



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

KAREN YASMIM PEREIRA DOS SANTOS AVELINO

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS DE DNA
BASEADOS EM TECNOLOGIA DE ELETRODOS FLEXÍVEIS E PLATAFORMAS
POLIMÉRICAS NANOESTRUTURADAS PARA O DIAGNÓSTICO DE
PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Recife

2021

KAREN YASMIM PEREIRA DOS SANTOS AVELINO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS DE DNA
BASEADOS EM TECNOLOGIA DE ELETRODOS FLEXÍVEIS E PLATAFORMAS
POLIMÉRICAS NANOESTRUTURADAS PARA O DIAGNÓSTICO DE
PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Danielly Lima de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade

Recife

2021

Catálogo na Fonte:
Elaine C Barroso, CRB-4/1728

Avelino, Karen Yasmim Pereira dos Santos

Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos de DNA baseados em tecnologia de eletrodos flexíveis e plataformas poliméricas nanoestruturadas para o diagnóstico clínico de Papilomavírus humano / Karen Yasmim Pereira dos Santos Avelino – 2021.

328 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Danielly Lima de Oliveira

Coorientador: César Augusto Souza de Andrade

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2021.

Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Papilomavírus humano 2. Nanopartículas 3. Polímeros condutores I. Oliveira, Maria Danielly Lima de (orient.). II. Andrade, César Augusto Souza de (coorient.) III. Título

579.2445

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2021-268

KAREN YASMIM PEREIRA DOS SANTOS AVELINO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCENSORES ELETROQUÍMICOS DE DNA
BASEADOS EM TECNOLOGIA DE ELETRODOS FLEXÍVEIS E PLATAFORMAS
POLIMÉRICAS NANOESTRUTURADAS PARA O DIAGNÓSTICO DE
PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Aprovada em: 18/08/2021

Banca Examinadora

Prof.^a. Dr.^a. Maria Danielly Lima de Oliveira (Presidente da banca)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a. Dr.^a. Maira Galdino da Rocha Pitta (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a. Dr.^a. Norma Lucena-Silva (Examinadora externa)
Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Aggeu Magalhães/PE

Prof. Dr. Kleber Gonçalves Bezerra Alves (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

*Àqueles que renunciaram a si para proporcionar a mim amparo, educação e amor,
meus pais.*

AGRADECIMENTOS

*Em todos os momentos da minha vida exaltarei grandiosa gratidão a **Deus** por me condicionar, amparar e revigorar meu ânimo. Sua ininterrupta presença em meu caminhar demonstra o quanto o seu amor é infindável. Digna desejo ser de sua plenitude, proteção e compaixão. A Ele todo o sempre, porque a sabedoria e a força a Ele pertencem!*

*Aos meus pais, **Paulo** e **Maria**, por serem meu refúgio de paz e fonte inesgotável de afeto, cuidado e compreensão. Idealizadores dos meus sonhos, agradeço por confiarem a mim a sua ternura, dedicação, incentivo e ensinamentos. Ao meu irmão e amigo, **Paulo Victor**, obrigada por acreditar em minha vitória e ser o meu suporte em todas as circunstâncias. Que o Senhor seja o alicerce da nossa família em todo o tempo, amo vocês incondicionalmente.*

*Ao meu amor, **Saulo**, agradeço por ser o meu ponto de equilíbrio, apoiador, companheiro e amigo em dias de alegrias, conquistas, incertezas e tristezas. Sou grata a Deus por compartilhar uma vida mais leve com você.*

*Aos meus mestres, **Prof^a. Dr^a. Maria Danielly** e ao **Prof. Dr. César Andrade**, agradeço por me revelar, instruir e conduzir à trajetória acadêmica e científica. Ao longo desses incontáveis anos, vocês influenciaram minha formação pessoal e profissional de forma singular. Complementares e inestimáveis foram os ensinamentos repassados por cada um. À medida que a **Prof^a. Danielly** me proporcionou sabedoria, experiência, serenidade, bondade e sensatez, o **Prof. César** me fez transpor limites e alcançar novos horizontes. Por cada conselho, aprendizado, oportunidade, reconhecimento e confiança, serei eternamente grata.*

*À mestranda e minha amiga, **Leóny**, minha infinita gratidão pela paciência, entusiasmo, proatividade, colaboração e assistência imprescindíveis para o desenvolver de nossos projetos científicos.*

*Aos meus queridos amigos, **Alisson, Bárbara Nascimento, Bárbara Santos, Brenda, Pedro e Ruana**, agradeço por me amparar, sustentar, encorajar, compreender e conceder felicidade plena.*

*A todos os companheiros do Grupo de Biodispositivos Nanoestruturados, especialmente a **Alberto, Beatriz, Estefani, Flávia, Giselle, Isaac, Kalline, Maurília, Raíza e Sevy**, por todos os momentos inesquecíveis e instruções que contribuíram para minha pesquisa.*

*À **Profa. Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva** do Laboratório de Imunogenética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz pela cooperação e transferência de conhecimentos.*

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que incentivaram e me apoiaram a desenvolver este trabalho, meu muito obrigado.

I can live with doubt and uncertainty and not knowing. I think it is much more interesting to live not knowing than to have answers that might be wrong. If we will only allow that, as we progress, we remain unsure, we will leave opportunities for alternatives. We will not become enthusiastic for the fact, the knowledge, the absolute truth of the day, but remain always uncertain. In order to make progress, one must leave the door to the unknown ajar (FEYNMAN, 1956).

RESUMO

O Papilomavírus humano (HPV) é considerado um dos principais fatores etiológicos do câncer cervical. Considerando a baixa sensibilidade dos exames citológicos e os elevados custos dos métodos moleculares, o desenvolvimento de testes efetivos para o diagnóstico de HPV é uma prioridade. Objetivando-se desenvolver e aprimorar a performance analítica de biodispositivos utilizáveis na identificação de genótipos de HPV, biossensores eletroquímicos inter-relacionados foram fabricados. Primariamente, duas plataformas nanoestruturadas foram construídas sobre um transdutor de ouro, constituídas por: i) compósito híbrido de nanopartículas de ouro e polianilina (AuNP/PANI) e ii) polipirrol (PPy), nanopartículas de ouro (AuNPs) e cisteamina (Cys). Posteriormente, para otimização do estudo, tiras flexíveis de óxido de índio dopado com estanho (ITO) foram utilizadas no desenvolvimento de eletrodos de trabalho miniaturizados. Através destas estratégias nanotecnológicas, biossensores ultrasensíveis foram elaborados para avaliação da presença de HPV e identificação de famílias genotípicas, mediante ancoragem química de sequências específicas de DNA funcionalizadas com o grupo amino na terminação 3' (NH₂-DNA) (sondas MY11, BSH6, BSH16, BSH18, BSH26, BSH53 e BSH61). As técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram usadas para análise das modificações eletródicas e monitoramento da hibridização molecular. A microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura (SEM) possibilitaram a caracterização topográfica e morfológica dos sistemas nanoestruturados de DNA. Alterações nas correntes amperométricas e nos valores de resistência à transferência de carga (R_{CT}) foram observadas após exposição dos biossensores a amostras plasmidiais e espécimes cervicais contendo o genoma viral. As ferramentas propostas foram capazes de identificar a presença de HPV em concentrações mínimas, na ordem de fentograma por microlitro. Além disso, através do emprego da sonda MY11 foi possível verificar diferentes perfis de resposta eletroquímica para os genótipos de alto (HPV16, 18, 31, 33, 45 e 58) e baixo risco oncogênico (HPV6, 11, 53 e 54), sugerindo assim, um diagnóstico diferencial de HPV. Em pacientes com diagnóstico positivo para HPV, ensaios de triagem permitiram a determinação da família viral responsável pela infecção e o monitoramento do biomarcador para tumorigênese, gene p53. As respostas analíticas foram obtidas rapidamente, em um intervalo de 15 minutos, sem marcadores adicionais e com elevada reprodutibilidade, sensibilidade, especificidade e seletividade. Destarte, verifica-se que os biodispositivos eletroquímicos de DNA apresentam vantagens

apreciáveis para o diagnóstico de papilomavírus em estágios iniciais da infecção, contribuindo para a prevenção do câncer e implementação de estratégias terapêuticas eficazes.

Palavras-chave: Biossensor; Impedância eletroquímica; Nanocompósito híbrido; Nanopartículas de ouro; Papilomavírus humano; Polímeros condutores.

ABSTRACT

Human Papillomavirus (HPV) is considered one of the main etiologic factors of cervical cancer. Considering the low sensitivity of cytological exams and high costs of the molecular methods, the development of effective tests for the diagnosis of HPV is a priority. In order to develop and improve the analytical performance of biodevices usable in the identification of HPV genotypes, interrelated electrochemical biosensors were manufactured. Primarily, two nanostructured platforms were built on a gold transducer, consisting of: i) hybrid composite of gold nanoparticles and polyaniline (AuNP/PANI) and ii) polypyrrole (PPy), gold nanoparticles (AuNPs) and cysteamine (Cys). Subsequently, to optimize the study, flexible strips of tin-doped indium oxide (ITO) were used in the development of miniaturized working electrodes. Through these nanotechnological strategies, ultrasensitive biosensors were designed to assess the presence of HPV and identify genotypic families, by chemical anchorage of specific DNA sequences functionalized with the amino group at the 3' termination (NH₂-DNA) (MY11, BSH6, BSH16, BSH18, BSH26, BSH53 and BSH61 probes). The techniques of cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were used for the analysis of electrode modifications and monitoring of molecular hybridization. Atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM) enabled the topographic and morphological characterization of the nanostructured DNA systems. Changes in the amperometric currents and in the charge transfer resistance (R_{CT}) values were observed after exposure of the biosensors to plasmid samples and cervical specimens containing the viral genome. The proposed technological tools were able to identify the presence of HPV in minimal concentrations, in the order of phentogram per microliter. In addition, using the MY11 probe, it was possible to verify different electrochemical response profiles for the high (HPV16, 18, 31, 33, 45 and 58) and low oncogenic risk genotypes (HPV6, 11, 53 and 54), suggesting thus, a differential diagnosis of HPV. In patients with positive diagnosis for HPV, screening assays allowed the determination of the viral family responsible for the infection and the monitoring of the biomarker for tumorigenesis, p53 gene. The analytical responses were obtained rapidly, in an interval of 15 minutes, without additional markers and with high reproducibility, sensitivity, specificity, and selectivity. Thus, it is verified that the electrochemical DNA biodevices have appreciable advantages for the diagnosis of papillomavirus in the early stages of infection, contributing to the prevention of cancer and implementation of effective therapeutic strategies.

Keywords: Biosensor; Conductive polymers; Electrochemical impedance; Gold nanoparticle; Human papillomavirus; Hybrid nanocomposite.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Características do genoma viral e principais funções das proteínas do HPV	29
Figura 2 –	Comparação dos dez tipos oncogênicos de HPV mais frequentes entre mulheres com câncer cervical no mundo, em comparação com as regiões desenvolvidas e em desenvolvimento	30
Figura 3 –	O ciclo de vida do HPV	31
Figura 4 –	Classificação dos testes moleculares para o diagnóstico de HPV	35
Figura 5 –	Mapa global para o mercado econômico de biossensores nanotecnológicos com taxa de crescimento por região	37
Figura 6 –	Representação esquemática de um biossensor	38
Figura 7 –	Ilustração esquemática de um biossensor catalítico (a) e três diferentes tipos de biossensores de afinidade (b)	39
Figura 8 –	A estrutura conformacional do DNA e as interações bioespecíficas entre suas bases nitrogenadas	45
Figura 9 –	Representação de um transdutor de ouro funcionalizado com sondas de DNA	46
Figura 10 –	Estratégias de imobilização de DNA em superfícies sólidas	48
Figura 11 –	Diagramas energéticos de materiais isolantes, semicondutores e condutores	56
Figura 12 –	Visão geral de dispositivos baseados em tecnologia de substratos flexíveis para o diagnóstico em pronto atendimento	57
Figura 13 –	Classificação dos nanomateriais à Organização Internacional de Padronização	59
Figura 14 –	Estruturas moleculares dos principais polímeros condutores	61
Figura 15 –	Mecanismo de síntese eletroquímica de polipirrol	63
Figura 16 –	Representação do compósito híbrido de nanopartículas de ouro e polianilina	69
Figura 17 –	Representação esquemática de uma célula eletroquímica de compartimento único composta por três eletrodos: eletrodo de trabalho, eletrodo de auxiliar e eletrodo de referência	71
Figura 18 –	Exemplo de aplicação de um potencial em forma triangular (a) para	

	geração de um voltamograma cíclico (b)	71
Figura 19 –	Esquema geral de um gráfico de Nyquist (a) cujos valores teóricos podem ser simulados por meio de um circuito equivalente de Randles (b)	75
Figura 20 –	Esquema da distribuição de íons na dupla camada elétrica	77
Figura 21 –	Ilustração do mecanismo de funcionamento de um microscópio de força atômica	79
Figura 22 –	Efeito da distância entre a sonda e a amostra sobre o regime de forças do sistema	80
Figura 23 –	Modos de operação de um microscópio de força atômica: modo de contato (a), modo de não contato (b) e modo de contato intermitente (c)	81
Figura 24 –.	Processo de fabricação de biossensor eletroquímico de DNA baseado em nanocompósito AuNP/PANI	87
Figura 25 –	Imagens do eletrodo flexível miniaturizado antes e após o processo de biofuncionalização	88
Figura 26 –	Representação esquemática das etapas de montagem do sistema sensor baseado em polipirrol, nanopartículas de ouro, cisteamina, sonda oligonucleotídica e albumina sérica bovina para a biodetecção de papilomavírus	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Biossensores eletroquímicos de DNA desenvolvidos para detecção de HPV	52
Tabela 2 –	Descrição dos genótipos de HPV pertencentes às famílias de biorreconhecimento das sondas específicas de DNA	83
Tabela 3 –	Número de acesso do gene L1 para cada genótipo de HPV utilizado para construção das sondas de DNA	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de força atômica (do inglês <i>atomic force microscopy</i>)
AuNPs	Nanopartículas de ouro
AuNP/PANI	Compósito híbrido de nanopartículas de ouro e polianilina
CAGR	Taxa composta de crescimento anual (do inglês, <i>compound annual growth rate</i>)
cDNA	DNA complementar
Cys	Cisteamina (do inglês <i>cysteamine</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPV	Voltametria de pulso diferencial (do inglês, <i>differential pulse voltammetry</i>)
dsDNA	DNA de cadeia dupla (do inglês <i>double-stranded DNA</i>)
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
FDA	Agência de administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos (do inglês <i>Food and Drug Administration</i>)
HCV	Vírus da hepatite C
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (do inglês, <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
ISO	Organização Internacional de Padronização (do inglês, <i>International Organization for Standardization</i>)
ITO	Óxido de índio dopado com estanho (do inglês <i>indium tin oxide</i>)
LCR	Região longa de controle (do inglês, <i>long control region</i>)
MPTMS	3-mercaptopropil-trimetoxissilano
NHS	N-hidroxissuccinimida
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
ORF	Fase de leitura aberta (do inglês, <i>open reading frame</i>)
PANI	Polianilina
PBS	Solução salina de tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
PET	Politereftalato de etileno
PPy	Polipirrol

