras. A evolução da doença é progressiva e incapacitante sem o tratamento adequado e o prognóstico ruim quando há manifestações extra-articulares (MOK *et al.*, 2015).

O fator reumatoide é um marcador comumente dosado em casos suspeitos de AR, entretanto em exames sorológicos ainda são restritos, visto que a especificidade do mesmo é relativamente baixa (DOYLE *et al.*, 2015). O biomarcador consiste em um auto-anticorpo, mas comumente do tipo IgM, que se liga à porção Fc de anticorpos IgG, porém a imunodeteção desse anticorpo não confirma o diagnóstico da AR, pois ele é encontrado em outras doenças inflamatórias bem como em idosos saudáveis (WANG, M. *et al.*, 2016).

Dessa forma, o diagnóstico preciso da AR ocorre somente por meio da associação de uma série de sintomas e sinais característicos, além de exames laboratoriais e imaginológicos. Todavia, o diagnóstico precoce e a determinação do tratamento no estágio inicial podem modificar o curso da doença (LEDINGHAM, 2016). Além disso, os custos diretos e indiretos associados à doença, sobretudo a redução de produtividade e/ou perda de capacidade laboral têm consequências sócio-econômicas para o paciente, a família e a sociedade.

Diversos exames complementares tem sido utilizados para auxiliar na confirmação de um diagnóstico diferencial, determinação do prognóstico e no acompanhamento da doença, como por exemplo ensaios imunoenzimático, para identificar anticorpos anti-peptídeo citrulinado cíclico (GUO *et al.*, 2015), a dosagem da proteína C reativa para verificar o nível da inflamação (BAKTIR *et al.*, 2015), diagnósticos por imagens (REGENSBURGER *et al.*, 2015) e diagnóstico ultrassônico (DOHN *et al.*, 2013). Recentemente, foi descrito a identificação de um peptídeo mimético de uma região antigênica da proteína anidrase carbônica III (CAIII), o qual foi utilizado como antígeno específico capaz de auxiliar no diagnóstico da AR com alta sensibilidade e especificidade (ARAUJO *et al.*, 2015). Este autoantígeno se expressa na membrana sinovial de

pacientes com AR e seus autoanticorpos circulantes foram encontrados no sangue de pacientes (Figura 7), constituindo-se assim em uma nova e potente forma de diagnóstico da artrite reumatoide (ROBERT-PACHOT *et al.*, 2007).

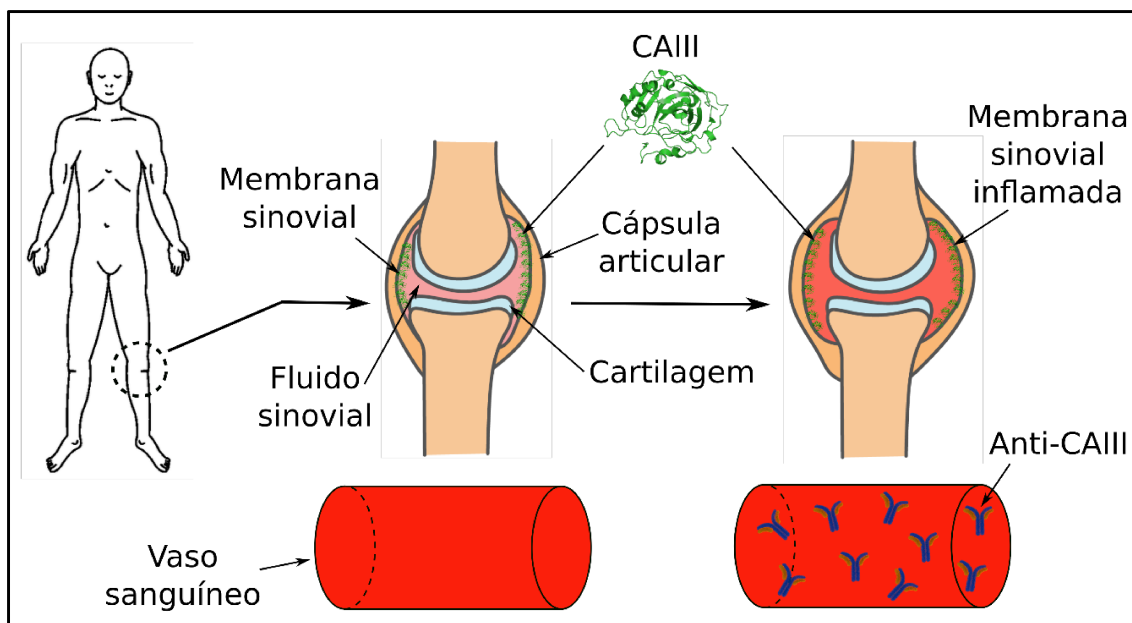


Figura 7: Esquema de uma articulação com e sem artrite reumatoide. Destaque para a presença da CAIII (em verde) na membrana sinovial, e do aparecimento do Anti-CAIII nos indivíduos acometidos com AR (autoria própria).

Devido à importância do diagnóstico precoce, é importante salientar que os testes existentes hoje para AR são demorados, requerem o uso de reagentes específicos 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 invasivos e desconfortáveis para os pacientes (ROJANASANTIKUL *et al.*, 2014). Portanto, é essencial o desenvolvimento de métodos rápidos, acessíveis, sensíveis, seletivos e de baixo custo para a detecção precoce e o monitoramento da doença em tempo real. Deste modo, os biossensores são dispositivos que apresentam as características adequadas para utilização no diagnóstico, uma vez que apresentam baixo custo de produção, rapidez de resposta, seletividade, alta sensibilidade para a detecção de doenças e a possibilidade do diagnóstico em amostras reais (ARAUJO *et al.*, 2016). Outra vantagem é o processo de

miniaturização do sistema, o que resulta na utilização de pequenas quantidades de amostra sangue.

Na presente tese, foi proposta a elaboração de um dispositivo sensibilizado com um peptídeo mimético capaz de realizar o diagnóstico precoce da AR 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, contribuindo com desenvolvimento de políticas e ações em saúde pública.

2. BIOSSENSORES

Os biossensores são dispositivos analíticos (TURNER, 2013) constituídos por um bioreceptor, imobilizado na superfície do eletrodo, que ao entrar em contato com o analito produz uma mudança físico-química (variações de calor, massa, índice de refração, corrente elétrica, potencial, resistência elétrica, capacitância, dentre outras) identificada por um transdutor (RAPP; GRUHL; LANGE, 2010) (Figura 8).

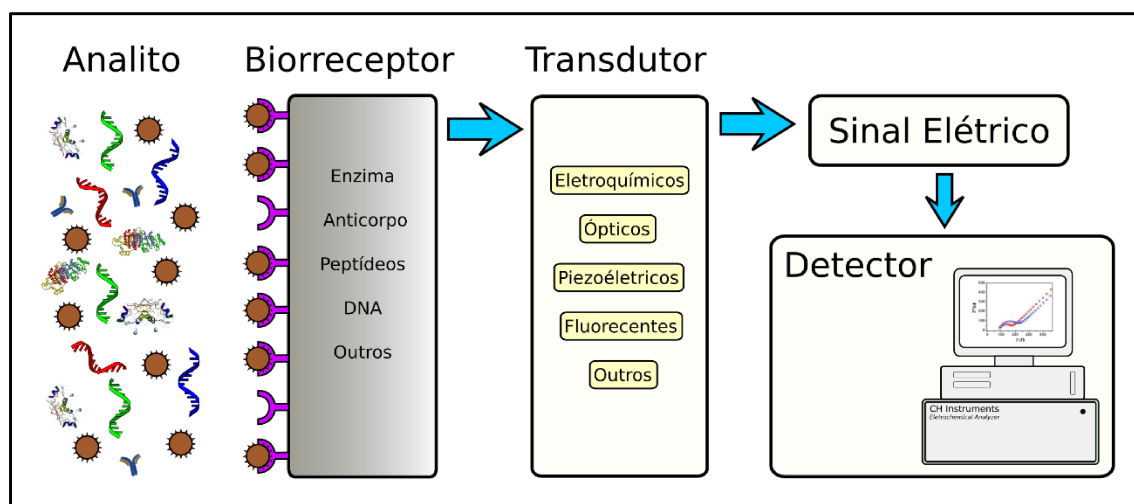


Figura 8: Representação esquemática do biossensor (autoria própria).

O sinal produzido pelo biossensor é proporcional à concentração do analito de interesse (KIMMEL *et al.*, 2012) sendo mensurável na interface do sistema de transdução, fornecendo assim informações analíticas quantitativas

ou semi-quantitativas, por meio de um receptor bioquímico que está em contato espacial direto com um elemento de transdução (MEHROTRA, 2016).

O termo biossensor foi primeiramente proposto por Cammann (CAMMANN, 1977), embora o primeiro instrumento bioanalítico, denominado eletrodo de enzima ter sido desenvolvido por Clark e Lyons (CLARK; LYONS, 1962) visando a detecção de glicose.

Desde então, o número e diversidade de aplicações dos biossensores cresceram, incluindo análises clínicas, diagnóstico de doenças, aplicações farmacêuticas (KURBANOGU *et al.*, 2016; VAN DEN KIEBOOM *et al.*, 2015), monitoramento agrícola por meio da detecção de agentes patogênicos, compostos pesticidas e corantes (RAMACHANDRAN *et al.*, 2015), monitoramento da qualidade de alimentos e processos industriais, verificando a presença de produtos, enzimas, ou subprodutos do processo (BARBERIS *et al.*, 2015; OMANOVIC-MIKLICANIN; VALZACCHI, 2017), monitoramentos militares, quando em ataques biológicos para identificação de microrganismos (KABESSA *et al.*, 2016; KOMAROVA *et al.*, 2015).

Vantagens como especificidade e sensibilidade, uso de pequena quantidade de amostra biológica, precisão, rapidez, potencial para portabilidade, miniaturização, simplicidade, baixo custo e automação fazem dos biossensores ferramentas promissoras às metodologias analíticas convencionais (WANG, J., 2006). São ferramentas muito úteis em regiões com recursos limitados ou de difícil acesso, devido ao perfil geográfico, para aplicação no diagnóstico de doenças, interferindo diretamente em estratégias de tratamento de pacientes e no prognóstico de doenças (SHARMA *et al.*, 2011).

Outra característica indispensável no desenvolvimento de um biossensor é tempo reduzido de resposta, o que possibilita a sua aplicação no monitoramento e detecção em tempo real da presença ou atividade de uma determinada substância (BURCU BAHADIR; KEMAL SEZGINTURK, 2015). Adicionalmente deve apresentar estabilidade, tanto operacional como de armazenamento, o que depende significativamente do método de imobilização escolhido para o bioreceptor (ALVES *et al.*, 2017).

O sistema de transdução também é relevante, e deve ser adequado ao sensor de acordo com a natureza da interação bioquímica com as espécies de interesse. O tipo de transdução de sinal está diretamente relacionado à

característica física ou química do produto gerado pelo componente biológico (LUONG; MALE; GLENNON, 2008).

Assim, os biossensores podem ser classificados de acordo com o tipo de transdução de sinal. São eles: eletroquímicos, ópticos, piezoelétricos, fluorescentes, quimioluminescentes, entre outros (VIGNESHVAR *et al.*, 2016). Durante o desenvolvimento deste trabalho foram empregados biossensores eletroquímicos e ópticos.

2.1. Classificação de acordo com o transdutor

2.1.1. Biossensores eletroquímicos

Biossensores eletroquímicos são aqueles em que o transdutor converte a resposta do evento de reconhecimento biológico em sinal elétrico mediante aplicação de um potencial/corrente, onde a presença do analito afeta a magnitude do sinal observável (IVNITSKII; KUROCHKIN; VARFOLOMEEV, 1991). Esses sinais elétricos são provenientes de processos oxidativos ou redutivos das espécies eletroativas por meio da transferência de elétrons na interface eletrodo-solução.

Esta associação entre as técnicas eletroquímicas e biomoléculas específicas possibilitou o desenvolvimento de tecnologias de reconhecimento molecular sensíveis e seletivas, com aplicações que incluem a análise clínica, ambiental, toxicológica, medicina do esporte (SADIK; ALUOCH; ZHOU, 2009), segurança alimentar, descoberta de novas drogas, controle de processos, segurança e defesa (TURNER, 2013).

Os biossensores eletroquímicos podem ser subdivididos de acordo com o princípio de funcionamento do transdutor: potenciométricos, condutimétricos, amperométricos e impedimétrico (LAI *et al.*, 2016).

Os sensores potenciométricos geram um potencial proporcional ao logaritmo da atividade da espécie ativa em relação ao eletrodo de referência (BRETT; BRETT, 1996). Nos condutimétricos, há uma mudança na condutância medida entre um par de eletrodos (SOLDATKIN *et al.*, 2013). Nos sensores amperométricos é medida a corrente produzida perante a aplicação de um potencial fixo mantido no eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo de

referência, a qual é proporcional à concentração da espécie eletroativa que sofre oxidação ou redução (LI *et al.*, 2011). Nos sensores impedimétricos são monitoradas alterações na capacitância e resistência à transferência de carga, que são causadas pela imobilização ou reconhecimento de materiais e que resultam em alterações na impedância (SINGHAL *et al.*, 2017).

Dentre as classificações dos biossensores eletroquímicos descritas acima, neste trabalho foram desenvolvidos sensores amperométricos e impedimétricos.

2.1.2. Biossensores ópticos

Os biossensores ópticos são outra importante subclasse de biossensores em que o transdutor óptico responde à incorporação/interação de moléculas sobre a superfície do eletrodo por meio de mudanças em suas propriedades ópticas, tais como a absorção, refletância ou fluorescência (PAHURKAR *et al.*, 2015). O produto da reação modifica a intensidade da luz emitida ou gera um sinal óptico detectável (DUTTA *et al.*, 2001).

Diversos sistemas ópticos são propostos para desenvolvimento de sensores e biossensores, incluindo elipsometria (QI *et al.*, 2009), espectroscopia (luminescência, fluorescência, Raman) (BENITO-PENA *et al.*, 2016; CHEN, H.; XIA, 2014; TRIA *et al.*, 2016) ressonância de plásmon de superfície (HALL; NGATIA; VAN DUYNE, 2011) e nanopartículas de ouro (CORDEIRO *et al.*, 2016)

Neste sentido, os sensores de ressonância de plasmons de superfície (SPR) cujo princípio de desenvolvimento envolve um feixe luminoso que atravessa um prisma e atinge a superfície de ouro, de forma a excitar os plasmons de superfície, são empregados em estudos de fenômenos de superfície (PIRIYA *et al.*, 2017). As vantagens da espectroscopia de SPR, como um dispositivo de biossensoriamento, está em sua capacidade de detecção em tempo real e *in vivo*, possibilidade de regeneração da superfície do sensor (reduzindo tempo e custo das análises), além de ser uma técnica não destrutiva (GUO 2012). As medidas são diretas, ou seja, não necessitam de marcadores químicos e/ou biológicos, além de tornar possível a detecção de analitos em meios biológicos complexos com alta especificidade e sensibilidade (BOKKEN *et al.*, 2003).

A literatura apresenta plataformas eletroquímicas (JOHARI-AHAR *et al.*, 2015; RAVALLI *et al.*, 2013) e ópticas (SAHA *et al.*, 2012) promissoras para o desenvolvimento de biossensores em que nanopartículas de ouro (AuNPs) foram utilizadas para modificar a superfície de eletrodos ou empregadas como um sensor colorimétrico. O princípio físico dos biossensores baseados em AuNPs está associado à oscilação dos elétrons na superfície das AuNPs, induzidos por um campo eletromagnético incidente (SHAWKY *et al.*, 2017).

A incidência de um campo elétrico homogêneo sobre a partícula metálica, resulta no deslocamento de elétrons desta partícula no sentido contrário ao campo elétrico da onda incidente. Este deslocamento das cargas promove a indução de um campo elétrico na partícula. O dipolo induzido promove o aparecimento de um campo elétrico restaurador na partícula, o qual tem a função de restaurar o equilíbrio dado pela distorção das cargas. Esta força restauradora e a indução do dipolo, quando acoplado, geram a ressonância plasmônica.

Nanopartículas pequenas (cerca de 15 nm) absorvem luz verde, o que corresponde a uma banda de absorção em ~ 520 nm no espectro da luz visível, refletindo a cor vermelha (Figura 9a). À medida que o tamanho das AuNPs aumenta, a luz não polariza as nanopartículas de forma homogênea, causando uma mudança de cor (vermelho para roxo) (Figura 9b) observadas durante a agregação de AuNPs (ZHANG *et al.*, 2011). Esta agregação é consequência da desestabilização das cargas mantidas previamente por íons citrato (KIMLING *et al.*, 2006).

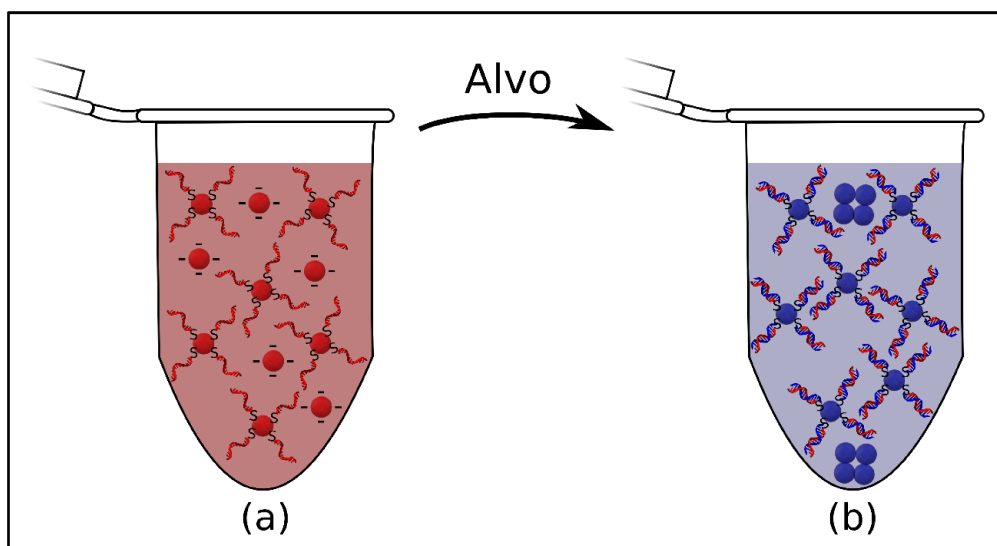


Figura 9: Esquema ilustrativo das nanopartículas de ouro. (a) solução coloidal de cor vermelha referente as AuNPs estabilizadas pelos íons citrato ou pela presença da sonda; (b) solução coloidal de cor roxa referente as AuNPs agregadas devido a interação sonda- analito (autoria própria).

A biossensibilidade colorimétrica dos dispositivos baseados em AuNPs justifica sua aplicação (ZHAO; BROOK; LI, 2008) e apresenta várias vantagens: biocompatibilidade com grupos funcionais de biomoléculas, área superficial elevada, excelente condutividade elétrica, baixo custo de produção, simplicidade, rapidez de resposta, seletividade, sensibilidade para a detecção de analitos, utilização de amostras reais em pequenas quantidades e elevada estabilidade (QUESADA-GONZALEZ; MERKOCI, 2015)

Os ensaios colorimétricos apresentam alta sensibilidade quando comparados aos ensaios de biodetecção tais como os que utilizam fluorescência (SAHA *et al.*, 2012). Assim, a mudança de cor provocada pela agregação AuNPs na presença do analito torna esta plataforma eficiente para a detecção colorimétrica baseada no índice de absorbância das AuNPs (análise quantitativa) e observação visual no momento exato da interação, dispensando instrumentos sofisticados utilizados durante análises qualitativas (CHEN, *et al.*, 2014).

2.2. Classificação de acordo com o elemento de reconhecimento

O elemento biológico imobilizado sobre a superfície do dispositivo analítico é o responsável pela sua especificidade. Assim os biossensores podem ser classificados quanto ao tipo de elemento de reconhecimento biológico em:

- ✓ Sensores enzimáticos (RATHEE *et al.*, 2016);
- ✓ Genossensores (DNA, RNA ou fragmentos ácidos nucleicos) (OROZCO *et al.*, 2016);
- ✓ Biossensores celulares e microbiológicos (MANKIEWICZ-BOCZEK *et al.*, 2015);
- ✓ Biossensores miméticos (ARAUJO *et al.*, 2016);
- ✓ Imunossensores (complexo antígeno-anticorpo) (JUSTINO; DUARTE; ROCHA-SANTOS, 2016).

2.2.1. Biossensores baseados em ácidos nucleicos

Os genossensores baseiam-se na detecção específica de sequências de ácidos nucléicos presentes em amostras complexas ou purificadas complementares às sequências que foram imobilizadas sobre o eletrodo (SILVA *et al.*, 2016). Em condições adequadas de temperatura, pH e força iônica, a sonda irá interagir com o alvo eventualmente presente na amostra analisada, processo denominado de hibridização, ou seja, a formação da dupla hélice entre as sequências complementares (LABUDA *et al.*, 2010)

A detecção direta da sequência-alvo se baseia na oxidação das bases nitrogenadas, sendo os resíduos das bases nitrogenadas purinas (guanina e adenina) os mais facilmente oxidáveis, possuindo potencial de oxidação de +0,9 V e +1,2 V, utilizando como referência o eletrodo Ag/AgCl, respectivamente (OLIVEIRA-BRETT *et al.*, 2004). Na detecção eletroquímica direta das bases nitrogenadas utilizando amostras complexas, essa faixa de potencial pode ser problemática, principalmente devido à presença de interferentes eletroativos. Dessa forma, a procura por novos indicadores eletroativos cujos potenciais de oxidação sejam menores é de grande importância para a construção dos biossensores (ALVES-BALVEDI *et al.*, 2016). Desta forma, os intercaladores de DNA eletroativos, tais como azul de metileno, complexos de rutênio e brometo de etídio (BALVEDI *et al.*, 2014; CASTRO *et al.*, 2014; MINASYAN *et al.*, 2006) são utilizados na detecção indireta da hibridização do DNA. A Figura 10 ilustra o

desenvolvimento de um genossensor eletroquímico a partir da modificação da superfície de um eletrodo empregado no presente estudo.

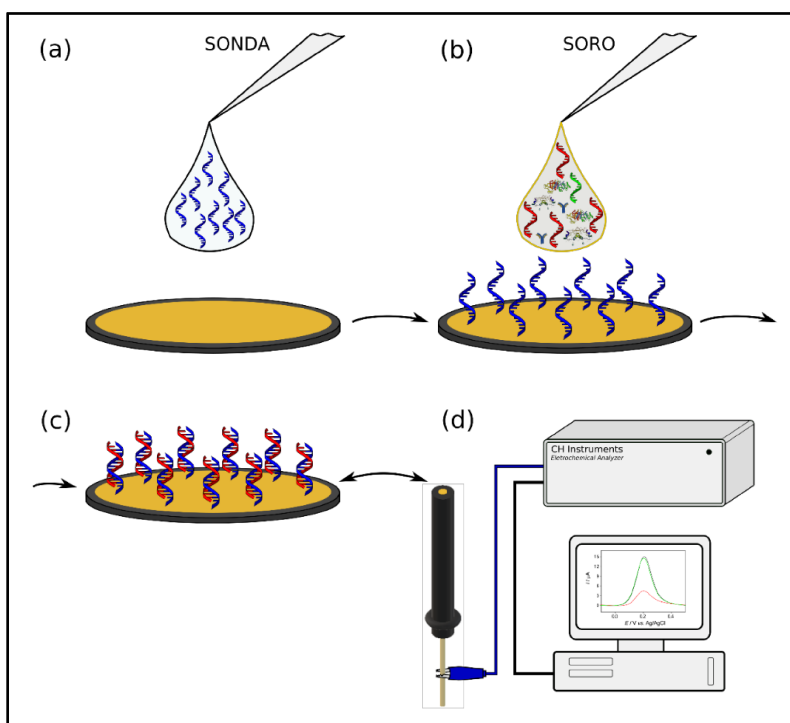


Figura 10: Esquema representativo do genossensor. (a) imobilização da sonda sobre a superfície do eletrodo de ouro; (b) adição de amostra do analito; (c) hibridização entre sonda:analito alvo; (d) detecção eletroquímica (autoria própria).

2.2.2. Biossensores baseados em peptídeos

Os imunossensores baseiam-se no reconhecimento específico entre antígeno e anticorpo em uma amostra complexa que converte a interação biológica em um sinal captado por um transdutor, como por exemplo eletroquímico (MOHAMMED; DESMULLIEZ, 2011) ou óptico (MATTOUSSI *et al.*, 2004), podendo ser utilizado em diagnósticos clínicos, monitoramento ambiental dentre outros (JUSTINO; DUARTE; ROCHA-SANTOS, 2016).

A imobilização orientada da sonda é fundamental quando se trabalha com a classe de imunossensores, devido à forma estrutural das biomoléculas (CONROY *et al.*, 2009). O anticorpo apresenta uma região constante, chamada de fragmento cristalizável (Fc) e uma região variável denominada de fragmento de ligação do antígeno (Fab, do inglês *Fragment Antigen-Binding*) (HALL; NGATIA; VAN DUYNE, 2011). Cada porção Fab apresenta um único sítio de

ligação do antígeno, chamado de epítopo e a sequência de aminoácidos presentes no epítopo confere ao anticorpo sua especificidade (ROTHER *et al.*, 2008).

Peptídeos são pequenos polímeros formados a partir de aminoácidos unidos por intermédio de ligações peptídicas, estabelecidas entre um grupo α -amino de um aminoácido e um grupo α -carboxílico de outro aminoácido (LI; CHO, 2012). Os peptídeos miméticos que imitam os epítomos, são biomarcadores de grande interesse (ARAUJO *et al.*, 2015), podendo ser empregados para o desenvolvimento de plataformas nanotecnológicas e biossensores miméticos (ALVES *et al.*, 2016; GOULART *et al.*, 2010). Estes bioelementos apresentam como característica grande afinidade pelo seu ligante imunogênico, são estáveis e fáceis de sintetizar (ROSSI *et al.*, 2014). O complexo peptídeo-alvo é mantido por interações como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, hidrofóbicas e/ou de Van der Waals (LADNER *et al.*, 2004).

A interação (sonda/alvo) altamente específica é convertida em um sinal eletroquímico como resposta de corrente elétrica, cuja magnitude está relacionada à presença e concentração do analito (JUSTINO; DUARTE; ROCHA-SANTOS, 2016) conferida pela sensibilidade do sensor. Neste caso, uma alteração na corrente de pico (ip) pode ser justificada pela formação do imunocomplexo, que disponibiliza mais aminoácidos passíveis de serem oxidados que provavelmente estão incluídos na sequência primária de anticorpos (ARAUJO *et al.*, 2016).

Os anticorpos ou peptídeos em geral podem ser imobilizados diretamente sobre a superfície de eletrodos, sobre matrizes poliméricas e nanomateriais, podendo ser estudados e caracterizados por uma diversidade de técnicas, que incluem os métodos eletroquímicos, espectroscópicos, microscópicos abordados nesse trabalho.

3. ELETRODOS DE TRABALHO E SUA CARACTERIZAÇÃO

3.1. Eletrodo de trabalho

A escolha do material que constitui o eletrodo de trabalho é essencial para o êxito na construção da plataforma analítica e sua aplicabilidade. Esta matriz deve apresentar propriedades inerentes tais como condutividade, resistência, estabilidade, área superficial adequada a aplicação de biomoléculas, capacidade de serem quimicamente modificados, versatilidade e ampla faixa de trabalho (FERREIRA *et al.*, 2014)

Na presente tese, eletrodos de ouro e eletrodos de grafite foram utilizados para o desenvolvimento dos genossensores e do biossensor mimético, respectivamente (Figuras 11 e 12).

O Eletrodo de Grafite (EG) foi fabricado artesanalmente a partir de discos de grafite de espessura entre 1 – 3 mm, previamente cortados de uma barra de grafite (Alfa Aesar, 99,9999%) de 6 mm de diâmetro.

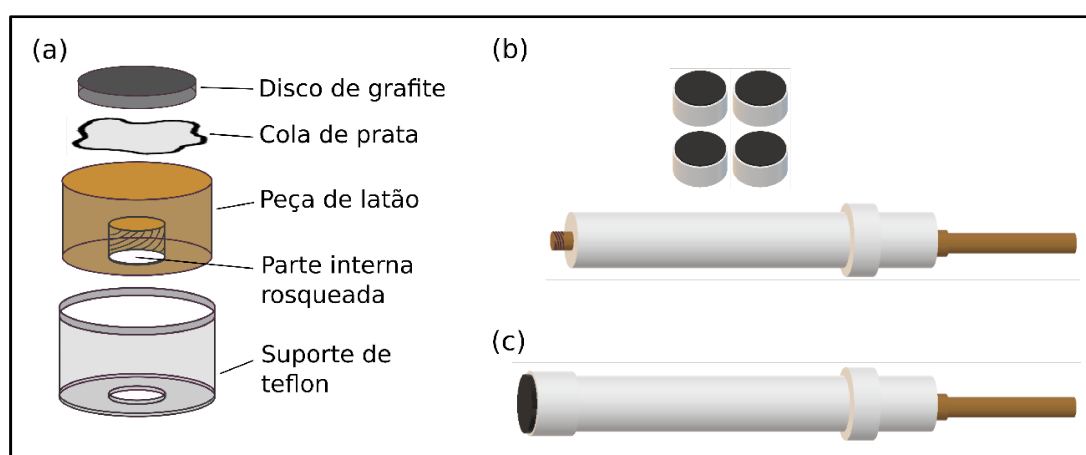


Figura 11: Representação esquemática de cada etapa de preparação dos eletrodos de grafite. (a) montagem artesanal do grafite no suporte rosqueável; (b) eletrodo de grafite pronto e base de latão; (c) eletrodo de grafite inserido na base de latão (autoria própria).

A vantagem da fabricação desses eletrodos está na possibilidade de serem desmontados após o uso, ou seja, os discos de grafite juntamente com a cola adesiva epóxi podem ser removidos, tornando o latão disponível para a colagem de novos discos de grafites, sendo assim, reutilizáveis. Outra vantagem está no baixo custo de fabricação dos mesmos quando comparados a aquisição de eletrodos comerciais. Assim, esse sistema de três eletrodos descritos foi utilizado em todas as análises realizadas nesse trabalho.

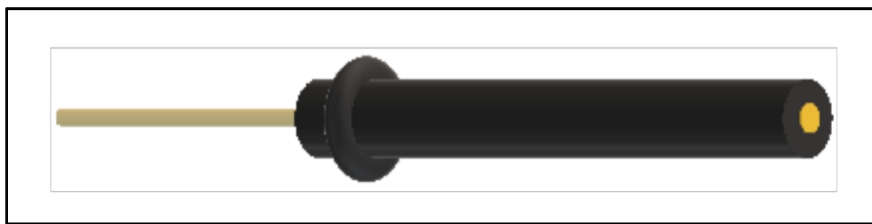


Figura 12: Representação esquemática do eletrodo de ouro (autoria própria).

As diferenças em trabalhar com eletrodos de ouro comerciais comparado ao eletrodo de grafite artesanal são: não exige etapa de montagem; possibilidade de comparar com outras técnicas que utilizam substrato de Au, como por exemplo a SPR, Microbalança de Cristal de Quartzo e AuNPs.

O procedimento de ciclagem em uma faixa de potencial pré-determinada tem como finalidade a remoção de impurezas que possam estar adsorvidas nas superfícies dos eletrodos e que sejam eletroativas na janela de potencial trabalhada, bem como permite obter um perfil eletroquímico dos mesmos. Esses parâmetros iniciais constituem a base para seleção dos eletrodos, vislumbrando potencializar ao máximo propriedades como condutividade, aumento de área superficial, modificações químicas, seletividade, aumento de transferência de elétrons.

3.2. Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM)

Modificações químicas na superfície dos eletrodos de trabalho são eficientes estratégias que convergem sinergicamente melhorando propriedades elétricas e mecânicas (KUILLA *et al.*, 2010), podendo levar a aumento de sensibilidade, uniformização da superfície, aumento na reprodutibilidade, disponibilização de grupos funcionais, formação de um ambiente favorável para a imobilização de biomoléculas (MELO *et al.*, 2011), entre outros.

Há diferentes métodos de modificação disponíveis para os diferentes tipos de eletrodos, os quais incluem a modificação química, modificação por eletroadsorção e a modificação por adsorção.

A modificação por adsorção foi empregada durante a construção das plataformas na qual o oligonucleotídeo foi imobilizado. Esta modificação envolve o contato de espécies eletroativas com a superfície do eletrodo por determinado

tempo para que ocorra interação, seja eletrostática, por forças de Van der Waals ou ligações de hidrogênio, na interface. Esse método pode ser irreversível ou reversível, podendo haver perdas do material por lixiviamento (IOST *et al.*, 2011).

A modificação por eletroadsorção envolve a aplicação de um potencial ao eletrodo, onde a quantidade do material depositado pode estar em função do tempo, nos métodos cronoamperométricos, ou em função do número de ciclos, nos métodos voltamétricos. Esse método é muito utilizado no desenvolvimento de polímeros em superfícies eletródicas (BRITO-MADURRO *et al.*, 2007), e foi empregado na construção do biossensor mimético nesta tese.

Os eletrodos podem ser modificados com diversos materiais, dentre eles, nanopartículas metálicas (RAVALLI *et al.*, 2013), nanomateriais a base de carbono (DA SILVA; MADURRO; MADURRO, 2017), polímeros condutores (FRANCO *et al.*, 2008) e/ou associações entre eles (FENG *et al.*, 2014; STANKOVICH *et al.*, 2006).

O óxido de grafeno (OG) e óxido de grafeno reduzido (OGR) são utilizados para modificar a superfície do eletrodo com intuito de oferecer ao sistema as propriedades inerentes desses nanomateriais a base de carbono (MAO; PU; CHEN, 2012).. Ambos fornecem uma ampla área superficial e são biocompatíveis, características almejadas para uma imobilização de sonda eficiente (DREYER *et al.*, 2010; ZHANG, *et al.*, 2014).

O OG é derivado do grafeno e apresenta propriedades ímpares, tais como afinidade por anéis aromático, natureza hidrofílica dos grupos funcionais presentes no plano basal e bordas que proporciona dispersibilidade em água (DREYER *et al.*, 2010). Além disso, possui biocompatibilidade e capacidade eletrocatalítica (LEE *et al.*, 2015) apesar da alta resistência a transferência de carga quando comparado ao grafeno, óxido de grafeno reduzido e grafite (DA SILVA; MADURRO; MADURRO, 2017).

O OGR apresenta como importante característica a alta condutividade elétrica, propriedade estabelecida pela restauração da nuvem π de elétrons em contrapartida, apresenta uma menor afinidade pela água devido a quantidade inferior de grupos oxigenados quando comparado ao OG (WANG, *et al.*, 2011). Essa propriedade de baixa solubilidade do OGR em água pode evitar que o mesmo seja lixiviado durante as etapas de lavagem, evitando a perda do nanomaterial.

Assim, mediante as características descritas anteriormente, estes nanomateriais a base de carbono foram selecionados para modificar o eletrodo de ouro. O OGR e o OG foram incorporados sobre a superfície do eletrodo por adsorção física para construção do biossensores para as Hepatites B e C, respectivamente.

Os sensores que fazem uso de eletrodos modificados com polímeros conjugados podem ser ferramentas de baixo custo na quantificação e qualificação de uma variedade de substâncias biológicas e químicas (RODRIGUES *et al.*, 2015). As principais vantagens dos polímeros aplicados em biossensoriamento são:

1. Podem ser aplicados para produção de sensores altamente sensíveis e específicos (FRANCO *et al.*, 2008);
2. Suas propriedades podem ser controladas a fim de formar uma camada sensotiva para uma ampla faixa de reposta de analitos diversificados (COSNIER; HOLZINGER, 2011);
3. Espécies biológicas podem ser imobilizadas produzindo biossensores, e neste caso pode ser usado para diagnóstico de doenças (MALHOTRA; CHAUBEY; SINGH, 2006);
4. Uma variedade de polímeros que podem ser utilizados (FERREIRA, *et al.*, 2011);
5. Com relação as propriedades eletroquímicas, apresentam alta condutividade elétrica, baixo potencial de ionização e alta afinidade eletrônica (BAGHERI; AYAZI; NADERI, 2013);
6. Há possibilidade de imobilização de espécies ativas, bloqueio de interferentes e aumento da transferência de elétrons, da sensibilidade e da seletividade dos eletrodos (CHILLAWAR; TADI; MOTGHARE, 2015).

Os polímeros condutores são uma classe de polímeros funcionais que apresentam uma configuração de ligações simples e duplas alternadas ao longo da cadeia, as quais são responsáveis pela condução eletrônica (ABRAHAO *et al.*, 2013).

Mediante o exposto, o monômero ácido 3-hidroxibenzóico foi escolhido para modificar a superfície do eletrodo de grafite (Figura 13a) na construção do

biossensor mimético no presente trabalho (Figura 13b). Este monômero foi explorado em trabalhos anteriores (FERREIRA, *et al.*, 2014; FERREIRA, *et al.*, 2011) e o mecanismo de eletropolimerização foi sugerido (FERREIRA, *et al.*, 2014) (Figura 14) demonstrando que o mesmo apresenta grande potencial para a imobilização de biomoléculas. O poli(ácido 3-hidroxibenzóico) é composto por uma cadeia de poliéter com grupos carboxílicos expostos (Figura 13c). Estes grupos funcionais permitem a interação com materiais biológicos promovendo assim uma imobilização efetiva, uma vez que esta etapa é primordial na construção do biossensor. No caso do peptídeo, que possui grupamentos aminas expostos, há uma interação eletrostática desses com os grupos carboxílicos presentes no filme polimérico (Figura 13d). A síntese do polímero foi realizada por polimerização eletroquímica (Figura 13b) sendo o material depositado diretamente na superfície do eletrodo a temperatura ambiente em meio ácido, utilizando a técnica de voltametria cíclica.

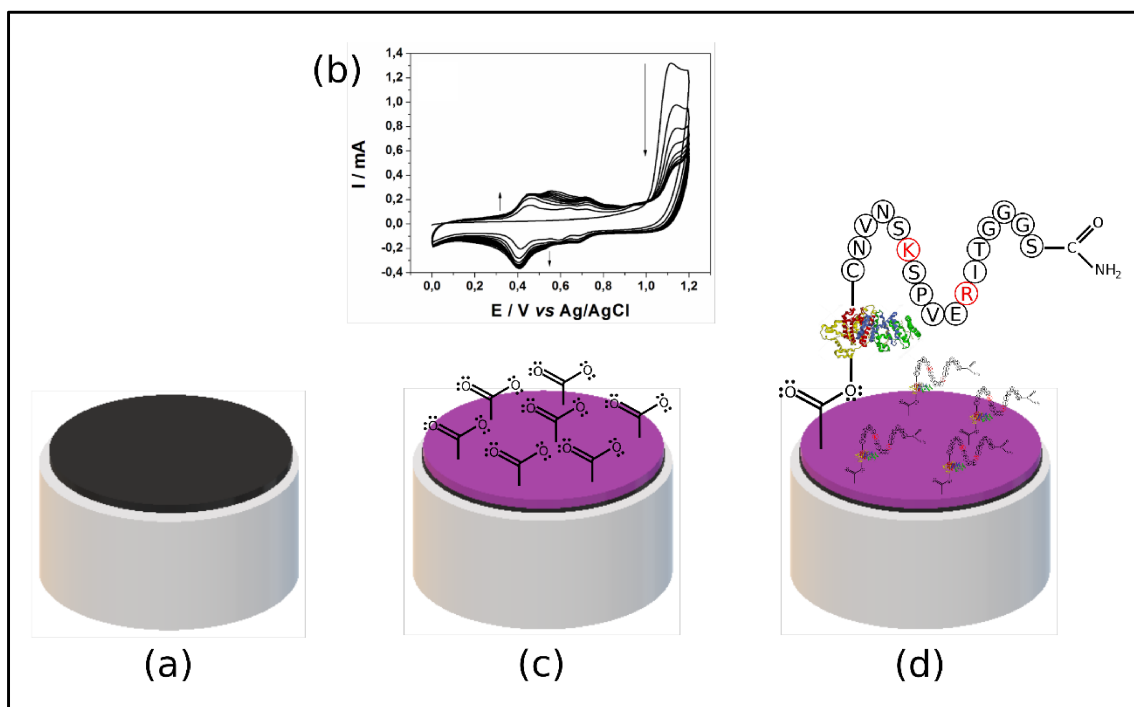


Figura 13: Representação do biossensor mimético construído sobre um eletrodo de grafite modificado com filme polimérico condutor. (a) eletrodo de grafite; (b) gráfico da eletropolimerização; (c) EQM com filme polimérico (cor roxa) e grupos carboxílicos expostos; (d) imobilização do peptídeo (autoria própria).

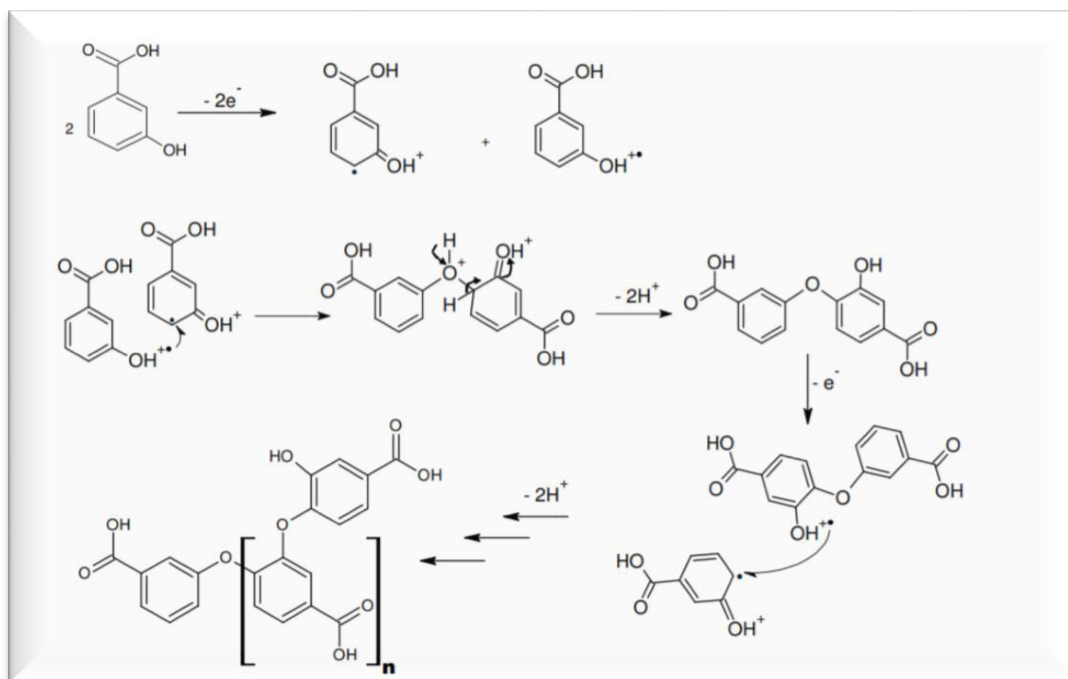


Figura 14: Representação do mecanismo de polimerização do ácido 3-hidroxibenzoico proposto por Ferreira et al., 2011 mostrando uma cadeia de poliéter com grupos carboxílicos expostos.

É possível realizar a modificação química do nanomaterial depositado sobre a superfície do eletrodo disponibilizando grupamentos funcionais na tentativa de fornecer um ambiente para a imobilização da biomolécula de forma mais orientada no EQM (WAN *et al.*, 2013). Para isso pode ser aplicado inicialmente agentes de ligação cruzada tais como EDC/NHS (Figura 15a e Figura 16) que ativam os grupos carboxilas, presentes no nanomaterial ou filme polimérico, e tornam esses grupos susceptíveis a realizarem ligações covalentes com os grupos amins presentes nas biomoléculas ou outro material modificador da superfície. O ligante etilenodiamina (ETD) (Figura 15b) foi empregado neste trabalho, ele substituiu o éster succinimídila disponibilizando grupos amina com intuito de orientar melhor a sonda de DNA na tentativa de realizar ligações covalentes culminando em uma ligação foforoamida.

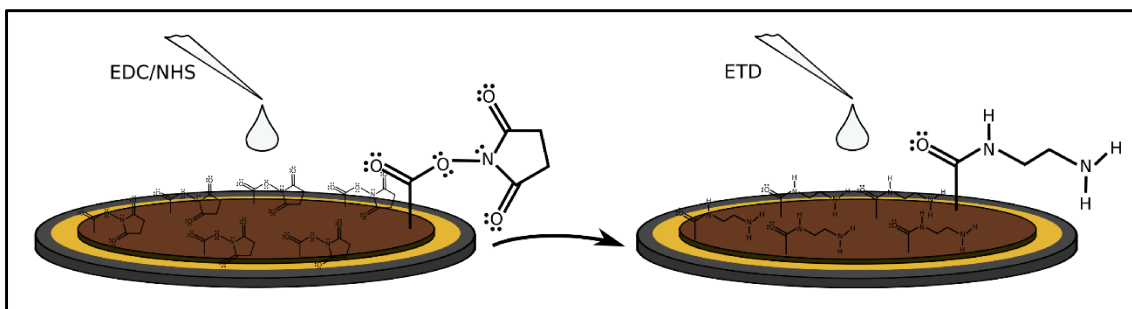


Figura 15: Representação eletrodo de Au (amarelo) com nanomaterial OG (marron) Au-GO. (a) ativação do OG; (b) disponibilização de grupos aminos na superfície do Au-OG (autoria própria).

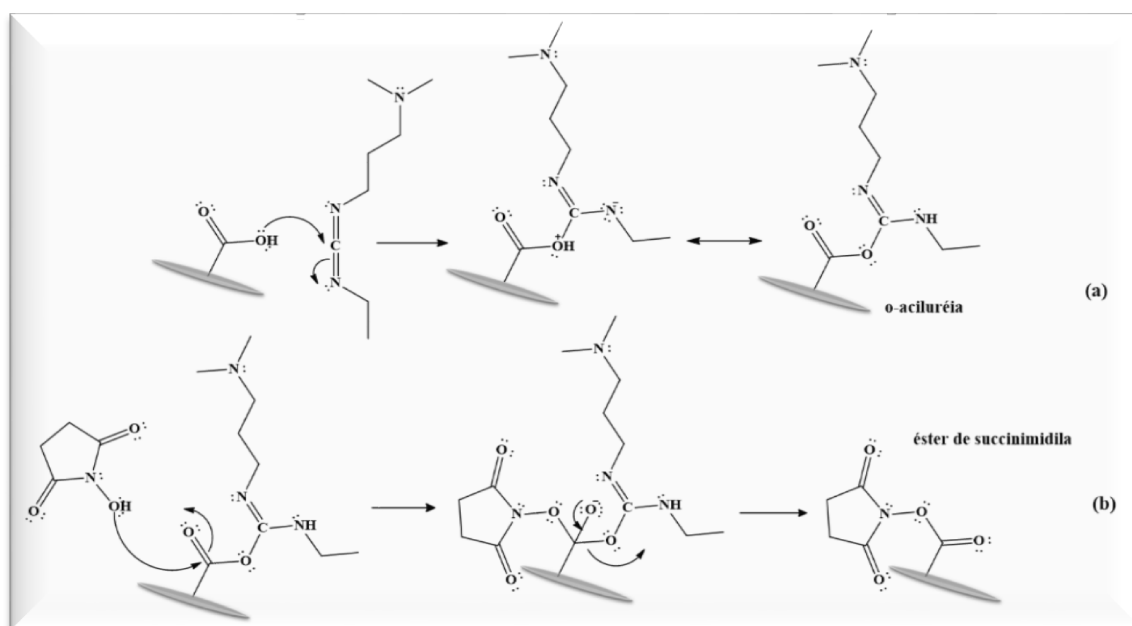


Figura 16: Esquema representativo do mecanismo de ativação de superfícies carboxiladas por adição de EDC-NHS.

3.3. Preparação dos eletrodos e da célula eletroquímica

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato CH *Instruments* modelo 760C (Figura 17a) e em um potenciostato/galvanostato da Autolab modelo PGSTAT302N e módulo FRA, Eco Chemie, Utecht (Figura 17b), do LAFIP/BIOSSENS. Ambos potenciostatos são acoplados a computadores contendo os *softwares* CHI, GPES e NOVA, respectivamente, para o controle dos parâmetros durante a realização dos experimentos e aquisição dos dados. As respostas eletroquímicas foram obtidas por meio das técnicas de voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e de impedância.

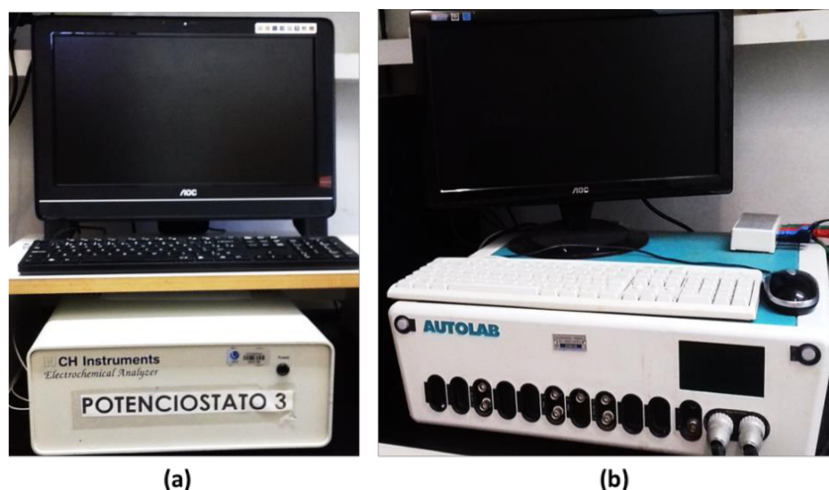


Figura 17: Imagem fotográfica do potenciostato CH *Instruments* modelo 760C (a) e potenciostato/galvanostato Autolab modelo PGSTAT302N (b) (autoria própria).

Para os testes eletroquímicos foi empregada uma célula eletroquímica (Figura 18) contendo três compartimentos sendo eles para:

1. Contra-eletrodo ou eletrodo auxiliar: minimiza os erros causados pela resistência da célula no controle do potencial do eletrodo de trabalho;
2. Eletrodo de trabalho: onde ocorrem as reações de interesse analítico;
3. Eletrodo de referência: usado para manter o potencial constante frente a uma diferença de potencial, devendo apresentar um potencial estável com o tempo e a temperatura, e que não seja alterado por pequenas perturbações.

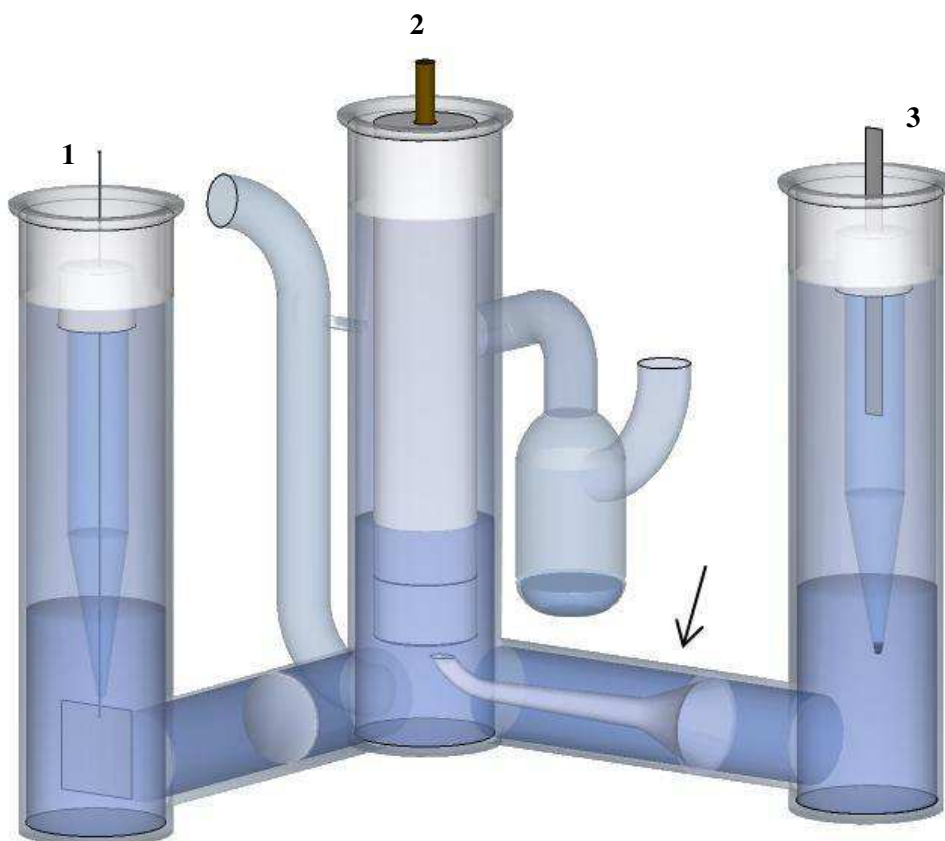


Figura 18: Esquema de uma célula eletroquímica de 3 eletrodos. Da esquerda para a direita, em cada compartimento: (1) eletrodo auxiliar, (2) eletrodo de trabalho e (3) eletrodo de referência. O detalhe indicado pela seta é um capilar de *Luggin*, cuja finalidade é a aproximação dos eletrodos de trabalho e referência visando diminuir a resistência ôhmica. (Fonte: Rodovalho, 2014).

4. TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

As técnicas potenciodinâmicas são grupos amplos e fundamentais para estudos eletroquímicos, em que um potencial dependente de tempo é aplicado a um sistema eletroquímico e a resposta de corrente é registrada. Neste grupo, destacam-se técnicas como a voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (VPD) (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008).

4.1. Voltametria cíclica

Na voltametria cíclica (VC) o potencial inicial (E_i) aplicado varia linearmente em um sentido até o potencial final (E_f), então, o sentido da varredura é invertido e o potencial volta ao valor inicial (E_i), provocando as reações redox na presença de espécies eletroativas existentes na solução ou na superfície do eletrodo.

Durante a aplicação do potencial, numa velocidade constante de varredura, o potenciostato registra a corrente em função do potencial aplicado, gerando assim um voltamograma cíclico no qual é mostrado na Figura 19.

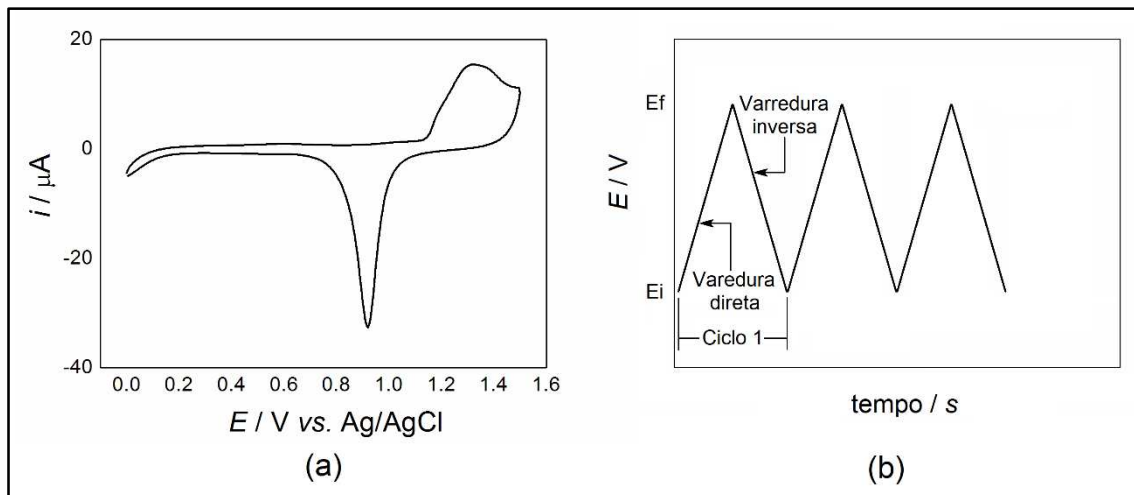


Figura 19: Representações gráficas da voltametria cíclica. (a) Voltamograma cíclico, com a corrente elétrica (i) em função do potencial (E); (b) Gráfico de potencial em função do tempo: em cada ciclo o potencial é variado de E_i a E_f , em seguida retornando a E_i . (Adaptado de KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).

A VC é uma técnica muito utilizada para efetuar e compreender processos que ocorrem na interface eletrodo/solução (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008; BRETT; BRETT, 1996).

Como os descritos abaixo:

- ✓ eletropolimerização;
- ✓ informações qualitativas no estudo de processos eletroquímicos;
- ✓ investigação de processos eletródicos;
- ✓ informações do potencial de oxidação ou redução associado a determinado processo;
- ✓ informações sobre o número de elétrons envolvidos; a taxa de transferência eletrônica e efeitos de adsorção;
- ✓ elucidação dos mecanismos de reações;
- ✓ informação sobre a ocorrência de reações químicas acopladas a processos adsortivos.

Embora não seja usualmente empregada em análises quantitativas, devido a uma menor sensibilidade; é indicada para o estudo do comportamento de pares redox (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).

4.2. Voltametria de pulso diferencial

A técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD) é mais sensível (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008) do que a VC porque minimiza a contribuição da corrente capacitiva, possibilitando um limite de detecção na ordem de 10^{-7} a 10^{-8} mol/L (BRETT; BRETT, 1996). Nessa técnica é aplicado um potencial de base crescente em uma região onde não ocorrem reações faradaicas.

Durante a VPD, pulsos de amplitude fixos são *sobrepostos* a uma rampa de potencial crescente (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015). Desta forma, a corrente é amostrada em dois intervalos de tempo (t_p) de cerca de 15 ms cada um: o primeiro intervalo antes da aplicação do pulso (E_s) e o segundo próximo do final do tempo de aplicação do pulso (E_p) de potencial sendo que a diferença entre esses valores é amplificada e registrada.

O valor final da corrente é a diferença entre os dois valores medidos. A resposta é dada na forma de um pico (BRETT; BRETT, 1996), sendo o valor resultante da corrente apresentado em um gráfico versus o potencial aplicado, gerando o voltamograma de pulso diferencial. A área do pico na forma de Gaussiana é diretamente proporcional à concentração de analito existente na solução (Figura 20).

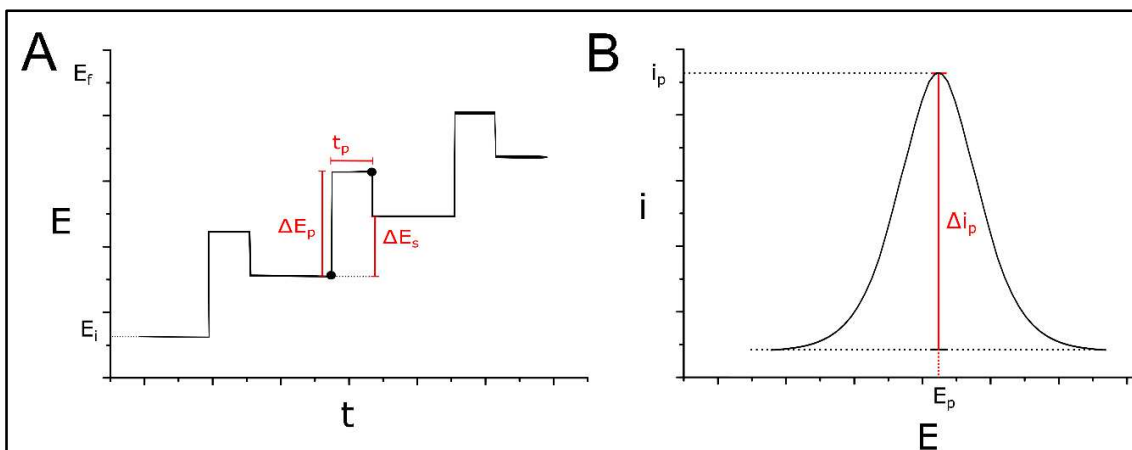


Figura 20. Representações gráficas da voltametria de pulso diferencial. A) Gráfico de potencial em função do tempo: são aplicados pulsos periódicos de potencial. Os pontos destacados representam a amostragem de corrente para um pulso. B) Voltamograma de pulso diferencial, com a corrente elétrica em função do potencial. Neste exemplo, é possível observar um pico de oxidação. E: potencial elétrico; i: corrente elétrica; ΔE_p : variação de potencial de pulso; ΔE_s : variação de potencial de amostragem; t_p : período de pulso; Δi_p : variação de corrente de pico. (Adaptado de KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).

4.3. Espectroscopia de impedância eletroquímica

A imobilização e/ou reconhecimento de biomateriais podem ser monitorados por meio de alterações na capacitância e resistência à transferência de carga culminando em alterações na impedância (BONANNI *et al.*, 2006).

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é uma técnica que mede a impedância de um sistema eletroquímico, como função da frequência de uma perturbação sinusoidal de pequena amplitude (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008). Entre as formas comuns de representação, destaca-se o diagrama de Nyquist, em que dados relativos a diversas frequências são representados em um plano complexo de impedância que extrapola os valores imaginários de impedância (Z'') em função dos valores reais (Z') (Figura 21).

Também é comumente utilizado o diagrama de Bode, em que são representados os valores absolutos de impedância e deslocamento de fase em função da frequência (BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008).

Os dados obtidos por esta técnica são analisados mediante um modelo teórico de circuito elétrico, que pode possuir elementos que representem a resistência da solução (R_s), resistência ao transporte de carga (R_{ct}), capacitância

entre o eletrodo e os íons carregados na solução (C_{dl}), e impedância devido à taxa de difusão do composto redox até o eletrodo (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015). A Figura 19 ilustra a representação dos dados impedimétricos pelo diagrama de Nyquist e um modelo de circuito equivalente.

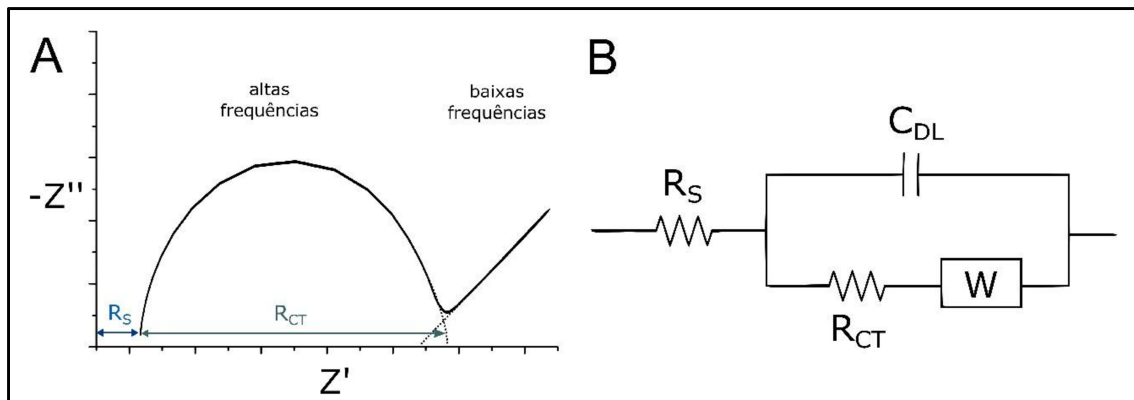


Figura 21: Espectroscopia de impedância eletroquímica. A) Diagrama de Nyquist, destacando as regiões de altas e baixas frequências, além dos cálculos de componentes da impedância. B) Circuito equivalente que serve de modelo para explicar os dados experimentais. R_S : resistência da solução; R_{CT} : resistência à transferência de carga; W : impedância de Warburg; C_{DL} : capacitância (Adaptado de BARD; INZELT; SCHOLZ, 2008).

5. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS

As técnicas microscópicas foram utilizadas para caracterizar morfológicamente os eletrodos de ouro (Figura 22a) e eletrodos de grafite (Figura 22b). Elas permitem uma visualização da superfície do eletrodo representativa de cada etapa de modificação, em que os aspectos como morfologia, rugosidade e espessura podem ser obtidos.

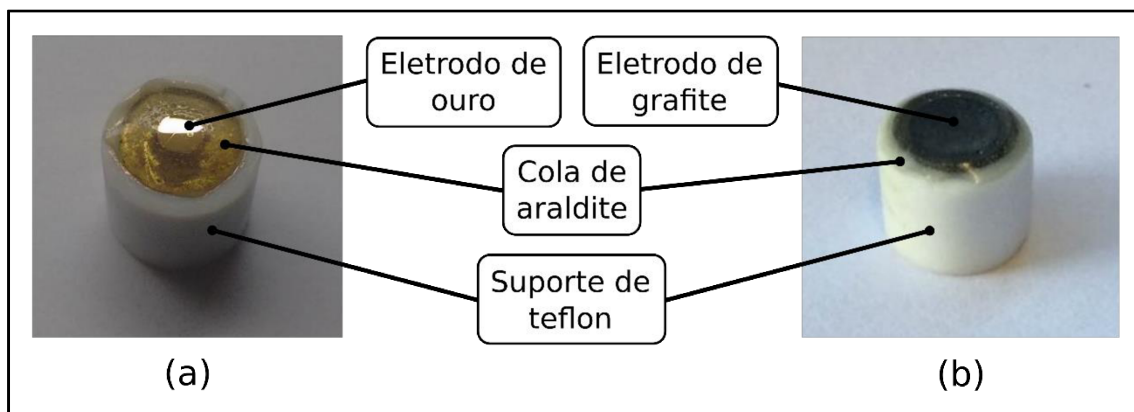


Figura 22: Imagem fotográfica: (a) eletrodo de ouro (24 quilates, $\varnothing = 3$ mm); (b) eletrodo de grafite ($\varnothing = 6$ mm).