PVC	Policloreto de vinila
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
SELEX	Evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (do inglês, <i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>)
SEM	Microscopia eletrônica de varredura (do inglês, <i>scanning electron microscopy</i>)
ssDNA	DNA de cadeia simples (do inglês <i>single-stranded DNA</i>)
SWV	Voltametria de onda quadrada (do inglês <i>square wave voltammetry</i>)
Teflon	Politetrafluoroetileno
URR	Região reguladora <i>upstream</i> (do inglês, <i>upstream regulatory region</i>)
VC	Voltametria cíclica

LISTA DE SÍMBOLOS

C_{dl}	Capacitância da dupla camada
E	Potencial
I	Corrente elétrica
i_{pa}	Corrente de pico anódica
i_{pc}	Corrente de pico catódica
ne^-	Número de elétrons
O	Forma oxidada
R	Forma reduzida
R_{CT}	Resistência à transferência de carga (do inglês <i>resistance to charge transfer</i>)
R_s	Resistência da solução
Z	Impedância
Z'	Componente real da impedância
$-Z''$	Componente imaginária da impedância
Z_W	Impedância de Warburg
ω	Frequência angular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	REVISÃO DE LITERATURA	28
3.1	PAPILOMAVÍRUS HUMANO	28
3.1.1	Aspectos moleculares e classificação do HPV	28
3.1.2	Processo de infecção e oncogênese viral	31
3.1.3	Métodos convencionais de diagnóstico	33
3.2	AVANÇOS DA NANOTECNOLOGIA E O DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES	36
3.2.1	Classificação dos biossensores em relação ao elemento receptor	38
3.2.2	Classificação dos biossensores em relação ao elemento transdutor	42
3.2.3	Biossensores de DNA eletroquímicos	44
3.2.4	Métodos de imobilização de DNA	47
3.2.5	Estado da arte dos biossensores de DNA para a pesquisa eletroquímica de HPV ..	49
3.2.6	Tecnologia de eletrodos flexíveis	55
3.3	MATERIAIS NANOTECNOLÓGICOS E FUNCIONAIS PARA APLICAÇÕES EM BIOSSENSORES	58
3.3.1	Polímeros intrinsecamente condutores: polianilina e polipirrol	60
3.3.2	Nanopartículas de ouro	64
3.3.3	Métodos de síntese de nanopartículas de ouro	65
3.3.4	Nanocompósito híbrido de ouro e polianilina	68
3.4	TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS	69
3.4.1	Voltametria cíclica	69
3.4.2	Espectroscopia de impedância eletroquímica	73
3.5	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS BIODISPOSITIVOS NANOESTRUTURADOS	78
3.5.1	Microscopia de força atômica	78
4	METODOLOGIA	83
4.1	MATERIAIS	83

4.2	AMOSTRAS BIOLÓGICAS	83
4.3	METODOLOGIA DE OBTENÇÃO DAS SONDAS DE BIORRECONHECIMENTO	84
4.4	PREPARAÇÃO DO COMPÓSITO HÍBRIDO AuNP/PANI	86
4.5	CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOCOMPÓSITO AuNP/PANI	86
4.6	FABRICAÇÃO DE ELETRODOS MINIATURIZADOS FLEXÍVEIS	88
4.7	CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES DE DNA BASEADOS EM PLATAFORMA DE PPy-AuNP-Cys	88
4.8	AVALIAÇÃO DE BIOATIVIDADE	90
4.9	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA	91
4.10	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL	91
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
5.1	ARTIGO 1: <i>Metal-polymer hybrid nanomaterial for impedimetric detection of human papillomavirus in cervical specimens</i> (artigo publicado na revista <i>Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis</i>)	92
5.2	ARTIGO 2: <i>Impedimetric sensing platform for human papillomavirus and p53 tumor suppressor gene in cervical samples</i> (artigo submetido na revista <i>Journal of Science: Advanced Materials and Devices</i>)	107
5.3	ARTIGO 3: <i>Flexible sensor based on conducting polymer and gold nanoparticles for electrochemical screening of HPV families in cervical specimens</i> (artigo publicado na revista <i>Talanta</i>)	142
5.4	PATENTE: Biossensor baseado em filme polimérico e nanoestruturas metálicas e seu uso em aplicações biomédicas (número do pedido - INPI: BR 10 2019 021496 1)	169
6	CONCLUSÕES	222
7	PERSPECTIVAS	224
8	REFERÊNCIAS	225
9	APÊNDICES	257
9.1	APÊNDICE A – PRODUTO COMPLEMENTAR. Patente: Plataforma sensora baseada em filme fino polimérico associado a compósito híbrido e seu uso em diagnóstico biomédico plataforma sensora baseada em filme fino polimérico associado a compósito híbrido e seu uso em diagnóstico biomédico (número do pedido - INPI: BR 10 2019 021496 1)	257

9.2	APÊNDICE B – PRODUTO COMPLEMENTAR. Artigo submetido na revista <i>Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis: Nanostructured sensor platform based on organic polymer conjugated to metallic nanoparticle for the impedimetric detection of SARS-CoV-2 at various stages of viral infection</i>	289
10	ANEXOS	329
10.1	ANEXO A – COMPROVAÇÃO DE APRECIÇÃO ÉTICA	329

1 INTRODUÇÃO

O HPV, um vírus de DNA não envelopado, é um agente infeccioso oncogênico responsável por causar infecções nas mucosas e no epitélio anogenital. Este patógeno pode acarretar uma variedade de condições clínicas, incluindo verrugas, causadas por tipos virais de baixo risco oncogênico (HPV2, 3, 6, 7, 10, 11, 27, 28, 40, 42, 43, 44, 54, 57, 61, 72 e 81), e neoplasias, resultantes de alterações citogenéticas ocasionadas por tipos virais de alto risco oncogênico (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59) (HUTTER; DECKER, 2016; SERRANO et al., 2018). Entre os mais de 200 genótipos de HPV descritos na literatura, os tipos 16 e 18 destacam-se por estarem relacionados a lesões escamosas intraepiteliais de alto grau e câncer cervical invasivo. O câncer de colo uterino é frequentemente associado a múltiplas infecções por tipos virais distintos de HPV. Entretanto, o efeito das infecções por múltiplos genótipos de HPV sobre a gravidade da neoplasia cervical é controversa (WU et al., 2019). Acredita-se que a progressão e a severidade da doença estejam relacionadas aos tipos de interações moleculares estabelecidas entre genótipos específicos de HPV presentes em infecções múltiplas (SENAPATI et al., 2017). Ademais, infere-se que infecções persistentes por papilomavírus estão intrinsicamente relacionadas ao desenvolvimento de variáveis tipos de câncer, como o câncer cervical, peniano, vaginal, vulvar, anal, orofaríngeo, de cabeça e pescoço (DE MARTEL et al., 2017).

A identificação de genótipos de HPV em amostras clínicas pode possibilitar um melhor prognóstico para o paciente, a subsequente prática de protocolos clínicos dirigidos para a obtenção de resultados satisfatórios e o rastreio de genótipos virais mais frequentes em uma população (HUTTER; DECKER, 2016). Os métodos moleculares usados para a triagem de papilomavírus podem ser classificados em ensaios de hibridização de ácidos nucleicos (hibridização *southern blotting*, hibridização *in situ* e hibridização *dot-blot*), ensaios de amplificação de sinal (testes de captura híbrida) e ensaios de amplificação de ácidos nucleicos, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (RASOULI et al., 2018). Apesar de serem específicos, estes métodos apresentam limitações para o uso extensivo em áreas hospitalares e laboratoriais, tais como os altos custos para a aquisição de equipamentos, quantidades significativas de DNA purificado, sensibilidade limitada e protocolos experimentais complexos com longo tempo de análise (CAMPOS-FERREIRA et al., 2016; MAHMOODI et al., 2019). Logo, o desenvolvimento de novos ensaios moleculares para a

detecção de HPV com elevada acurácia e performance bioanalítica é de grande relevância para a promoção da saúde de pacientes infectados.

O avanço da pesquisa biotecnológica tem contribuído significativamente para a concepção de dispositivos eletrônicos aplicáveis ao setor de diagnósticos clínicos (MEHROTRA, 2016; METKAR; GIRIGOSWAMI, 2019; REBELO et al., 2019). Os dispositivos sensoriais representam uma tendência emergente e tecnológica nas ciências biomédicas, contribuindo para a identificação, quantificação e monitoramento de espécies químicas específicas (HUANG et al., 2017). Em especial, ressaltam-se os biossensores de DNA eletroquímicos por serem sistemas de detecção baseados em segmentos de ácidos nucleicos imobilizados sobre a superfície de transdutores eletroquímicos. Nestes biodispositivos, a resposta analítica está relacionada ao processo de hibridização entre o fragmento oligonucleotídico receptor (DNA de cadeia simples – ssDNA) e sua cadeia complementar (SADIGHBAYAN et al., 2019). Os biossensores de DNA eletroquímicos são potencialmente úteis para diagnósticos em serviços de saúde e pesquisas acadêmicas. Estes apresentam elevada sensibilidade de detecção com possibilidade de análise em tempo real, requerem pequenas quantidades de amostras biológicas e sua instrumentação é relativamente simples, permitindo a automação e portabilidade (FERAPONTOVA, 2018).

Com o advento da nanotecnologia e síntese de novos materiais em nanoescala, foi possível reduzir significativamente as limitações inerentes ao processo de construção de biossensores de DNA (SHABANINEJAD et al., 2019; ZHANG; CHEN, 2019). Por meio de estratégias de modificação interfacial, nanomateriais e elementos funcionais têm sido largamente utilizados para elaboração de plataformas nanoestruturadas (SHARIATI et al., 2019; SHETTI et al., 2019). Estas atuam como interfaces entre os receptores biológicos e a superfície do transdutor eletroquímico (BAEK et al., 2020). Através de estudos minuciosos sobre as propriedades físico-químicas de cada componente e o detalhamento do plano metodológico, plataformas nanoestruturadas inovadoras têm sido projetadas (FRÍAS et al., 2015). Entre suas atribuições, exemplificam-se a preservação da estrutura conformacional e bioatividade de moléculas biológicas ancoradas, aumento de sensibilidade, reprodutibilidade de sinal analítico e estabilidade a longo prazo (YE; ZUO; FAN, 2018).

Comumente, as plataformas nanoestruturadas são construídas em substratos sólidos, tais como suportes de vidro e silício, que limitam a aplicabilidade de dispositivos analíticos (NAMDARI; DARAEE; EATEMADI, 2016). No campo dos biossensores, a tecnologia de eletrônica flexível é uma tendência em ascensão (LI et al., 2018). Substratos flexíveis

revestidos com filmes de ITO têm possibilitado a obtenção de ferramentas analíticas atrativas devido a sua transparência óptica com elevada transmitância, elevada condutividade elétrica, estabilidade química e facilidade de associação com processos de microfabricação (AYDIN; SEZGINTÜRK, 2017; BLAIR; CORRIGAN, 2019). Outrossim, o uso de ITO é capaz de reduzir os custos de produção e ampliar as possibilidades de design, integração de sinal e miniaturização (ECONOMOU; KOKKINOS; PRODROMIDIS, 2018). Portanto, espera-se que o uso de transdutores flexíveis integrados a nanomateriais proporcione a produção de sistemas sensores, dispositivos de monitorização contínua e testes de pronto-atendimento com características inovativas e funcionais (TRIPATHY et al., 2018).

Assumindo a premissa que as AuNPs e os polímeros orgânicos polianilina (PANI) e PPy compõem o grupo dos principais materiais com propriedades físico-químicas aplicáveis para o sensoriamento biológico (KUMAR et al., 2015; AYDEMIR; MALMSTRÖM; TRAVAS-SEJDIC, 2016; SHRIVASTAVA; JADON; JAIN, 2016; NEZAKATI et al., 2018), novos nanossistemas foram desenvolvidos para o diagnóstico diferencial de genótipos de HPV. Ensaio de bioatividade foram inicialmente realizados a partir da imobilização covalente de uma sequência oligonucleotídica degenerada (sonda MY11) responsável pela identificação do gene L1 de papilomavírus, sem discriminação de genótipos. Em complementariedade, sequências de DNA específicas para o biorreconhecimento de famílias de HPV foram também utilizadas. Para a ancoragem biomolecular, duas plataformas de interfaceamento baseadas em i) compósito híbrido AuNP/PANI e ii) PPy-AuNP-Cys foram projetadas por meio de técnicas de automontagem e estruturação química. A otimização do método de detecção foi alcançada através da fabricação de transdutores flexíveis de óxido condutor (ITO), os quais permitiram a realização de testes de triagem para HPV e monitoramento do biomarcador oncogênico gene p53 em espécimes cervicais (amostras de DNA complementar, cDNA).

Para melhor compreensão, esta tese foi organizada nas subdivisões descritas a seguir.

- Introdução, onde foi descrita a importância do desenvolvimento de novos dispositivos nanoestruturados para o diagnóstico molecular de papilomavírus;
- Objetivos geral e específicos;
- Revisão da literatura com a discussão dos seguintes tópicos: papilomavírus humano; aspectos moleculares e classificação do HPV; processo de infecção e oncogênese viral; métodos convencionais de diagnóstico; avanços da nanotecnologia e o desenvolvimento de biossensores; classificação dos

biossensores em relação ao elemento receptor; classificação dos biossensores em relação ao elemento transdutor; biossensores de DNA eletroquímicos; métodos de imobilização de DNA; estado da arte dos biossensores de DNA para a pesquisa eletroquímica de HPV; tecnologia de eletrodos flexíveis; materiais nanotecnológicos e funcionais para aplicações em biossensores; polímeros intrinsecamente condutores: polianilina e polipirrol; nanopartículas de ouro e métodos de síntese; nanocompósito híbrido de ouro e polianilina; técnicas eletroanalíticas com ênfase em voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica; avaliação morfológica dos biodispositivos nanoestruturados com destaque para microscopia de força atômica;

- Metodologia para obtenção dos biodispositivos eletroquímicos nanoestruturados;
- Resultados e discussão apresentados na forma de três artigos científicos e uma patente, intitulados de a) *Metal-polymer hybrid nanomaterial for impedimetric detection of human papillomavirus in cervical specimens*; b) *Impedimetric sensing platform for human papillomavirus and p53 tumor suppressor gene in cervical samples*; c) *Flexible sensor based on conducting polymer and gold nanoparticles for electrochemical screening of HPV families in cervical specimens*; e d) Biossensor baseado em filme polimérico e nanoestruturas metálicas e seu uso em aplicações biomédicas;
- Conclusões e perspectivas da tese;
- Referências utilizadas para fundamentação teórica do estudo;
- Apêndices onde foram apresentados trabalhos científicos desenvolvidos em paralelo ao doutoramento (produtos complementares);
- Anexos onde encontra-se a comprovação de apreciação ética do projeto científico desenvolvido.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver biossensores eletroquímicos de DNA baseados em plataformas poliméricas nanoestruturadas aplicáveis ao diagnóstico clínico de papilomavírus.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Plataforma em eletrodo de ouro baseada em nanocompósito AuNP/PANI

- Realizar estruturação do nanocompósito AuNP/PANI por técnica de automontagem em eletrodo de ouro e avaliar suas propriedades eletroquímicas interfaciais.
- Funcionalizar quimicamente o filme híbrido auto-organizado com uma sequência oligonucleotídica específica para o reconhecimento do gene L1 de todos os genótipos de HPV (sonda MY11).
- Verificar a capacidade de biodetecção e a sensibilidade do biossensor (AuNP/PANI-Sonda MY11) após sua interação com amostras clínicas (amostras de cDNA) de pacientes infectados com diferentes genótipos de HPV (HPV6, 11, 16, 31, 33, 45 e 58).
- Avaliar a seletividade do biossensor frente aos segmentos de DNA não complementares ao receptor biológico.
- Realizar cálculo de limite de detecção do sistema sensor.
- Examinar os perfis de reposta eletroquímica da sonda MY11 frente aos genótipos de HPV de alto e baixo risco oncogênico.
- Realizar análise topográfica e morfológica do filme biológico AuNP/PANI-Sonda MY11 e avaliar as características estruturais de sua superfície após o processo de biodetecção por meio das técnicas de AFM e SEM.