5.1. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica que envolve a utilização de um feixe de elétrons de pequeno diâmetro que exploram a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitem o sinal do detector a uma tela catódica obtendo assim uma a ampliação de imagens com alta resolução e com aparência tridimensional obtidas por um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (Figura 23). Esta técnica permite caracterizar microestruturalmente diferentes tipos de materiais (CASTRO *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2017).



Figura 23: Imagem fotográfica do equipamento MEV. (a) Modelo Tescan modelo Vega3 LMU; (b) revestidor de pulverização Quorum 150 R.

5.2. Microscopia de força atômica

O princípio básico da microscopia de força atômica consiste na medição de forças ou interações entre uma ponteira e a superfície da amostra a partir de um microscópio de força atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscope*). Esta técnica permite uma caracterização em escala atômica, obtida por vários métodos simultâneos, tornando-a mais completo. A microscopia de força atômica fundamenta – se na varredura, próxima ou em contato, da superfície por uma uma fina sonda, de 100 a 200 μm de comprimento, aderida a uma ponteira (do inglês cantilever). Também é composto por um sistema piezoelétrico que controla a separação

ponteira/superfície e translações no mesmo plano, e um sistema de *feedback* que mantém a ponteira próxima da superfície (ALLISON *et al.*, 2010; COHEN; BITLER, 2008) A Figura 24 mostra imagem do equipamento AFM utilizado durante o estudo.

Em outras palavras, à medida que a ponteira se aproxima da amostra, há uma atração pela superfície devido às forças atrativas, que vão aumentando até que a distância seja tão próxima que promove a repulsão dos orbitais eletrônicos dos átomos e enfraquece a força atrativa, onde a ponteira se dobra afastando-se da amostra podendo, então, ser operados nos modos contato e não-contato. Como resposta a força de interação entre a ponta e a superfície, a mola é defletida (CHIORCEA-PAQUIM *et al.*, 2008).

Existem três modos diferentes de operação na técnica de AFM: o modo contato, o não contato e o contato intermitente.

1. Modo contato:

- a separação é da ordem de Å;
- a força de repulsão iônica permite que a topografia da superfície seja mapeada em alta resolução.

2. Modo não contato:

- cantilever se encontra mais afastado da amostra (cerca de centenas de ângstrons);
- a força de interação é atrativa;
- ocorre um aumento da frequência de oscilação da ponteira, aumentando assim a sensibilidade do microscópio;
- há detecção por forças de Van der Waals e forças eletrostáticas.

3. Modo de operação contato intermitente:

- ocorre de forma semelhante ao modo não contato;
- difere apenas na distância entre a ponteira e a amostra,
- a ponteira fica mais próxima da superfície da amostra.

A escolha do modo de operação mais adequado depende da natureza da amostra a ser avaliada (rigidez, rugosidade), tempo de varredura, objetivo do experimento, entre outros (TENCER *et al.*, 2007).

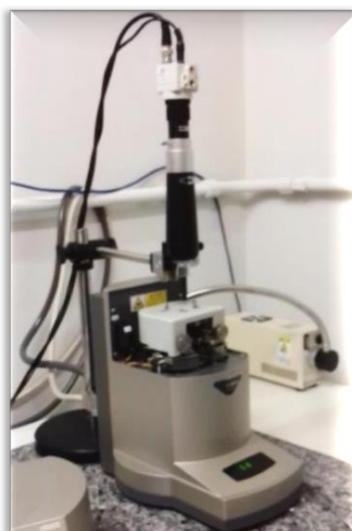


Figura 24: Imagem fotográfica AFM Shimadzu, modelo SPM 9600.

6. TÉCNICAS ÓPTICAS

6.1. Ressonância de plásmon de superfície (SPR)

A técnica de SPR permite a observação do efeito físico acumulativo das reações no eletrodo e não requer marcadores radioativos ou bioquímicos, possui um planejamento experimental flexível e promove análises automáticas e rápidas (GUO, 2012).

A configuração de Kretschman (1975) é a mais utilizada em espectroscopia de SPR, pois geralmente apresenta maior sensibilidade e resolução, consistindo em um disco de vidro recoberto com um fino filme metálico colocado diretamente sobre o prisma e os plásmons são excitados na interface externa.

Quando uma luz monocromática atinge uma interface contendo dois meios com constantes dielétricas diferentes, parte da luz é refletida e parte é refratada. O aumento do ângulo de incidência desta fonte luminosa acarreta aumento no ângulo de refração. Assim, quando a radiação advinda do laser incide sobre o prisma em um determinado ângulo e alcança a superfície metálica parte dessa energia é refratada, e os elétrons livres presentes no metal absorvem essa energia e oscilam gerando um campo eletromagnético evanescente, há então a formação de ondas de plásmons de superfície (OPS),

que se propagam paralelamente à interface do metal com o meio dielétrico. A radiação refletida captada por um detector é resultante da diferença entre a radiação incidente e a radiação absorvida pelos elétrons livres (SITU *et al.*, 2010).

Então o fenômeno de ressonância das OPS, é detectado pela atenuação da intensidade de radiação refletida, portanto condições máximas de ressonância da OPS são acompanhadas por um mínimo da reflexão interna total (Figura 17 a) (KRETSCHMANN *et al.*, 1975).

Quando a componente paralela do fóton de luz incidente é equivalente a constante de propagação da OPS ($k_x = k_{OPS}$) ocorrerá a transferência ressonante de energia da onda incidente para a OPS, ocorrendo a queda acentuada na refletância (Homola; Koudela 1999) (Figura 25b). Este fenômeno ocorre em ângulo específico, denominado ângulo de ressonância de plásmons de superfície (θ_{SPR}) ou ângulo de SPR crítico. Dessa forma, alterações nas proximidades da interface metal/ambiente promovem uma alteração nas condições de ressonância do sistema, como resultado, ocorre um deslocamento no θ_{SPR} (Figuras 25b e 25 c).

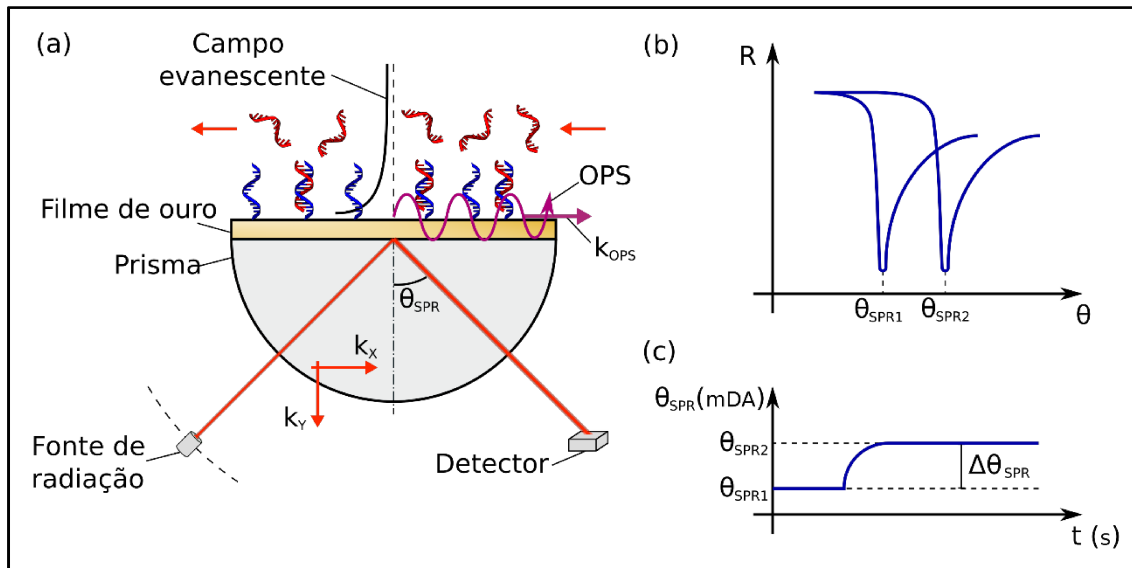


Figura 25: Representação esquemática da configuração de Kretschmann para SPR. O dielétrico em contato com o metal possibilita a transferência ressonante de energia da onda incidente para a OPS; (b) Curvas de refletância na ausência (θ_{SPR1}) e presença (θ_{SPR2}) de espécies na superfície do filme metálico; (c) Sensorgrama esquemático representativo da relação entre o θ_{SPR} (dado em mDA - miligraus de ângulo) e tempo durante a interação de espécies com a superfície do filme metálico (Adaptado de DAMOS *et al.*, 2004).

Ainda é possível correlacionar a mudança angular à quantidade de biomoléculas adsorvidas na superfície do sensor, sendo convertida em massa ($120 \text{ mDA} = 1 \text{ ng} / \text{mm}^2$) (STENBERG, 1991).

Na presente tese as medidas ópticas do ângulo de SPR (θSPR) foram obtidas para analisar as interações biomoleculares usando um Autolab Springle (*Eco Chemie*) (Figura 26). A parte óptica do sistema é composta de um prisma (Figura 18 b; 18c) e de um disco de vidro recoberto com um fino filme de ouro (Metrohm-Autolab) (Figura 26d). A fonte de radiação empregada foi o laser de He-Ne (com emissão em 670 nm) e a intensidade da luz refletida foi medida através de um detector de fotodiodo. As medidas foram iniciadas através da adição de solução, normalmente solução tampão para obtenção de uma linha de base. Uma vez obtida a linha de base, o bioelemento (sonda) é injetado sobre a superfície do disco e a sua imobilização é acompanhada através da mudança do θSPR em função do tempo de interação. O mesmo procedimento de lavagem e adição do alvo é realizado, e as etapas de funcionalização são observadas por meio do deslocamento no θSPR .

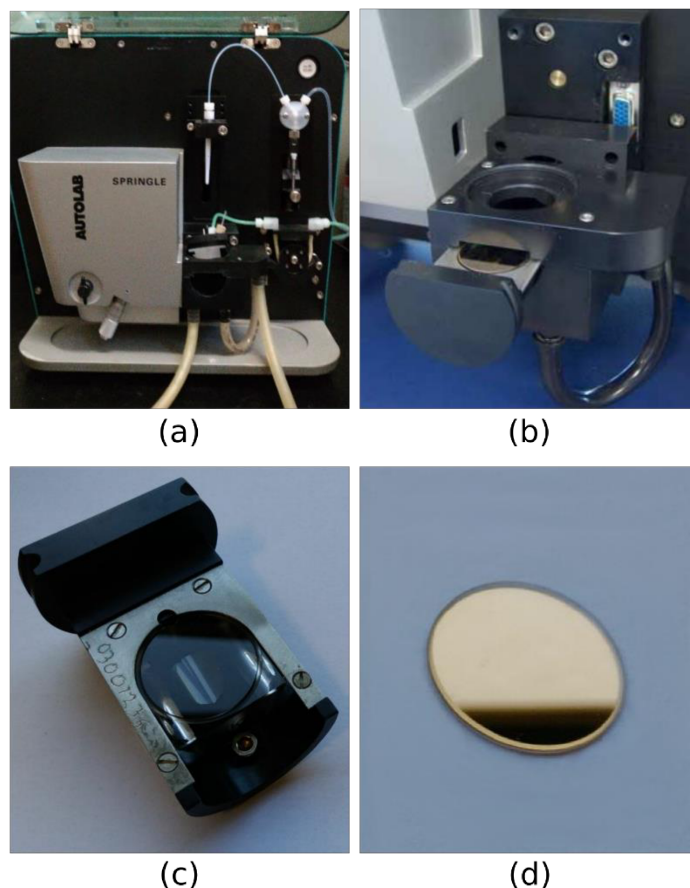


Figura 26: Imagem fotográfica do equipamento SPR. (a) Fotografia de um espectrômetro de SPR, modelo AUTOLAB SPRINGLE; (b) imagem do prisma acoplado ao equipamento; (c) imagem do prisma sendo possível visualizar a local de inserção do disco; (d) imagem do disco de vidro com filme de ouro (autoria própria).

6.2. Colorimétrica - Nanopartículas de ouro

A solução coloidal de AuNPs pode ser preparada por redução química a partir de uma solução contendo íons áuricos e é comumente estabilizada por íons citrato que impedem a agregação das nanopartículas conferindo estabilidade eletrostática (KIMLING *et al.*, 2006). As AuNPs são constituídas de átomos metálicos aglomerados na faixa de 1 a 1000 nm e apresentam características intermediárias de metais em escala macro e compostos moleculares (BRUST; KIELY, 2002). O tamanho da nanopartícula, responsável pela cor da solução, pode ser verificado utilizando a microscopia eletrônica de transmissão.

O sensor colorimétrico com base em AuNPs utilizados para detecção de microrganismos tem sido reportado na literatura, visando a interação de sondas de DNA ou RNA com analitos (EOM; LEE; HAN, 2012). Como opção eficiente/custo benefício à métodos de detecção de patogênicos convencionalmente utilizados que envolvem a fixação de corantes fluorescentes (PIRIYA *et al.*, 2017).

Na presente tese AuNPs foram sintetizadas usando o método de Turkevich-Frens modificado (KIMLING *et al.*, 2006) com tamanho de 15 a 20 nm de cor vermelho escuro, e foram estabilizadas por íons citrato sódio cujo pico de absorvância foi registrado em 520 nm.

Na presença da solução saturada de cloreto de sódio, as AuNPs são totalmente desestabilizadas devido a alteração da força iônica do meio, que desarranja a rede de íons citrato localizada em volta da AuNPs, consequentemente ocorre a agregação das nanopartículas, o tamanho se altera de 15 nm para 50 nm e a coloração torna-se roxa. Assim, o fenômeno pode ser monitorado visualmente e confirmado pela técnica espectroscopia de UV-VIS utilizada na caracterização das propriedades ópticas de AuNPs (TEICHROEB *et al.*, 2006).

6.3. Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível (UV/VIS)

A técnica espectroscópica de absorção na região do ultravioleta e visível (UV/VIS) fornece informações a respeito da estrutura e algumas propriedades dos materiais quando mensura a quantidade de luz absorvida pela amostra em um certo comprimento de onda. Assim a quantidade de luz absorvida quando um feixe de radiação monocromática atravessa o meio absorvente depende da concentração (c), do coeficiente de absorção molar (E) da espécie absorvente e do percurso óptico da radiação (l) (RODRIGUES *et al.*, 2014).

Na presente tese, a espectroscopia no UV-VIS foi utilizada para identificar e quantificar AuNPs, bem como observar a interação entre elas e as interações delas com as biomoléculas adicionadas ao meio através da mudanças ou alargamentos nos espectros de absorção.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. 6. ed. Philadelphia: Editora Saunders Company, 2007.

ABRAHAO, O.; MACHADO, A. E. H.; SILVA, F. F. S.; MADURRO, J. M.; DE CASTRO, C. M.; SONODA, M. T. Tyramine electropolymerization revisited by DFT and experimental study. **Journal of Molecular Structure**, v. 1037, p. 200-208, 2013.

ALLISON, D. P.; MORTENSEN, N. P.; SULLIVAN, C. J.; DOKTYCZ, M. J. Atomic force microscopy of biological samples. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, v. 2, n. 6, p. 618-34, 2010.

ALVES-BALVEDI, R. P.; CAETANO, L. P.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. Use of 3,3',5,5' tetramethylbenzidine as new electrochemical indicator of DNA hybridization and its application in genossensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 226-31, 2016.

ALVES, L. M.; CASTRO, A. C. H.; OLIVEIRA, S. M.; JÚNIOR, L. C. O.; GOULART, L. R.; BONETTI, A. M.; MACHADO, A. E. H.; UEIRA-VIEIRA, C.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. Development of a mimetic system for electrochemical detection of glutamate. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 20, n. 9, p. 2479-2489, 2016.

ALVES, R. D. F.; DA SILVA, A. G.; FERREIRA, L. F.; FRANCO, D. L. Synthesis and characterization of a material derived from 4-mercaptobenzoic acid: A novel platform for oligonucleotide immobilization. **Talanta**, v. 165, p. 69-75, 2017.

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.

ARAUJO, G. R.; VAZ, E. R.; FUJIMURA, P. T.; FONSECA, J. E.; DE LIMA, L. M.; CANHAO, H.; VENTURINI, G.; CARDOZO, K. H.; CARVALHO, V. M.; NAPIMOGA, M. H.; GOULART, L. R.; GONCALVES, J.; UEIRA-VIEIRA, C. Improved serological detection of rheumatoid arthritis: a highly antigenic mimotope of carbonic anhydrase III selected in a murine model by phage display. **Arthritis Research & Therapy**, v. 17, p. 168, 2015.

ASPINALL, E. J.; HAWKINS, G.; FRASER, A.; HUTCHINSON, S. J.; GOLDBERG, D. Hepatitis B prevention, diagnosis, treatment and care: a review. **Occupational Medicine (London)**, v. 61, n. 8, p. 531-40, 2011.

BAGHERI, H.; AYAZI, Z.; NADERI, M. Conductive polymer-based microextraction methods: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 767, p. 1-13, 2013.

BAKTIR, A. O.; SARLI, B.; CEBICCI, M. A.; SAGLAM, H.; DOGAN, Y.; DEMIRBAS, M.; SUTBEYAZ, S. T.; ARINC, H. Preclinical impairment of myocardial function in rheumatoid arthritis patients. Detection of myocardial strain by speckle tracking echocardiography. **Herz**, v. 40, n. 4, p. 669-74, 2015.

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.

BARBERIS, A.; SPISSU, Y.; FADDA, A.; AZARA, E.; BAZZU, G.; MARCEDDU, S.; ANGIONI, A.; SANNA, D.; SCHIRRA, M.; SERRA, P. A. Simultaneous amperometric detection of ascorbic acid and antioxidant capacity in orange, blueberry and kiwi juice, by a telemetric system coupled with a fullerene- or nanotubes-modified ascorbate subtractive biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 67, p. 214-23, 2015.

BARD, A. J.; INZELT, G.; SCHOLZ, F. **Electrochemical dictionary**. 1. Ed. Leipzig: Editora Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008.

BENITO-PENA, E.; VALDES, M. G.; GLAHN-MARTINEZ, B.; MORENO-BONDI, M. C. Fluorescence based fiber optic and planar waveguide biosensors. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 943, p. 17-40, 2016.

BOKKEN, G. C. A. M.; CORBEE, R. J.; VAN KNAPEN, F.; BERGWERFF, A. A. Immunochemical detection of Salmonella group B, D and E using an optical surface plasmon resonance biosensor. **Fems Microbiology Letters**, v. 222, n. 1, p. 75-82, 2003.

BONANNI, A.; ESPLANDIU, M. J.; PIVIDORI, M. I.; ALEGRET, S.; DEL VALLE, M. Impedimetric genosensors for the detection of DNA hybridization. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, n. 7, p. 1195-201, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico Hepatites Virais**. Brasília: BRASIL, 2016. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2016/59121/boletim_hepatites_05_08_2016_pdf_96185.pdf. Acesso em: 06 jul. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais**. Brasília: BRASIL, 2015. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2015/58551/manual_tecnico_hv_pdf_75405.pdf. Acesso em: 06 jul. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções**. Brasília: BRASIL, 2017. Disponível: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2016/59318/pcdt_hepatite_b_10_04_2017_web_pdf_15464.pdf. Acesso em: 06 jul. 2017.

BRASS, V.; MORADPOUR, D.; BLUM, H. E. Hepatitis C virus infection: in vivo and in vitro models. **Journal of Viral Hepatitis** v. 14 Suppl 1, p. 64-7, 2007.

BRETT, A. M. O.; BRETT, Christopher M. A. **Electroquímica – Princípios, Métodos e Aplicações**. 1. Ed. Editora Coimbra: Livraria Almedina, 1996.

BRITO-MADURRO, A. G.; FERREIRA, L. F.; VIEIRA, S. N.; ARIZA, R. G.; FILHO, L. R. G.; MADURRO, J. M. Immobilization of purine bases on a poly-4-aminophenol matrix. **Journal of Materials Science**, v. 42, n. 9, p. 3238-3243, 2007.

BRUST, M.; KIELY, C. J. Some recente advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 2, n. 202, p. 175-186, 2002.

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

CAMMANN, K. Bio-sensors based on ion-selective electrodes. **Fresenius' Zeitschrift for Analytische Chemie**, v. 287, n. 1, p. 1-9, 1977.

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.

CHEN, H.; XIA, Y. Compact hybrid (gold nanodendrite-quantum dots) assembly: plasmon enhanced fluorescence-based platform for small molecule sensing in solution. **Analytica Chimica**, v. 86, n. 22, p. 11062-9, 2014.

CHEN, W.-W.; GUO, Y.-M.; ZHENG, W.-S.; XIANYU, Y.-L.; WANG, Z.; JIANG, X.-Y. Recent Progress of Colorimetric Assays Based on Gold Nanoparticles for

Biomolecules. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 307-314, 2014.

CHILLAWAR, R. R.; TADI, K. K.; MOTGHARE, R. V. Voltammetric techniques at chemically modified electrodes. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 399-418, 2015.

CHIORCEA-PAQUIM, A. M.; PAULIUKAITE, R.; BRETT, C. M.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. AFM nanometer surface morphological study of in situ electropolymerized neutral red redox mediator oxysilane sol-gel encapsulated glucose oxidase electrochemical biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 2, p. 297-305, 2008.

CHOO, Q. L.; KUO, G.; WEINER, A. J.; OVERBY, L. R.; BRADLEY, D. W.; HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 359-62, 1989.

CHOO, Q. L.; WEINER, A. J.; OVERBY, L. R.; KUO, G.; HOUGHTON, M.; BRADLEY, D. W. Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. **British Medical Bulletin**, v. 46, n. 2, p. 423-41, 1990.

CIANCIO, A.; RIZZETTO, M. Chronic hepatitis D at a standstill: where do we go from here? Nature reviews, **Gastroenterology & hepatology**, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 68-71, 2014.

CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, n. 1, p. 29-45, 1962.

COHEN, S. R.; BITLER, A. Use of AFM in bio-related systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 13, n. 5, p. 316-325, 2008.

CONROY, P. J.; HEARTY, S.; LEONARD, P.; O'KENNEDY, R. J. Antibody production, design and use for biosensor-based applications.

Seminars in Cell & Developmental Biology v. 20, n. 1, p. 10-26, 2009.

CORDEIRO, M.; FERREIRA CARLOS, F.; PEDROSA, P.; LOPEZ, A.; BAPTISTA, P. V. Gold Nanoparticles for Diagnostics: Advances towards Points of Care. **Diagnostics (Basel)**, v. 6, n. 4, 2016.

COSNIER, S.; HOLZINGER, M. Electrosynthesized polymers for biosensing. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 5, p. 2146-56, 2011.

CRUZ, H. M.; SCALIONI LDE, P.; DE PAULA, V. S.; DA SILVA, E. F.; DO, O. K.; MILAGRES, F. A.; CRUZ, M. S.; BASTOS, F. I.; POLLO-FLORES, P.; LEAL, E.; MOTTA-CASTRO, A. R.; PILOTTO, J. H.; LEWIS-XIMENEZ, L. L.; LAMPE, E.; VILLAR, L. M. Evaluating HBsAg rapid test performance for different biological samples from low and high infection rate settings & populations. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, p. 548, 2015.

CRUZ, H. M.; SCALIONI, L. P.; PAULA, V. S.; MIGUEL, J. C.; O, K. M.; MILAGRES, F. A.; CRUZ, M. S.; BASTOS, F. I.; FLORES, P. P.; LEAL, E.; MOTTA-CASTRO, A. R.; LEWIS-XIMENEZ, L. L.; LAMPE, E.; VILLAR, L. M. Poor sensitivity of rapid tests for the detection of antibodies to the hepatitis B virus: implications for field studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 209-213, 2017.

DA SILVA, J. V.; MADURRO, A. G. B.; MADURRO, J. M. Modified electrode with reduced graphene oxide/poly(3-hydroxyphenylacetic acid): a new platform for oligonucleotide hybridization. **Journal of Solid State Electrochemistry**, 2017.

DAMOS F. S.; MENDES R. K.; KUBOTA L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970-979, 2004.

DE ALMEIDA, M. K.; DOS SANTOS, K. N.; FECURY, A. A.; DE OLIVEIRA, C. S.; FREITAS, A. S.; QUARESMA, J. A.; FUZII, H. T.; MARTINS, L. C. Prevalence of viral hepatitis B and C in riverside communities of the Tucuruí Dam, Para, Brazil.

Journal of Medical Virology, v. 84, n. 12, p. 1907-12, 2012.

DE CARVALHO-MELLO, I. M.; FILHO, J. E.; GOMES-GOUVEA, M. S.; DE MELLO MALTA, F.; DE QUEIROZ, A. T.; PINHO, J. R.; CARRILHO, F. J. Molecular evidence of horizontal transmission of hepatitis C virus within couples. **Journal of General Virology**, v. 91, n. Pt 3, p. 691-6, 2010.

DE MARTIN, E.; SENZOLO, M.; GAMBATO, M.; GERMANI, G.; VITALE, A.; RUSSO, F. R.; BURRA, P. Fibrosis progression and the pros and cons of antiviral therapy for hepatitis C virus recurrence after liver transplantation: a review. **Transplantation Proceedings** v. 42, n. 6, p. 2223-5, 2010.

DOHN, U. M.; TERSLEV, L.; SZKUDLAREK, M.; HANSEN, M. S.; HETLAND, M. L.; HANSEN, A.; MADSEN, O. R.; HASSELQUIST, M.; MOLLER, J.; OSTERGAARD, M. Detection, scoring and volume assessment of bone erosions by ultrasonography in rheumatoid arthritis: comparison with CT. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 72, n. 4, p. 530-4, 2013.

DOYLE, T. J.; PATEL, A. S.; HATABU, H.; NISHINO, M.; WU, G.; OSORIO, J. C.; GOLZARRI, M. F.; TRASLOSHEROS, A.; CHU, S. G.; FRITS, M. L.; IANNACCONE, C. K.; KOONTZ, D.; FUHRMAN, C.; WEINBLATT, M. E.; EL-CHEMALY, S. Y.; WASHKO, G. R.; HUNNINGHAKE, G. M.; CHOI, A. M.; DELLARIPA, P. F.; ODDIS, C. V.; SHADICK, N. A.; ASCHERMAN, D. P.; ROSAS, I. O. Detection of Rheumatoid Arthritis-Interstitial Lung Disease Is Enhanced by Serum Biomarkers. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 191, n. 12, p. 1403-12, 2015.

DREYER, D. R.; PARK, S.; BIELAWSKI, C. W.; RUOFF, R. S. The chemistry of graphene oxide. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 228-40, 2010.

DUTTA, S.; PADHYE, S.; NARAYANASWAMY, R.; PERSAUD, K. C. An optical biosensor employing tiron-immobilised polypyrrole films for estimating monophenolase activity in apple juice. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 4-5, p. 287-94, 2001.

E SILVA, T. D. S.; DE CASTRO, A. C. H.; DE REZENDE RODOVALHO, V.; MADURRO, J. M.; MADURRO, A. G. B. Development of electrochemical genosensor for MYCN oncogene detection using rhodamine B as electroactive label. **Journal of Solid State Electrochemistry**, 2016.

EOM, M.-S.; LEE, Y.-S.; HAN, M.-S. A Gold Nanoparticles-Based Colorimetric Assay for DNA-Binding Molecules Using Non-Cross-Linking Aggregation. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 33, n. 4, p. 1341-1344, 2012.

FENG, H.; WANG, B.; TAN, L.; CHEN, N.; WANG, N.; CHEN, B. Polypyrrole/hexadecylpyridinium chloride-modified graphite oxide composites: Fabrication, characterization, and application in supercapacitors. **Journal of Power Sources**, v. 246, p. 621-628, 2014.

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.

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields' Virology**. 5. ed. [S.l.]: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

FORTON, D. M.; KARAYIANNIS, P.; MAHMUD, N.; TAYLOR-ROBINSON, S. D.; THOMAS, H. C. Identification of unique hepatitis C virus quasispecies in the central nervous system and comparative analysis of internal translational efficiency of brain, liver, and serum variants. **Journal of Virology**, v. 78, n. 10, p. 5170-83, 2004.

FRANCO, D. L.; AFONSO, A. S.; VIEIRA, S. N.; FERREIRA, L. F.; GONÇALVES, R. A.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electric and morphologic properties. **Materials Chemistry and Physics**, v. 107, n. 2-3, p. 404-409, 2008.

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. **Infection, Genetics and Evolution - Journal** v. 39, p. 12-21, 2016.

FREIMAN, J. M.; TRAN, T. M.; SCHUMACHER, S. G.; WHITE, L. F.; ONGARELLO, S.; COHN, J.; EASTERBROOK, P. J.; LINAS, B. P.; DENKINGER, C. M. Hepatitis C Core Antigen Testing for Diagnosis of Hepatitis C Virus Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. **Annals of Internal Medicine**, v. 165, n. 5, p. 345-55, 2016.

GOODNOW, C. C.; SPRENT, J.; FAZEKAS DE ST GROTH, B.; VINUESA, C. G. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. **Nature**, v. 435, n. 7042, p. 590-7, 2005.

GOULART, L. R.; VIEIRA, C. U.; FRESCHI, A. P. P.; CAPPARELLI, F. E.; FUJIMURA, P. T.; ALMEIDA, J. F.; FERREIRA, L. F.; GOULART, I. M. B.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Biomarkers for Serum Diagnosis of Infectious Diseases and Their Potential Application in Novel Sensor Platforms. **Critical Reviews in Immunology**, v. 30, n. 2, p. 201-222, 2010.

GOWER, E.; ESTES, C.; BLACH, S.; RAZAVI-SHEARER, K.; RAZAVI, H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. **J Hepatologic**, v. 61, n. 1 Suppl, p. S45-57, 2014.

GUO, C. J.; LV, J. H.; NIU, D. S.; MA, T.; SUN, S. X.; LI, L. X.; ZHAO, X.; WU, L.; JIN, Q. H. Detection of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis patients undergoing total knee arthroplasty. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 3, p. 4410-4, 2015.

GUO, X. Surface plasmon resonance based biosensor technique: a review. **Journal Biophotonics**, v. 5, n. 7, p. 483-501, 2012.

HADZIYANNIS, S. Review: hepatitis delta. **Journal of gastroenterology and Hepatology**, [S.l.], v. 12, n. 4, p. 289-298, 1997.

HALL, W. P.; NGATIA, S. N.; VAN DUYNE, R. P. LSPR Biosensor Signal Enhancement Using Nanoparticle-Antibody Conjugates. **The Journal of Physical Chemistry C Nanomater Interfaces**, v. 115, n. 5, p. 1410-1414, 2011.

HEIAT, M.; RANJBAR, R.; ALAVIAN, S. M. Classical and modern approaches used for viral hepatitis diagnosis. **Hepatitis Monthly**, v. 14, n. 4, p. e17632, 2014.

IOST, R. M.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G.; NANTES, I. L.; CASELI, L.; CRESPILO, F. N. Strategies of Nano-Manipulation for Application in Electrochemical Biosensors. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 6, n. 7, p. 2965-2997, 2011.

IVNITSKII, D. M.; KUROCHKIN, I. N.; VARFOLOMEEV, S. D. Electrochemical Biosensors - Review. **Journal of Analytical Chemistry of the Ussr**, v. 46, n. 8, p. 1059-1072, 1991.

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.

JUSTINO, C. I.; DUARTE, A. C.; ROCHA-SANTOS, T. A. Immunosensors in Clinical Laboratory Diagnostics. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 73, p. 65-108, 2016.

KABESSA, Y.; EYAL, O.; BAR-ON, O.; KOROUA, V.; YAGUR-KROLL, S.; BELKIN, S.; AGRANAT, A. J. Standoff detection of explosives and buried landmines using fluorescent bacterial sensor cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, p. 784-8, 2016.

KANWAL, F.; EL-SERAG, H. B.; ROSS, D. Surveillance for hepatocellular carcinoma: can we focus on the mission? **Clinical Gastroenterol Hepatologic**, v. 13, n. 4, p. 805-7, 2015.

KARUNAKARAN, C.; RAJKUMAR, R.; BHARGAVA, K. Introduction to Biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, p. 1-68, 2015.

KIMLING, J.; MAIER, M.; OKENVE, B.; KOTAIDIS, V.; BALLOT, H.; PLECH, A. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 32, p. 15700-15707, 2006.