Plataforma em eletrodo de ouro baseada em PPy-AuNP-Cys

- Executar a eletropolimerização do monômero pirrol em eletrodo de ouro e, em seguida, promover a deposição eletroquímica de AuNPs sobre a matriz polimérica.

- Realizar quimissorção de moléculas de Cys sobre as nanopartículas metálicas para concepção da plataforma nanoestruturada PPy-AuNP-Cys.
- Imobilizar quimicamente a sonda de biorreconhecimento MY11 sobre o eletrodo modificado com PPy-AuNP-Cys.
- Verificar a capacidade de biodeteção e a sensibilidade do biossensor (PPy-AuNP-Cys-Sonda MY11) frente à plasmídeos recombinantes contendo o gene L1 de diferentes tipos de HPV (HPV6, 11, 16, 18, 45, 53, 54, 58).
- Realizar ensaios de bioatividade em amostras clínicas provenientes de mulheres infectadas com papilomavírus.
- Avaliar a seletividade do biossensor frente a sequências de DNA não complementares e amostras clínicas negativas para HPV contendo o genoma de *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis* e vírus da hepatite C (HCV).
- Realizar cálculo de limite de detecção e limite de quantificação do sistema sensor.
- Examinar os perfis de repostas eletroquímicas para os genótipos de HPV de alto e baixo risco oncogênico por meio do uso da sonda MY11 imobilizada em plataforma nanoestruturada PPy-AuNP-Cys.
- Correlacionar a biodeteção do gene p53, um biomarcador preditivo de tumorigênese, em espécimes cervicais de pacientes infectadas com papilomavírus de alto risco oncogênico.
- Proferir avaliação topográfica do filme biológico PPy-AuNP-Cys-Sonda MY11 e analisar as características morfológicas de sua superfície após o processo de biodeteção por meio da técnica de AFM.

Plataforma em eletrodo flexível baseada em PPy-AuNP-Cys

- Produzir eletrodos miniaturizados com base em tecnologia de sistemas flexíveis.
- Elaborar a plataforma de interfaceamento PPy-AuNP-Cys sobre tiras flexíveis de ITO e verificar sua capacidade de transdução analítica.
- Imobilizar quimicamente sondas oligonucleotídicas sobre transdutores miniaturizados para o biorreconhecimento de genomas pertencentes a famílias de HPV (sondas BSH6, BSH16, BSH18, BSH26, BSH53 e BSH61).

- Verificar a capacidade de biodetecção de cada sistema sensor através de ensaios com plasmídeos recombinantes contendo o gene L1 de diferentes tipos de HPV (HPV6, 11, 16, 18, 33, 45, 51, 53, 58, 61, 62, 66, 72, 81 e 84).
- Caracterizar as interações biológicas de identificação do analito a nível da interface eletroquímica e determinar os respectivos limites de detecção e quantificação.
- Analisar a seletividade dos biossensores flexíveis frente a misturas de plasmídeos contendo o gene L1 de papilomavírus não pertencentes à família de reconhecimento da sonda.
- Executar ensaios de triagem em espécimes cervicais provenientes de pacientes infectados com HPV e monitorar a presença do gene p53.
- Realizar análise topográfica do filme biológico PPy-AuNP-Cys-Sonda BSH e avaliar as características morfológicas de sua superfície após o processo de biodetecção por meio da técnica de AFM.

3 REVISÃO DE LITERATURA

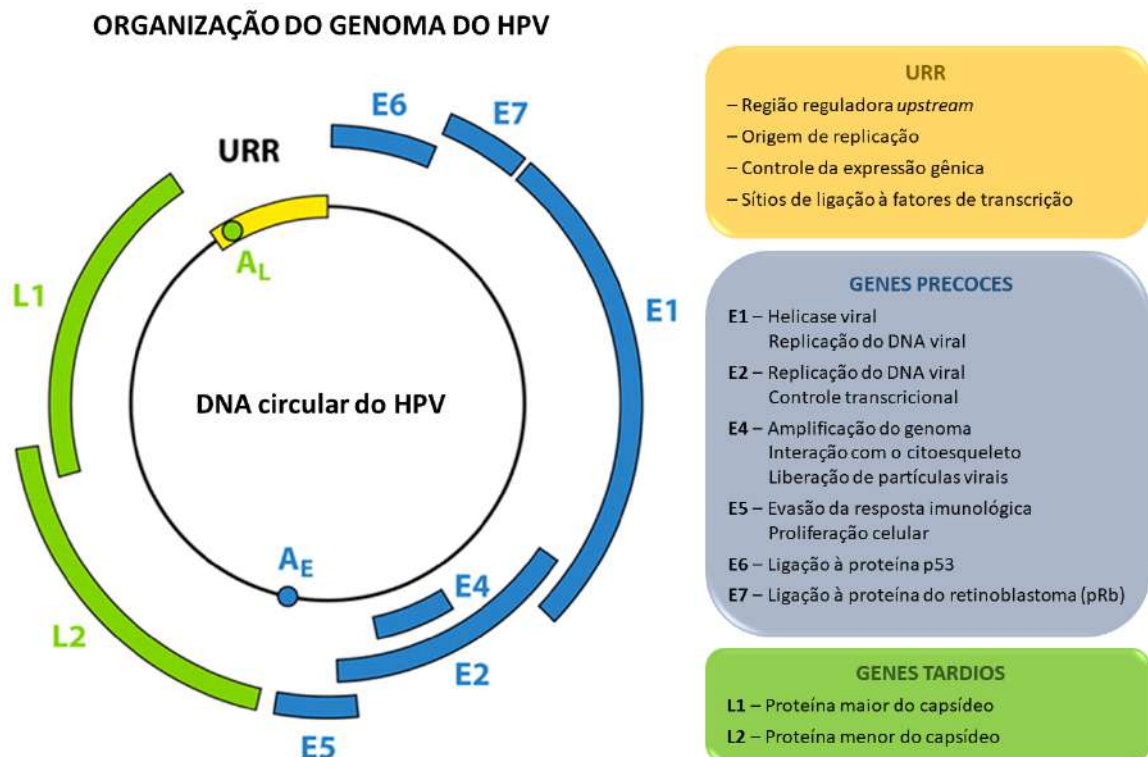
3.1 PAPILOMAVÍRUS HUMANO

3.1.1 Aspectos moleculares e classificação do HPV

O HPV é um vírus pertencente à família *Papillomaviridae*, composto por um capsídeo não envelopado de simetria icosaédrica com diâmetro de aproximadamente 50 a 60 nm. O genoma de DNA de fita dupla circular do HPV possui entre 5748 a 8607 pares de bases, sendo organizado em três regiões: a) região inicial (E – *early region*, composta por genes codificados precocemente à replicação viral: E1, E2, E4, E5, E6 e E7), b) região tardia (L – *late region*, composta por genes codificados tardiamente: L1 e L2) e c) região reguladora *upstream* (URR) (Figura 1). Resumidamente, os genes E1 e E2 codificam proteínas que são críticas para a replicação do DNA viral e controle da transcrição gênica. A proteína E4 é expressa em fases posteriores da infecção e tem papel importante na alteração da matriz intracelular, maturação e liberação de novas partículas virais. As proteínas E5, E6 e E7 são biomoléculas relacionadas à adaptação de nicho celular, amplificação viral e carcinogênese. As regiões tardias (genes L1 e L2) codificam proteínas do capsídeo viral durante os estágios finais da replicação do papilomavírus. Finalmente, a URR, também conhecida como região longa de controle (LCR), é uma sequência não codificadora que executa funções regulatórias. Nesta região há origem de replicação e sítios de ligação para fatores de transcrição e proteínas regulatórias (HARDEN; MUNGER, 2017; MIRABELLO et al., 2018; GHEIT, 2019).

Com base na identidade da sequência de nucleotídeos da fase de leitura aberta (ORF, *open reading frame*) do gene L1, que corresponde a região mais conservada do genoma viral e codifica a principal proteína do capsídeo, os papilomavírus são classificados em 53 gêneros, entre os quais apenas cinco gêneros infectam os seres humanos (GHEIT, 2019). De acordo com o *International Human Papillomavirus Reference Center* (<https://www.hpvcenter.se/>) foram descritos até o momento 228 tipos de HPV incluídos nos gêneros *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gamma papillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus*. Enfatiza-se que os tipos de HPV pertencentes a diferentes gêneros compartilham menos de 60% de similaridade, enquanto diferentes espécies de HPV dentro de um mesmo gênero compartilham entre 60 e 70% de similaridade. Já um novo tipo de HPV possui menos de 90% de semelhança com qualquer outro tipo de HPV (MÜHR; EKLUND; DILLNER, 2018).

Figura 1 – Características do genoma viral e principais funções das proteínas do HPV.



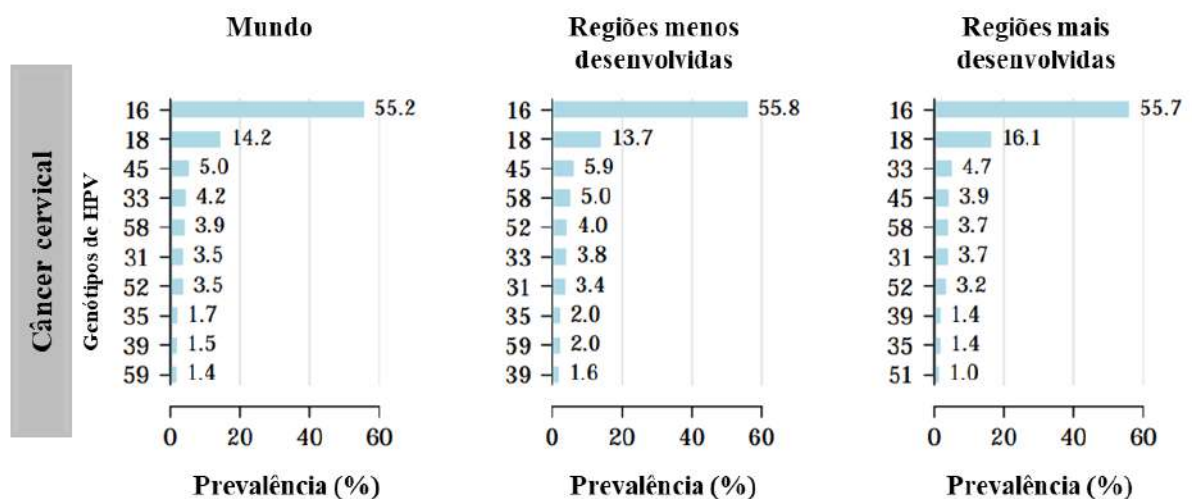
Fonte: adaptado de STANLEY, 2012.

Embora apresentem uma alta diversidade genética, os diferentes tipos de HPV podem ser caracterizados por seu tropismo em infectar tecidos epiteliais e mucosos. Estudos bioquímicos e epidemiológicos descrevem um subgrupo de 12 tipos de HPV pertencentes ao gênero *Alphapapillomavirus* como genótipos de HPV de alto risco oncogênico (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59), associados ao desenvolvimento de câncer cervical e suas lesões precursoras (Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer, IARC Grupo 1). Estes genótipos de alto risco oncogênico são agentes etiológicos de outros tipos de cânceres, como o câncer de vulva, vagina, pênis, ânus e um subconjunto de cânceres de cabeça e pescoço, particularmente o câncer orofaríngeo, esofágico e laríngeo. Ademais, os genótipos de HPV26, 30, 34, 53, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 82, 85 e 97 são classificados como prováveis ou possíveis cancerígenos para seres humanos (IARC Grupos 2A e 2B) (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER WORKING GROUP, 2012). Os HPVs pertencentes ou não ao gênero *Alphapapillomavirus* podem também ser classificados como genótipos de baixo risco oncogênico, incluindo HPV2, 3, 6, 7, 10, 11, 27, 28, 40, 42, 43, 44, 54, 57, 61, 72 e 81. Estes genótipos podem induzir infecções crônicas assintomáticas,

verrugas benignas anogenitais e cutâneas, condilomas acuminados e papilomatose respiratória recorrente (BRIANTI; FLAMMINEIS; MERCURI, 2017; GHEIT, 2019).

Inferese-se que o HPV causa aproximadamente 100% dos casos de câncer cervical, entretanto, a subestimação da prevalência ocorre devido às limitações dos métodos de estudo. Em todo o mundo, os genótipos de HPV16 e 18 são responsáveis por 70% de todos os casos de câncer cervical, por 41% a 67% das lesões cervicais de alto grau e 16% a 32% das lesões cervicais de baixo grau. Depois do HPV16 e 18, os seis genótipos mais frequentes em todas as regiões geográficas são o HPV31, 33, 35, 45, 52 e 58, responsáveis por mais de 20% dos casos de câncer de colo uterino (Figura 2). O câncer cervical é classificado como o terceiro tipo de câncer mais frequente entre as mulheres no mundo, com uma incidência anual de 569.847 novos casos e taxa de mortalidade de 311.365 mortes em 2018. Espera-se que este número aumente para aproximadamente 460.000 mortes por ano até 2040, caso medidas profiláticas e métodos de diagnóstico efetivos não sejam implementados contra o papilomavírus (SERRANO et al., 2018; BRUNI et al., 2019).

Figura 2 – Comparação dos dez tipos oncogênicos de HPV mais frequentes entre mulheres com câncer cervical no mundo, em comparação com as regiões desenvolvidas e em desenvolvimento.

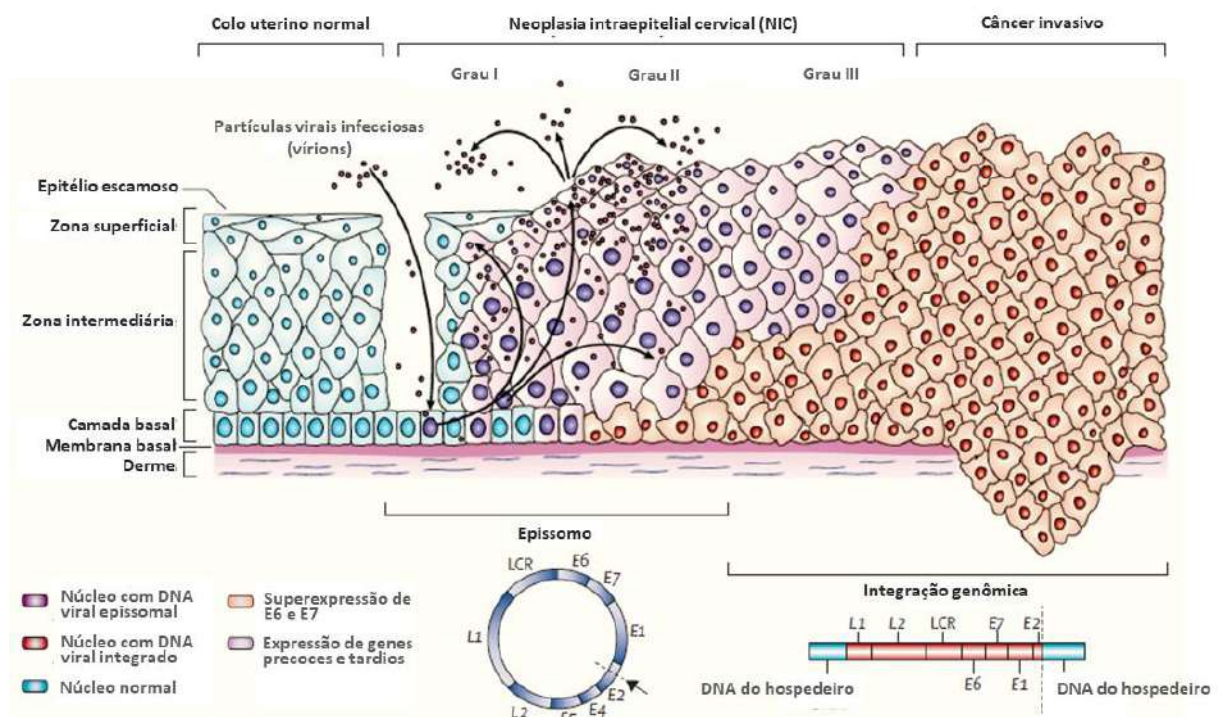


Fonte: adaptada de BRUNI et al., 2019.

3.1.2 Processo de infecção e oncogênese viral

Para compreender o mecanismo de transformação celular utilizado pelo HPV para oncogênese, é essencial conhecer o ciclo de vida viral (Figura 3). O ciclo de vida do HPV depende da diferenciação terminal das células-alvo, os queratinócitos, no epitélio escamoso. O HPV infecta queratinócitos basais do compartimento indiferenciado e proliferativo do epitélio escamoso estratificado através de feridas e micro abrasões na pele, órgãos genitais e áreas orofaríngeas. Durante o curso da infecção pelo HPV, o vírus se liga a proteoglicanos de sulfato de heparina na membrana basal através da proteína L1 do capsídeo viral. Esta ligação desencadeia mudanças conformacionais na estrutura do capsídeo, expondo a proteína L2 para posterior clivagem molecular. Este processo constitui um pré-requisito para a captação e internalização do vírus pela célula-alvo. A absorção do vírus ocorre por meio de vesículas endossômicas e é mediada pela proteína L1 (RODEN; STERN, 2018).

Figura 3 – O ciclo de vida do HPV.



A infecção por HPV ocorre nas células epiteliais basais por meio de pontos anatomicamente acessíveis, como microlesões. O genoma viral permanece nos núcleos das células hospedeiras como epissomos. Com a proliferação e diferenciação celular, inicialmente, ocorre a expressão dos genes precoces do HPV. Nos estágios finais do ciclo de vida celular, as proteínas estruturais tardias L1 e L2 são codificadas, resultando na montagem e liberação de partículas virais infectantes, os vírions. A

integração do genoma viral ao DNA do hospedeiro ocasiona a superexpressão das oncoproteínas E6 e E7. Como resultado, a regulação do ciclo celular é interrompida, promovendo a imortalização das células anômalas e, eventualmente, o estabelecimento do câncer cervical. Fonte: adaptada de CROSBIE et al., 2013.

No citoplasma celular processa-se o desnudamento do vírus, o que permite a inserção do DNA viral no núcleo da célula infectada. O genoma do HPV permanece no núcleo da célula hospedeira como epissomos virais (unidades de replicação viral com forma circular). Inicialmente, o promotor precoce do genoma viral torna-se ativo, resultando na expressão das proteínas E1 (helicase viral) e E2 (proteína de ligação de DNA, responsável por direcionar a helicase E1 para a origem viral de replicação na URR). Com o auxílio de fatores de replicação do hospedeiro, como as enzimas DNA polimerase, topoisomerase e primase, os epissomos virais são rapidamente replicados em um número de 50 a 100 cópias por célula. Esta constitui a primeira fase de replicação e manutenção do genoma do HPV. Em células basais infectadas, o genoma viral circular é replicado em conjunto com o DNA celular, onde o número de cópias virais permanece constante em relação ao DNA do hospedeiro. Este fato garante a divisão igual dos epissomos virais para as células filhas. A proteína E2 desempenha um papel central neste processo, controlando a transcrição do vírus (BURLEY; ROBERTS; PARISH, 2020).

A migração dos queratinócitos infectados para a superfície do epitélio induz a diferenciação celular. A diferenciação do epitélio impulsiona a fase produtiva do ciclo de vida do HPV com a expressão dos genes virais E4, E5, E6 e E7, bem como altos níveis de E1 e E2 que possibilitam a amplificação do genoma viral para milhares de cópias por célula. A montagem e maturação dos vírions estão restritas à camada superior do epitélio em células suprabasais altamente diferenciadas, onde ocorre a ativação do promotor tardio do genoma viral e a expressão das proteínas estruturais L1 e L2. A liberação viral coincide com a eliminação natural das células senescentes no final do ciclo de vida dos queratinócitos (PINIDIS et al., 2016; MAC; MOODY, 2020).

A maioria das infecções é eliminada pelo sistema imunológico, entretanto, algumas lesões cervicais benignas evoluem para o câncer. A infecção persistente pode ocasionar neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de baixo grau (NIC I), a qual pode progredir para lesões NIC II e III. Frequentemente, estas alterações estão associadas a infecções por HPVs de alto risco oncogênico, que podem evoluir para câncer cervical invasivo. Em um processo típico de carcinogênese por HPVs de alto risco oncogênico, o genoma viral é integrado ao DNA da célula hospedeira. No entanto, em uma mesma célula pode-se encontrar epissomos virais e o genoma do HPV integrado aos cromossomos humanos. A proteína E2 frequentemente

desenvolve um papel repressor sobre a transcrição dos genes E6 e E7. Com a modulação de sua atividade biológica, as oncoproteínas virais E6 e E7 podem ser superexpressas, desregulando os pontos de verificação do ciclo celular normal e promovendo uma vida prolongada a célula infectada (CROSBIE et al., 2013; CHABEDA et al., 2018).

Especificamente, a expressão exacerbada dos genes E6 e E7 do HPV está associada ao mecanismo de tumorigênese, cujos produtos possuem um papel importante na etiologia do câncer cervical (GHITTONI et al., 2015). As proteínas p53 e Rb (retinoblastoma) são os principais alvos das oncoproteínas E6 e E7, respectivamente (HOPPE-SEYLER et al., 2018). O gene supressor de tumor p53 regula a resposta biológica mediante a presença de moléculas de DNA danificadas, induzindo a parada do ciclo celular na fase G1 para reparo genético. Todavia, se a alteração no DNA for extensa, as vias apoptóticas serão ativadas. Como consequência da degradação da proteína p53 pelo HPV, a transformação celular maligna, a instabilidade genômica e o estabelecimento neoplásico são favorecidos (GHEIT, 2019). Enfatiza-se que a degradação proteolítica de p53 pode ocasionar o aumento da expressão do gene p53 no organismo humano, em uma tentativa de manter suas atividades regulatórias (KAWAMATA et al., 2002). Assim, o nível de expressão do gene p53 em queratinócitos cervicais pode ser usado como um biomarcador para avaliar a progressão de lesões pré-cancerosas até o estabelecimento do câncer cervical. No entanto, é importante notar que o prognóstico baseado apenas na expressão do gene p53 pode ser impreciso se a presença de papilomavírus não for considerada (SMITH et al., 2008).

3.1.3 Métodos convencionais de diagnóstico

A existência de uma forte relação entre a infecção por papilomavírus e a carcinogênese cervical destaca a importância do diagnóstico precoce (GUIMERA et al., 2020). Historicamente, a colposcopia em combinação com o teste de Papanicolaou tem sido o método clínico comumente utilizado para determinar a presença ou ausência de lesões no epitélio cervical causadas por HPV (TSIKOURAS et al., 2016). A confirmação do diagnóstico pode ser feita por avaliação histopatológica através de biópsia. Embora amplamente empregadas, estas técnicas apresentam baixa especificidade e sensibilidade, os resultados obtidos não são suficientemente preditivos, a reprodutibilidade entre os avaliadores não é satisfatória e a correlação entre alterações visuais no tecido e a severidade da doença é pouco significativa (SCHIFFMAN et al., 2007; VALENCIA et al., 2016). Diante destas

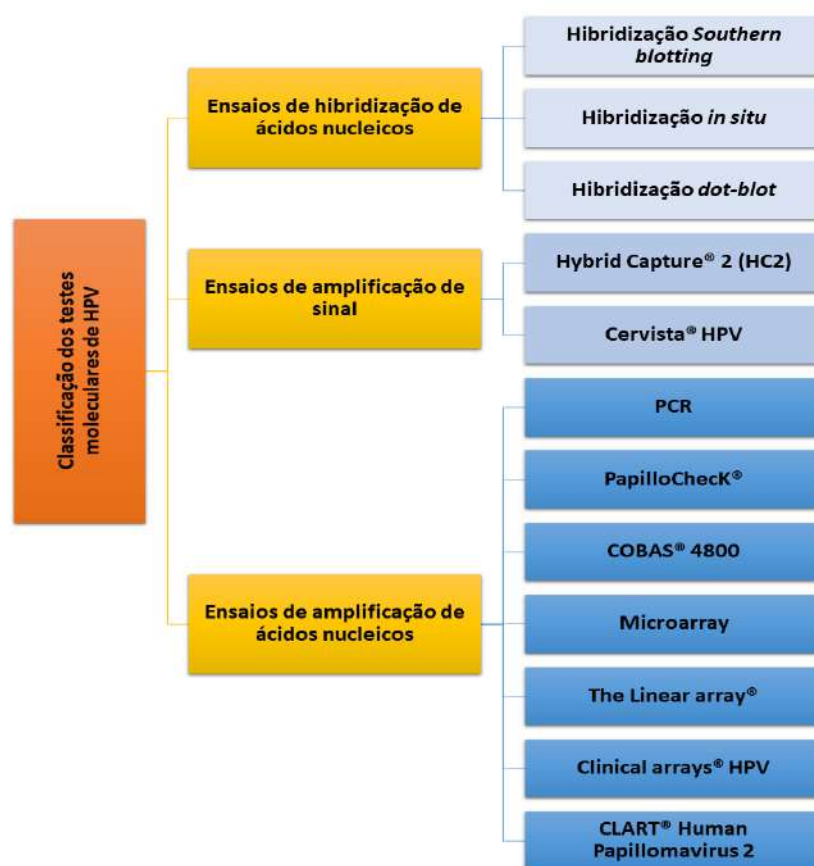
limitações, novas estratégias para a detecção de HPV têm sido exploradas, como ensaios sorológicos e propagação do vírus em cultura de células. Entretanto, restrições são inerentes a estas metodologias. Por exemplo, os testes sorológicos podem não quantificar prontamente as imunoglobulinas anti-HPV em condições clínicas com baixas cargas virais e as reações imunológicas cruzadas com espécies da mesma família viral devem ser consideradas. Em adição, a cultura de células para a propagação viral exibe baixa sensibilidade, logo, a identificação viral é dependente, na maioria dos casos, de técnicas de biologia molecular (KARIMIZEFREH et al., 2017; SHARIATI et al., 2019).

Nos dias em curso, os métodos para o diagnóstico molecular de papilomavírus e discriminação de cepas virais podem ser categorizados em ensaios de hibridização de ácidos nucleicos, ensaios de amplificação de sinal e ensaios de amplificação de ácidos nucleicos (Figura 4). As técnicas de *Southern blotting*, hibridização *in situ* e hibridização *dot-blot* fundamentam-se em protocolos de hibridização de ácidos nucleicos a partir do uso de sondas marcadas com corantes fluorescentes ou isótopos radioativos para a detecção específica de sequências gênicas, como o genoma de HPV em amostras cervicais. Apesar da resposta analítica ser de alta qualidade, a baixa sensibilidade, necessidade de quantidades relativamente grandes de DNA purificado e procedimentos extensivos são obstáculos destes métodos (ABREU et al., 2012; BHAGAVAN; HA, 2015).

Os ensaios de amplificação de sinal por captura híbrida tornaram-se o método de escolha em muitos países e são amplamente utilizados em testes clínicos aprovados pela agência federal FDA (*Food and Drug Administration*) do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos. As tecnologias moleculares de captura híbrida baseiam-se na amplificação de sinais quimioluminescentes ou fluorescentes gerados, inicialmente, a partir do processo de hibridização entre a sonda de biorreconhecimento e a sequência de ácido nucleico alvo. Estes ensaios são projetados para evitar a amplificação do alvo gênico e minimizar a possibilidade de contaminação por produtos de reações enzimáticas (ARNEY; BENNETT, 2010). Por exemplo, cita-se o teste digene HC2 HPV DNA com utilização da tecnologia Hybrid Capture® 2 (HC2) para a detecção qualitativa de 18 genótipos de HPV de alto e baixo risco oncogênico (HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) em amostras clínicas. Em adição, o teste Cervista® HPV HR é um método de diagnóstico *in vitro* para a detecção qualitativa de DNA de 14 genótipos de HPV com risco oncogênico (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68). Ressalta-se que os testes supracitados possuem sensibilidade limitada e não permitem a identificação de

genótipos específicos de HPV, analisando apenas os grupos de alto e baixo risco oncogênico. Além disso, resultados positivos podem ser obtidos a partir da hibridização com tipos de HPV não incluídos no teste. Em decorrência da necessidade de profissionais com habilidades especializadas para execução do protocolo experimental e manuseio de equipamentos, as estratégias de biodeteção não atendem aos requisitos para o diagnóstico clínico em unidades primárias de saúde (ABREU et al., 2012; TSIKOURAS et al., 2016; RASOULI et al., 2018).