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

KOBAYASHI, S.; MOMOHARA, S.; KAMATANI, N.; OKAMOTO, H. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of environmental factors. **The FEBS Journal**, v. 275, n. 18, p. 4456-62, 2008.

KOMAROVA, N. V.; ANDRIANOVA, M. S.; GUBANOVA, O. V.; KUZNETSOV, E. V.; KUZNETSOV, A. E. Development of a novel enzymatic biosensor based on an ion-selective field effect transistor for the detection of explosives. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 221, p. 1017-1026, 2015.

KRETSCHMANN E.; KRÖGER E. Reflection and transmission of light by a rough surface, including results for surface-plasmon effects. **Journal of the Optical Society of America**, v. 65, n 2, p. 150-154, 1975.

KUIKEN, C.; SIMMONDS, P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. **Methods in Molecular Biology**, v. 510, p. 33-53, 2009.

KUILLA, T.; BHADRA, S.; YAO, D.; KIM, N. H.; BOSE, S.; LEE, J. H. Recent advances in graphene based polymer composites. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 11, p. 1350-1375, 2010.

KURBANOGU, S.; DOGAN-TOPAL, B.; RODRIGUEZ, E. P.; BOZAL-PALABIYIK, B.; OZKAN, S. A.; USLU, B. Advances in electrochemical DNA biosensors and their interaction mechanism with pharmaceuticals. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 775, p. 8-26, 2016.

LABUDA, J.; BRETT, A. M. O.; EVTUGYN, G.; FOJTA, M.; MASCINI, M.; OZSOZ, M.; PALCHETTI, I.; PALEČEK, E.; WANG, J. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n. 5, 2010.

LADNER, R. C.; SATO, A. K.; GORZELANY, J.; DE SOUZA, M. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 12, p. 525-529, 2004.

LAI, J.; YI, Y.; ZHU, P.; SHEN, J.; WU, K.; ZHANG, L.; LIU, J. Polyaniline-based glucose biosensor: A review. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 782, p. 138-153, 2016.

LEDINGHAM, J. M. Importance of early detection and referral of rheumatoid arthritis. **BMJ Journals**, v. 353, p. i2172, 2016.

LEE, S. B.; LEE, S. M.; PARK, N. I.; LEE, S.; CHUNG, D. W. Preparation and characterization of conducting polymer nanocomposite with partially reduced graphene oxide. **Synthetic Metals**, v. 201, p. 61-66, 2015.

LEMON, S. M. Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis, and prevention. **Clinical Chemistry**, [S.l.], v. 43, n. 8, p. 1494-9, 1997.

LI, S. C.; CHEN, J. H.; CAO, H.; YAO, D. S.; LIU, D. L. Amperometric biosensor for aflatoxin B1 based on aflatoxin-oxidase immobilized on multiwalled carbon nanotubes. **Food Control**, v. 22, n. 1, p. 43-49, 2011.

LI, Z. J.; CHO, C. H. Peptides as targeting probes against tumor vasculature for diagnosis and drug delivery. **Journal of Translational Medicine**, v. 10 Suppl 1, p. S1, 2012.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 688-700, 2013.

LUONG, J. H.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. Biosensor technology: technology push versus market pull. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 5, p. 492-500, 2008.

LYRA, A. C.; FAN, X.; DI BISCEGLIE, A. M. Molecular biology and clinical implication of hepatitis C virus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 5, p. 691-5, 2004.

MALHOTRA, B. D.; CHAUBEY, A.; SINGH, S. P. Prospects of conducting polymers in biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 578, n. 1, p. 59-74, 2006.

MANDELL, G.; BENNETT, J.; DOLIN, R. **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**. 7 ed., v. 1. Philadelphia, United States of America: Editora Elsevier, 2010.

MANKIEWICZ-BOCZEK, J.; KARWACIAK, I.; RATAJEWSKI, M.; GAGALA, I.; JURCZAK, T.; ZALEWSKI, M.; PULASKI, L. Application of cellular biosensors for detection of atypical toxic bioactivity in microcystin-containing cyanobacterial extracts. **Aquatic Toxicology**, v. 168, p. 1-10, 2015.

MAO, S.; PU, H.; CHEN, J. Graphene oxide and its reduction: modeling and experimental progress. **RSC Advances**, v. 2, n. 7, p. 2643, 2012.

MASHHADIZADEH, M. H.; TALEMI, R. P. Synergistic effect of magnetite and gold nanoparticles onto the response of a label-free impedimetric hepatitis B virus DNA biosensor. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 59, p. 773-81, 2016.

MATTOUSSI, H.; MEDINTZ, I.; CLAPP, A.; GOLDMAN, E.; JAISWAL, J.; SIMON, S.; MAURO, J. Luminescent quantum dot-bioconjugates in immunoassays, FRET, biosensing, and imaging applications. **Journal of the Association for Laboratory Automation**, v. 9, n. 1, p. 28-32, 2004.

MEHROTRA, P. Biosensors and their applications - A review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, n. 2, p. 153-9, 2016.

MELO, E. I.; FRANCO, D. L.; AFONSO, A. S.; REZENDE, H. C.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M.; COELHO, N. M. M. A Biosensor Using Poly(4-Aminophenol)/Acetylcholinesterase Modified Graphite Electrode for the Detection of Dichlorvos. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 6, p. 1217-1222, 2011.

MINASYAN, S. H.; TAVADYAN, L. A.; ANTONYAN, A. P.; DAVTYAN, H. G.; PARSADANYAN, M. A.; VARDEVANYAN, P. O. Differential pulse voltammetric studies of ethidium bromide binding to DNA. **Bioelectrochemistry**, v. 68, n. 1, p. 48-55, 2006.

MOHAMMED, M. I.; DESMULLIEZ, M. P. Lab-on-a-chip based immunosensor principles and technologies for the detection of cardiac biomarkers: a review. **Lab on a Chip - Journals**, v. 11, n. 4, p. 569-95, 2011.

MOHD HANAFIAH, K.; GROEGER, J.; FLAXMAN, A. D.; WIERSMA, S. T. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. **Hepatology**, v. 57, n. 4, p. 1333-42, 2013.

MORADPOUR, D.; BLUM, H. E. A primer on the molecular virology of hepatitis C. **Liver International**, v. 24, n. 6, p. 519-25, 2004.

MUNIR, S.; SALEEM, S.; IDREES, M.; TARIQ, A.; BUTT, S.; RAUFF, B.; HUSSAIN, A.; BADAR, S.; NAUDHANI, M.; FATIMA, Z.; ALI, M.; ALI, L.; AKRAM, M.; AFTAB, M.; KHUBAIB, B.; AWAN, Z. Hepatitis C treatment: current and future perspectives. **Virologic Journal**, v. 7, p. 296, 2010.

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

OLIVEIRA, C. S. F. D.; SILVA, A. V. E.; SANTOS, K. N. D.; FECURY, A. A.; ALMEIDA, M. K. C. D.; FERNANDES, A. P.; COSTA, C. A. D.; FREITAS, A. S.; CORVELO, T. C. D. O.; MARTINS, L. C. Hepatitis B and C virus infection among Brazilian Amazon riparians. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 546-550, 2011.

OMANOVIC-MIKLICANIN, E.; VALZACCHI, S. Development of new chemiluminescence biosensors for determination of biogenic amines in meat. **Food Chemistry**, v. 235, p. 98-103, 2017.

OROZCO, J.; VILLA, E.; MANES, C. L.; MEDLIN, L. K.; GUILLEBAULT, D. Electrochemical RNA genosensors for toxic algal species: enhancing selectivity and sensitivity. **Talanta**, v. 161, p. 560-566, 2016.

OTT, J. J.; STEVENS, G. A.; GROEGER, J.; WIERSMA, S. T. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. **Vaccine**, v. 30, n. 12, p. 2212-9, 2012.

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.

PIRIYA, V. S. A.; JOSEPH, P.; DANIEL, S. C. G. K.; LAKSHMANAN, S.; KINOSHITA, T.; MUTHUSAMY, S. Colorimetric sensors for rapid detection of various analytes. **Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications**, v. 78, p. 1231-1245, 2017.

QI, C.; ZHU, W.; NIU, Y.; ZHANG, H. G.; ZHU, G. Y.; MENG, Y. H.; CHEN, S.; JIN, G. Detection of hepatitis B virus markers using a biosensor based on imaging ellipsometry. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 16, n. 11, p. 822-32, 2009.

QUESADA-GONZALEZ, D.; MERKOCI, A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 73, p. 47-63, 2015.

RAMACHANDRAN, R.; MANI, V.; CHEN, S. M.; KUMAR, G. G.; GOVINDASAMY, M. Recent Developments in Electrode materials and Methods for Pesticide Analysis - An overview. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 10, n. 1, p. 859-869, 2015.

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. 2403-12, 2010.

RATHEE, K.; DHULL, V.; DHULL, R.; SINGH, S. Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 5, p. 35-54, 2016.

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.

REGENSBURGER, A.; RECH, J.; ENGLBRECHT, M.; FINZEL, S.; KRAUS, S.; HECHT, K.; KLEYER, A.; HASCHKA, J.; HUEBER, A. J.; CAVALLARO, A.; SCHETT, G.; FAUSTINI, F. A comparative analysis of magnetic resonance imaging and high-resolution peripheral quantitative computed tomography of the hand for the detection of erosion repair in rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 54, n. 9, p. 1573-81, 2015.

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. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 272-9, 2016.

RINDFLEISCH, J. A.; MULLER, D. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. **American Family Physician**, v. 72, n. 6, p. 1037-47, 2005.

ROBERT-PACHOT, M.; DESBOS, A.; MOREIRA, A.; BECCHI, M.; TEBIB, J.; BONNIN, M.; AITSISELMI, T.; BIENVENU, J.; FABIEN, N. Carbonic anhydrase III: a new target for autoantibodies in autoimmune diseases. **Autoimmunity**, v. 40, n. 5, p. 380-9, 2007.

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.

RODRIGUES, L. P.; FERREIRA, L. F.; DO MONTE, A. F. G.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Bioelectrode Applied to Diagnosis of Cardiac Disease. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 9, p. 6528-6538, 2014.

ROJANASANTIKUL, P.; PATTRAPORNPIST, P.; ANURUCKPARADORN, K.; KATCHAMART, W. The performance of a point of care test for detection of anti-mutated citrullinated vimentin and rheumatoid factor in early rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 33, n. 7, p. 919-23, 2014.

ROSSI, G.; REAL-FERNANDEZ, F.; PANZA, F.; BARBETTI, F.; PRATESI, F.; ROVERO, P.; MIGLIORINI, P. Biosensor analysis of anti-citrullinated protein/peptide antibody affinity. **Analytical Biochemistry**, v. 465, p. 96-101, 2014.

ROTHER, C.; URLINGER, S.; LOHNING, C.; PRASSLER, J.; STARK, Y.; JAGER, U.; HUBNER, B.; BARDROFF, M.; PRADEL, I.; BOSS, M.; BITTLINGMAIER, R.; BATAA, T.; FRISCH, C.; BROCKS, B.; HONEGGER, A.; URBAN, M. The human combinatorial antibody library HuCAL GOLD combines diversification of all six CDRs according to the natural immune system with a novel display method for efficient selection of high-affinity antibodies. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, n. 4, p. 1182-200, 2008.

SADIK, O. A.; ALUOCH, A. O.; ZHOU, A. Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 9, p. 2749-65, 2009.

SAEED, U.; WAHEED, Y.; ASHRAF, M. Hepatitis B and hepatitis C viruses: a review of viral genomes, viral induced host immune responses, genotypic distributions and worldwide epidemiology. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 2, p. 88-96, 2014.

SAHA, K.; AGASTI, S. S.; KIM, C.; LI, X.; ROTELLO, V. M. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 5, p. 2739-79, 2012.

SCALIONI LDE, P.; CRUZ, H. M.; DE PAULA, V. S.; MIGUEL, J. C.; MARQUES, V. A.; VILLELA-NOGUEIRA, C. A.; MILAGRES, F. A.; CRUZ, M. S.; BASTOS, F. I.; ANDRADE, T. M.; MOTTA-CASTRO, A. R.; LEWIS-XIMENEZ, L. L.; LAMPE, E.; VILLAR, L. M. Performance of rapid hepatitis C virus antibody assays among high- and low-risk populations. **Journal of Clinical Virology**, v. 60, n. 3, p. 200-5, 2014.

SCHEIBLAUER, H.; EL-NAGEH, M.; DIAZ, S.; NICK, S.; ZEICHHARDT, H.; GRUNERT, H. P.; PRINCE, A. Performance evaluation of 70 hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) assays from around the world by a geographically diverse panel with an array of HBV genotypes and HBsAg subtypes. **Vox Sanguinis**, v. 98, n. 3 Pt 2, p. 403-14, 2010.

SHAKOORI, Z.; SALIMIAN, S.; KHARRAZI, S.; ADABI, M.; SABER, R. Electrochemical DNA biosensor based on gold nanorods for detecting hepatitis B virus. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 2, p. 455-61, 2015.

SHARMA, H.; DIEP, N.; CHEN, A.; LEW, V.; KHINE, M. Unconventional Low-Cost Fabrication and Patterning Techniques for Point of Care Diagnostics. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 39, n. 4, p. 1313-1327, 2011.

SHAWKY, S. M.; AWAD, A. M.; ALLAM, W.; ALKORDI, M. H.; EL-KHAMISY, S. F. Gold aggregating gold: A novel nanoparticle biosensor approach for the direct quantification of hepatitis C virus RNA in clinical samples. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 92, p. 349-356, 2017.

SIMMONDS, P. **Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy**. Berlin: Editora Springer Ralf Bartenschlager, v. 369. p. 1-15, 2013.

SINGHAL, C.; INGLE, A.; CHAKRABORTY, D.; PN, A. K.; PUNDIR, C. S.; NARANG, J. Impedimetric genosensor for detection of hepatitis C virus (HCV1) DNA using viral probe on methylene blue doped silica nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 84-93, 2017.

SITU, C.; MOONEY, M. H.; ELLIOTT, C. T.; BUIJS, J. Advances in surface plasmon resonance biosensor technology towards high-throughput, food-safety analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1305-1315, 2010.

SOLDATKIN, O. O.; BURDAK, O. S.; SERGEYEVA, T. A.; ARKHYPKOVA, V. M.; DZYADEVYCH, S. V.; SOLDATKIN, A. P. Acetylcholinesterase-based conductometric biosensor for determination of aflatoxin B1. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 188, p. 999-1003, 2013.

STANKOVICH, S.; DIKIN, D. A.; DOMMETT, G. H.; KOHLHAAS, K. M.; ZIMNEY, E. J.; STACH, E. A.; PINER, R. D.; NGUYEN, S. T.; RUOFF, R. S. Graphene-based composite materials. **Nature**, v. 442, n. 7100, p. 282-6, 2006.

STENBERG, E. P., B.; ROOS, H.; URBANICZKY, C. Quantitative Determination of Surface Concentration of Protein with Surface Plasmon Resonance Using Radiolabeled Proteins. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 143, n. 2, p. 513-526, 1991

STRAUSS, E. [Hepatitis C]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 1, p. 69-82, 2001.

STRAUSS, E. História Natural da Hepatite C - Fatores de Progressão. Avaliação Prognóstica da Hepatite C Crônica. In: ROBERTO FOCCACIA (Ed.). **Tratado de Hepatites Virais e Doenças Associadas**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2013. p. 453-470.

TAKAHASHI, T.; NAKAGAWA, S.; HASHIMOTO, T.; TAKAHASHI, K.; IMAI, M.; MIYAKAWA, Y. MAYUMI, M. Large-scale isolation of Dane particles from plasma containing hepatitis B antigen and demonstration of a circular double-stranded DNA molecule extruding directly from their cores. **Journal of Immunology**, v. 117, n. 4, p. 1392-1397, 1976.

TEICHROEB, J. H.; FORREST, J. A.; NGAI, V.; JONES, L. W. Anomalous thermal denaturing of proteins adsorbed to nanoparticles. **The European Physical Journal. E, Soft Matter**, v. 21, n. 1, p. 19-24, 2006.

TENCER, M.; CHARBONNEAU, R.; LAHOUD, N.; BERINI, P. AFM study of BSA adlayers on Au stripes. **Applied Surface Science**, v. 253, n. 23, p. 9209-9214, 2007.

TRIA, S. A.; LOPEZ-FERBER, D.; GONZALEZ, C.; BAZIN, I.; GUISEPPI-ELIE, A. Microfabricated biosensor for the simultaneous amperometric and luminescence detection and monitoring of Ochratoxin A. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, p. 835-42, 2016.

TURNER, A. P. Biosensors: sense and sensibility. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 8, p. 3184-96, 2013.

ULIANA, C. V.; RICCARDI, C. S.; YAMANAKA, H. Diagnostic tests for hepatitis C: recent trends in electrochemical immunosensor and genosensor analysis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 42, p. 15476-91, 2014.

VAN DEN KIEBOOM, C. H.; VAN DER BEEK, S. L.; MÉSZÁROS, T.; GYURCSÁNYI, R. E.; FERWERDA, G.; DE JONGE, M. I. Aptasensors for viral diagnostics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 74, p. 58-67, 2015.

VIGNESHVAR, S.; SUDHAKUMARI, C. C.; SENTHILKUMARAN, B.; PRAKASH, H. Recent Advances in Biosensor Technology for Potential Applications - An Overview. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 4, p. 11, 2016.

VIJ, R.; DENTON, C. P.; NOTH, I. Molecular Phenotyping. A Guide to Improving Detection of Interstitial Lung Disease in Patients with Rheumatoid Arthritis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 191, n. 12, p. 1349-50, 2015.

VILLAR, L. M.; O, K. M.; SCALIONI, L. P.; CRUZ, H. M.; PORTILHO, M. M.; MENDONCA, A. C.; MIGUEL, J. C.; FIGUEIREDO, A. S.; ALMEIDA, A. J.; LAMPE, E. Prevalence of hepatitis B and C virus infections among military personnel. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 3, p. 285-90, 2015.

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

WANG, H. W.; HU, Z. A.; CHANG, Y. Q.; CHEN, Y. L.; ZHANG, Z. Y.; YANG, Y. Y.; WU, H. Y. Preparation of reduced graphene oxide/cobalt oxide composites and their enhanced capacitive behaviors by homogeneous incorporation of reduced graphene oxide sheets in cobalt oxide matrix. **Materials Chemistry and Physics**, v. 130, n. 1-2, p. 672-679, 2011.

WANG, J. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 10, p. 1887-92, 2006.

WANG, M.; WANG, B.; MA, Z.; SUN, X.; TANG, Y.; LI, X.; WU, X. Detection of the novel IL-1 family cytokines by QAH-IL1F-1 assay in rheumatoid arthritis. **Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)**, v. 62, n. 4, p. 31-4, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Hepatitis B, Fact sheet N°204. [accessed 2017 Jul]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Hepatitis C, Fact sheet N°164. [accessed 2017 jul]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>.

XU, H.; GU, D.; HE, J.; SHI, L.; YAO, J.; LIU, C.; ZHAO, C.; XU, Y.; JIANG, S.; LONG, J. Multiplex biomarker analysis biosensor for detection of hepatitis B virus. **Bio-medical Materials and Engineering**, v. 26 Suppl 1, p. S2091-100, 2015.

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

YAO, F.; ZHANG, Y.; WEI, Y.; KANG, X. A rapid and sensitive detection of HBV DNA using a nanopore sensor. **Chemical Communications (Camb)**, v. 50, n. 89, p. 13853-6, 2014.

ZHANG, S. B.; YAN, Y. T.; HUO, Y. Q.; YANG, Y.; FENG, J. L.; CHEN, Y. F. Electrochemically reduced graphene oxide and its capacitance performance. **Materials Chemistry and Physics**, v. 148, n. 3, p. 903-908, 2014.

ZHANG, X.; ZHAO, Y.; ZHOU, H.; QU, B. A new strategy for photoelectrochemical DNA biosensor using chemiluminescence reaction as light source. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 5, p. 2737-41, 2011.

ZHAO, W.; BROOK, M. A.; LI, Y. Design of gold nanoparticle-based colorimetric biosensing assays. **ChemBioChem**, v. 9, n. 15, p. 2363-71, 2008.

Carbon nanomaterial as a platform for genosensors: a system for the diagnosis of the hepatitis C in real sample

Danielle A. Oliveira^a, Jussara V. Silva^b, José M. R. Flauzino^a, Heliane S. Sousa^b, Ana C. H. Castro^a, Márcia M. C. N. Soares^c, João M. Madurro^b, Ana G. Brito-Madurro^{a*}

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

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

c. Adolfo Lutz Institute, Regional Laboratory in São José do Rio Preto, Brazil

*Author to whom correspondence should be addressed: Tel. +55 34 32182203; Fax: +55 3432182203; E-mail: agbrito@ufu.br

Abstract

This work describes the development of a genosensor for the detection of the hepatitis C virus in real sample. Graphene oxide modified gold electrode was functionalized with ethylenediamine (GO-ETD) for the grafting of the HCV-specific probe. HCV-infected serum and viral genomic RNA were evaluated using differential pulse voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. The HCV-specific probe:gRNA interaction caused a reduction in the current peak response of about 2.9 times when compared to the HCV-specific probe and negative control using differential pulse voltammetry. The EIS measurements showed an approximate 2-fold increase in charge transfer resistance values after the addition of HCV genomic RNA. The genosensor was also able to discriminate HCV-positive serum samples from HCV-negative serum with a difference of 3.04 times between these samples. An inverse linear relationship was observed with the peak current using ferrocyanide as redox indicator. The limits of detection and quantification were 1:483 (v/v) and 1:145 (v/v), respectively. The developed genosensor enables a selective diagnosis of hepatitis C.

Keywords: hepatitis C; genosensor; electrochemical detection; nanomaterial; graphene oxide; ethylenediamine.

INTRODUCTION

Hepatitis C is an infectious disease whose etiology is an RNA virus (HCV) that replicates in the hepatocyte cytoplasm and can progress to chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Matsuura et al. 2017). It is considered one of the major causes of liver transplantation worldwide (De Martin et al. 2010). The virus has a worldwide distribution (Gower et al. 2014), with an estimate of 130-170 million seropositive people, out of which about 71 million are chronically infected with an estimate of 399,000 people dying annually from HCV-related causes (WHO, 2017, Mohd Hanafiah et al. 2013).

The transmission of HCV occurs through contact with infected blood, due to percutaneous exposure, blood or hemoderivates transfusion, and transplants

from infected donors (CDC, 2013). After the viral exposure, the presence of the HCV genomic RNA in serum may occur about 2 weeks before the presence of the anti-HCV antibody (Uliana et al. 2014). Thus, the determination of HCV-RNA confirms the diagnosis qualitatively and quantitatively, helping in the planning of the treatment to monitor the efficacy of the antiviral therapy (Beardsley 1994), Park et al. 2010).

Early diagnosis of hepatitis C is critical to prevent the disease progression and its complications. Currently, the most widely detection proceedings used for HCV are chemiluminescent methods, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and nucleic acid tests, such as the polimerase chain reaction (PCR) (Freiman et al. 2016). However, these methods require qualified personnel, appropriate laboratory environment and generally expensive reagents, as well as time. Biosensors are great analytical tools, since they can be used as miniaturized and portable real-time diagnostic devices requiring small volumes of samples (Wang 2006, 2017); they can be used as point-of-care devices for the detection and the monitoring of the HCV infection (Kashish et al. 2015, Silva et al. 2016) (Rapp et al. 2010) (Zhou et al. 2016b).

Carbon-based nanomaterials are extensively used to modify the surface of electrochemical biosensors, improving properties such as surface area, signal amplification, sensitivity, conductivity, selectivity and stability ((Lee et al. 2016) Radi 2010). Graphene oxide is a nanomaterial with interesting properties, such as affinity for aromatic rings (Chung 2013), hydrophilic nature due to the presence of functional groups in the basal plane (epoxides and hydroxyls) and in the edges (carbonyl and carboxyl) (Dreyer et al. 2010), as well as electrocatalytic capacity (Lee et al. 2016), despite the high resistance to charge transfer (da Silva et al. 2017) when compared to graphene, reduced graphene oxide and graphite, due to the ether groups that interrupted the π electron cloud.

In this work, graphene oxide was funcionalized with amino groups for the HCV- specific DNA probe immobilization on the surface of the gold electrode aiming at the construction of a new diagnostic platform for the electrochemical detection of hepatitis C virus genomic RNA.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and solutions

All reagents were of analytical grade without prior purification. Ultra purity water (18.2 M Ω .cm, Master System, Gehaka, Brazil) was used for the preparation of all solutions. All solutions used in the electrochemical analysis were deoxygenated by means of ultra-pure nitrogen bubbling for 1 min.mL⁻¹ prior to use. Potassium permanganate (KMnO₄, 99%), sulfuric acid (H₂SO₄, 98%), sodium dodecylsulfate (SDS, 99%), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC, 98%), N-hydroxysuccinimide (NHS, 98%), ethylenediamine (ETD, 99.5%) and bovine serum albumin (BSA, 95%) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical, USA. Hydrogen peroxide (H₂O₂, 30%) and sodium nitrate (NaNO₃, 99.5%) were purchased from Synth, Brazil. Potassium ferrocyanide/ferricyanide (K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆].3H₂O, 5 mmol L⁻¹) was purchased from Acros Organics USA. HCV-specific DNA probe (5'-CCCCTGTGAGGAAGTTCTGTCTTCACGC-3') was synthesized by Invitrogen Life Technologies (USA).

2.2. Biological samples

HCV-infected patients' serum and HCV genomic RNA were used as target samples. HCV-negative serum, Zika virus genomic RNA, HBV genomic DNA were used as controls. Biological samples were supplied by the Adolfo Lutz Institute (EC: 2.004.369). Serum samples were incubated with lysis buffer (1:1 v/v, EDTA 25 mmol L⁻¹, Tris-HCl 200 mmol L⁻¹, NaCl 250 mmol L⁻¹, SDS 1%, pH = 7.5) for 1 hour at 25 °C and stored later at -8 °C. The samples were diluted (1:100) in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer solution, pH 7.4, before use.

2.3. Apparatus

The electrochemical studies were carried out on a potentiostat of CH Instruments 620C and on a potentiostat/galvanostat autolab PGSTAT 302N with a FRA2 module, using a three-compartment electrochemical cell. Gold (2 mm diameter, CH instruments) platinum wire and Ag/AgCl (KCl 3.0 mol L⁻¹) were used as working, auxiliary and reference electrodes, respectively. Scanning electron

microscope (SEM, VEGA3 TESCAN) and Atomic force microscope (Shimadzu Scanning Probe Microscope – SPM 9600) were used for the surface analyses (Au, Au/GO-EDT, Au/GO-ETD/probe/BSA and Au/GO-ETD/probe/BSA/target).

2.4. Preparation of the gold electrode modified with GO and ETD

The gold electrodes (Au) were initially sonicated with ethanol (70%) for 10 minutes, mechanically polished with alumina slurry (0.3 μm), washed with deionized water and dried in the air. The preconditioning of the electrode was performed in a 0.5 mol L⁻¹ H₂SO₄ solution through cyclic voltammetry between + 0.0 V and +1.2 V, 5 cycles, 50 mV.s⁻¹. Graphene oxide (GO) was produced according to the Hummers method (Hummers and Offeman 1958) with some modifications. Briefly, the graphite powder (2 g) was oxidized with potassium permanganate (6 g) and sodium nitrate (2 g) in sulfuric acid medium (50 mL). This mixture was maintained in a water bath at 42 °C under agitation for 60 minutes. After this time, deionized water (95 mL) was added to the system and stirred for another 30 minutes. Subsequently, another amount of deionized water (285 mL) was added in addition with hydrogen peroxide (20 mL, 30%). The solution was centrifuged three times at 900 rpm, followed by drying at 50 °C for three days and maceration. It was maintained under the protection of sunlight.

An aqueous dispersion of GO (1 mg mL⁻¹) was obtained by sonicating the GO powder in deionized water for 2h. In order to optimize the probe immobilization, different volumes of the OG aqueous dispersion (6 μL , 9 μL , 12 μL and 15 μL) were applied onto the gold electrode, being applied in interval of 3 microlitres maintained at 55 °C until complete drying, promoting the formation of GO layers. Afterwards, an EDC/NHS solution (3 μL , 100 mmol L⁻¹) was dripped over the Au/GO and kept at room temperature for 10 minutes. The electrode was washed with water and the ETD solution (3 μL , 1 mol L⁻¹) was dripped onto Au /GO-NHS, sealed and left at room temperature for 10 minutes, followed by washing.

2.5. Bioelectrode construction

For the probe immobilization, 3 μL of the solution ($1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) was applied over the Au/GO-ETD, sealed and left at room temperature for 30 minutes. Then, the electrode was washed by immersion in sodium phosphate buffer for the removal of non-adsorbed probes and the excess of buffer was gently removed with absorbent paper. 4 μL of a BSA solution (0.5% w/v) was dripped onto the Au/GO-ETD/probe and the electrode was sealed and incubated at 37 °C for 30 minutes. Then, the electrode was washed by immersion in sodium phosphate buffer solution.

2.6. Electrochemical detections

On the surface of the Au/GO-ETD/ss-DNA/BSA, 3 μL of the positive or negative control was applied; the electrode was sealed and incubated for 20 minutes at 55 °C, and then washed by immersion in phosphate buffer solution. Differential pulse voltammetry (DPV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) measurements were performed using $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (5 mmol L^{-1}) in KCl (0.1 mmol L^{-1}) as support electrolyte (amplitude modulation 25 mV, pulse Interval 0.2 s, scan rate 30 mV.s^{-1} , potential interval -0.1 V - +0.5 V). EIS measurements were conducted using 10 mV perturbation amplitude, 10 kHz - 0.1 Hz.

2.7. Calibration curve

HCV-infected serum sample lysate (1:100, 1:200, 1:300, 1:400 and 1:500 in phosphate buffer solution) was employed for the construction of the calibration curve. 3 μL of the samples was dripped onto Au/GO-ETD/probe/BSA, which was incubated for 20 minutes at 55 °C and washed with phosphate buffer solution. DPV measurements were performed using $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (5 mmol L^{-1}) in KCl (0.1 mmol L^{-1}) as support electrolyte (amplitude modulation 25 mV, pulse Interval 0.2 s, scan rate 30 mV.s^{-1} , potential interval -0.1 V - +0.5 V).

3. Results and discussion

3.1. Graphene oxide optimization

Graphene oxide bears unique properties due to the presence of oxygenated functional groups (Mao et al. 2012). The polar character of GO facilitates the dipole-dipole interactions and hydrogen bonds, contributing to the maintenance of the native conformation of the immobilized biomolecules (Zhang et al. 2013).

Different volumes of GO were functionalized with amino groups (Sam et al. 2010), for the HCV-specific DNA probe immobilization (Figure 2) by electrostatic interaction between DNA phosphate groups and positively charged amino groups. This process can be done with N-ethyl-N'-(3-(dimethylamino) propyl) carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) (Sam et al. 2010), with subsequent substitution of the succinimidyl ester with the ethylene diamine (ETD) linker. The most accepted graphene oxide model is the Lerf-Klinowski, in which the carboxyl groups present at the edges (Lerf 1998) can be activated by the EDC/NHS molecules and thus become susceptible to covalent bonds with the amine groups present in the ETD.

Inset Figure 2

A 2.5-fold increase was observed in the current value response using 12 μL GO. Such increase was due to the greater quantity of amine groups exposed, attracting the ferrocyanide to the electrode surface (Figure 2A).

The duplex formation occurred after the addition of the VHC-specific target, increasing the negative charge density on the electrode surface and decreasing the current value of about 3.3 times monitoring the anionic redox indicator.

Figure 2B shows that the chemical modification of the nanomaterial with ETD was effective. An increase was observed in the oxidation peak current of electroactive indicator ($i_p = 35.0 \mu\text{A} \pm 0.19 \mu\text{A}$) when compared to Au/GO ($i_p = 25.0 \mu\text{A} \pm 0.19 \mu\text{A}$), suggesting that the ferrocyanide ion was attracted to the surface of the electrode, since the amino groups are positively charged at neutral pH. After the addition of the HCV-probe, the current signal response decrease about 2.3 times ($i_p = 15.0 \mu\text{A} \pm 0.9 \mu\text{A}$), indicating that the negatively charged phosphate groups present in the DNA structure cause repulsion of the anionic probe. This aspect can be potentiated by the presence of BSA, which is also negatively charged at neutral pH ($pI = 4.7$).

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) has been shown to be an effective method for the study of the interfacial properties of the biochemical process and binding events occurring on the electrode (Yadav et al. 2016; Zhou et al. 2016a).

EIS analysis was utilized to confirm the electrode modification steps in the frequency range of $10^4 - 10^{-2}$ Hz (Fig. 2C).

The bare gold electrode (curve a) exhibited a small semicircle at high frequencies and charge transfer resistance (R_{ct}) of 348Ω . The GO ($12\mu\text{L}$) deposition onto the electrode surface causes an increase in R_{ct} (curve b) in accordance with literature (da Silva et al. 2017).