Figura 4 – Classificação dos testes moleculares para o diagnóstico de HPV.



Fonte: adaptada de RASOULI et al., 2018.

Considerado o método padrão ouro para a pesquisa genotípica de HPV, a técnica de PCR em tempo real permite a amplificação de ácidos nucleicos por meio da extração de material genético de espécimes cervicais. Empregando um processo de termociclagem, uma DNA polimerase termoestável e *primers* oligonucleotídicos específicos, a sequência alvo é amplificada, resultando na formação de *amplicons*, os produtos de PCR. Por meio do uso de corantes intercalantes de moléculas de DNA de cadeia dupla (dsDNA) ou sondas marcadas

com fluoróforos, a sequência alvo é identificada e quantificada com elevada sensibilidade, reprodutibilidade e acurácia (NAVARRO et al., 2015). Como desvantagens do método, têm-se procedimentos laboriosos e intensivos, tempo de resposta relativamente prolongado, reagentes e equipamentos caros e o requerimento de laboratórios certificados e profissionais altamente qualificados. Ademais, os ensaios de detecção e genotipagem com PCR envolvem o uso *primers* consenso que amplificam regiões conservadas do genoma viral. Entretanto, as correspondências entre os nucleotídeos são variáveis em relação aos distintos tipos de HPV. Em adição, mutações pontuais no genoma do papilomavírus são descritas e podem reduzir a eficiência de *primers* específicos (LOWE et al., 2010; CIVIT et al., 2012; URREGO et al., 2015). Em vista disso, verifica-se a importância do desenvolvimento de métodos biotecnológicos efetivos para o diagnóstico ultrasensível de HPV (MAHMOODI et al., 2019).

3.2 AVANÇOS DA NANOTECNOLOGIA E O DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES

A nanociência possui um papel central no processo de inovação e criação de tecnologias moleculares de bioanálise. Conceitualmente, a nanociência corresponde a conhecimentos sistematizados adquiridos sobre a matéria em escala nanométrica de 1 a 100 nanômetros, onde 1 nanômetro equivale a 1 bilionésimo de metro (1×10^{-9} m) (GUBALA et al., 2018). Esta área científica possui uma importante influência na elaboração de insumos e ferramentas biotecnológicas, atuando em um campo de investigação multidisciplinar com a associação da biologia molecular, bioquímica, engenharia e física. Inúmeros são os domínios de aplicação dos nanodispositivos biotecnológicos, incluindo a vida cotidiana, segurança alimentar, diagnósticos clínicos, monitoramento ambiental e controle de qualidade de produtos industriais (ARDUINI et al., 2016). Apesar das distintas funcionalidades, o crescimento econômico no setor da saúde é expressivo, especialmente no âmbito dos diagnósticos biomédicos. Podendo este ser atribuído, principalmente, a concepção e uso de biossensores para a pesquisa clínica de colesterol, glicose sanguínea, gases sanguíneos, testes de gravidez, análises toxicológicas e doenças infecciosas (RESEARCH AND MARKETS, 2021).

O mercado global de biossensores foi avaliado em US \$ 22,4 bilhões em 2020 e espera-se expandir a uma taxa composta de crescimento anual (do inglês, *compound annual*

growth rate – CAGR) de 7,9%, durante o período de 2021 a 2028 (RESEARCH AND MARKETS, 2021). Apesar da estagnação e dificuldade econômica em grande parte dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, como o Brasil, um maior engajamento para a pesquisa, desenvolvimento e inovação de biossensores é essencial. A propriedade de conhecimentos acerca de tecnologias avançadas, materiais inovadores e processos inteligentes de manufatura impulsionará novas oportunidades para o aumento da taxa de participação do nosso país no mercado mundial de biossensores (Figura 5). Como consequências, a economia, o sistema brasileiro de inovação e a saúde populacional poderão ser impactados positivamente.

Figura 5 – Mapa global para o mercado econômico de biossensores nanotecnológicos com taxa de crescimento por região.

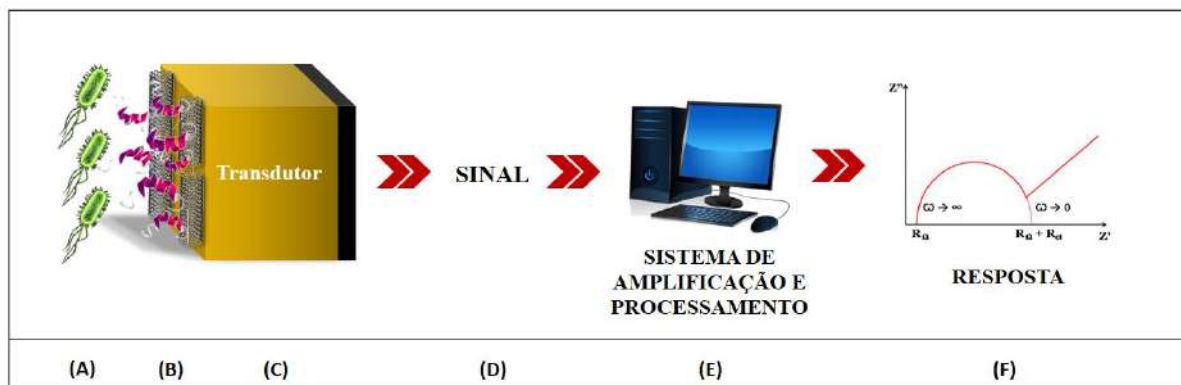


Fonte: adaptada de RESEARCH AND MARKETS, 2020.

Neste cenário, define-se biossensores como dispositivos eletrônicos capazes de fornecer informações analíticas específicas sobre alvos moleculares de forma quantitativa ou semiquantitativa. Estes dispositivos são constituídos por três unidades funcionais básicas: elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico), transdutor e sistema de amplificação e processamento de sinal (Figura 6). O elemento receptor é representado por uma molécula biológica responsável pela identificação do alvo molecular através de interações intermoleculares específicas ou por meio de reações catalíticas (MORALES; HALPERN, 2018). Destaca-se que o biorreceptor é mantido em contato espacial com uma superfície transdutora. O transdutor é responsável por converter a resposta bioquímica oriunda do processo de biorreconhecimento em um sinal mensurável e proporcional à concentração do

analito detectado. Por fim, o sistema eletrônico promove a amplificação e o processamento do dado analítico, conduzindo-o para um monitor, onde o resultado poderá ser apresentado visualmente e interpretado por analistas (BAZIN et al., 2017; SIREESHA et al., 2018; DEMEKE et al., 2020).

Figura 6 – Representação esquemática de um biossensor.



A detecção do analito (A) é realizada através de um componente biológico (B) associado a um transdutor (C). A superfície transdutora é responsável pela conversão da resposta bioquímica em um sinal mensurável (D) que será amplificado e processado por um software de computador (E), posteriormente, os dados experimentais serão apresentados na forma de gráficos (F). Fonte: adaptada de SILVA et al., 2014.

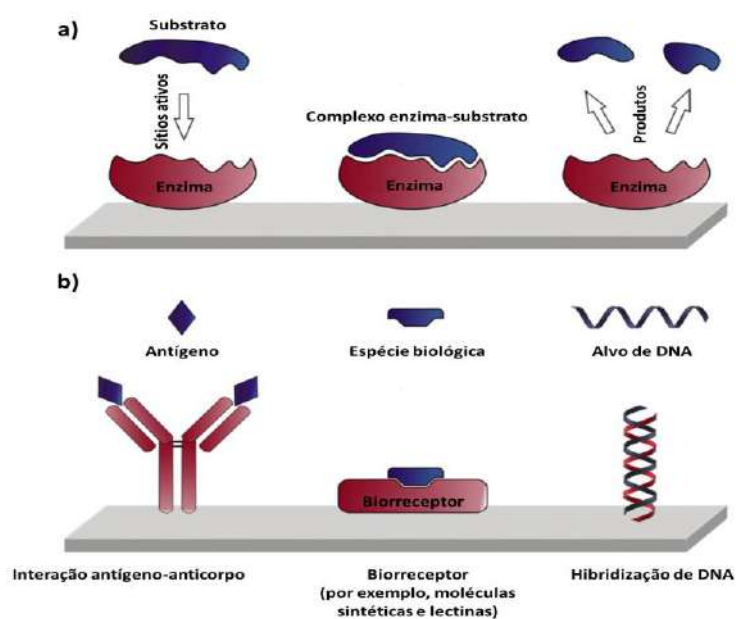
Dentre as várias características que descrevem um biossensor ideal, evidenciam-se a funcionalidade, elevada sensibilidade, especificidade, seletividade, baixo limite de detecção, acurácia, precisão, linearidade, rápido tempo de resposta, reprodutibilidade, robustez, portabilidade, miniaturização, conectividade, descartabilidade, reusabilidade, simplicidade de construção, facilidade de uso, estabilidade, vida útil prolongada, baixo custo e escalabilidade de produção (BHALLA et al., 2020). Devido estas atrativas propriedades, pode-se inferir que os sistemas de detecção baseados em tecnologia de sensoriamento são ferramentas promissoras para análises clínicas em unidades de pronto atendimento, complexos hospitalares e estabelecimentos comerciais de saúde. No entanto, estudos detalhados devem ser realizados para assegurar o potencial de uso, validação analítica e custo destes métodos inovativos de biodetecção (HOBSON, 2016).

3.2.1 Classificação dos biossensores em relação ao elemento receptor

Diferentes elementos biológicos podem ser utilizados para a construção de biodispositivos nanotecnológicos, como por exemplo, tecidos vegetais ou animais, células, receptores celulares, organelas, enzimas, sistemas multienzimáticos, anticorpos, antígenos, ácidos nucleicos, aptâmeros, lectinas e microrganismos (MITTAL et al., 2017). Apesar de haver inúmeros tipos de biorreceptores, a escolha adequada do elemento biológico é essencial para assegurar a especificidade e afinidade do biossensor à molécula alvo (GAUDIN, 2017).

Neste âmbito, os biossensores podem ser inicialmente classificados de acordo com o mecanismo de interação do elemento receptor com o analito e os eventos bioquímicos resultantes. Desta forma, designamos os biossensores em biocatalíticos ou de bioafinidade (Figura 7). Nos biossensores de bioafinidade, o receptor biológico reconhece o alvo molecular e forma um complexo estável capaz de gerar um sinal de transdução. Estes sistemas de biodeteção envolvem, por exemplo, o uso de antígenos, anticorpos, lectinas e receptores proteicos. Assim, o equilíbrio é alcançado sem o consumo do analito pela molécula biológica imobilizada. Em oposição, nos biossensores catalíticos, o receptor biológico catalisa uma reação química caracterizada pela biotransformação do analito em subprodutos que serão posteriormente identificados. Neste caso, a interação receptor/analito é acompanhada por mudanças nas concentrações dos substratos ou produtos (PISOSCHI et al., 2013; GOODE; RUSHWORTH; MILLNER, 2015; SANATI et al., 2019).

Figura 7 – Ilustração esquemática de um biossensor catalítico (a) e três diferentes tipos de biossensores de afinidade (b).



Fonte: adaptada de SANATI et al., 2019.

Os biossensores também podem ser classificados de acordo com a natureza do elemento receptor em:

- Biossensores enzimáticos: baseiam-se no uso de enzimas como elementos receptores. O princípio de detecção está relacionado ao consumo ou formação de substâncias químicas resultantes da interação enzima/analito (NGUYEN et al., 2019). Exemplos de enzimas utilizadas na construção de biossensores são a penicilinase (LI. et al., 2019), urease (SAFITRI et al., 2017), álcool desidrogenase (RAMONAS et al., 2019), peroxidase (VOKHMYANINA et al., 2020) e glicose oxidase (RASSAS et al., 2019).
- Genossensores ou biossensores de DNA: são desenvolvidos a partir da imobilização de sequências oligonucleotídicas capazes de viabilizar o reconhecimento molecular através de um processo específico de hibridização (BLAIR; CORRIGAN, 2019). Os fragmentos gênicos podem ser oriundos do ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA) (JUSTINO et al., 2015). Entre as diversas aplicações dos biossensores de DNA, destacam-se o diagnóstico de doenças infecciosas, genéticas, neurológicas e neoplásicas, além das imunodeficiências (ABU-SALAH et al., 2015; RAFIQUE et al., 2019).
- Imunossensores: são baseados na imobilização de antígenos ou anticorpos na superfície do transdutor. O processo de biodetecção é caracterizado por uma reação imunológica que conduz a formação de complexos antígeno-anticorpo. Entre os analitos investigados pelos imunossensores destacam-se hormônios proteicos ou esteroidais (CINCOTTO et al., 2016; MARTÍNEZ-GARCÍA, 2016; KHAN et al., 2019), metabólitos de drogas (EISSA; ALMTHEN; ZOUROB, 2019), vírus (LAYQAH; EISSA, 2019), bactérias (PANDEY et al., 2017), toxinas alimentares (BHARDWAJ et al., 2019) e poluentes ambientais, como os inseticidas (LI et al., 2016) e fungicidas (RAPINI; MARRAZZA, 2016).
- Biossensores à base de lectinas: nestas ferramentas de bioanálise, moléculas de lectinas são ancoradas em substratos transdutores para o reconhecimento de carboidratos e glicoconjugados com elevada especificidade. Estas proteínas de origem não imunológica são isoladas de fontes animais e vegetais, podendo causar

aglutinação de células e precipitação de polissacarídeos, glicoproteínas, glicolipídeos, peptidoglicanos e ácido teicoico. Por exemplo, citam-se as lectinas Concanavalina A e CramoLL extraídas a partir das sementes das espécies *Cratylia mollis* e *Canavalia ensiformis*, respectivamente. Na pesquisa de diagnóstico biomédico, as lectinas têm proporcionado a investigação de arbovírus, tais como vírus da dengue, Chikungunya, Zika e febre amarela (AVELINO et al., 2014; SIMÃO et al., 2020); células cancerígenas (ZANGHELINI et al., 2017); bactérias patogênicas (OLIVEIRA et al., 2011; MI et al., 2021); e fungos oportunistas (SÁ et al., 2020).

- Aptassensores: nestes biodispositivos, aptâmeros são utilizados como elementos receptores. Aptâmeros são segmentos de oligonucleotídeos de fita simples (DNA ou RNA) que são sintetizados para adquirirem uma conformação estrutural com alta especificidade e afinidade para qualquer alvo de interesse farmacêutico ou biológico, como proteínas, íons e pequenas moléculas (CHEN et al., 2019; LI et al., 2019). Estas moléculas orgânicas são produzidas por meio de uma técnica combinatória denominada de evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (do inglês, *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* – SELEX). Em razão do elemento de biodeteção ser sintético e não possuir origem natural, os aptassensores são comumente chamados de biossensores miméticos ou artificiais (CHARBGOO et al., 2016).
- Biossensores microbiológicos: são caracterizados pela imobilização de microrganismos sobre superfícies transdutoras. Nestes sistemas biossensíveis, as bactérias, leveduras e fungos atuam como elementos de biodeteção (LIM et al., 2015). As principais aplicações dos biossensores microbiológicos concentram-se, principalmente, no monitoramento ambiental e diagnóstico de doenças infecciosas (BEREZA-MALCOLM, L.T.; SUN et al., 2015).
- Biossensores celulares: baseiam-se no uso de células como elementos receptores. Muitos biossensores microbiológicos também são denominados de biossensores celulares. No entanto, a classe de biossensores celulares utiliza qualquer tipo de célula viva como elemento de biodeteção, seja ela oriunda de microrganismos ou não (GUPTA et al., 2019; YE; GUO; SUN, 2019). Em linhas gerais, estes biossensores

apresentam uma versatilidade de uso, incluindo a detecção precoce de doenças crônicas, identificação de patógenos, monitoramento ambiental e testes toxicológicos. Além destas aplicações, os biossensores celulares permitem a caracterização da ação farmacológica de inúmeras moléculas sobre o sistema biológico, como o efeito das drogas antineoplásicas sobre as células do câncer (CHENG et al., 2015; HU et al., 2017).

3.2.2 Classificação dos biossensores em relação ao elemento transdutor

Conforme o sistema de transdução de sinal e o tipo de energia mensurada, os biossensores podem ser categorizados em:

- Biossensores ópticos: são biodispositivos baseados, frequentemente, na conversão de fenômenos ópticos em sinais elétricos quantificáveis. As técnicas ópticas aplicadas possuem, por exemplo, a finalidade de caracterizar o processo de construção do sistema sensor e monitorar a concentração do analito (DAMBORSKÝ; ŠVITEL; KATRLÍK, 2016). Entre as propriedades ópticas avaliadas, pode-se exemplificar a absorção e transmitância de energia eletromagnética, índice de refração, fluorescência, fosforescência e refletividade (ZHANG et al., 2017). Entre as vantagens destes biossensores, destacam-se a elevada sensibilidade, facilidade de integração de sinal, detecção livre de marcadores e obtenção de repostas analíticas em tempo real (NG et al., 2017). O método de transdução livre de marcador mais utilizado é a ressonância de plásmons de superfície, o qual permite o desenvolvimento de ensaios de biossensibilidade à base óptica (LEVA-BUENO; PEYMAN; MILLNER, 2020).
- Biossensores piezoelétricos: os biossensores baseados em piezoeletricidade utilizam cristais anisotrópicos como transdutores de sinal por apresentarem uma frequência de ressonância natural (como o cristal de quartzo, por exemplo) (POHANKA, 2017). Inicialmente, ao aplicar uma tensão alternada sobre o cristal, detecta-se uma frequência específica associada à massa e às constantes elásticas do material que o constitui (SKLÁDAL, 2016). Entretanto, ao imobilizar o elemento receptor na superfície do cristal e expor o biossensor ao alvo biológico, observa-se alterações nos valores de frequência. Estas mudanças na frequência do cristal poderão ser

relacionadas às massas das substâncias em estudo (POHANKA, 2017). Entre as técnicas mais utilizadas para o desenvolvimento de biossensores piezoelétricos, ressalta-se a microbalança de cristal de quartzo (BAKSHPOUR et al., 2019; LIM et al., 2020).

- Biossensores térmicos: os primeiros biossensores baseados em enzimas introduzidos por Clark e Lyons em 1962 inspiraram e atraíram o interesse dos pesquisadores no desenvolvimento de métodos de transdução baseados em calorimetria (CLARK; LYONS, 1962). A ideia geral fundamenta-se no princípio de que todas as reações bioquímicas envolvem a liberação ou absorção de energia na forma de calor. Partindo desta conjectura, biossensores térmicos (também denominados biossensores calorimétricos) foram desenvolvidos para detectar variações de calor/temperatura durante o processo de interação receptor-analito. Geralmente, estas variações são mensuradas por meio de termístores e termopares (termopilhas) de alta sensibilidade (KHAREWAL et al., 2020). As mudanças na quantidade de calor/temperatura podem ser correlacionadas com a entalpia molar das substâncias e o número de reagentes consumidos ou produtos formados no sistema (SINGH et al., 2020). As enzimas são os principais elementos de biodeteção usados para a construção de biossensores térmicos, no entanto, células, DNA e anticorpos também podem ser empregados (LEE et al., 2013; BARI; REIS; NESTOROVA, 2019). Os biossensores térmicos são instrumentos muito atraentes para estudos de hibridização com sequências específicas de DNA, ensaios enzimáticos, testes de controle de qualidade e vigilância ambiental (BAI et al., 2017; LI et al., 2017; BARI; REIS; NESTOROVA, 2019).
- Biossensores eletroquímicos: com base em uma análise estatística, o segmento eletroquímico dominou o mercado global de biossensores e foi responsável pela maior participação na receita de 70,9% em 2020, devido às suas aplicações generalizadas para quantificação e análise em processos bioquímicos e biológicos (RESEARCH AND MARKETS, 2021). Entre suas características atrativas, ressaltam-se à alta sensibilidade, precisão, rápida mensuração analítica, simplicidade para realização de bioensaios, facilidade de miniaturização, robustez e custo relativamente baixo (WANG; DAI, 2015; SANATI et al., 2019). Nestes sistemas, o evento molecular de reconhecimento do alvo biológico é transduzido em um sinal de domínio

eletroquímico. Assim, os biossensores eletroquímicos são capazes de quantificar mudanças nas propriedades físico-químicas do meio, tais como resistência do eletrólito, difusão de espécies eletroativas, transferência interfacial de elétrons e armazenamento de cargas (LEVA-BUENO; PEYMAN; MILLNER, 2020). Nestes instrumentos de detecção, os transdutores são eletrodos constituídos por materiais inertes, como por exemplo, ouro, carbono vítreo, platina e suportes flexíveis revestidos com substâncias condutoras (UNTIVEROS et al., 2019; YE et al., 2019). De acordo com o método de transdução de sinal, os biossensores eletroquímicos podem ser subclassificados em:

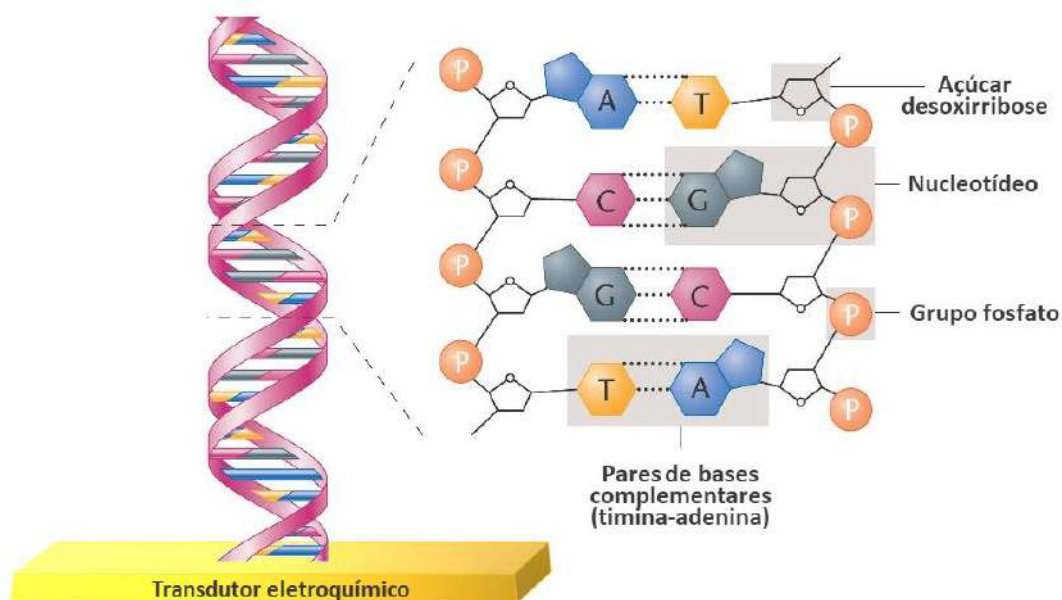
- a) biossensores amperométricos (medem o fluxo de corrente elétrica gerada pela reação de oxirredução de espécies eletroativas presentes na célula eletroquímica quando se aplica uma variação de potencial) (VÁSQUEZ et al., 2017);
- b) biossensores potenciométricos (quantificam o potencial gerado no eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo de referência quando uma corrente é aplicada entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar) (DRAGHI; FERNANDES, 2017);
- c) biossensores condutimétricos (mensuram a condutância da dupla camada elétrica, correlacionando-a com a concentração do analito detectado) (KHAREWAL et al., 2020; LAKARD, 2020);
- d) biossensores impedimétricos (aferem a impedância gerada no sistema a partir da aplicação de um potencial senoidal no eletrodo de trabalho frente a uma determinada faixa de frequência, obtendo-se assim, uma corrente elétrica alternada que será associada à impedância total da interface eletrodo/solução) (RAMANATHAN et al., 2016; SHEIKHZADEH et al., 2016).

3.2.3 Biossensores de DNA eletroquímicos

Um fator primordial capaz de influenciar a capacidade de detecção dos sistemas analíticos é a escolha do material biológico a ser usado como biorreceptor (MITTAL et al., 2017). Dentre as inúmeras biomoléculas, os segmentos de ácidos nucleicos são amplamente

usados na materialização de biossensores de DNA. Esta classe de dispositivos sensoriais possui significativo potencial de aplicabilidade para o diagnóstico clínico e laboratorial através da identificação, quantificação e monitoramento da expressão gênica. O elemento básico para concepção de biossensores de DNA é um fragmento de oligonucleotídeo do tipo ssDNA (denominado de sonda) capaz de reconhecer a cadeia de DNA complementar (DNA alvo) com elevada especificidade e seletividade. Como resultado da interação entre os sítios específicos de DNA, obtêm-se uma estrutura nucleotídica híbrida do tipo dsDNA, a qual caracteriza o processo de hibridização ou anelamento molecular (Figura 8) (RAFIQUE et al., 2019). Enfatiza-se que através de ferramentas avançadas de bioinformática e bancos de dados com sequenciamento genômico, sondas de DNA específicas podem ser desenvolvidas para a captura de genes alvo. Com esta finalidade, a padronização do design (que inclui a sequência de nucleotídeos, o comprimento da sonda e a posição em que a sonda se ligará ao alvo) e, conseqüentemente, sua especificidade, tornam-se fatores essenciais para a aplicabilidade das sondas em ensaios de triagem genética por meio de sistemas sensores (NIMSE et al., 2011).

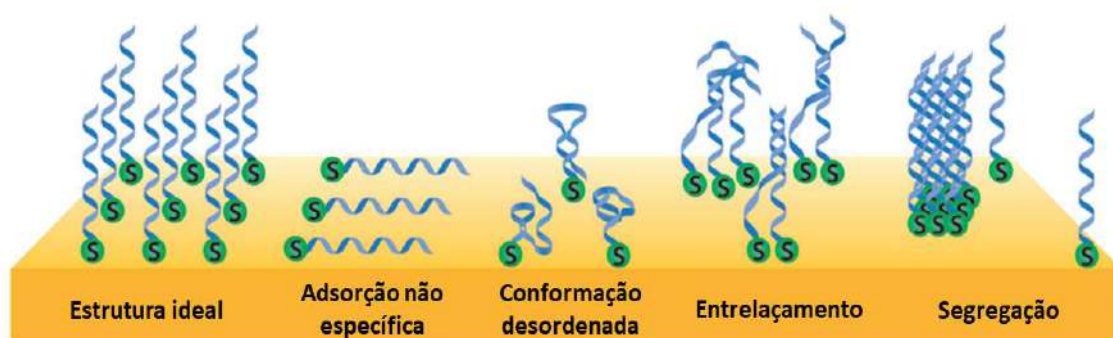
Figura 8 – A estrutura conformacional do DNA e as interações bioespecíficas entre suas bases nitrogenadas.



O DNA possui estrutura de dupla hélice (dsDNA). Cada fita é composta de subunidades nucleotídicas. Os nucleotídeos são compostos por um açúcar (desoxirribose), um grupo fosfato e uma base nitrogenada, a qual pode ser classificada como púrica (adenina – A; guanina – G) ou pirimídica (citosina – C; timina – T). As bases formam pares complementares ao longo da hélice. Fonte: adaptada de *Concepts of Genetics* (<https://bio3400.nicerweb.com/>).

Os biossensores eletroquímicos de DNA são projetados a partir da imobilização de segmentos de ácidos nucleicos sobre a superfície de transdutores físico-químicos. Como uma regra geral para a construção de biossensores eletroquímicos de DNA, as sondas devem ser imobilizadas de maneira previsível, assegurando sua estrutura conformacional e capacidade de biodetecção (YE; ZUO; FAN, 2018). Independente da identidade molecular, a adsorção não-específica, conformação desordenada, entrelaçamento e segregação entre as moléculas biorreceptoras devem ser minimizados (Figura 9) (YE; ZUO; FAN, 2018). Assim, considera-se a estabilidade, orientação e acessibilidade das sondas de DNA parâmetros essenciais para assegurar sua afinidade à molécula alvo e eficiência de hibridização (KURBANOGU et al., 2016). Nestas circunstâncias, a arquitetura do biossensor de DNA e a estratégia de ancoragem da molécula de biorreconhecimento são pontos cruciais para um processo de bioanálise eficaz (CHAO et al., 2016; JIA; DONG; WANG, 2016). Nota-se que estes dispositivos eletroquímicos baseados em tecnologia de DNA exibem a capacidade de discriminar sequências oligonucleotídicas com substituições de nucleotídeo único e podem detectar níveis mínimos de ácidos nucleicos em amostras biológicas, devido a sensibilidade do método de transdução. Ademais, o ensaio bioanalítico requer pequena quantidade de amostra clínica e a camada de reconhecimento pode ser recuperada por intermédio de protocolos experimentais que promovam a de-hibridização, diminuindo assim, o custo do biossensor (XU et al., 2017; HUANG; HE; LI, 2018).

Figura 9 – Representação de um transdutor de ouro funcionalizado com sondas de DNA.



A heterogeneidade da interface é decorrente da adsorção inespecífica, conformação desordenada, entrelaçamento e segregação de sondas de DNA, que impedem a formação de uma monocamada de DNA ideal. Fonte: adaptada de YE; ZUO; FAN, 2018.