The circuit equivalent (inset Figure 2C) was employed to adjust the impedance spectra. The charge transfer resistance (R_{ct}) values are indicated in Table 1. The GO presented R_2 value of $11.4\text{ k}\Omega$, what might be attributed to the fact that the COO^- groups formed in the material hindered the electron transfer of negatively charged $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ from the solution to the electrode surface. After the covalent immobilization, using ethylenediamine, a decrease was observed in R_2 ($3.7\text{ K}\Omega$). Probably, this layer assisted the electron transportation of the redox moieties to the electrode due to the free amino group. After the HCV-probe immobilization, there was an increase in resistance ($R_2=5.98\text{ K}\Omega$), indicating that the DNA layer acted as a barrier for electron transfer between the electrode surface and the redox probes, in accordance with Rabti et al. 2016. The results obtained confirmed the immobilization of VHC-probe onto the Au/GO-ETD electrode.

Table 1. Equivalent circuit parameters of electrode modification steps related to Fig. 2C.

	Au/GO	Au/GO-ETD	Au/GO-ETD/ssDNA
R_s	141 Ω	117 Ω	125 Ω
R_1	1.67 $\text{K}\Omega$	587 Ω	942 Ω
R_2	11.4 $\text{K}\Omega$	3.7 $\text{k}\Omega$	5.98 $\text{K}\Omega$

3.2. Detection of genomic RNA

The genosensor was utilized for the detection of the genomic RNA samples of ten positive patients for HCV, hepatitis b virus genomic DNA (HBV) and zika virus genomic RNA (Figures 3A and 3B).

Insert Figure 3

The genosensor was able to discriminate HCV positive samples from the negative control. A decrease was observed in peak current values of 2.5 times (medium value). The genosensor was selective, since it discriminated the hepatitis b virus genomic DNA (HBV) and zika virus genomic RNA (Figure 3A).

Figure 3B shows the differential pulse voltammetry for Au/GO-ETD/probe/BSA (curve a), Au/GO-ETD/probe/BSA/Zika virus g-DNA (curve b) and Au/GO-ETD/probe/BSA/HCV-gRNA (curve c). The interaction between bioelectrode:HCV-gRNA caused the peak current response to drop about 3.3 times ($i_p = 5.16 \mu A \pm 0.41 \mu A$) when compared to the probe current response ($i_p = 15.0 \mu A \pm 0.93 \mu A$). Such decrease was not observed in the negative control ($i_p = 14.5 \mu A \pm 0.25 \mu A$), where the current values remained very close to the genosensor in the absence of the target. This decrease in current values possibly occurs due to the duplex formation (ssDNA:HCV-gRNA) which causes a diffusional barrier and a decrease in the electron transfer of the indicator to the electrode surface.

Figure 3C shows the results of nyquist plots to confirm the duplex formation. It was observed that the value of R_2 (10.14 k Ω) increased after the HCV-gRNA addition when compared with the probe ($R_2 = 5.98$ k Ω), which was not observable after the addition of negative control ($R_2 = 4.3$ k Ω). These results corroborate with the voltammetric analysis (Figure 3B).

3.3. Detection of HCV positive-serum samples and calibration curve

The genosensor was evaluated using real samples of the HCV positive patients. Figure 4A shows the discrimination between the probe and the positive control, in which the interaction of the bioelectrode with the HCVg-RNA, present

in the serum, caused a decrease of about 3.8 times in the current response peak of the oxidation indicator. The selectivity of the analytical device can be verified, since the serum is a complex biological fluid, with many interferers. The biosensor was also able to discriminate between positive ($i_p = 4.12 \mu\text{A} \pm 0.10 \mu\text{A}$) and negative serum samples ($i_p = 12.5 \mu\text{A} \pm 1.48 \mu\text{A}$). The difference observed was about 3.0 times.

The calibration curve was designed using infected patient's lysate serum samples in dilutions of 1:100, 1:200, 1:300, 1:400 and 1:500 (Figure 4B). An inverse linear relationship was observed with the peak current, $i_p = 1.76313 \times 10^{-8} \times df + 2.35353 \times 10^{-6}$ ($r = 0.998$), where df is the dilution factor. The limits of detection and quantification were 1:483 and 1:145, respectively.

3.4. Morphological analyzes

SEM and AFM images for bare electrodes of Au, Au-ETD, Au-ETD/probe/BSA and Au/EDC/NHS/EDT/probe/BSA/gRNA HCV are shown in Figure 5.

SEM analysis (Figure 5A) showed that bare Au electrode presents homogeneous topography (image a). Au electrode sensitized with Au-EDT activated graphene oxide, presented rougher topography and globular structures, in accordance with literature (Chng and Pumera 2011). Silva and collaborators (Silva et al. 2008) observed that the presence of more compacted points on globule surface was possibly caused by the activation of the carboxylic groups (image b). After probe grafting, surface homogenization was observed. Single-stranded DNA is more flexible, covering the valleys from the activated graphene oxide (image c). After HCV gRNA target addition, the surface topography was modified, indicating duplex formation (image d).

The surface roughness was evaluated using AFM in the presence or absence of the biomolecules (Figure 5B). Bare gold electrode presents smooth topography, $R_q: 13.73 \pm 1.25$, (image a). After activation, the gold electrode assumes a rougher surface 275.13 ± 22.13 (image b) characterized by the presence of higher clusters with rounded edges randomly distributed over the surface.

In the presence of the probe (image c), the sensor decreased the roughness value becoming a more homogenous surface 111.09 ± 1.95 , in accordance with MEV analysis. In the interaction of the probe with the gRNA HCV (image d), there was an increase in roughness and more globular topography (Rq: 145.81 ± 1.67). That is due to the duplex formation, reducing the flexibility of the biomolecule (Izadi et al. 2016).

4. Concluisons

The modification of graphene oxide on the surface of the gold electrode, with subsequent chemical modification with ETD, mediated by the use of EDC/NHS, made exposed amino groups available, which were proved primordial for the immobilization of the probe. This efficient adsorption was evidenced by the electrochemical studies, monitoring the peak current value of Fe^{2+} oxidation. The best results in the oligonucleotide immobilization and target interaction were obtained with GO (12 μL) and probe concentration of $1 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

The results obtained by the EIS corroborated with the studies obtained in the DPV, proving the increase of resistance to each stage of modification of the gold electrode and incorporation of biomolecules.

The SEM images of the biosensor construction are in agreement with the AFM images. The images also showed that with the insertion of the probe on the surface of the platform, there was a decrease in the roughness of the system, as the single strand of the DNA is more flexible and covers the valleys on the platform. After hybridization of the probe with the target, a significant change was observed in morphology and roughness, indicating biological recognition.

The developed analytical device was specific and selective in identifying HCV-gRNA, both in isolated genomic RNA and in human serum, from different infected patients, translating this bio-recognition event into a measurable signal in only 20 minutes of test, with a detection limit of 1:483 (v/v).

These results are promising in the development of a new genosensor for the detection of hepatitis C.

Acknowledgements

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

Figure captions

Figure 1. Schematic illustration of the manufacturing steps of the genosensor proposed. (1) Electrode preconditioning; (2) application of the OG on the Au surface; (3) representation of the OG on Au; (4) formation of OG layer on Au surface; (5) activation of the surface with the succinimidyl ester; (6) substitution of the succinimidyl ester by the ETD; (7) immobilization of the probe; (8) surface blocking step; (9) target-probe interaction; (10) electrochemical detection, where: black – probe, red - positive control, green - negative control.

Figure 2: **(A)** Histogram referring to the optimization of the GO volume applied on the gold electrode surface, showing the current variation in probe and target detection. Supporting electrolyte: $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol L^{-1} and KCl 0.1 mol L^{-1} , amplitude: 25mV, pulse interval: 0.2 s, $\nu = 50 \text{ mV.s}^{-1}$. **(B)** Differential pulse voltammograms (baseline subtracted) of the ferrocyanide ion oxidation onto the surface of the electrodes: (a) Au, (b) Au/GO, (c) Au/GO-ETD, and (d) Au/GO-ETD/ssDNA. **(C)** Nyquis plots in $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ redox pair for: (a) bare gold electrode (b) Au/GO, (c) Au/GO-ETD, and (d) Au/GO-ETD/ssDNA. **(D)** equivalent circuit, where, R_s , R_W , R_{ct} and CPE represent the solution resistance, the Warburg diffusion resistance, the charge-transfer resistance and the constant-phase element, respectively.

Figure 3. **(A)** Histogram obtained from the differential pulse voltammograms in the presence of the probe, hepatitis b virus genomic DNA (HBV), zika virus genomic RNA and the genomic RNA samples of ten positive patients for HCV (1-10). **(B)** Differential pulse voltammograms (baseline subtracted) of the ferrocyanide ion oxidation onto the surface of the electrodes: probe (a), negative control/NC (b) e HCV positive sample/PC (c). Supporting electrolyte: $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$

5 mmol L⁻¹ and KCl 0,1 mol L⁻¹, amplitude: 25mV, pulse interval: 0.2 s, $\nu = 50$ mV.s⁻¹. **(C)** Nyquist plots in K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆ redox pair for: Au/OG-ETD/ssDNA (a), Au/GO-ETD/ssDNA/gRNA-HCV (b), Au/GO-ETD/ssDNA/gRNA Zika (c). Inset: equivalent circuit, where R_s, R_W, R_{ct} and CPE represent the solution resistance, the Warburg diffusion resistance, the charge-transfer resistance and the constant phase element, respectively.

Figure 4. (A) Histogram obtained from the differential pulse voltammograms in the absence (probe) and presence of a lysed healthy serum sample (NC) and a lysed serum sample with the HCV (PC). **(B)** Differential pulse voltammograms from different dilutions of the lysed serum sample of infected patient. **(C)** Calibration curve of ferrocyanide oxidation peak current in function of the dilution factor of lysed serum sample of infected patients. Supporting electrolyte: K₄Fe(CN)₆ 5 mmol L⁻¹ and KCl 0,1 mol L⁻¹, amplitude: 25mV, pulse interval: 0.2 s, $\nu = 50$ mV.s⁻¹.

Figure 5. (A) SEM images **(B)** AFM images for bare Au electrode (a), Au-ETD (b), Au-ETD/probe/BSA (c) and Au-ETD/probe/BSA/gRNA HCV (d).

Figure 1

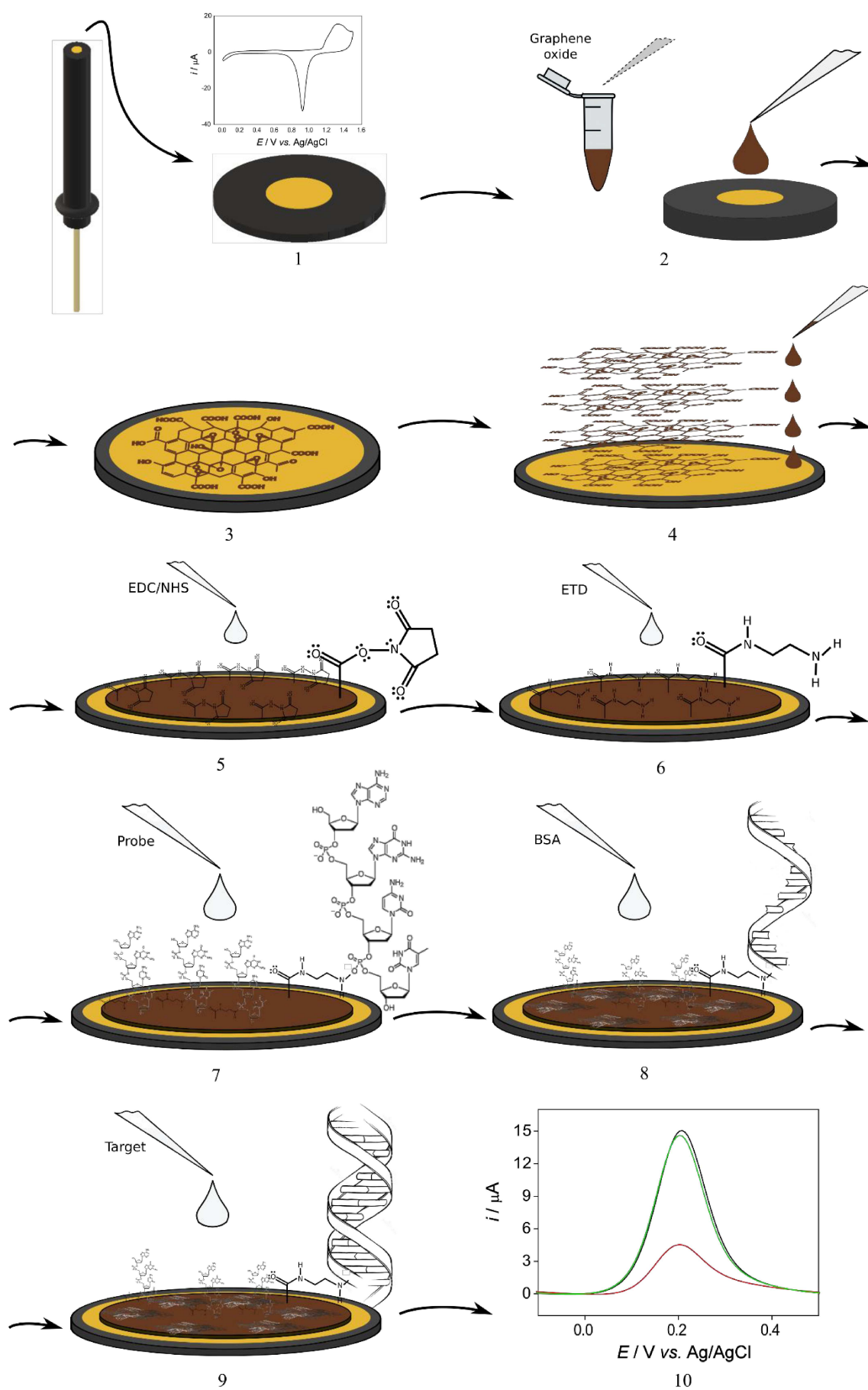


Figure 2A

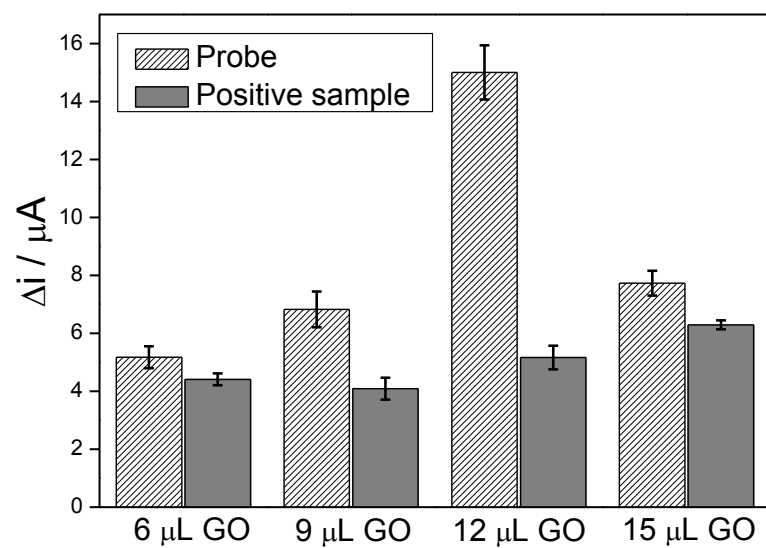


Figure 2B

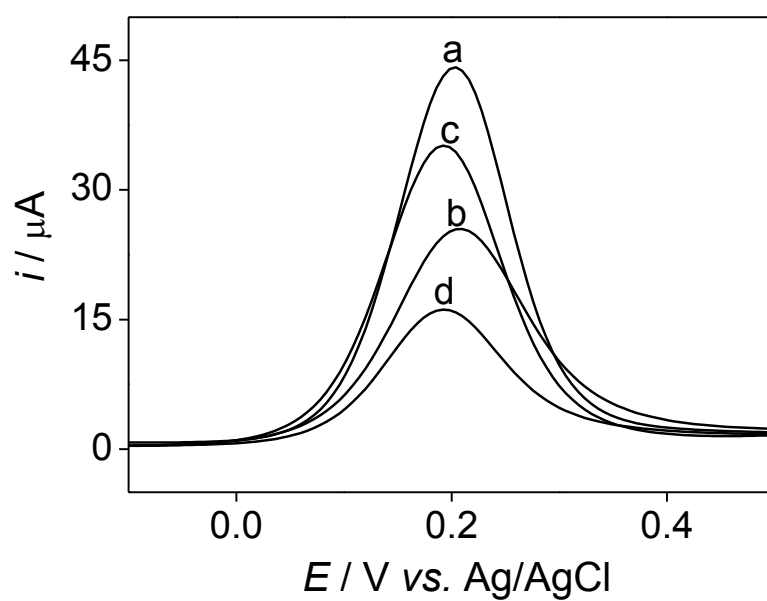


Figure 2C

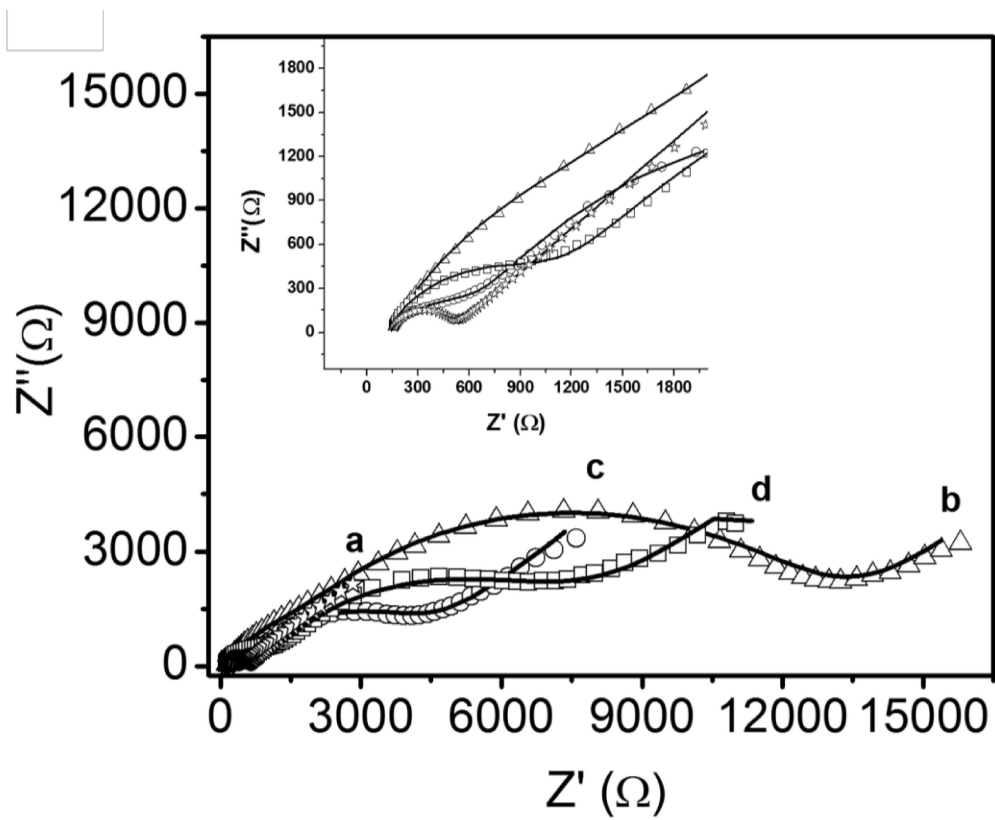


Figure 2D

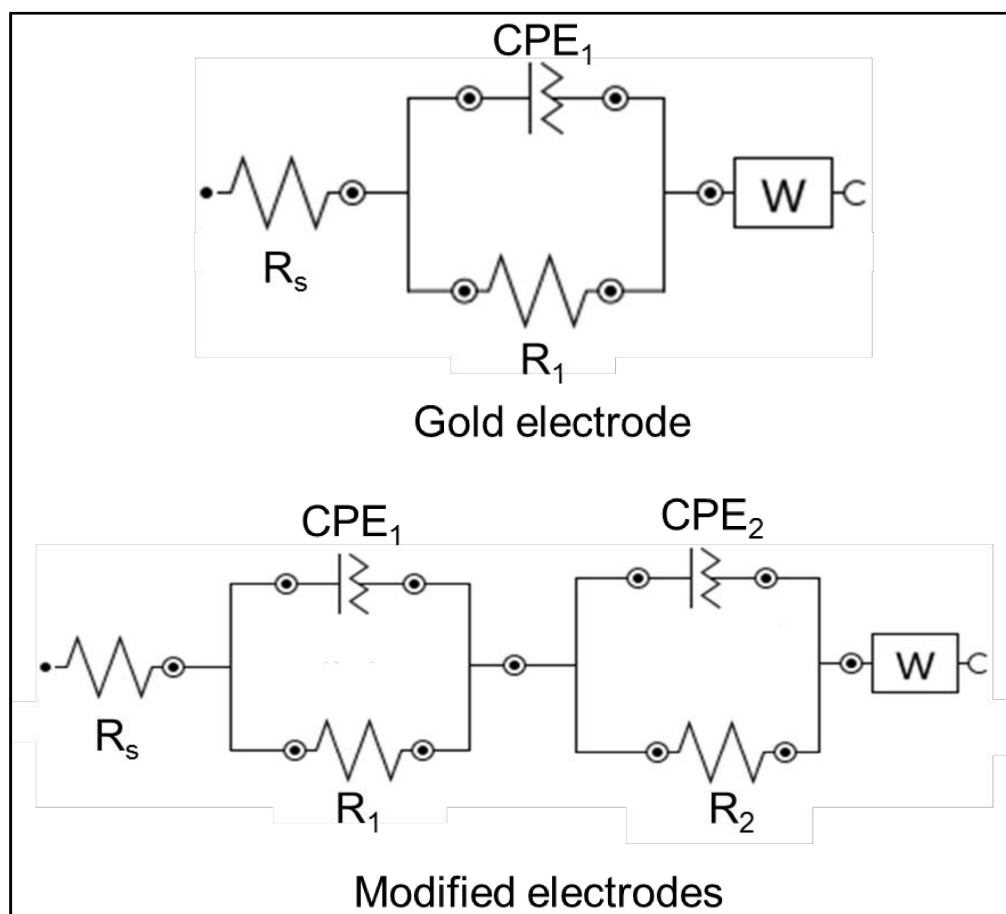


Figure 3A

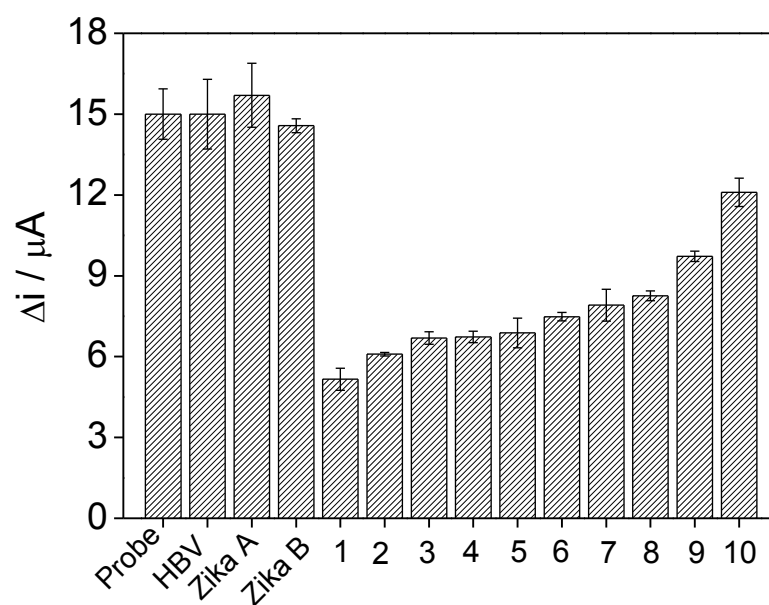


Figure 3B

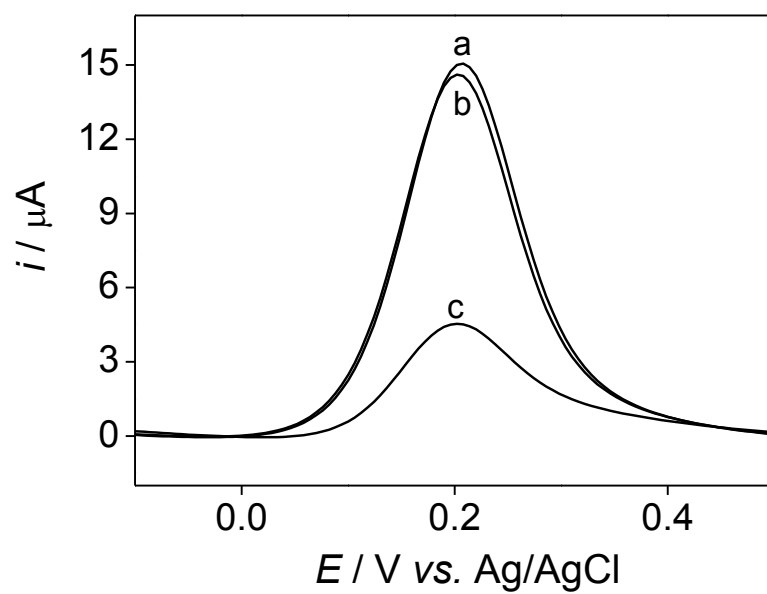


Figura 3C

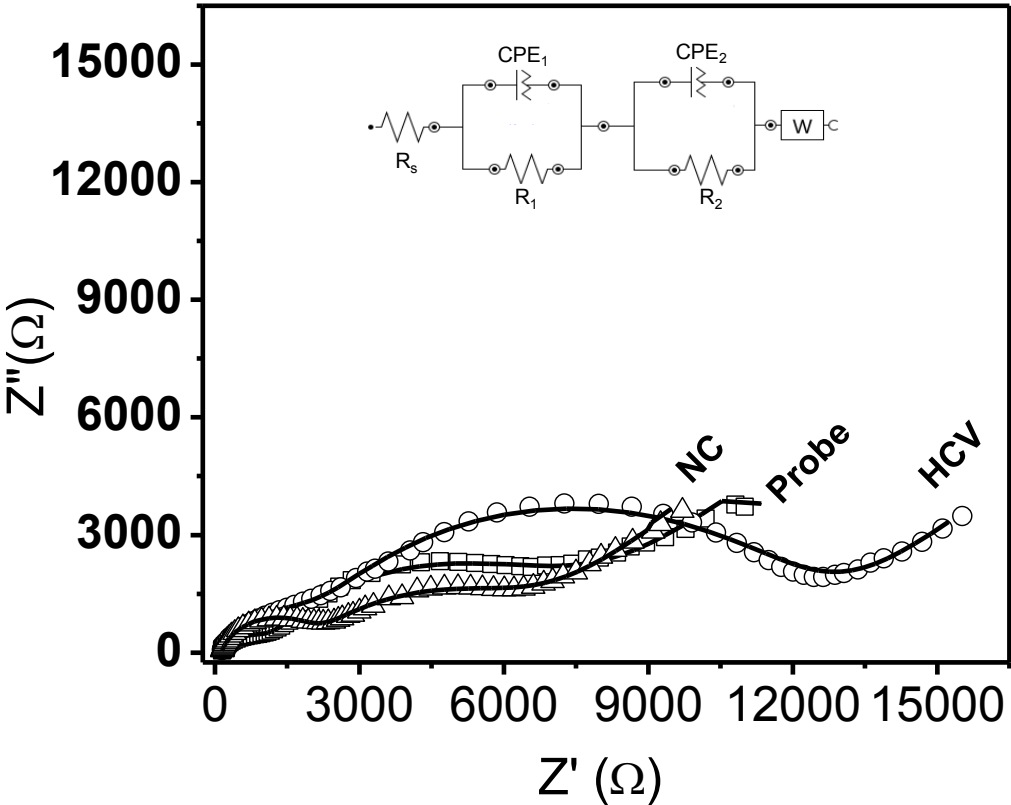


Figure 4A

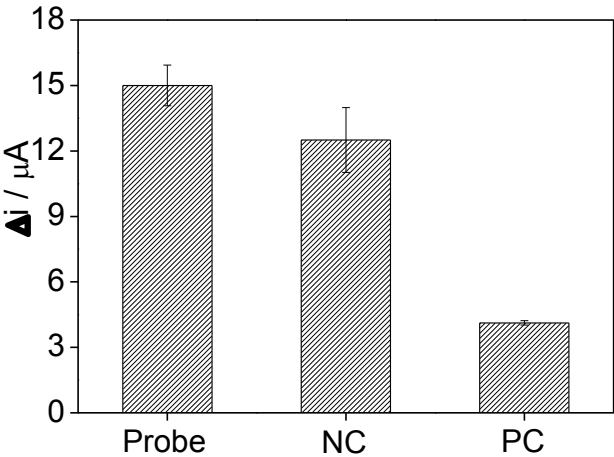


Figure 4B

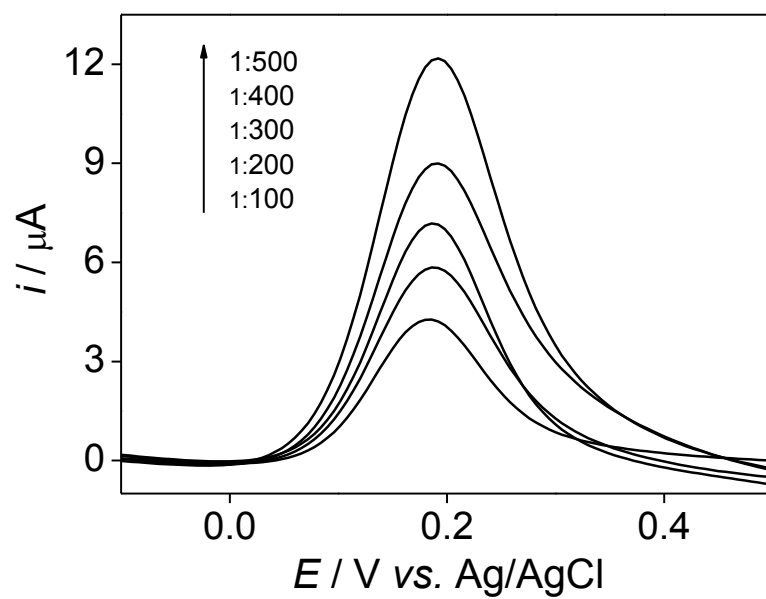


Figure 4C

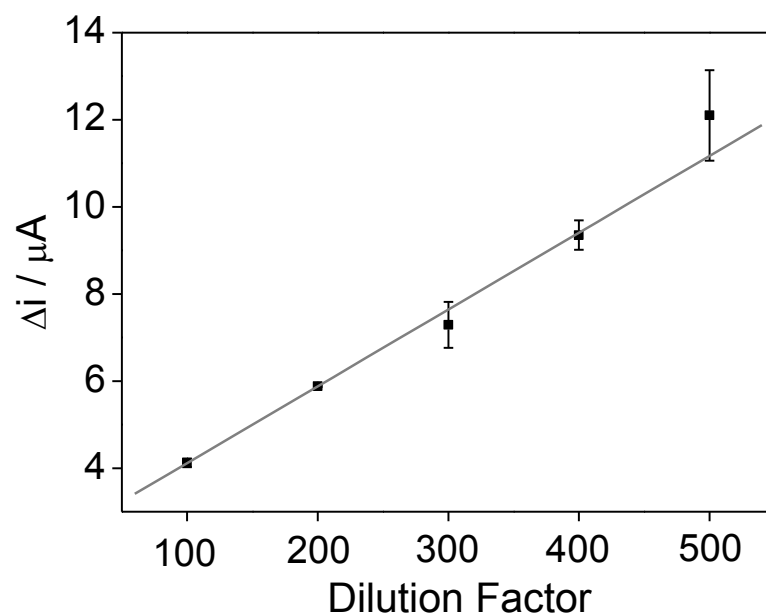
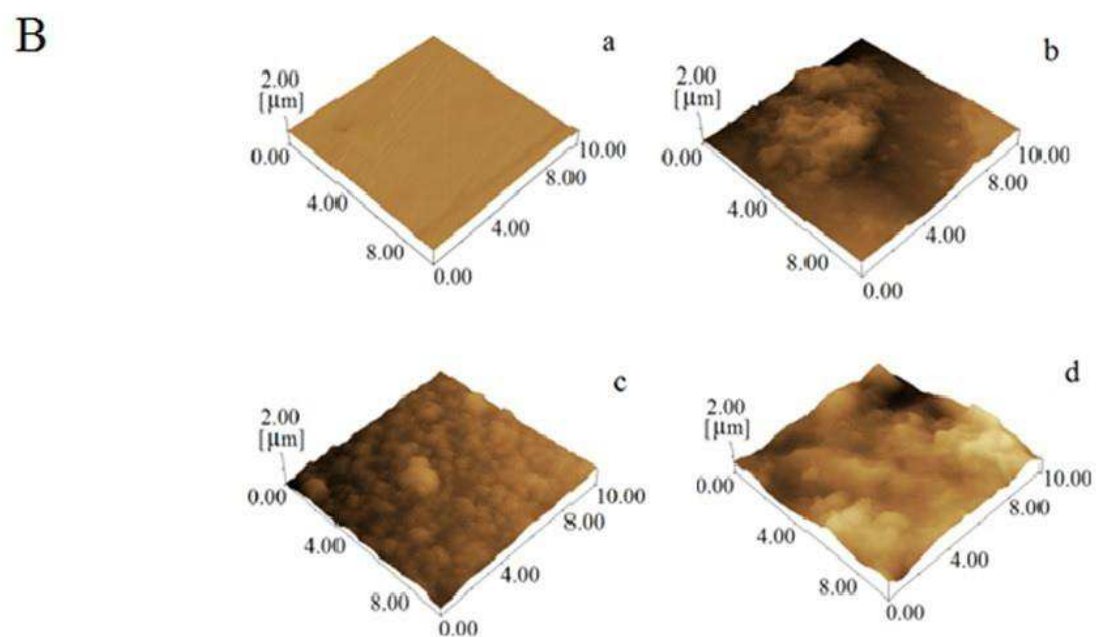
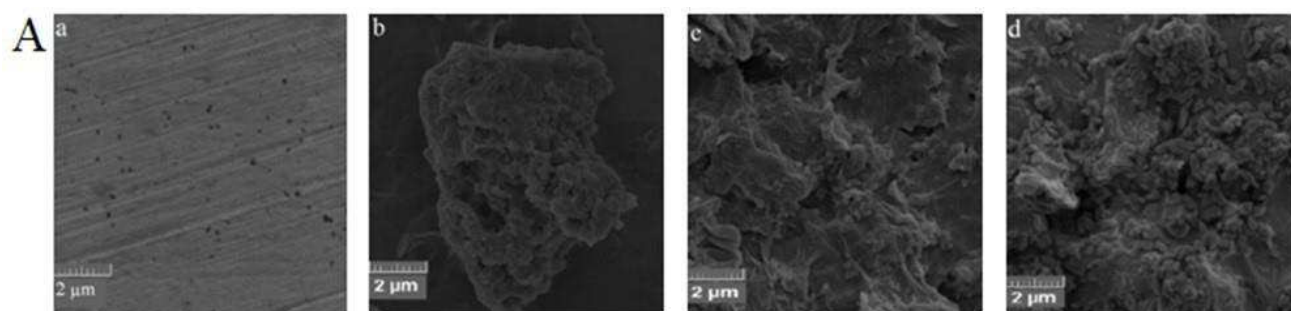


Figure 5



REFERENCES

Beardsley, A.M.L.B., J. T.; Rozen, L.; Gowans, E. J., 1994. A comparison of hepatitis C virus (HCV) RNA and antibody as markers of infection and predictors of infectivity. *Aust New Zeal J Med* 24(2), 6.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). Vital signs: evaluation of hepatitis C virus infection testing and

Chng, E.L.K., Pumera, M., 2011. Solid-State Electrochemistry of Graphene Oxides: Absolute Quantification of Reducible Groups using Voltammetry. *Chem-Asian J* 6(11), 2899-2901.

Chung, C.K., Y.; Shin, D.; Ryoo, S.; Hong, B. H.; Min, A. D., 2013. Biomedical Applications of Graphene and Graphene Oxide. *Accounts of Chemical Research* 46(10), 14.

da Silva, J.V., Madurro, A.G.B., Madurro, J.M., 2017. Modified electrode with reduced graphene oxide/poly(3-hydroxyphenylacetic acid): a new platform for oligonucleotide hybridization. *J Solid State Electr.*

De Martin, E., Senzolo, M., Gambato, M., Germani, G., Vitale, A., Russo, F.R., Burra, P., 2010. Fibrosis progression and the pros and cons of antiviral therapy for hepatitis C virus recurrence after liver transplantation: a review. *Transplantation proceedings* 42(6), 2223-2225.

Dreyer, D.R., Park, S., Bielawski, C.W., Ruoff, R.S., 2010. The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society reviews* 39(1), 228-240.

e Silva, T.D.S., de Castro, A.C.H., de Rezende Rodovalho, V., Madurro, J.M., Madurro, A.G.B., 2016. Development of electrochemical genosensor for MYCN oncogene detection using rhodamine B as electroactive label. *J Solid State Electr.*

Freiman, J.M., Tran, T.M., Schumacher, S.G., White, L.F., Ongarello, S., Cohn, J., Easterbrook, P.J., Linas, B.P., Denking, C.M., 2016. Hepatitis C Core Antigen Testing for Diagnosis of Hepatitis C Virus Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *Annals of internal medicine* 165(5), 345-355.

Gower, E., Estes, C., Blach, S., Razavi-Shearer, K., Razavi, H., 2014. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *Journal of hepatology* 61(1 Suppl), S45-57.

Hummers, W.S., Offeman, R.E., 1958. Preparation of Graphitic Oxide. *J Am Chem Soc* 80(6), 1339-1339.

Izadi, Z., Sheikh-Zeinoddin, M., Ensafi, A.A., Soleimanian-Zad, S., 2016. Fabrication of an electrochemical DNA-based biosensor for *Bacillus cereus* detection in milk and infant formula. *Biosensors & bioelectronics* 80, 582-589.

Kashish, Gupta, S., Dubey, S.K., Prakash, R., 2015. Genosensor based on a nanostructured, platinum-modified glassy carbon electrode for *Listeria* detection. *Anal Methods-Uk* 7(6), 2616-2622.

Lee, J., Hong, M.H., Han, S., Na, J., Kim, I., Kwon, Y.J., Lim, Y.B., Choi, H.J., 2016. Sensitive and Selective Detection of HIV-1 RRE RNA Using Vertical Silicon Nanowire Electrode Array. *Nanoscale research letters* 11(1), 341.

Lerf, A., He, H.; Forster, M.; Klinowski, J., 1998. Structure of Graphite Oxide Revisited. *J. Phys. Chem. B* 102, 6.

Mao, S., Pu, H., Chen, J., 2012. Graphene oxide and its reduction: modeling and experimental progress. *Rsc Adv* 2(7), 2643.

Matsuura, K., Sawai, H., Ikeo, K., Ogawa, S., Iio, E., Isogawa, M., Shimada, N., Komori, A., Toyoda, H., Kumada, T., Namisaki, T., Yoshiji, H., Sakamoto, N., Nakagawa, M., Asahina, Y., Kurosaki, M., Izumi, N., Enomoto, N., Kusakabe, A., Kajiwar, E., Itoh, Y., Ide, T., Tamori, A., Matsubara, M., Kawada, N., Shirabe, K., Tomita, E., Honda, M., Kaneko, S., Nishina, S., Suetsugu, A., Hiasa, Y., Watanabe, H., Genda, T., Sakaida, I., Nishiguchi, S., Takaguchi, K., Tanaka, E., Sugihara, J., Shimada, M., Kondo, Y., Kawai, Y., Kojima, K., Nagasaki, M., Tokunaga, K., Tanaka, Y., Japanese Genome-Wide Association Study Group for Viral, H., 2017. Genome-Wide Association Study Identifies TLL1 Variant Associated With Development of Hepatocellular Carcinoma After Eradication of Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology* 152(6), 1383-1394.

- Mohd Hanafiah, K., Groeger, J., Flaxman, A.D., Wiersma, S.T., 2013. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* 57(4), 1333-1342.
- Park, Y., Lee, J.H., Kim, B.S., Kim, D.Y., Han, K.H., Kim, H.S., 2010. New automated hepatitis C virus (HCV) core antigen assay as an alternative to real-time PCR for HCV RNA quantification. *Journal of clinical microbiology* 48(6), 2253-2256.
- Petralia, S., Cosentino, T., Sinatra, F., Favetta, M., Fiorenza, P., Bongiorno, C., Sciuto, E.L., Conoci, S., Libertino, S., 2017. Silicon nitride surfaces as active substrate for electrical DNA biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* 252, 492-502.
- Rabti, A., Raouafi, N., Merkoçi, A., 2016. Bio(Sensing) devices based on ferrocene–functionalized graphene and carbon nanotubes. *Carbon* 108, 481-514.
- Radi, A.E., 2010. Recent Updates of Chemically Modified Electrodes in Pharmaceutical Analysis. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* 13, 25.
- Rapp, B.E., Gruhl, F.J., Lange, K., 2010. Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications. *Analytical and bioanalytical chemistry* 398(6), 2403-2412.
- Sam, S., Touahir, L., Salvador Andresa, J., Allongue, P., Chazalviel, J.N., Gouget-Laemmel, A.C., Henry de Villeneuve, C., Moraillon, A., Ozanam, F., Gabouze, N., Djebbar, S., 2010. Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 26(2), 809-814.
- Silva, F.B., Vieira, S.N., Goulart, L.R., Boodts, J.F.C., Brito-Madurro, A.G., Madurro, J.M., 2008. Electrochemical investigation of oligonucleotide-DNA hybridization on poly(4-methoxyphenethylamine). *International journal of molecular sciences* 9(7), 1173-1187.

Uliana, C.V., Riccardi, C.S., Yamanaka, H., 2014. Diagnostic tests for hepatitis C: recent trends in electrochemical immunosensor and genosensor analysis. *World journal of gastroenterology* 20(42), 15476-15491.

Wang, J., 2006. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors & bioelectronics* 21(10), 1887-1892.

Wang, Y., Huang, X., Li, H., Guo, L., 2017. Sensitive impedimetric DNA biosensor based on (Nb,V) codoped TiO₂ for breast cancer susceptible gene detection. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 77, 867-873.

WHO: World Health Organization. Hepatitis C -2017. In <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>

Yadav, P., Pandey, K., Bhatt, P., Tripathi, B., Pandey, M.K., Kumar, M., 2016. Probing the electrochemical properties of TiO₂/graphene composite by cyclic voltammetry and impedance spectroscopy. *Materials Science and Engineering: B* 206, 22-29.

Zhang, H., Sun, Y., Gao, S., Zhang, J., Zhang, H., Song, D., 2013. A Novel Graphene Oxide-Based Surface Plasmon Resonance Biosensor for Immunoassay. *Small* 9 (15), 2537–2540.

Zhou, X., Xue, S., Jing, P., Xu, W., 2016a. A sensitive impedimetric platform biosensing protein: Insoluble precipitates based on the biocatalysis of manganese(III) meso-tetrakis (4-N-methylpyridiniumyl)-porphyrin in HCR-assisted dsDNA. *Biosensors & bioelectronics* 86, 656-663.

Zhou, Y.Y., Tang, L., Zeng, G.M., Zhang, C., Zhang, Y., Xie, X., 2016b. Current progress in biosensors for heavy metal ions based on DNAzymes/DNA molecules functionalized nanostructures: A review. *Sensor Actuat B-Chem* 223, 280-294.

APPLICATION OF NANOMATERIALS FOR THE ELECTRICAL AND OPTICAL DETECTION OF THE GENOMIC DNA OF HEPATITIS B VIRUS

Danielle A. Oliveira^a, Jussara V. Silva^b, José M. R. Flauzino^a, Ana C. H. Castro^a,
Anna C. R. Moço^a, Márcia M. C. N. Soares^c, João M. Madurro^b, Ana G. Brito-
Madurro^{a*}

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

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

c. Adolfo Lutz Institute, Regional Laboratory in São José do Rio Preto, Brazil

*Author to whom correspondence should be addressed: Tel. +55 34 32182203;
Fax: +55 3432182203; E-mail: agbrito@ufu.br

Abstract

This work describes different approaches for the detection of hepatitis B virus genomic DNA using electrochemical and optical techniques. The platforms consisted of a single-stranded DNA probe grafted on a gold electrode modified with reduced graphene oxide, bare gold or gold nanoparticles. The VPD analysis indicates that the addition of HBV genomic DNA target caused an increase of about 1.4 times when compared to the negative control. EIS measurements showed that an increase of about 2 times occurs in the charge transfer resistance values after the addition of HBV genomic DNA. The SPR genosensor showed that positive HBV samples resulted in a change of about 15-fold compared to the negative samples. Assays using colloidal suspension of gold nanoparticles showed a shift of the absorption band to longer wavelengths due to the interaction (HEPB1S probe: HBV genomic DNA). All the approaches used in this work were effective in detecting genomic DNA in positive samples for HBV.

Keywords: hepatitis B, genosensor, electrochemical detection, surface plasmon resonance, gold nanoparticles

Introduction

Hepatitis B is a disease caused by a viral infection in liver cells and occurs through percutaneous and mucosal membrane exposure to contaminated blood and body fluids, including serum, semen and saliva [1]. It can be asymptomatic, rapid and progressive, and remains as a great public health problem [2-4]. The World Health Organization estimates that there are 240 million people chronically infected with hepatitis B virus (HBV) in the world, with about 600,000 deaths per year [5]. Complete vaccination is the most effective strategy to reduce global morbidity and mortality [6]. However, there is a portion of individuals who do not respond positively to this immunization. There are several tests for the HBV detection, for the disease progression monitoring, and to check the acquired immunity, such as the immunoenzymatic assay (ELISA) [2], Western Blot, fluoroimmunoassay, and polymerase chain reaction [3]. However, these

techniques require the use of expensive equipment and reagents as well as skilled personnel, and are performed exclusively in a hospital or laboratorial environment [7].

Biosensors are alternatives to the current methods, since they can be used as real-time diagnostic devices, requiring no professional handling, with a quick response and relatively low cost of construction, are potentially miniaturized and portable. Recent advances in micro and nanotechnologies have allowed the development of highly sensitive and cost-effective electrochemical and optical biosensors [8] for HBV detection [9]. Nanomaterials based on carbon and noble metals, such as reduced graphene oxide (rGO) and gold nanoparticles (AuNPs), respectively, have gained space in scientific research due to their distinct properties, such as high electrical and thermal conductivities, high mechanical resistance and large surface area [10]. These materials are widely employed to increase the performance of DNA biosensors [11,12] combining their excellent properties with the stability and complementarity of the DNA molecules [13].

In this context, electrical and optical methods were used in this work for the detection of the genomic DNA extracted from the blood plasma of patients with hepatitis B (Fig. 1). This is a new platform using a specific probe for the genomic DNA of the HBV onto gold electrodes modified with reduced graphene oxide, bare gold or gold nanoparticles.

Here Figure 1

Experimental

Chemicals and solutions

All reagents were of analytical grade, without previous purification. Ultra high purity water (18.2 MΩ.cm, Master System, Gehaka, Brazil) was used for the preparation of all solutions. Ethidium bromide (3,8-diamino-5-ethyl-6-phenyl phenatridinium bromide) was obtained from Merck KGaA. All solutions used in the electrochemical analysis were deoxygenated by means of ultra-pure nitrogen bubbling for at least 25 minutes before use. Tetrachloroauric (III) acid trihydrate (99%), graphite powder, potassium permanganate (KMnO₄) and sulfuric acid

(H₂SO₄) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical, USA (ACS purity). Ammonium hydroxide 28% (w/v) and sodium nitrate were purchased from Synth. The DNA oligonucleotide probe for the HBV virus (HEPB1S) was synthesized by Invitrogen Life Technologies (USA) with the following sequence: 5'-(HS)-GAGGAGTTGGGGGAGCACATT-3'. The oligonucleotide solutions were prepared in sodium phosphate buffer (0.1 mol.L⁻¹, pH 7.4) and SSC buffer (sodium chloride 0.3 mol.L⁻¹, sodium citrate 0.03 mol.L⁻¹, Sigma-Aldrich, USA, pH 7.0) for the electrochemical and optical assays, respectively. All oligonucleotide samples were stored at -8 °C.

Apparatus

The electrochemical studies were conducted in a potentiostat from CH Instruments 620C and Autolab PGSTAT 302N potentiostat/galvanostat with a FRA2 module. A three-electrode electrochemical cell was employed for the electrochemical experiments. A gold electrode (2 mm diameter, CH Instruments) was used as working electrode, a platinum wire as auxiliary electrode, and Ag/AgCl (KCl 3.0 mol.L⁻¹) as a reference electrode. The assays using AuNPs were carried out using a Shimadzu UV-1650PC spectrophotometer. Surface plasmon resonance measurements were performed in an SPR 91156 (Autolab Twingle/Springle ESPR). The surface morphology was assessed with an atomic force microscopy (AFM) in an SPM 9600 microscope (Shimadzu).

Preparation of the gold electrode modified with rGO

The gold electrodes (Au) were initially sonicated with ethanol (70%) for 10 minutes, mechanically polished with alumina slurry (0.3 μm) and washed with deionized water and dried in the air. The preconditioning of the electrode was performed in a 0.5 mol.L⁻¹ H₂SO₄ (98%, Synth) solution through cyclic voltammetry between +0.0 V and +1.2 V, 5 cycles, 50 mV.s⁻¹. Graphene oxide was produced according to the Hummers method [14], and then reduced with hydrazine (64%, Dynamic) [15]. An aqueous dispersion of the reduced graphene oxide (rGO, 6 μL, 1 mg.mL⁻¹) was applied to the surface of the gold electrode and maintained at 55 °C until complete drying.

Genomic DNA samples

Genomic DNA of HBV-positive or negative patients were provided by the Adolfo Lutz Institute (Ethics Committee number 1.131.34). For the selectivity tests, *E. coli* genomic DNA, hepatitis C virus (HCV) genomic RNA and health plasma samples (HS) were used. The genomic DNA was extracted with an ABBOTT m2000sp extractor, and DNase free water was used in the elution buffer. The health plasma samples were obtained from the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia. These samples were incubated with a lysis buffer (EDTA 25 mmol.L⁻¹, Tris-HCl 200 mmol.L⁻¹, NaCl 250 mmol.L⁻¹, SDS 1%, pH = 7.5) for 1 hour at 25°C prior to its use. The genomic DNA was diluted (1:100) in phosphate buffer for electrochemical tests and in SSC buffer for the optical assays. All genomic DNA samples were submitted to thermal denaturation at 98 °C for 5 minutes before hybridization to obtain the single-stranded DNA (ssDNA).

Genosensor construction

3 µL of HEPB1S probe (1×10^{-6} mol.L⁻¹) were added onto the surface of the gold electrode modified with rGO (Au/rGO). Then, 4 µL of sodium sulfate dodecyl solution (0.1 mol.L⁻¹) were applied for 5 minutes, at room temperature, to remove non-adsorbed HEPB1S probe. For the surface blocking of the modified electrode, bovine serum albumin solution (4 µL, 0.5% w/v) was applied and then incubated for 30 minutes at 37 °C. The washing of the gold electrode modified with rGO and sensibilized with HEPB1S was performed by immersion in phosphate buffer for 15 seconds.

Electrochemical detection by the genosensor

5 µL of positive or negative genomic DNA samples were applied on the surface of the genosensor, maintained for 20 minutes at 55 °C and then washed with phosphate buffer solution. For the detection, ethidium bromide solution (4 µL, 1×10^{-4} mol.L⁻¹) was applied onto the electrode, then incubated for 10 minutes at room temperature and washed with deionized water. Differential pulse voltammetry measurements were conducted using phosphate buffer as

electrolyte. The measurements of the electrochemical impedance spectroscopy (EIS) was performed at perturbation amplitude of 10 mV and frequency range of 10 kHz to 0.1 Hz in 5.00 mmol.L⁻¹ K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆ containing 0.10 mol.L⁻¹ KCl solution.

Assay using gold nanoparticles (AuNPs)

The AuNPs were produced using a modified Turkevich-Frens method. In this method, gold salts are reduced, which leads to the nucleation and growth of gold nanoparticles with 15 to 20 nm in size, stabilized by citrate ions (Frens, 1973). After synthesis, the AuNPs were stored at 4 °C until use. 2 µL of the probe solution (HEPB1S, 126 µmol.L⁻¹) were conjugated with 200 µL of AuNPs solution and maintained at room temperature for 1 hour. Microtubes containing the modified AuNPs with HEPB1S were submitted to 98 °C for 5 minutes. Then, 2 µL of the HBV genomic DNA (1:100) were added and maintained at 55 °C for 20 min for the duplex formation. Prior to the hybridization process, the genomic DNA was digested using the restriction enzyme EcoRI, which was diluted in a specific buffer (50 mmol.L⁻¹ NaCl, 10 mmol.L⁻¹ Tris-HCl, 10 mmol.L⁻¹ MgCl₂, DTT 1 mmol.L⁻¹, pH 7.6). Saturated sodium chloride solution was used to promote the aggregation of AuNPs. Absorbance measurements were monitored by UV-VIS spectroscopy.

Assay using surface plasmon resonance (SPR)

The bare gold disk was previously cleaned with a piranha solution (70% H₂SO₄, 30% H₂O₂) for 2 minutes, rinsed with deionized water and dried with nitrogen gas. For the probe immobilization, 100 µL of HEPB1S (10⁻⁶ mol.L⁻¹) was added onto the electrode and incubated for 1h at 28 °C. After this, 200 µL of 0.01% BSA (w/v) was added for 1h. For the target detection, 100 µL of HBV genomic DNA (1:100) was added onto the gold disk and incubated for 20 minutes. Negative controls used were: *E. coli* genomic DNA, hepatitis C virus (HCV) genomic RNA and healthy plasma samples. After each modification, the electrodes were rinsed with 400 µL of phosphate buffer.

Results and Discussion

Electrochemical impedance spectroscopy analysis

The Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) spectra were plotted in the form of Nyquist plots (Fig. 2A and 2B) and fitted to obtain the theoretical curve corresponding to the equivalent circuit with frequency response (NOVA 1.0). Electrochemical impedimetric measurements were recorded using Au, Au/rGO/HEPB1S probe, Au/rGO/HEPB1S:positive sample (HBV genomic DNA) and Au/rGO/HEPB1S:negative sample (*E. coli* genomic DNA, HCV genomic RNA and healthy plasma samples).

Here figure 2

Bare gold presents a very small semicircle domain, indicating a low electron-transfer resistance ($R_{ct} = 300\Omega$), Fig. 2A. For Au/rGO, there was the absence of the semicircle caused by the increase in electrical conductivity of the nanocomposite (see inset) when compared to the bare Au. After the biofunctionalization steps (Fig. 2B), Au/rGO/HEPB1S probe showed an increase in the charge transfer resistance (R_{ct}). After the addition of the genomic DNA (sample positive), an increase of about 2.5 times in the charge transfer resistance values was observed ($R_{ct} = 1721\Omega$). The addition of the negative control ($R_{ct} = 817\Omega$) does not cause a substantial difference in the resistance when compared to the Au/rGO/HEPB1S probe response.

The increase in diameter of the semicircles observed after hybridization is due to the adsorption of biomolecules, which retards the electron transfer kinetics between the redox probe and the electrode surface [16] and shows that the genosensor is capable of discriminating specific or non-specific samples. R_{ct} values of the samples of HBV-positive patients were higher in relation to the negative samples demonstrating the selectivity of the interaction of the probe with the HBV genomic DNA. The response of the system was presented using the Δ ratio (Fig. 2C) described in previous studies [17].

$$\Delta\text{ratio} = \Delta\text{HBV genomic DNA} / \Delta\text{HEPB1S}$$

$$\Delta\text{HBV genomic DNA} = R_{ct}(\text{HEPB1S: HBV genomic ssDNA})$$

$$\Delta\text{HEPB1S} = R_{ct}(\text{probe})$$

Where R_{ct} (probe) is the charge transfer resistance value obtained after the probe immobilization on the electrode, and R_{ct} (HEPB1S: HBV genomic ssDNA) is the charge transfer resistance value observed after the incubation with the target analyte genomic ssDNA. The reproducibility of obtained results was evaluated using three electrodes.

Images of the Au electrode, Au/rGO, Au/rGO/HEPB1S/BSA, Au/rGO/HEPB1S/BSA/HBV genomic DNA (target) and Au/rGO/HEPB1S/BSA/*E. coli* genomic DNA (NC) presented roughness values (R_q) of 14 ± 1.20 nm, 185 ± 12.60 nm, 97 ± 1.22 nm, 226.2 ± 10.29 nm and 135 ± 8.29 nm, respectively. After the probe immobilization, there was a decrease of 47.5% in R_q values, and in the presence of the target there was a significantly increase, possibly due to the structure of the genomic DNA, more elongated and less flexible than is the probe [18,7,19] These results showed that there was the duplex formation (double-stranded DNA), in accordance with electrochemical and optical studies. AFM images corroborate with the results obtained by EIS, since that the increase in the charge transfer resistance (R_{ct}) values is according to the increase in the roughness (R_q) values for the surfaces evaluated. Rougher surfaces cause a decrease in the charge permeability of the Au/rGO/HEPB1S/BSA/HBV genomic DNA to a redox probe, increasing the R_{ct} values.

Detection by differential pulse voltammetry

DNA hybridization events can be monitored through indirect detection using redox indicators, such as ethidium bromide intercalator ([20,7,19]. Fig. 3A shows the differential pulse voltammogram relative to the oxidation of the ethidium bromide.

Here Figure 3

It can be observed that the oxidation peak of ethidium bromide occurs at +0.6 V. When the treated healthy plasma samples were added to the genosensor (rGO/gold electrode/HEPB1Sprobe), the current values observed were similar to those of the probe. However, with the addition of HBV genomic DNA ($i_p = 4.09 \mu A \pm 0.19 \mu A$), an increase of about 1.4 times was observed when compared to

the probe ($i_p = 2.93 \mu A \pm 0.24 \mu A$), indicating accumulation of the ethidium bromide on the surface of the genosensor and duplex formation. The histogram (Fig. 3B) shows the bar chart charge resultant of the oxidation process of the ethidium bromide for positive and negative samples for HBV. We observed an increase in the charge values after the incubation with the positive sample for the HBV, evidencing the specificity of the probe, which was able to differentiate the positive samples from the negative samples (for example, HCV) obtained from the patients with hepatitis B.

SPR analysis

The SPR angle change caused by the addition of the HBV-negative or positive samples is indicated in the Fig. 4.

Here Figure 4

The angular shift is used as a response unit to quantify the binding of biomolecules in the surface of the sensor, being converted to mass ($120 m^\circ = 1 \text{ ng/mm}^2$) [21]. The angular variation and mass of adsorbed material for HBV-negative ou positive samples is shown in Table 1.

Here Table 1

It is possible to observe alterations in the SPR angle in the presence of the target (positive samples) while the changes in the SPR signal were negligenciabile for the negative controls (*E. coli* genomic DNA, HCV genomic RNA and healthy plasma samples) (Fig. 4B and Table 1). The interaction of the HBV genomic DNA with the HEPBS1 probe corresponds to a mean of 12.70 ng/mm^2 (HBV positive samples) and 0.82 ng/mm^2 (HBV negative samples) of adsorved DNA. These results indicate that the system does not present cross-reactivity or non-specific binding.

Analysis using AuNPs

The AuNP synthesis and the catalytic properties of AuNPs have been employed to develop colorimetric sensors [22]. Colorimetric assays and ultraviolet-visible spectrophotometry (UV-vis) using AuNPs sensibilized with HEPB1S in the presence or absence of samples positive or negative for the Hepatitis B were carried out (Fig. 5). The color change of AuNP conjugated with the specific probe represents promising sensor platforms for disease diagnosis [23,24]. Images of colorimetric transition for the system containing: AuNP, AuNP/HEPB1S, AuNP/HEPB1S/positive sample, AuNP/HEPB1S/negative samples and AuNP saturated sodium chloride solution (blank) is shown in the Fig. 5A.

Here Figure 5

Considering that gold has affinity with compounds containing sulfur atoms [25] the conjugation of the probe HEPB1S was facilitated, and it maintained the AuNPs stabilized, as the absorbance peak remained close to 520 nm.

After sensibilization of the AuNP with probe DNA (HEPB1S), no alteration was observed in the color of colloidal suspension. Adding target (HBV-positive samples) caused color change (light red to blue) due to the aggregation of the nanoparticles and interaction with the HepB1 probe: HBV genomic DNA, and a shift of the absorption band to longer wavelengths.

AuNPs are highly dependent on the ionic strength solution. In the presence of saturated NaCl solution, Au-NPs are destabilized due to the alteration of the ionic force, which disrupts the citrate ion network located around the nanoparticles (Fig. 5B). The AuNps/HEPB1S system was effective in detecting the HBV genomic DNA and discriminate HBV-negative samples.

Conclusion

This work proposed five techniques for the detection of the hepatitis B virus in biological samples. The specificity of the HBV probe can be confirmed by voltammetry, EIS, SPR, absorbance measurements and AFM images. SPR genosensor demonstrated significant advantages in terms of response with the positive target addition, since HBV positive samples result in a change of about

15-fold compared to the negative samples. The produced genosensors enabled the discrimination of hepatitis B and hepatitis C. This assays presents promising results for the selective detection of hepatitis B in biological samples.

Acknowledgements

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). AFM Shimadzu at the Institute of Physics (INFIS) supported by the grant “Pró-Equipamentos” from the Brazilian Agency CAPES. Also, we would like to thank teacher Abílio Borghi for the review of the English manuscript.

Figure captions

Figure 1. Schematic illustration of the manufacturing steps of the DNA sensors.

Figure 2. Nyquist plots in $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ redox pair for: **(A)** bare gold electrode (a) and Au/rGO electrode (b). **(B)** Au/rGO/HEPB1S/HCV genomic RNA (a), Au/rGO/HEPB1S (b), Au/rGO/HEPB1S/*E. coli* genomic DNA (c), Au/rGO/HEPB1S/positive sample (d). Inset: equivalent circuit, where, R_s , R_W , R_{ct} and CPE represent the solution resistance, the Warburg diffusion resistance, the charge-transfer resistance and the constant phase element, respectively. **(C)** Histogram showing the $\Delta ratio$ for the positive (1-6) or negative samples (*E. coli*, HCV, HS1 and HS2). The AFM images for the evaluated surfaces are indicated in A and B.

Figure 3. **(A)** Differential pulse voltammograms (baseline subtracted) of the ethidium bromide oxidation onto transducer surface: in absence (a) or presence: healthy plasma (b) and HBV positive sample (c). **(B)** Histogram obtained from differential pulse voltammograms in the absence (probe) or presence of *E. coli* genomic DNA, HCV genomic RNA, healthy plasma samples (HS1 and HS2) and the genomic DNA samples of ten positive patients for HBV (1-10). Supporting

electrolyte: phosphate buffer (0.10 mol.L^{-1} , pH 7.4), modulation amplitude: 25 mV, pulse interval: 0.2 s, scan rate: 30 mV.s^{-1} .

■

Figure 4. (A) SPR sensograms of the healthy plasma (a), *E. coli* genomic DNA (b), HCV genomic RNA (c) and HBV positive sample (d). (B) SPR signal response for HBV negative (*E. coli*, HCV, HS1, HS2) and positive samples (1-10).

Figure 5. (A) Photographs of microtubes showing color formation for samples: AuNPs, AuNPs/HEPB1S, AuNPs/HEPB1S/*E. coli* (EC), AuNPs/HEPB1S/HCV genomic RNA (HCV), AuNPs/HEPB1S/healthy plasma samples 1 and 2 (HS1 and HS2) and AuNPs/NaCl saturated solution (blank). Samples (1-10): AuNPs/HEPB1S/HBV positive samples. (B) Absorption spectrum for: AuNPs (a), AuNPs/HEPB1S (b), AuNPs/HEPB1S/positive sample (c), AuNPs/HEPB1S/ *E. coli* genomic DNA (d) and AuNPs/ NaCl saturated solution (blank) (e).