3.2.4 Métodos de imobilização de DNA

A imobilização do elemento sensor desempenha um papel fundamental nas características de performance analítica e vida operacional do biodispositivo. As técnicas de imobilização empregadas no desenvolvimento de biossensores de DNA podem ser categorizadas em:

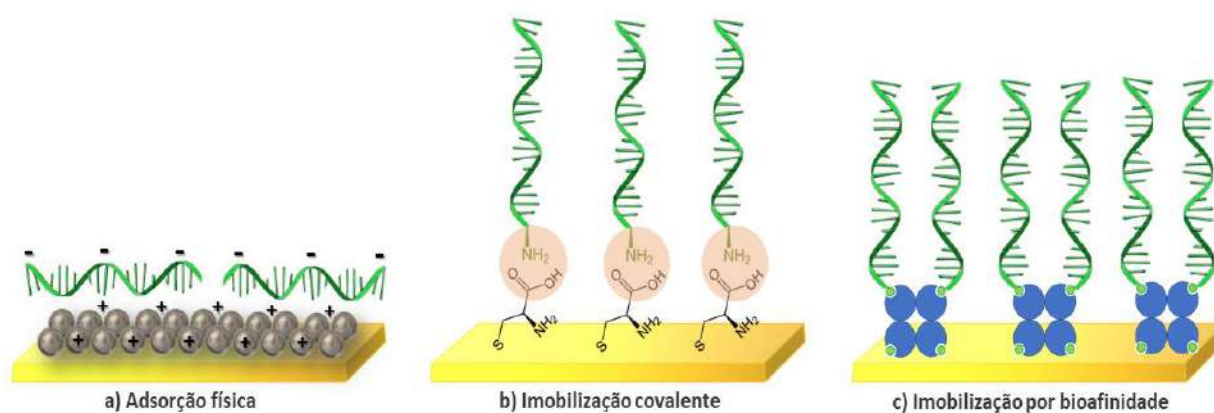
- Métodos físicos: a adsorção física de sondas de DNA em superfícies sólidas fundamenta-se, principalmente, em interações iônicas entre os grupos fosfato das moléculas de DNA carregados negativamente e o substrato carregado positivamente. Outrossim, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals podem ser estabelecidas entre as biomoléculas e o transdutor. Esta técnica é um método simples para imobilização de DNA e não requer qualquer modificação na estrutura molecular do ácido nucleico (RAHMAN et al., 2015) (Figura 10a).
- Métodos químicos: a formação de ligações covalentes entre o transdutor e a biomolécula é o método de imobilização mais utilizado em sistemas sensores (SONI et al., 2015; RASHEED; SANDHYARANI, 2016). Embora existam reagentes capazes de quebrar as ligações covalentes para permitir a reutilização de substratos, o processo de interação covalente é geralmente irreversível devido à natureza estável das ligações químicas (FRAAS, R.; FRANZREB, 2017). A imobilização covalente de fragmentos de DNA frequentemente ocorre entre grupos químicos intrínsecos ou sintéticos da biomolécula (tais como hidroxila, amino, carboxílico e tiol) e grupos funcionais do substrato (ASAL et al., 2019) (Figura 10b). Para o processamento da reação, comumente empregam-se agentes de acoplamento, tais como glutaraldeído, N-hidroxissuccinimida (NHS) e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (MCKENNA et al., 2016; THIPMANEE et al., 2016). Salienta-se que este tipo de ancoragem reduz o processo de lixiviação das moléculas de DNA, garantindo assim uma maior estabilidade e reprodutibilidade da camada sensora. Entre metodologias de imobilização química, exemplificam-se a quimissorção para a ligação de sequências de DNA com grupos tióis terminais sobre superfícies de ouro e a ancoragem por *crosslinking*. A quimissorção é baseada na forte afinidade entre os átomos de enxofre e ouro, o que permite a formação de ligações covalentes. Já no protocolo por *crosslinking*, substâncias reticuladoras com extremidades reativas livres são usadas

para formar ligações covalentes e ancorar biomoléculas na superfície do transdutor (ASAL et al., 2019). A título de exemplo, polímeros reticuláveis podem ser utilizados para a imobilização de segmentos nucleotídicos via imersão com subsequente deposição em eletrodos (LI et al., 2020).

- Métodos de bioafinidade: este método de ligação para sondas de DNA baseia-se na afinidade natural entre biomoléculas (RAHMAN et al., 2015). Para tal, o suporte transdutor e o biorreceptor devem ser ativados com substâncias específicas. O protocolo de bioafinidade mais conhecido e empregado para construção de biossensores é a interação entre as moléculas biotina e avidina (ou estreptavidina), uma vez que formam complexos não covalentes de alta afinidade. As sondas de DNA podem ser biotiniladas por síntese química e posteriormente imobilizadas em superfícies modificadas com avidina (ou estreptavidina). Assim, o processo de biointeração entre sondas de DNA biotiniladas e avidina (ou estreptavidina) permite uma orientação específica do DNA imobilizado (DONG et al., 2015) (Figura 10c).

Diante das informações apresentadas, verifica-se que os segmentos de DNA podem ser ancorados por meio de diferentes estratégias. Entretanto, a determinação do protocolo experimental deve ser minuciosamente avaliada para garantir as propriedades bioquímicas e funcionais da molécula receptora (FRÍAS et al., 2015).

Figura 10 – Estratégias de imobilização de DNA em superfícies sólidas.



Segmentos oligonucleotídicos podem ser ancorados em substratos sólidos através de três estratégias principais: método físico (a), método químico (b) e método por bioafinidade. Fonte: A autora (2021).

3.2.5 Estado da arte dos biossensores de DNA para a pesquisa eletroquímica de HPV

Os métodos eletroquímicos de transdução são de longe os mais bem-sucedidos comercialmente, possibilitando a projeção de estratégias de detecção sensíveis, seletivas e específicas; princípios de medição; e metodologias analíticas. Complementarmente, processos nanotecnológicos têm fornecido melhores táticas para obtenção de biossensores eletroquímicos com maior desempenho analítico (FRÍAS et al., 2015). Neste sentido, mostra-se na Tabela 1 as tendências das técnicas eletroquímicas para a biodetecção de HPV a partir do uso de fragmentos oligonucleotídicos como moléculas de reconhecimento biológico.

Enfatiza-se que os biossensores eletroquímicos são ferramentas diagnósticas promissoras para a pesquisa de HPV, por sua propensão à miniaturização, triagem imediata de amostras clínicas, simplicidade e baixo custo de instrumentação. Embora a regeneração da plataforma sensora possa minimizar o custo da análise, apenas algumas publicações descrevem biossensores eletroquímicos reutilizáveis (CIVIT et al., 2012; WANG et al., 2013). O real interesse em ensaios multiplex (CIVIT; FRAGOSO; O'SULLIVAN, 2010), que se refere, por exemplo, à realização de uma série de testes moleculares na forma de um ensaio de microarranjo de DNA, é evidente. Também se acentua a incorporação de tecnologias de microfluídica, sistemas de micro/nanoeletrônica e testes de pronto atendimento (testes *point-of-care*) para o aprimoramento dos ensaios bioanalíticos já estabelecidos (YANG; OH; HWANG, 2019; WANG et al., 2020).

A partir de uma análise descritiva, verifica-se que uma das plataformas transdutoras mais utilizadas para a imobilização de sequências oligonucleotídicas é o eletrodo de ouro (VERNON et al., 2003; SOARES et al., 2020). Destaca-se que o principal processo de automontagem biomolecular é estabelecido através de ligações covalentes do tipo tiol-ouro (CIVIT et al., 2012; CAMPOS-FERREIRA et al., 2013; SHARIATI et al., 2019). No entanto, os transdutores de sinal são diversos, tais como eletrodos de platina interdigitados (DAI TRAN et al., 2011), substratos de silício (WANG et al., 2013), suportes a base de papel (TEENGAM et al., 2017), eletrodos flexíveis de ITO (HE et al., 2020), eletrodos de carbono vítreo (HUANG et al., 2015), eletrodos impressos de carbono (JAMPASA et al., 2014), eletrodos de grafite (SABZI et al., 2008; CAMPOS-FERREIRA et al., 2016) e superfícies de policarbonato (SHARIATI et al., 2019).

O princípio de biodetecção pode ser realizado na presença de uma sonda repórter secundária, a qual atuará como um marcador durante o mensuramento eletroquímico. Citam-

se como moléculas de sinalização a tetrametilbenzidina (CIVIT; FRAGOSO; O'SULLIVAN, 2010; CIVIT et al., 2012), azul de metileno (SABZI et al., 2008; CAMPOS-FERREIRA et al., 2013; HE et al., 2020), antraquinona (JAMPASA et al., 2014; MAHMOODI et al., 2020), ferroceno (VERNON et al., 2003), hematoxilina (NASIRIZADEH et al., 2011) e dicloreto 1,10-fenantrolina rutênio ($[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$) (HUANG et al., 2015). Tais métodos podem proporcionar uma resposta eletroquímica amplificada com maior especificidade.

Além dos sistemas supracitados, dispositivos eletroquímicos livres de marcadores têm sido usados para a detecção de genótipos de HPV em amostras biológicas (WANG et al., 2013; RAMESH et al., 2019; SHARIATI et al., 2019). Nestas ferramentas de análise, frequentemente, são incorporados materiais nanotecnológicos com a finalidade de aperfeiçoar a resposta eletroquímica, aumentando a sensibilidade do sinal detectado. Em adição, permitem uma maior estabilidade e atividade da camada de biossensoriamento. As principais nanoestruturas e materiais funcionais associados no desenvolvimento de biossensores para identificação de papilomavírus são a cisteína (CAMPOS-FERREIRA et al., 2013; MAHMOODI et al., 2020), quitosana (JAMPASA et al., 2014; SOARES et al., 2020), carbodiimidazol (LIN et al., 2019), 3-aminopropil trietoxissilano (PARMIN et al., 2019a), polianilina (DAI TRAN et al., 2011), nanotubos de carbono de parede simples (WANG et al., 2013) e de parede múltipla (DAI TRAN et al., 2011), grafeno (HUANG et al., 2015), óxido de grafeno reduzido (MAHMOODI et al., 2020), nanobastões de óxido de zinco (RAMESH et al., 2019) e nanoestruturas de ouro, tais como nanopartículas (WANG et al., 2013; LV et al., 2019; MAHMOODI et al., 2020), nanofolhas (KARIMIZEFREH et al., 2017), nanobastões (HUANG et al., 2015) e nanotubos (SHARIATI et al., 2019).

As plataformas nanoestruturadas integradas a eletrodos e superfícies transdutoras devem ser evidenciadas, uma vez que permitem uma medição aprimorada do sinal de saída após o processo de biodetecção do HPV. Neste sentido, as técnicas de transdução de sinal por VC (NASIRIZADEH et al., 2011; CIVIT et al., 2012; NIE et al., 2020), voltametria de onda quadrada (SWV) (SABZI et al., 2008; JAMPASA et al., 2014), voltametria de pulso diferencial (DPV) (NASIRIZADEH et al., 2011; CAMPOS-FERREIRA et al., 2013; CAMPOS-FERREIRA et al., 2016) e EIE (WANG et al., 2013; HUANG et al., 2015; RAMESH et al., 2019) são as mais empregadas.

Portanto, frente aos estudos apresentados, verifica-se a notória elaboração de métodos ultrasensíveis para detecção de papilomavírus, principalmente os HPVs tipos 16, 18 e 45, associados a lesões intraepiteliais e câncer cervical (CIVIT et al., 2010; CIVIT et al., 2012;

HUANG et al., 2015). Os relatórios científicos sobre sistemas eletroquímicos baseados em DNA demonstram que a maioria dos ensaios detecta apenas um único genótipo viral (ESPINOSA et al., 2020; NIE et al., 2020; SOARES et al., 2020). Logo, estratégias metodológicas para o diagnóstico diferencial de HPV exibem acentuada importância na prática clínica (REBOLJ et al., 2016). Neste sentido, a fim de expandir e simplificar a pesquisa laboratorial, novas sequências de oligonucleotídeos podem ser construídas para a detecção de famílias de papilomavírus e segregação de grupos virais de alto e baixo risco oncogênico, tendo como princípio a identidade filogenética. Apesar de serem protótipos e necessitarem de estudos adicionais de reprodutibilidade, estabilidade, validação analítica e escalabilidade produtiva, estes dispositivos eletroquímicos de bioanálise exibem potencial para se tornarem métodos alternativos para o diagnóstico de HPV.

Tabela 1 – Biossensores eletroquímicos de DNA desenvolvidos para detecção de HPV.

Genótipos de HPV identificados	Plataforma sensora	Método de detecção	Técnica	Limite de detecção	Faixa de detecção	Tempo de detecção	Reusabilidade	Referências
21 genótipos diferentes de HPV (HPV6, 11, 16, 18, 26, 31, 35, 40, 42, 45, 51, 52, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 82, 83 e 84)	Superfície de ouro / oligonucleotídeos de captura	Dois eventos de hibridização devem ocorrer para detecção eletroquímica. O primeiro entre a sonda de captura e o alvo, e o segundo entre uma região adjacente do alvo e a sonda de sinal marcada com ferroceno.	VC	-	-	2 horas	-	VERNON et al., 2003
HPV16	Superfície de ouro / nanotubos de carbono de parede única / AuNPs/ sonda HPV16E7	Hibridização entre a sonda de captura e o alvo HPV (específico para região E7 do HPV16).	EIE	1 aM	1aM a 1 µM	2 horas	6 testes	WANG et al., 2013
HPV16	Superfície de ouro / L-cisteína / sonda HPV16	A detecção foi baseada nos sinais de redução do azul de metileno antes e após a hibridização entre a sonda e o alvo sintético ou DNA extraído de amostras clínicas.	DPV	18,13 nM	18,75 nM a 1000 nM	10 minutos	-	CAMPOS-FERREIRA et al., 2013
HPV16	Superfície de grafite / sonda HPV16 E6	A hibridização entre a sonda de captura e o gene E6 do HPV16 foi detectada diretamente por meio de sinais de oxidação da guanina.	DPV	16 pg/µL	5 pg/µL a 40 pg/µL	5 minutos	-	CAMPOS-FERREIRA et al., 2016
HPV16 e HPV45	Superfície de ouro / sondas tioladas HPV16E7p e HPV45E6	A hibridização foi detectada pela incorporação de uma sonda repórter marcada com peroxidase de rábano, capaz de emparelhar-se com o alvo. A 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina foi usada como um substrato cromogênico para a enzima.	VC	490 pM para HPV16E7p 110 pM para HPV45E6	0,1 nM a 50 nM	1 hora	-	CIVIT; FRAGOSO; O'SULLIVAN, 2010