Figure 1

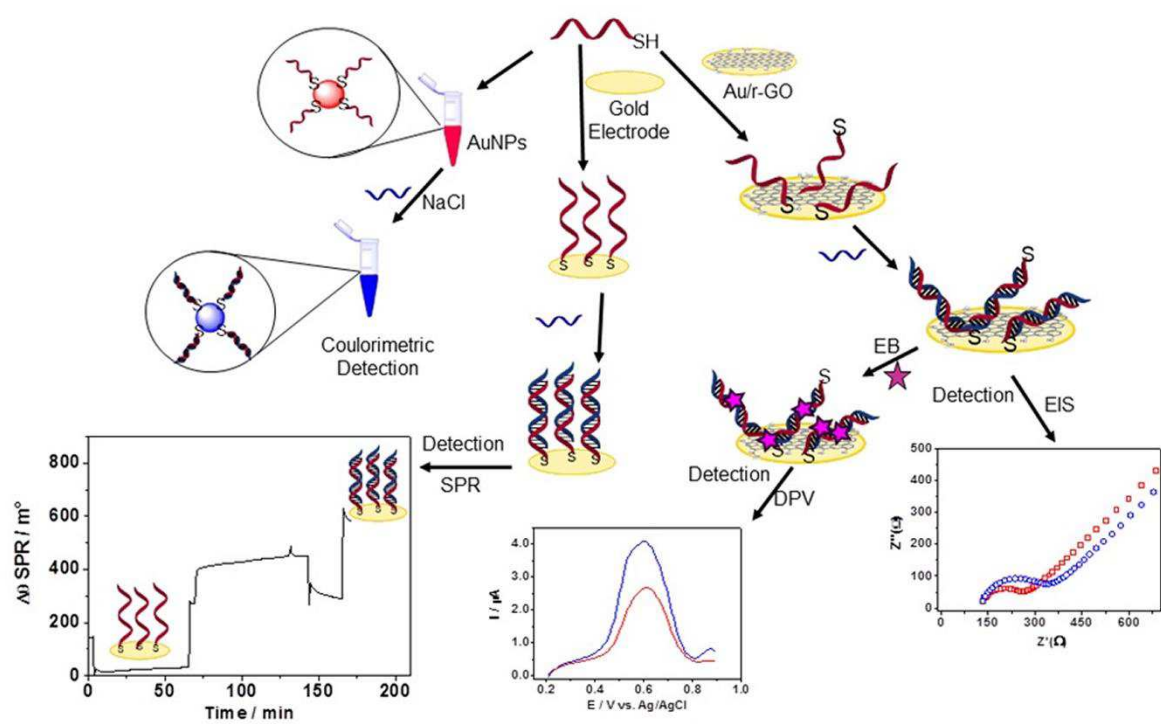
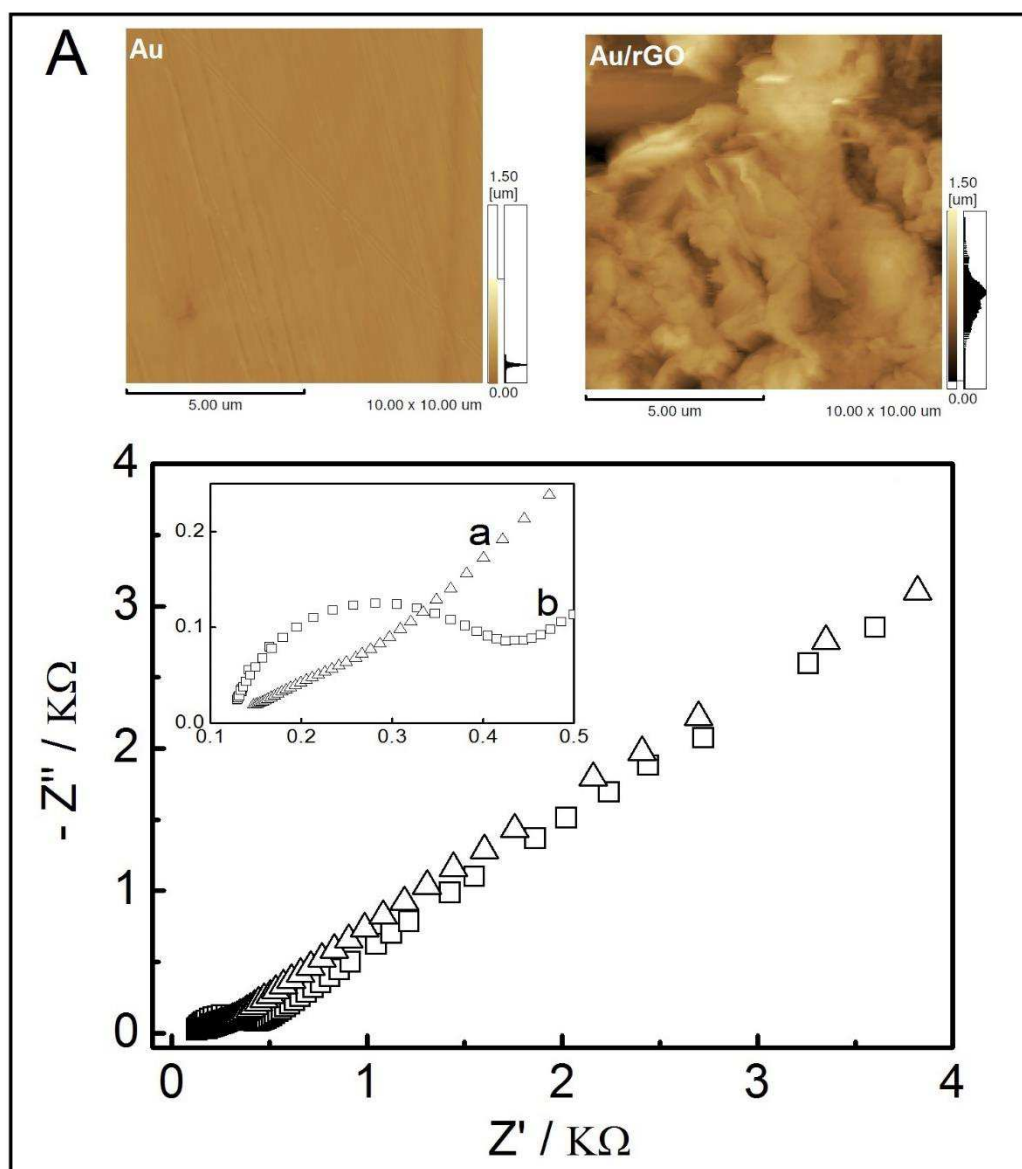
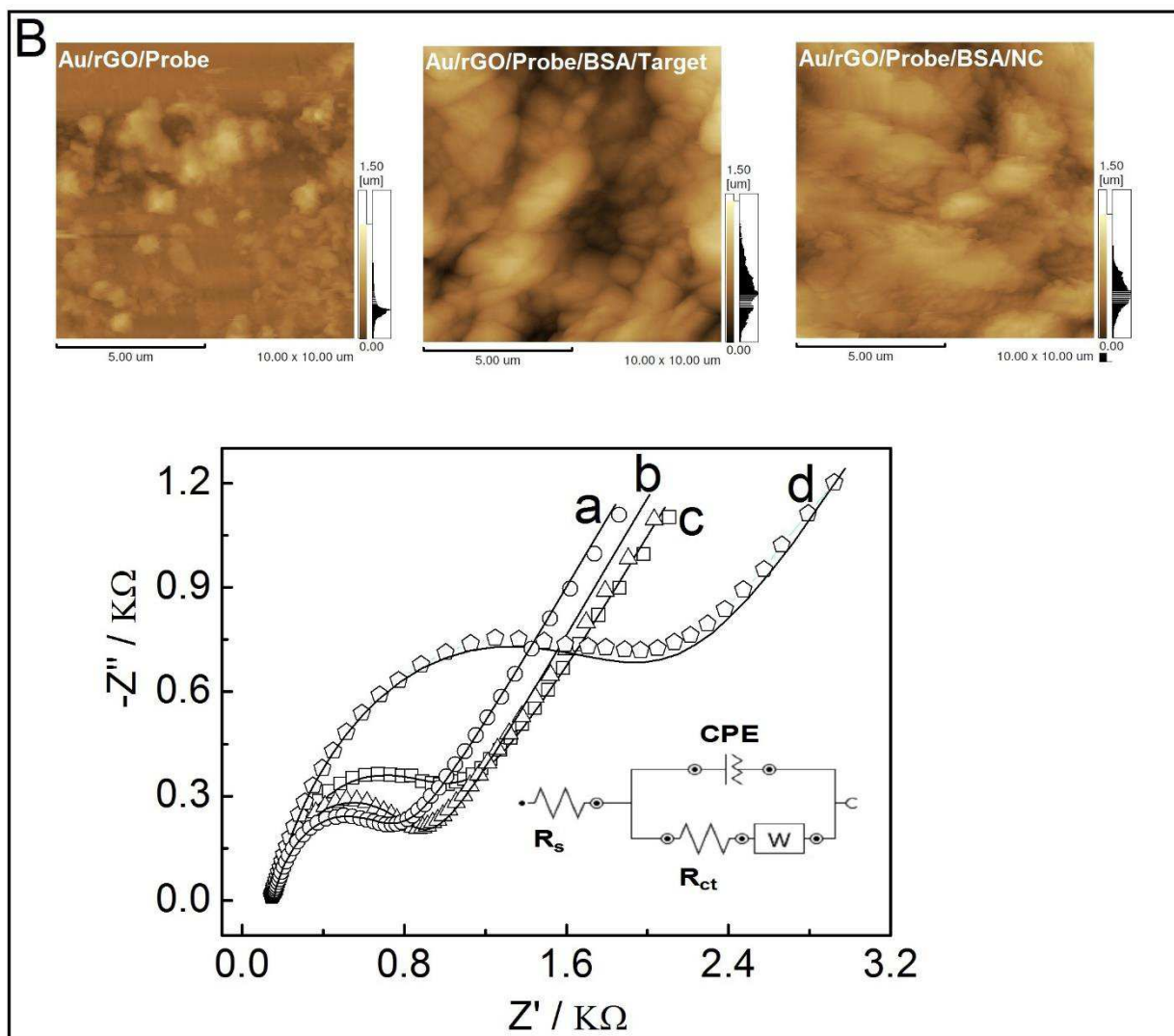


Figure 2





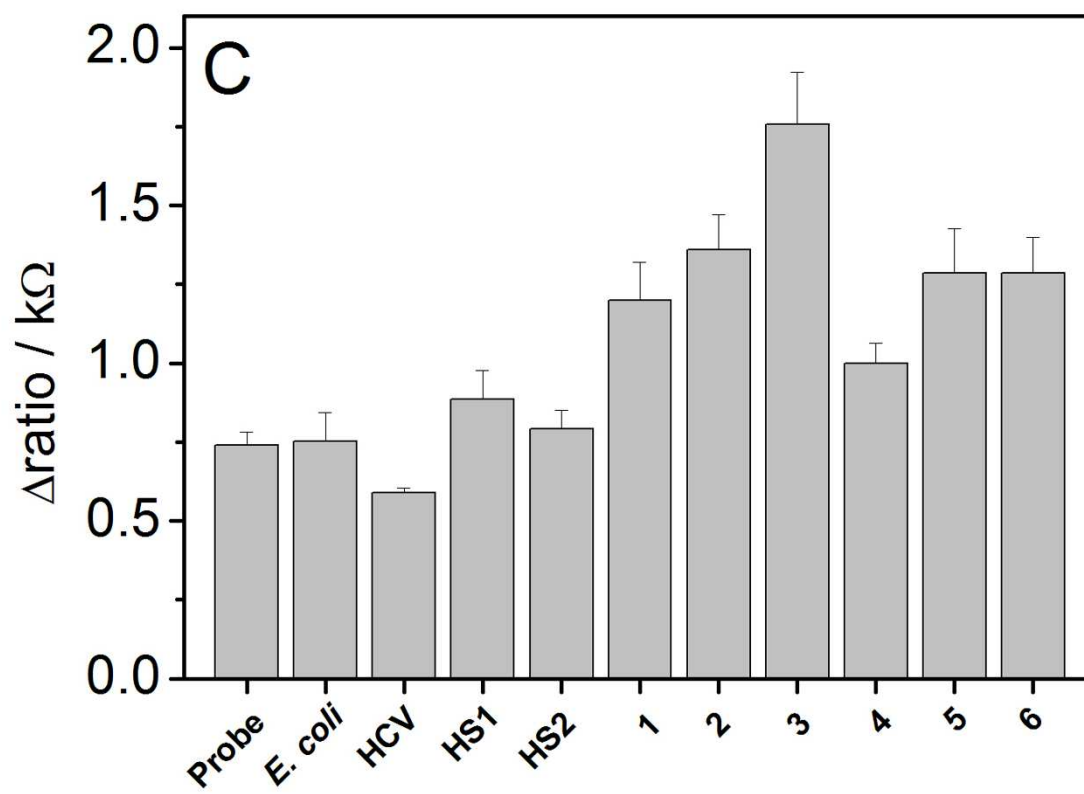


Figure 3

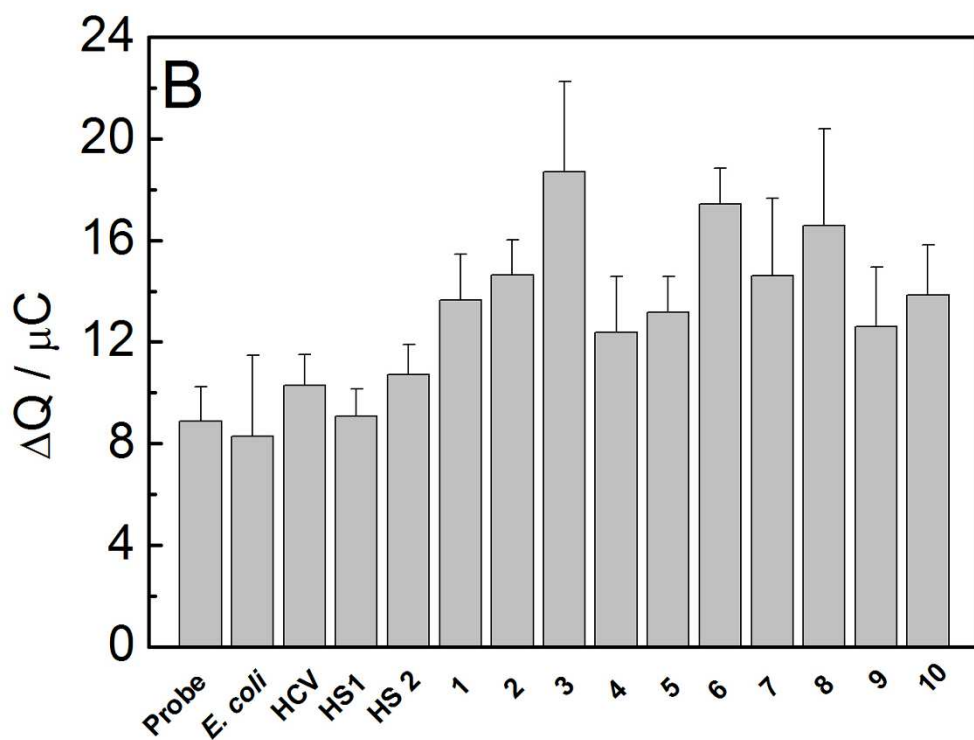
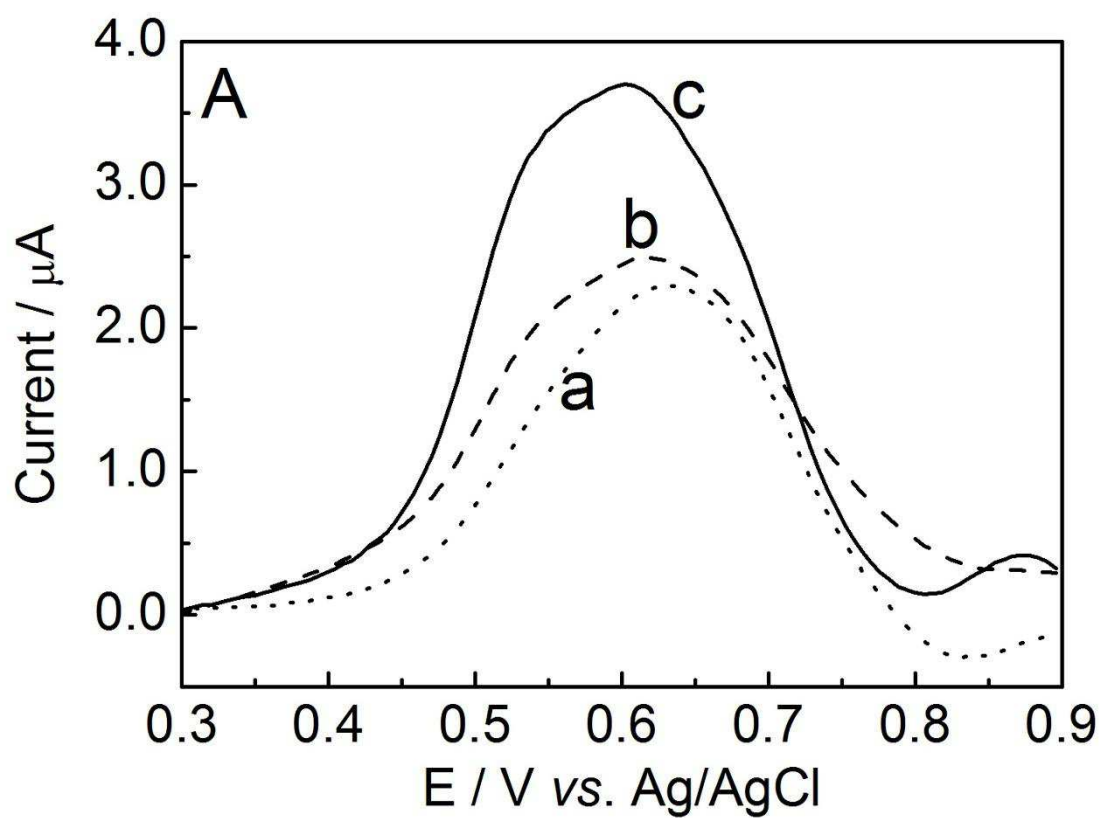


Figure 4

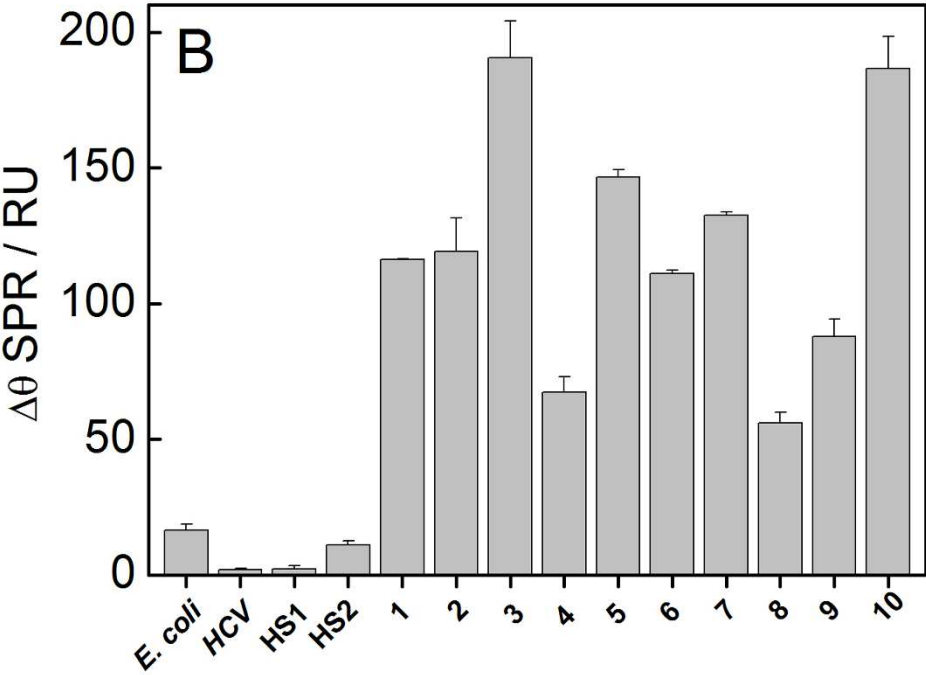
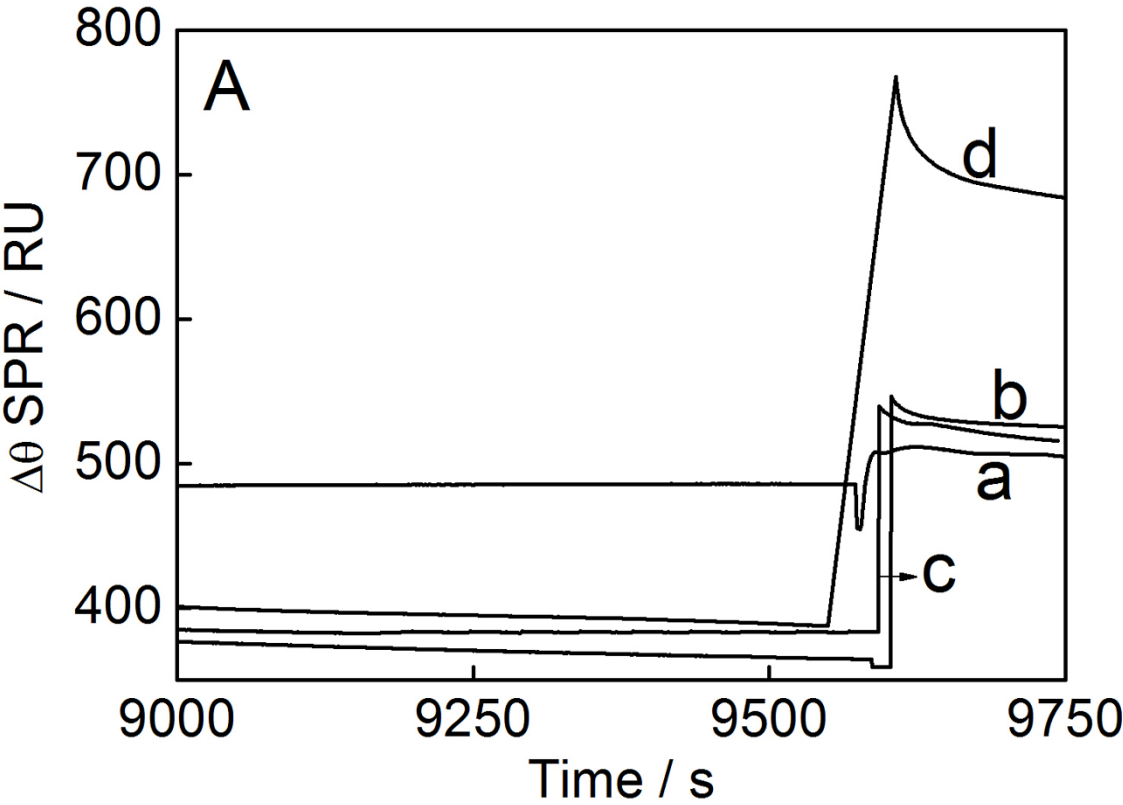
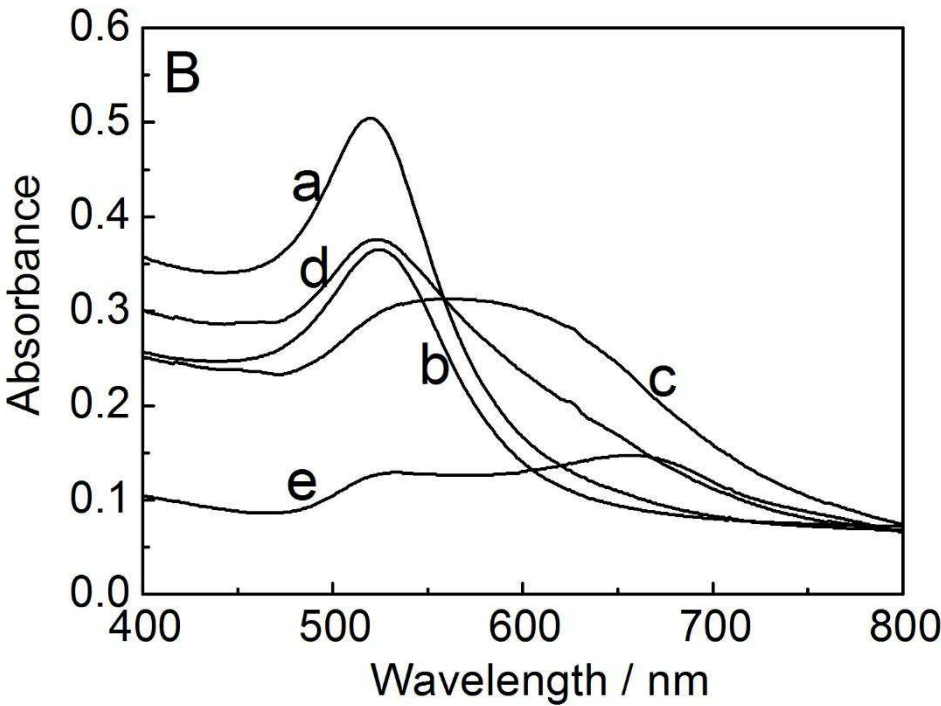
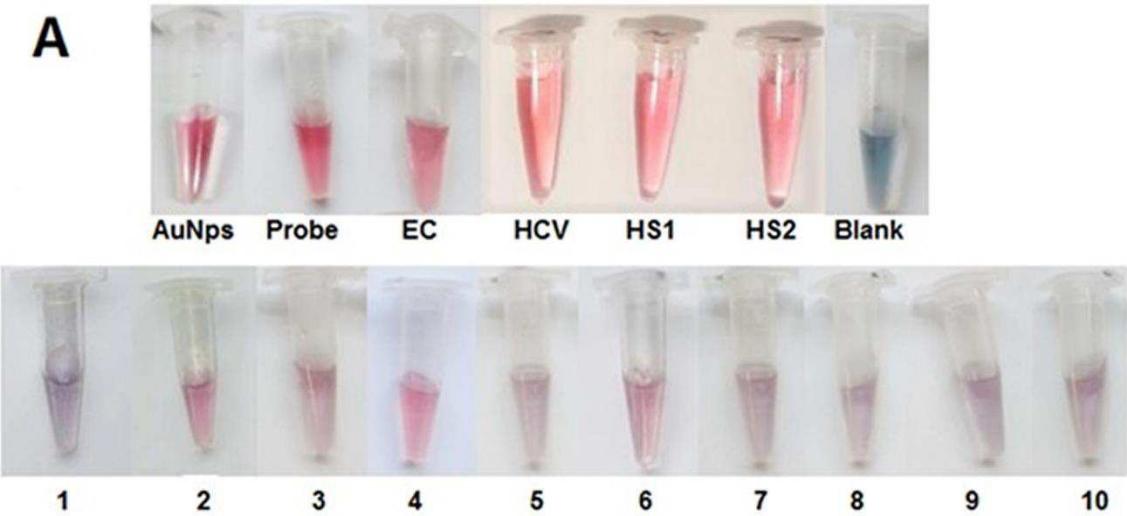


Figure 5



References

1. Riedel T, Surman F, Hageneder S, Pop-Georgievski O, Noehammer C, Hofner M, Brynda E, Rodriguez-Emmenegger C, Dostalek J (2016) Hepatitis B plasmonic biosensor for the analysis of clinical serum samples. *Biosens Bioelectron* 85:272-279. doi:10.1016/j.bios.2016.05.014
2. Mashhadizadeh MH, Talemi RP (2016) Synergistic effect of magnetite and gold nanoparticles onto the response of a label-free impedimetric hepatitis B virus DNA biosensor. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 59:773-781. doi:10.1016/j.msec.2015.10.082
3. Xu H, Gu D, He J, Shi L, Yao J, Liu C, Zhao C, Xu Y, Jiang S, Long J (2015) Multiplex biomarker analysis biosensor for detection of hepatitis B virus. *Biomed Mater Eng* 26 Suppl 1:S2091-2100. doi:10.3233/BME-151515
4. Shakoori Z, Salimian S, Kharrazi S, Adabi M, Saber R (2015) Electrochemical DNA biosensor based on gold nanorods for detecting hepatitis B virus. *Anal Bioanal Chem* 407 (2):455-461. doi:10.1007/s00216-014-8303-9
5. Kanwal F, El-Serag HB, Ross D (2015) Surveillance for hepatocellular carcinoma: can we focus on the mission? *Clin Gastroenterol Hepatol* 13 (4):805-807. doi:10.1016/j.cgh.2014.12.016
6. Launay O, Floret D (2015) Hepatitis B vaccination: a review. *Med Sci : M/S* 31 (5):551-558. doi:10.1051/medsci/20153105018
7. Castro ACH, Franca EG, de Paula LF, Soares MMCN, Goulart LR, Madurro JM, Brito-Madurro AG (2014) Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the hepatitis B virus. *Appl Surf Sci* 314:273-279. doi:10.1016/j.apsusc.2014.06.084
8. Choi YH, Lee GY, Ko H, Chang YW, Kang MJ, Pyun JC (2014) Development of SPR biosensor for the detection of human hepatitis B virus using plasma-treated parylene-N film. *Biosens Bioelectron* 56:286-294. doi:10.1016/j.bios.2014.01.035

9. Chen CC, Lai ZL, Wang GJ, Wu CY (2016) Polymerase chain reaction-free detection of hepatitis B virus DNA using a nanostructured impedance biosensor. *Biosens Bioelectron* 77:603-608. doi:10.1016/j.bios.2015.10.028
10. Hajihosseini S, Nasirizadeh N, Hejazi MS, Yaghmaei P (2016) A sensitive DNA biosensor fabricated from gold nanoparticles and graphene oxide on a glassy carbon electrode. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 61:506-515. doi:10.1016/j.msec.2015.12.091
11. Wei WQ, Feng Q, Jiang L, Waitara MS, Iwuchukwu OF, Roden DM, Jiang M, Xu H, Krauss RM, Rotter JI, Nickerson DA, Davis RL, Berg RL, Peissig PL, McCarty CA, Wilke RA, Denny JC (2014) Characterization of statin dose response in electronic medical records. *Clin Pharmacol Ther* 95 (3):331-338. doi:10.1038/clpt.2013.202
12. Hlavata L, Benikova K, Vyskocil V, Labuda J (2012) Evaluation of damage to DNA induced by UV-C radiation and chemical agents using electrochemical biosensor based on low molecular weight DNA and screen-printed carbon electrode. *Electrochim Acta* 71:134-139. doi:10.1016/j.electacta.2012.03.119
13. Ravan H, Kashanian S, Sanadgol N, Badoei-Dalfard A, Karami Z (2014) Strategies for optimizing DNA hybridization on surfaces. *Anal Biochem* 444:41-46. doi:10.1016/j.ab.2013.09.032
14. Hummers WS, Offeman RE (1958) Preparation of Graphitic Oxide. *J Am Chem Soc* 80 (6):1339-1339. doi:Doi 10.1021/Ja01539a017
15. Wang HW, Hu ZA, Chang YQ, Chen YL, Zhang ZY, Yang YY, Wu HY (2011) Preparation of reduced graphene oxide/cobalt oxide composites and their enhanced capacitive behaviors by homogeneous incorporation of reduced graphene oxide sheets in cobalt oxide matrix. *Mater Chem Phys* 130 (1-2):672-679. doi:DOI 10.1016/j.matchemphys.2011.07.043
16. Souto DE, Silva JV, Martins HR, Reis AB, Luz RC, Kubota LT, Damos FS (2013) Development of a label-free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti-Leishmania infantum antibodies in canine serum. *Biosens Bioelectron* 46:22-29. doi:10.1016/j.bios.2013.01.067

17. Bonanni A, Esplandiu MJ, Pividori MI, Alegret S, del Valle M (2006) Impedimetric genosensors for the detection of DNA hybridization. *Anal Bioanal Chem* 385 (7):1195-1201. doi:10.1007/s00216-006-0558-3
18. Oliveira-Brett AM, Piedade JAP, Silva LA, Diclescu VC (2004) Voltammetric determination of all DNA nucleotides. *Anal Biochem* 332 (2):321-329. doi:10.1016/J.Ab.2004.06.021
19. Balvedi RPA, Castro ACH, Madurro JM, Brito-Madurro AG (2014) Detection of a Specific Biomarker for Epstein-Barr Virus Using a Polymer-Based Genosensor. *Int J Mol Sci* 15 (5):9051-9066. doi:10.3390/ijms15059051
20. Minasyan SH, Tavadyan LA, Antonyan AP, Davtyan HG, Parsadanyan MA, Vardevanyan PO (2006) Differential pulse voltammetric studies of ethidium bromide binding to DNA. *Bioelectrochemistry* 68 (1):48-55. doi:10.1016/j.bioelechem.2005.03.006
21. Stenberg EP, B.; Roos, H.; Urbaniczky, C. (1991) Quantitative Determination of Surface Concentration of Protein with Surface Plasmon Resonance Using Radiolabeled Proteins. *J Colloid Interface Sci* 143 (2):513-526
22. Chen W-W, Guo Y-M, Zheng W-S, Xianyu Y-L, Wang Z, Jiang X-Y (2014) Recent Progress of Colorimetric Assays Based on Gold Nanoparticles for Biomolecules. *Chinese J Anal Chem* 42 (3):307-314. doi:10.1016/s1872-2040(13)60714-8
23. Agasti SS, Rana S, Park MH, Kim CK, You CC, Rotello VM (2010) Nanoparticles for detection and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* 62 (3):316-328. doi:10.1016/j.addr.2009.11.004
24. Cordeiro M, Ferreira Carlos F, Pedrosa P, Lopez A, Baptista PV (2016) Gold Nanoparticles for Diagnostics: Advances towards Points of Care. *Diagnostics* 6 (4). doi:10.3390/diagnostics6040043
25. Oliveira AAS, Costa DAS, Teixeira IF, Moura FCC (2015) Gold nanoparticles supported on modified red mud for biphasic oxidation of sulfur compounds: A synergistic effect. *Appl Catal B* 162:475-482. doi:10.1016/j.apcatb.2014.07.003

Serological electro detection of rheumatoid arthritis using *mimetic peptide*

Danielle Alves de Oliveira^a, Vinícius de Rezende Rodovalho^a, José Manuel Rodrigueiro Flauzino^a, Heliane Souza da Silva^a, Galber Rodrigues Araujo^a, Emília Rezende Vaz^c, Carlos Ueira Vieira^a, João Marcos Madurro^b, Ana Graci Brito Madurro^a

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

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

*Author to whom correspondence should be addressed. Tel. +55 34 32182203; Fax: +55 3432182203; E-mail: agbrito@iqufu.ufu.br

Abstract

This paper reports a new approach for detection of rheumatoid arthritis in serum samples based on graphite electrode modified with poly(3-hydroxybenzoic acid) and a mimetic peptide (M-12), through recognition of the specific antibody anti-CA3, monitoring the peak of the potassium ferrocyanide oxidation by differential pulse voltammetry. This approach allowed the distinction between positive and negative samples for rheumatoid arthritis, since it showed an expressive decrease in the current signal, about 2.2 times, when compared by negative serum. Analysis by SEM and AFM of the bioelectrode surface before and after interaction with the analyte target anti-CA3 showed significant differences in the topography and roughness values, in agreement with the voltammetric studies. The results demonstrate the proof-of-concept application of the biosensor, providing new approach for clinical diagnosis and point-of-care applications for rheumatoid arthritis monitoring.

Keywords: rheumatoid arthritis; bioelectrode; graphite electrodes; poly(3-hydroxybenzoic acid), mimetic peptide.

1. Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is the most common inflammatory autoimmune disease, which affects 0.8 % of the adult population worldwide [1]. Is a chronic disease, progressive and can be asymptomatic for long periods.

RA diagnosis manly requires serological tests, like detection of the rheumatoid factor (RF) and anti-citrullinated peptide antibodies (ACPAs) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [2, 3]. This technique requires trained personnel, expensive reagents and proper laboratory structure, thus the development of new detection devices is required to facilitate RA diagnosis [4].

Biosensors are great alternatives to the current methods because they can be used as point of care diagnostic devices, not requiring professional handling, presenting a rapid response, being miniaturized, portable and cheap [5]. However, the selection of a specific biological recognition element for the detection of the biomarker in the sample is essential [6]. Recently new targets for

RA detection are being developed [7-9] as alternatives to classic biomarkers, aiming to increase the specificity of diagnosis. Peptides that mimic epitopes of biomarkers are of great interest for use in biosensors, since they are more stable and easier to synthesize than larger biomolecules, presenting great affinity for their immunogenic ligand [10, 11]. M-12 peptide, which mimics the enzyme carbonic anhydrase III (CAIII), has been employed to diagnosis RA with sensitivity and specificity, being able to discriminate RA patients, ankylosing spondylitis and systemic lupus erythematosus with high accuracy through ELISA [12]. Thus, the immobilization of M-12 peptide on an electrode to construct an analytical device has a great potential.

Materials commonly used in the construction of bioelectrodes include gold, platinum, diamond doped with boron and carbon [13]. The latter, specifically graphite electrodes, have advantages such as low cost, versatility and wide range of work [14], and can be modified with polymer films to increase its reproducibility, redox interactions and the immobilization of biomolecules [15, 16]. Some monomers can be electropolymerized directly over the electrode surface, generating conducting polymers that optimize the electrochemical detection of analytes [17, 18]. Isomers of hydroxybenzoic acid, highlighting the 3-hydroxybenzoic acid (3-HBA), are used in the development of polymeric films for the modification of electrodes due to the presence of functional groups (carboxylic acid and hydroxyl) which are liable to undergo electropolymerization and can interact with biomolecules [19]. To detect the interaction between the immobilized biomolecule and the analyte, external redox molecules can be used, such as the ferrocyanide, which has a well defined oxidation peak and can discriminate different layers or samples on the electrode surface [20]

In this work, we report a original bioelectrode constructed on graphite electrode modified with poly(3-hydroxybenzoic acid) sensitized with a M-12 mimetic peptide for rheumatoid arthritis diagnosis to monitoring the interaction between M-12 peptide: antiCA-3, in real sample.

2. Experimental

2.1. Chemicals and Materials

All reagents were of analytical grade and were used as received, without further purification, including 3-hydroxybenzoic acid (3-HBA Sigma-Aldrich, 99%), perchloric acid (HClO₄ 37%, Merck), potassium chloride (KCl 99%, Neon), potassium ferricyanide (K₃Fe(CN)₆·3H₂O 99%, Vetec), potassium ferrocyanide (K₄[Fe(CN)₆] 99%, Reagan), dibasic sodium phosphate (Na₂HPO₄ 99%, Synth), monobasic sodium phosphate (NaH₂PO₄ 99%, Synth). All solutions used in electrochemical analysis were bubbled with nitrogen gas. Deionized water (Millipore Milli-Q system, conductivity 0.06 µS) was used for all solutions. M-12 peptide was synthesized by GenScript (sequence CNVNSKSPVERITGGGS, with a C-Terminal amidation and BSA conjugation on cysteine). Serum samples were obtained in the Clinics Hospital of the Federal University of Uberlândia. A pool from eight patients with rheumatoid arthritis was used as positive sample, and one health individual sample as negative control. The use of samples was approved by the Ethics Committee for Research with Human Beings of the Federal University of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil (CEP-UFU, number 685/09).

2.2. Apparatus

Electrochemical measurements were performed in a three-compartment cell using a CH Instruments model 760C potentiostat. A 6 mm diameter graphite disk, prepared from a graphite rod (99.9 %, Alfa Aesar) was used as working electrode. A Platinum plate (2 cm²) was used as counter electrode. All potentials were referred to a silver/silver chloride reference electrode (Ag/AgCl, KCl 3.0 mol.L⁻¹). Prior to electropolymerization, the graphite surface was mechanically polished with an alumina slurry (0.3 µm diameter), ultra-sonicated, washed with distilled water, and dried with nitrogen gas. The AFM images were obtained in a Shimatzu microscope model SPM-9600, in the non-contact mode. SEM images were generated in a Zeiss microscope model EVO-MA10. Prior to the obtaining of the SEM images, the modified electrodes were metalized with gold in a Leica sputter model EM-SDC050.

2.3. Electropolymerization of the 3-HBA

The polymerization of the 3-HBA monomer was conducted on graphite electrodes (GE) by cyclic voltammetry (10 scans, 0.0 and +1.2 V, 50 mV s⁻¹), from a 3-HBA solution (2.5 mmol.L⁻¹) prepared in HClO₄ (0.5 mol.L⁻¹) at room temperature (25 ± 1°C).

After the electropolymerization, the modified electrode was submitted to four potential scans in HClO₄ (0.5 mol.L⁻¹) solution to remove residual monomer and obtain the electrochemical profile of the modified electrode.

2.4. Probe immobilization (M-12) and detection of the analyte in serum

The probe immobilization (M-12) and detection of the analyte in serum sample was carried out according with Fig 1.

<Fig. 1>

M-12 peptide solution (1 mg.mL⁻¹, 15 µL) in phosphate buffer (0.1 mol.L⁻¹, pH 7.4) was applied onto the modified electrode surface and maintained in room temperature for 30 minutes. Next, 10 µL of diluted serum sample (1:10 in phosphate buffer 0.1 mol.L⁻¹, pH 7.4,) was applied onto the bioelectrode (poly 3-HBA/M12) and left in room temperature for 30 minutes. After each step, the electrode surface was rinsed three times with 50 µL of phosphate buffer (0.1 mol.L⁻¹, pH 7.4) and submitted to a differential pulse voltammetry in a potassium ferrocyanide/ferricyanide solution (5.0 mmol.L⁻¹, prepared in KCl 0.1 mol.L⁻¹ solution) at 40 mV.s⁻¹ between -0.1 V and +0.6 V. This redox pair [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻ was used to evaluate the interaction between the probe (M-12 peptide) and the target (Anti-CA3 in serum sample), as well as electrode modification with poly(3-HBA) and probe immobilization.

3. Results and Discussion

3.1. Electrochemical deposition of poly(3-HBA)

The hydroxybenzoic acid electropolymerization was carried out through potential scanning (Fig. 2A). The electrochemical characterization was carried out in HClO₄ solution (Fig. 2B).

<Fig. 2A and 2B>

Figure 2A shows the cyclic voltammetric behavior of 3-HBA in the graphite electrode.

The current peak at +1.11 V was attributed to the monomer oxidation, which decreased along the potential scans. After the first cycle, a gradual increase in the current between +0.3 V and +0.9 V can be observed due the coverage of the electrode with an electroactive material. This modification was confirmed in HClO₄ solution (Fig. 2B), in which there is an increase in the current response after the electrode modification with poly(3-HBA).

3.2. Morphological Analysis

AFM and SEM images were obtained to confirm the electrode modification, probe immobilization (M-12) and interaction with the target (antiCA-3), Fig 3.

<Fig. 3>

It was observed a in the surfaces after each modification step. The graphite electrode modified with poly(3-HBA) has a irregular aspect (Fig. 3a), however when M-12 probe is applied (Fig. 3b), the surface becomes smoother than the modified graphite electrode, by fact that the peptide fills the valleys of the graphite electrode. The interaction poly(3-HBA)/M-12/negative sample (Fig. 3c), does not cause significant change in surface. Nevertheless, in the presence of the positive sample, poly(3-HBA)/M-12/anti-CA3 (Fig. 3d), agglomerates in the form of sticks can be observed, suggesting that components of the serum are adsorbed in the electrode surface due attachment of antibody molecules (anti-CA3) onto the immunosensor surface for the serum of RA patients.

These results indicate that the M-12 probe was successfully incorporated on the modified surface, and that the bioelectrode discriminates negative and positive serum, in accordance with the voltammetric studies indicated in the Fig 4.

Corroborating with the SEM images, analysis by AFM shows an increase in the roughness values of the electrode surface when the positive sample is applied. The images of poly(3-HBA)/M-12/negative serum and poly(3-HBA)/M-

12/positive serum present roughness values of $32 \text{ nm} \pm 0,38 \text{ nm}$ and $46 \text{ nm} \pm 0.3 \text{ nm}$, respectively. This increase can be attributed to the immunocomplex formation between the antibody and the M-12 peptide [21].

3.3. Application for biological samples

The applicability for real sample analysis was carried out using a pool from eight patients with rheumatoid arthritis (as positive sample), and one health individual sample (as negative control), using the $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ redox pair as mediator (Fig 4).

<Fig 4>

The current signal value of the bioelectrode (poly 3-HBA/M-12, Fig 4b) increased 1.2 times when compared with the (poly 3-HBA, Fig 4a), suggesting that the probe is positively charged, thus attracting ferrocyanide ions closer to the electrode surface and thereby increasing the electron transfer. The interaction between bioelectrode:negative serum (Fig 4c) results in a slight increase in the peak current value. However, interaction bioelectrode:positive serum (Fig 3d) shows an expressive decrease in the current signal, about 2.2 times when compared by negative serum. This decrease can be due by steric hindrance when the anti-CA3 antibody interacts with the M-12 peptide captured onto the surface, decreasing the electron transfer to the electrode surface. This behavior was observed in the literature [22].

In addition, some negatively charged amino acids, in pH 7.4 value, such as aspartate and glutamate, which are likely to be included in the antibody primary sequence, can repel the ferrocyanate ion, reducing the oxidation current [10]. It was observed that both serum samples there was a shift to more cathodic potentials ($\Delta E = 0.1 \text{ V}$). This can be due the fact that the serum is a complex fluid in which there are different electroactive species that can act as oxidant agents, facilitating ferrocyanide oxidation.

4. Conclusion

The immobilization of M-12 peptide onto modified electrode with poly(3-HBA) and the bio-recognition between M-12 probe and anti-CA3 antibody (analyte) in positive serum for rheumatoid arthritis were possible using differential pulse voltammetry.

The bioelectrode was able to discriminate serum samples of rheumatoid arthritis patients and healthy individuals by the considerable decrease in the current signal value of ferrocyanide oxidation. However, the interaction bioelectrode:positive serum shows an expressive decrease in the current signal, about 2.2 times when compared by negative serum. Morphological analysis, by SEM and AFM, supports the electrochemical results.

This research suggests that a simple dispositive presents great potential for the molecular diagnosis of rheumatoid arthritis.

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).

Figure Captions

Figure 1. Schematic diagram illustrating the steps for construction of bioelectrode. Graphite electrode (A), graphite electrode/poly (3-HBA) (B), M-12 probe immobilization and BSA- blocking (C), biorecognition between M-12 peptide and anti-CA3 (D), addition of the redox probe, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (E), electrochemical transduction (F).

Figure 2. (A) Cyclic voltammogram of the graphite electrode in a 3-HBA solution (2.5 mmol.L^{-1}), 10 cycles. (B) Cyclic voltammograms obtained before (a) and after (b) electropolymerization. Supporting electrolyte: $0.5 \text{ mol.L}^{-1} \text{ HClO}_4$, 50 mV s^{-1} . *The arrows show successive scans.*

Figure 3. SEM microscopy images of the electrodes. Magnification: 50.000X, voltage: 10kV, scale 1 μ m. graphite electrode/poly(3-HBA) (A), graphite electrode/poly(3-HBA)/M-12 (B), graphite electrode/poly(3-HBA)/M-12/negative serum (C), graphite electrode/poly(3-HBA)/M-12/positive serum (D).

Figure 4. (A) Differential pulse voltammograms (baseline-corrected) of the electrodes in potassium ferrocyanide/ferricyanide solution (5.0 mmol.L⁻¹, prepared in a KCl 0.1 mol.L⁻¹ solution); $v = 40 \text{ mV.s}^{-1}$. Poly(3-HBA) (a), M-12 probe (b), negative serum (c), positive serum (d). (B) Bar chart of the current value of the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ oxidation process.

Figure 1

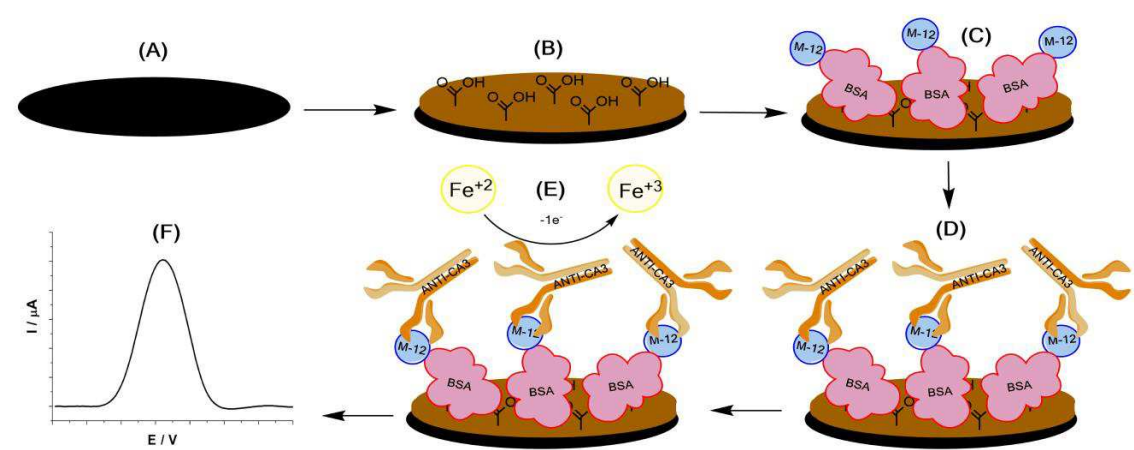


Figure 2

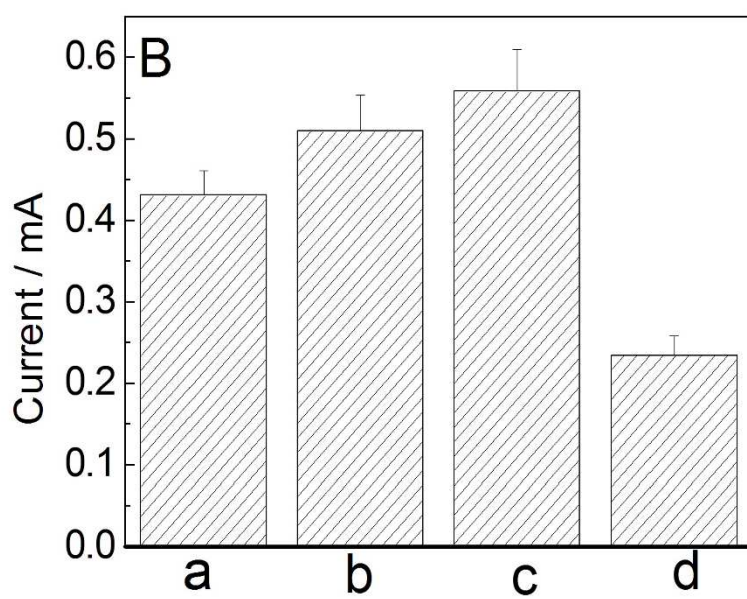
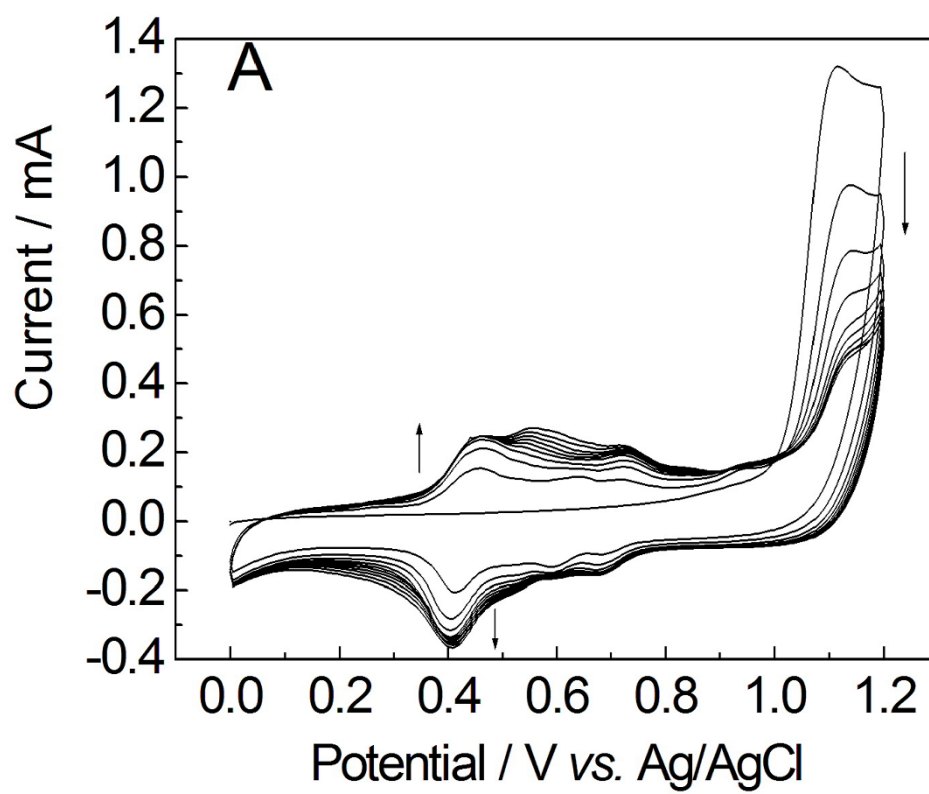


Figure 3

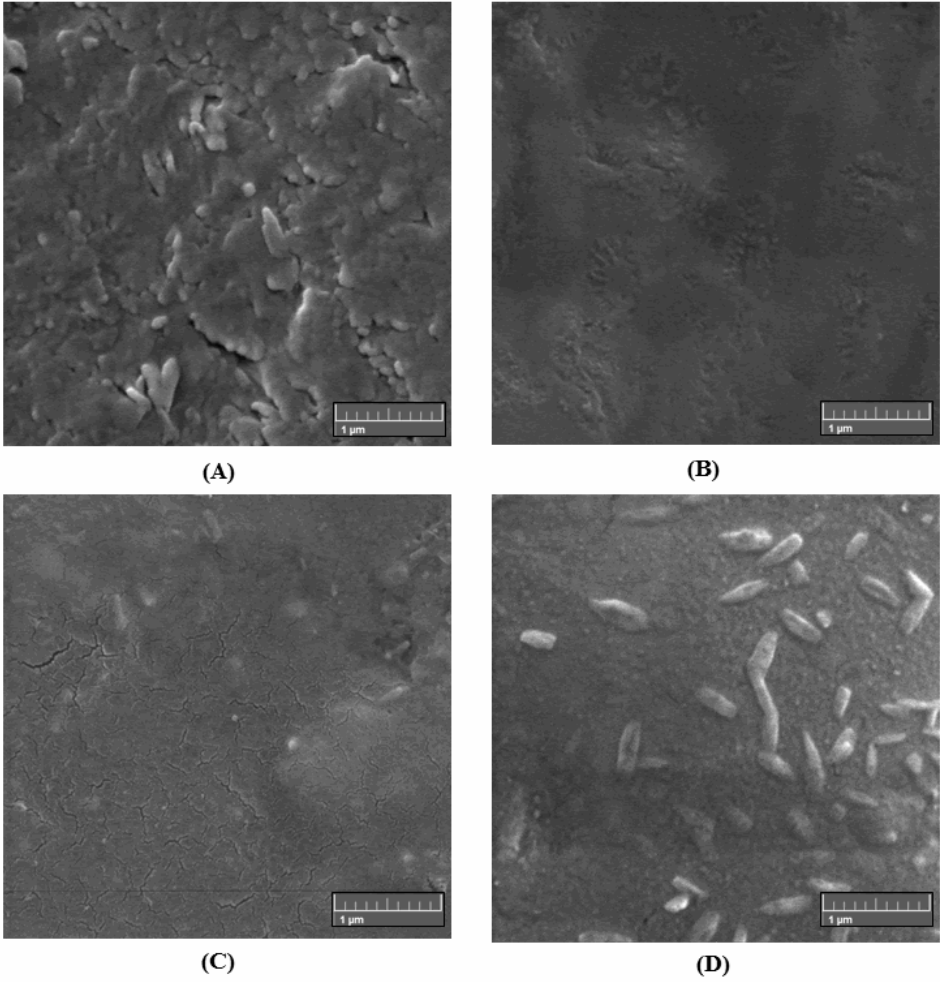
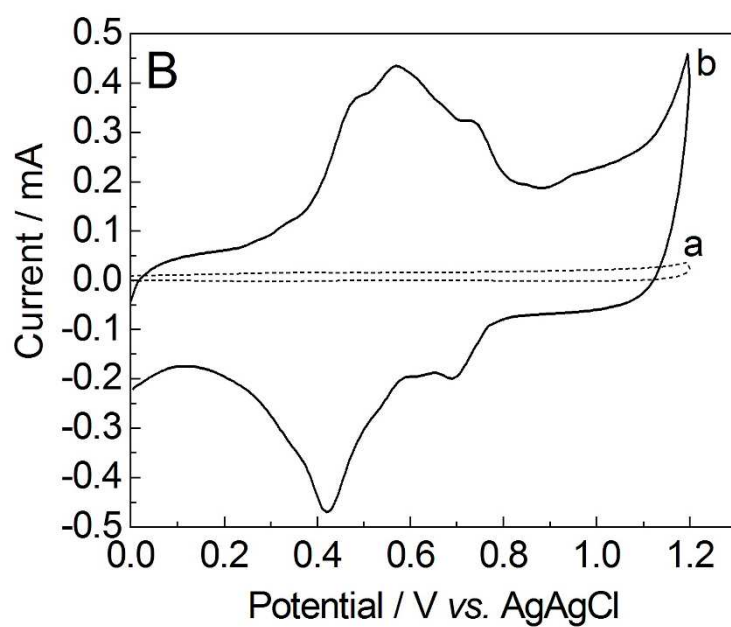
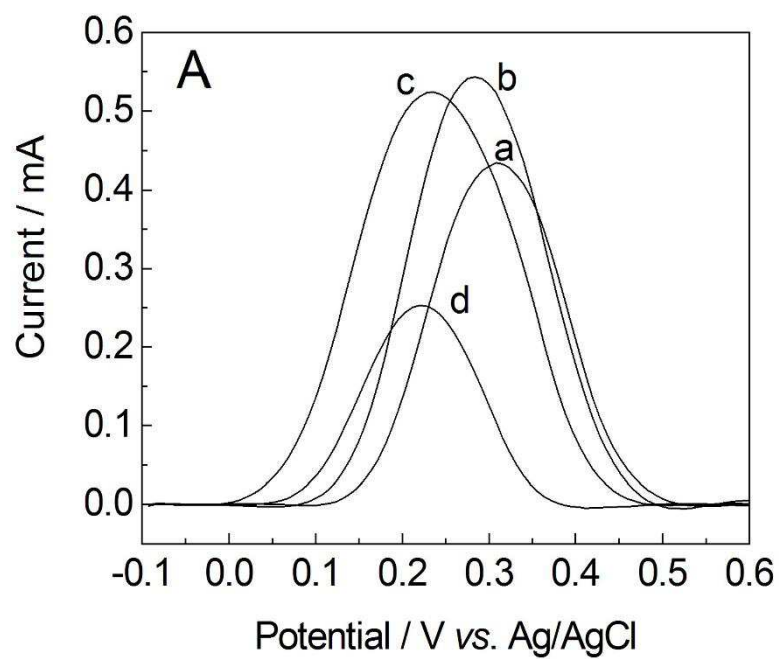


Figure 4



References

- [1] J.A. Rindfleisch, D. Muller, Diagnosis and management of rheumatoid arthritis, *American family physician* 72(6) (2005) 1037-47.
- [2] M.V. Cherkasova, A.A. Novikov, E.N. Alexndrova, D.E. Karateev, T.V. Popkova, E.L. Luchikhina, A.S. Avdeeva, E.L. Nasonov, [The clinical informativeness of detection of antibodies to citrullinated proteins under rheumatoid arthritis], *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika* 60(2) (2015) 46-9.
- [3] T.J. Doyle, A.S. Patel, H. Hatabu, M. Nishino, G. Wu, J.C. Osorio, M.F. Golzarri, A. Traslosheros, S.G. Chu, M.L. Frits, C.K. Iannaccone, D. Koontz, C. Fuhrman, M.E. Weinblatt, S.Y. El-Chemaly, G.R. Washko, G.M. Hunninghake, A.M. Choi, P.F. Dellaripa, C.V. Oddis, N.A. Shadick, D.P. Ascherman, I.O. Rosas, Detection of Rheumatoid Arthritis-Interstitial Lung Disease Is Enhanced by Serum Biomarkers, *American journal of respiratory and critical care medicine* 191(12) (2015) 1403-12.
- [4] J.M. Ledingham, g. British Society for Rheumatology national audit project working, c. steering, Importance of early detection and referral of rheumatoid arthritis, *Bmj* 353 (2016) i2172.
- [5] A.C.H. Castro, E.G. Franca, L.F. de Paula, M.M.C.N. Soares, L.R. Goulart, J.M. Madurro, A.G. Brito-Madurro, Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the hepatitis B virus, *Applied Surface Science* 314 (2014) 273-279.
- [6] L.R. Goulart, C.U. Vieira, A.P.P. Freschi, F.E. Capparelli, P.T. Fujimura, J.F. Almeida, L.F. Ferreira, I.M.B. Goulart, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro, Biomarkers for Serum Diagnosis of Infectious Diseases and Their Potential Application in Novel Sensor Platforms, *Crit Rev Immunol* 30(2) (2010) 201-222.
- [7] A. Alver, A. Senturk, H. Cakirbay, A. Mentese, F. Gokmen, E.E. Keha, F. Ucar, Carbonic anhydrase II autoantibody and oxidative stress in rheumatoid arthritis, *Clinical biochemistry* 44(17-18) (2011) 1385-9.
- [8] G. Theiler, F. Quehenberger, F. Rainer, M. Neubauer, M. Stettin, C. Robier, The detection of calcium pyrophosphate crystals in the synovial fluid of patients

with rheumatoid arthritis using the cytospin technique: prevalence and clinical correlation, *Rheumatology international* 34(1) (2014) 137-9.

[9] A. Zalewska, J. Szulimowska, N. Waszkiewicz, D. Waszkiel, K. Zwierz, M. Knas, Salivary exoglycosidases in the detection of early onset of salivary gland involvement in rheumatoid arthritis, *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej* 67 (2013) 1182-8.

[10] G.R. Araujo, P.T. Fujimura, E.R. Vaz, T.A. Silva, V.R. Rodovalho, A.G. Britto-Madurro, J.M. Madurro, J.E. Fonseca, C.H.M. Silva, P.S. Santos, A.F. Mourao, H. Canhao, L.R. Goulart, J. Goncalves, C. Ueira-Vieira, A novel reactive epitope-based antigen targeted by serum autoantibodies in oligoarticular and polyarticular juvenile idiopathic arthritis and development of an electrochemical biosensor, *Immunobiology* 224(5) (2016) 634-640.

[11] G. Rossi, F. Real-Fernandez, F. Panza, F. Barbetti, F. Pratesi, P. Rovero, P. Migliorini, Biosensor analysis of anti-citrullinated protein/peptide antibody affinity, *Anal Biochem* 465 (2014) 96-101.

[12] G.R. Araujo, E.R. Vaz, P.T. Fujimura, J.E. Fonseca, L.M. de Lima, H. Canhao, G. Venturini, K.H. Cardozo, V.M. Carvalho, M.H. Napimoga, L.R. Goulart, J. Goncalves, C. Ueira-Vieira, Improved serological detection of rheumatoid arthritis: a highly antigenic mimotope of carbonic anhydrase III selected in a murine model by phage display, *Arthritis research & therapy* 17 (2015) 168.

[13] R.M. Iost, J.M. Madurro, A.G. Brito-Madurro, I.L. Nantes, L. Caseli, F.N. Crespilho, Strategies of Nano-Manipulation for Application in Electrochemical Biosensors, *Int J Electrochem Sc* 6(7) (2011) 2965-2997.

[14] E.I. Melo, D.L. Franco, A.S. Afonso, H.C. Rezende, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro, N.M.M. Coelho, A Biosensor Using Poly(4-Aminophenol)/Acetylcholinesterase Modified Graphite Electrode for the Detection of Dichlorvos, *Braz Arch Biol Techn* 54(6) (2011) 1217-1222.

[15] L.P. Rodrigues, L.F. Ferreira, A.F.G. do Monte, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro, Bioelectrode Applied to Diagnosis of Cardiac Disease, *J Nanosci Nanotechno* 14(9) (2014) 6528-6538.

[16] L.F. Ferreira, L.M. Souza, D.L. Franco, A.C.H. Castro, A.A. Oliveira, J.F.C. Boodts, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro, Formation of novel polymeric films derived from 4-hydroxybenzoic acid, *Materials Chemistry and Physics* 129(1-2) (2011) 46-52.

- [17] R.M.L. Oliveira, S.N. Vieira, H.C. Alves, E.G. Franca, D.L. Franco, L.F. Ferreira, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro, Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: a new matrix for oligonucleotide hybridization, *Journal of Materials Science* 45(2) (2010) 475-482.
- [18] D.L. Franco, A.S. Afonso, S.N. Vieira, L.F. Ferreira, R.A. Gonçalves, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro, Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electric and morphologic properties, *Materials Chemistry and Physics* 107(2-3) (2008) 404-409.
- [19] D.C. Ferreira, L.P. Rodrigues, J.M. Madurro, A.G.B. Madurro, R.T.S. de Oliveira, O. Abrahao, Graphite Electrodes Modified with poly(3-hydroxybenzoic acid) for Oligonucleotides Sensors, *Int J Electrochem Sc* 9(11) (2014) 6246-6257.
- [20] H. Hennessey, N. Afara, S. Omanovic, A.L. Padjen, Electrochemical investigations of the interaction of C-reactive protein (CRP) with a CRP antibody chemically immobilized on a gold surface, *Anal Chim Acta* 643(1-2) (2009) 45-53.
- [21] A.A.P. Ferreira, W. Colli, M.J.M. Alves, D.R. Oliveira, P.I. Costa, A.G. Güell, F. Sanz, A.V. Benedetti, H. Yamanaka, Investigation of the interaction between Tc85-11 protein and antibody anti-T. cruzi by AFM and amperometric measurements, *Electrochimica Acta* 51(24) (2006) 5046-5052.
- [22] X. Chen, H. Xie, Z.Y. Seow, Z. Gao, An ultrasensitive DNA biosensor based on enzyme-catalyzed deposition of cupric hexacyanoferrate nanoparticles, *Biosensors & bioelectronics* 25(6) (2010) 1420-6.