HPV16, HPV18 e HPV45	Superfície de ouro / ditiol 16- (3,5-bis ((6-mercaptohexil) oxi) fenil) - 3,6,9,12,15- pentaohexa- decano / sondas tioladas HPV16E7p, HPV18E6 e HPV45E6	A detecção foi realizada com o alvo hibridizado entre uma sonda imobilizada na superfície transdutora e uma sonda repórter secundária marcada com peroxidase de rábano. A 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina foi usada como substrato cromogênico para peroxidase.	VC	220 pM para HPV16E7p	0,1 nM a 50 nM	20 minutos	5 testes	CIVIT et al., 2012
				170 pM para HPV18E6				
				110 pM para HPV45E6				
HPV (gene L1)	Superfície de grafite / sonda HPV	A hibridização entre a sonda e o alvo do HPV foi estudada pela medição do sinal do azul de metileno acumulado no eletrodo de grafite.	SWV	1,2 ng/μL	1,2 ng/μL a 50 ng/μL	3 minutos	-	SABZI et al., 2008
HPV16	Superfície de carbono / quitosana / sonda de ácido nucleico peptídico pirrolidinil marcado com antraquinona	A hibridização com o DNA do HPV16 foi estudada medindo-se o sinal eletroquímico do marcador antraquinona anexado à sonda.	SWV	4 nM	0,02 mM a 12 nM	15 minutos	-	JAMPASA et al., 2014
HPV (gene L1)	Superfície de ouro / sonda HPV com alcanotiol	O estudo foi realizado com base na interação da hematoxilina com a sonda HPV em sua forma simples e hibridizada.	VC e DPV	3,8 nM	12,5 nM a 400 nM	2 horas	-	NASIRIZADE H et al., 2011
HPV16	Superfície de carbono vítreo / grafeno / nanobastões de ouro / politionina / sonda HPV16	Além da sonda de captura, duas sondas auxiliares foram projetadas para a hibridização com DNA de HPV. Dicloreto 1,10-fenantroline rutênio ([Ru(phen) ₃] ²⁺) foi usado como o indicador eletroquímico.	EIE e DPV	40,3 fM	0,1 pM a 0,1 nM	90 minutos	-	HUANG et al., 2015

HPV16	Superfície de polycarbonato / nanotubos de ouro / sonda HPV tiolada	O sensor livre de rótulos foi desenvolvido a partir da imobilização de sondas de DNA tioladas sobre nanotubos de ouro em polarização de campo elétrico.	EIE	1fM	0,01 pM a 1 µM	-	-	SHARIATI et al., 2019
HPV16	Chip de eletrodos interdigitados / nanobastões de óxido de zinco / AuNPs / sonda HPV tiolada	O gene E6 do HPV16 foi identificado em células de cancer cervical através do uso de eletrodos interdigitados modificados com nanobastões de óxido de zinco e AuNPs.	EIE	1 fM	0,1 pM a 1 fM	10 minutos	-	RAMESH et al., 2019
Sete genótipos diferentes de HPV (HPV6, 11, 16, 31, 33, 45 e 58)	Superfície de ouro / compósito híbrido AuNP/PANI / sonda aminada MY11	Os genótipos de HPV foram identificados a partir do uso de uma sonda degenerada MY11 imobilizada sobre o nanocompósito híbrido de AuNP/PANI. O sistema livre de marcadores exibiu diferentes respostas eletroquímicas para genótipos de alto e baixo risco oncogênico.	VC e EIE	2,74 pg/µL para HPV11 7,43 pg/µL para HPV16	1 pg/µL a 100 pg/µL	15 minutos	-	AVELINO et al., 2020
Quinze genótipos diferentes de HPV, além do gene p53 (HPV6, 11, 16, 18, 33, 45, 51, 53, 58, 61, 62, 66, 72, 81 e 84)	Superfície flexível de ITO / PPy / AuNP / Cys / sondas aminadas BSH6, BSH16, BSH18, BSH26, BSH53, BSH61 e p53	A detecção livre de marcadores eletroquímicos para famílias de HPV e o monitoramento de gene p53 foram realizados através da imobilização de diferentes sondas de biorreconhecimento sobre um transdutor flexível nanoestruturado.	VC e EIE	0,89 pg/µL	1 fg/µL a 100 pg/µL	15 minutos	-	AVELINO et al., 2021

3.2.6 Tecnologia de eletrodos flexíveis

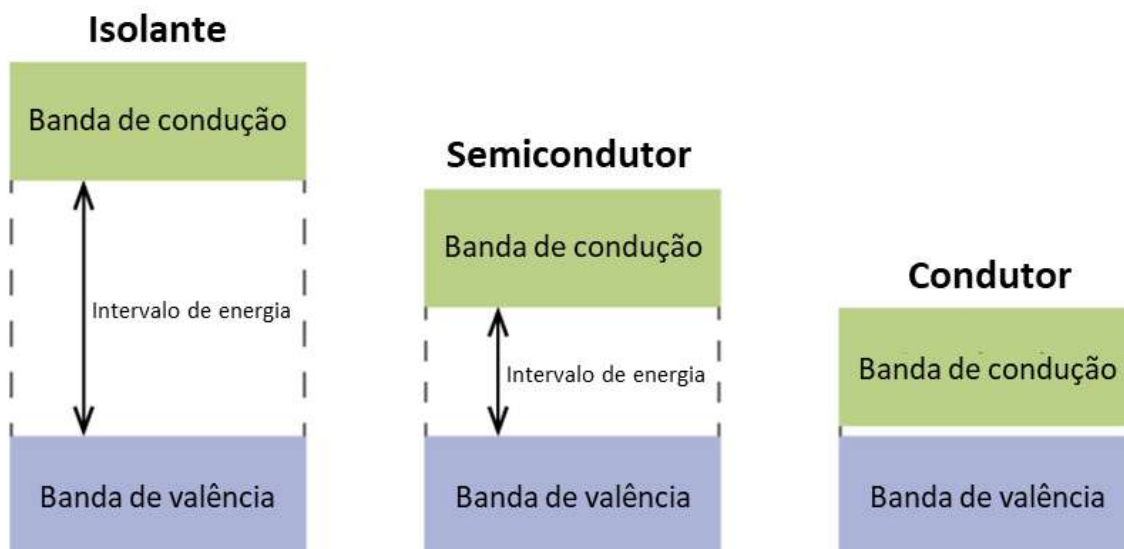
A miniaturização de sistemas eletrônicos e dispositivos analíticos dependem das propriedades químicas, elétricas, ópticas e magnéticas dos materiais que os constituem. Um fator limitante para usos distintos e compactação das ferramentas de diagnóstico é a natureza rígida ou quebradiça dos materiais comumente utilizados para fabricação de eletrodos, tais como vidro, *wafer* de silício e polímero PEEK (obtido a partir da resina de polieteretercetona) (PARMIN et al., 2019b; TRUTA; SALES, 2019). Logo, transdutores impressos e flexíveis representam um campo de pesquisa em ascensão, proporcionando novas oportunidades para o desenvolvimento de biossensores miniaturizados. Segundo a IDTechEx, os sensores impressos e flexíveis exibem uma perspectiva de 8 bilhões de dólares até 2025. O relatório prevê que os sensores flexíveis estarão entre os dispositivos tecnológicos com maior crescimento econômico na década seguinte, com uma CAGR de mais de 40% (ECONOMOU; KOKKINOS; PRODROMIDIS, 2018).

Entre as substâncias utilizadas para a elaboração de biossensores eletroquímicos flexíveis estão os óxidos condutores, como o ITO. Os filmes de ITO são notáveis devido a sua alta condutividade elétrica, baixa corrente capacitiva, atividade eletroquímica em uma ampla faixa de potencial e possibilidade de diferentes modificações de superfície (LUE et al., 2012; KARABOĞA; SEZGINTÜRK, 2018). Além da aplicação em sensores biológicos, ressalta-se a construção de dispositivos optoeletrônicos (aparelhos que emitem, detectam ou controlam a luz), como fotodetectores orgânicos e híbridos, sensores de toque capacitivos (painéis de toque), eletrodos transparentes, telas de cristal líquido e células solares (AYDIN; SEZGINTÜRK, 2017).

Quimicamente, o óxido de índio sem dopagem por estanho exibe um comportamento isolante na forma estequiométrica In_2O_3 (MONTEIRO et al., 2019). Nos materiais isolantes, os elétrons de valência preenchem orbitais moleculares disponíveis, compondo a denominada banda de valência. Nestas substâncias, existe uma separação substancial entre a banda de valência e a banda de condução, a qual é composta por orbitais vazios. Os elétrons de valência podem ser excitados até a banda de condução caso haja o fornecimento de uma grande quantidade de energia. Como a banda de valência está preenchida por elétrons e a banda de condução separada por uma significativa quantidade de energia, os elétrons não são móveis e o material, como o óxido de índio, é um isolante. Através de um processo de dopagem com o estanho, obtém-se o ITO com capacidade ampliada de transporte elétrico. A substância

dopante, o estanho, fornece elétrons para a banda de condução do óxido de índio, normalmente vazia, permitindo que o material conduza corrente elétrica. Por possuir um excesso de cargas negativas, o ITO ($\text{In}_2\text{O}_3:\text{Sn}$) é considerado um semiconductor extrínseco do tipo n (PARK et al., 2016; ATKINS; JONES; LAVERMAN, 2018) (Figura 11).

Figura 11 – Diagramas energéticos de materiais isolantes, semicondutores e condutores.

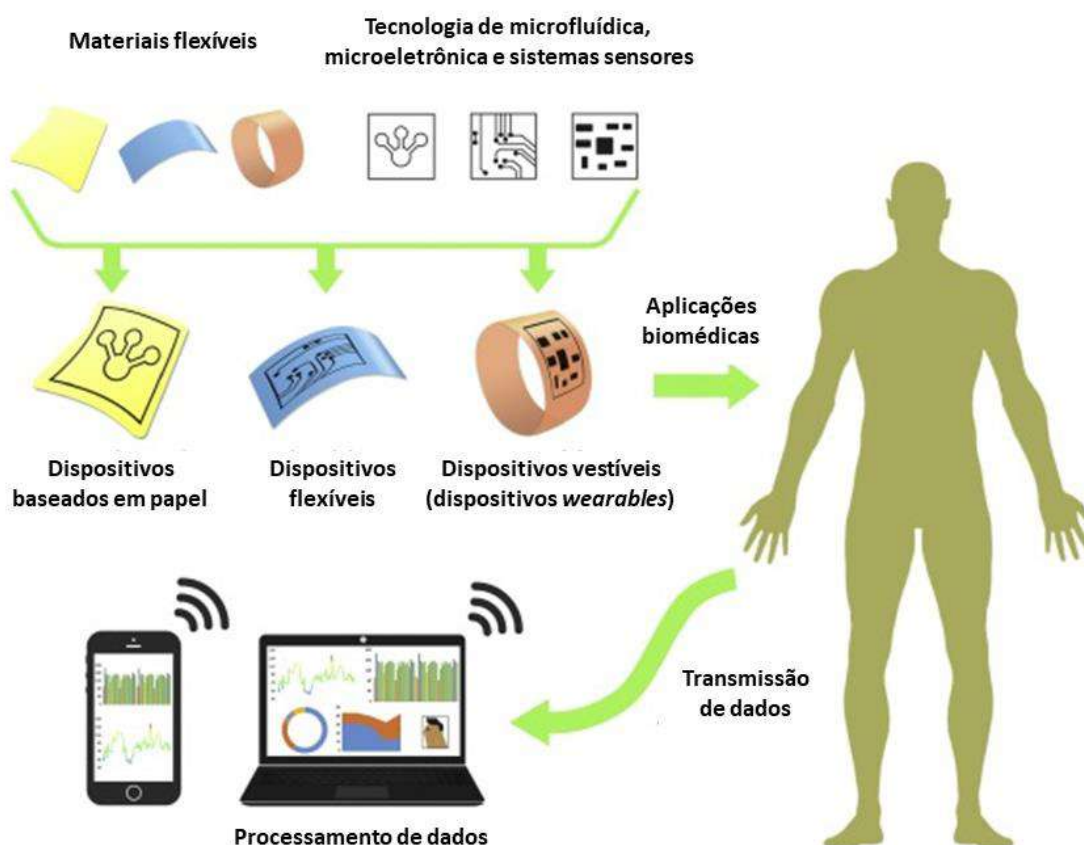


Em um material tipicamente isolante, a banda de valência completa está separada da banda de condução vazia eletronicamente por uma diferença de energia substancial. Em uma substância semicondutora, a banda de valência completa e a banda de condução vazia possuem energias próximas. Já em um sólido condutor, a banda de valência e a banda de condução estão tão próximas energeticamente que formam uma banda quase contínua, com isso, os elétrons podem mover-se livremente pelo material e, assim, transportar corrente elétrica. A saber, denomina-se de banda de condução uma banda vazia ou incompleta de orbitais moleculares. Fonte: A autora (2021).

Através da tecnologia de microfabricação é possível integrar materiais semicondutores de alto desempenho, como o ITO, sobre plásticos flexíveis (MITSUBAYASHI et al., 2003; MCALPINE et al., 2007). Substratos maleáveis de politereftalato de etileno (PET), polietileno naftaleno, politetrafluoroetileno (Teflon), policarbonato, copolímero de olefina cíclica e Kapton® (filme de poliimida) também têm sido investigados como suportes flexíveis em biossensores. Entre as características dos suportes de PET para a elaboração de sistemas eletroquímicos, destacam-se o baixo custo, plasticidade inerente, flexibilidade, ultra-conformabilidade, hidrofobicidade, efeito isolante, peso leve, baixo coeficiente de expansão térmica, resiliência estrutural contra deformação, resistência ao choque, transparência e descartabilidade (MCALPINE et al., 2007; ECONOMOU; KOKKINOS; PRODROMIDIS, 2018). Ao contrário dos substratos baseados em papel, os polímeros flexíveis não absorvem

líquidos e permitem uma entrega mais precisa de amostras para biodetecção. Ademais, os suportes flexíveis apresentam integração funcional e versatilidade de uso através da associação, por exemplo, a circuitos eletrônicos, nanomateriais e dispositivos vestíveis ou têxteis (WANG et al., 2016; TRIPATHY et al., 2018) (Figura 12).

Figura 12 – Visão geral de dispositivos baseados em tecnologia de substratos flexíveis para o diagnóstico em pronto atendimento.



Fonte: adaptada de WANG et al., 2016.

Recentemente, dispositivos flexíveis baseados em ITO estão sendo desenvolvidos para o diagnóstico de diferentes doenças (KARABOĞA; ŞİMŞEK; SEZGINTÜRK, 2016; ATCHUDAN et al., 2019; AYDIN; AYDIN; SEZGINTÜRK, 2020). No entanto, biossensores eletroquímicos flexíveis para a pesquisa de HPV ainda são restritos. Recentemente, He et al. (2020) desenvolveram um biossensor fundamentado no princípio de amplificação por círculo rolante (processo de replicação unidirecional de ácidos nucleicos para a síntese rápida de múltiplas cópias de moléculas circulares de DNA ou RNA) em substrato de ITO (HE et al., 2020). O sistema proposto exibiu uma resposta linear para a

biodetecção dos oncogenes E6 e E7 do HPV16 em uma faixa de 10 pM a 0,1 fM com um limite de detecção de 18,6 aM. Entretanto, a metodologia de bioanálise utilizou um conjunto de sete sequências oligonucleotídicas (entre sondas e *primers*), nucleotídeos e enzimas, tais como DNA polimerase, DNA ligase e exonuclease, além do marcador eletroquímico azul de metileno. Salienta-se que a identificação eletroquímica de biomarcadores é perfeitamente adequada para sistemas flexíveis de biossensoriamento com reduzido consumo de materiais e baixo custo de produção. Em adição, estes dispositivos podem exibir instrumentação portátil, miniaturização e elevada sensibilidade (ECONOMOU et al., 2018).

3.3 MATERIAIS NANOTECNOLÓGICOS E FUNCIONAIS PARA APLICAÇÕES EM BIOSSENSORES

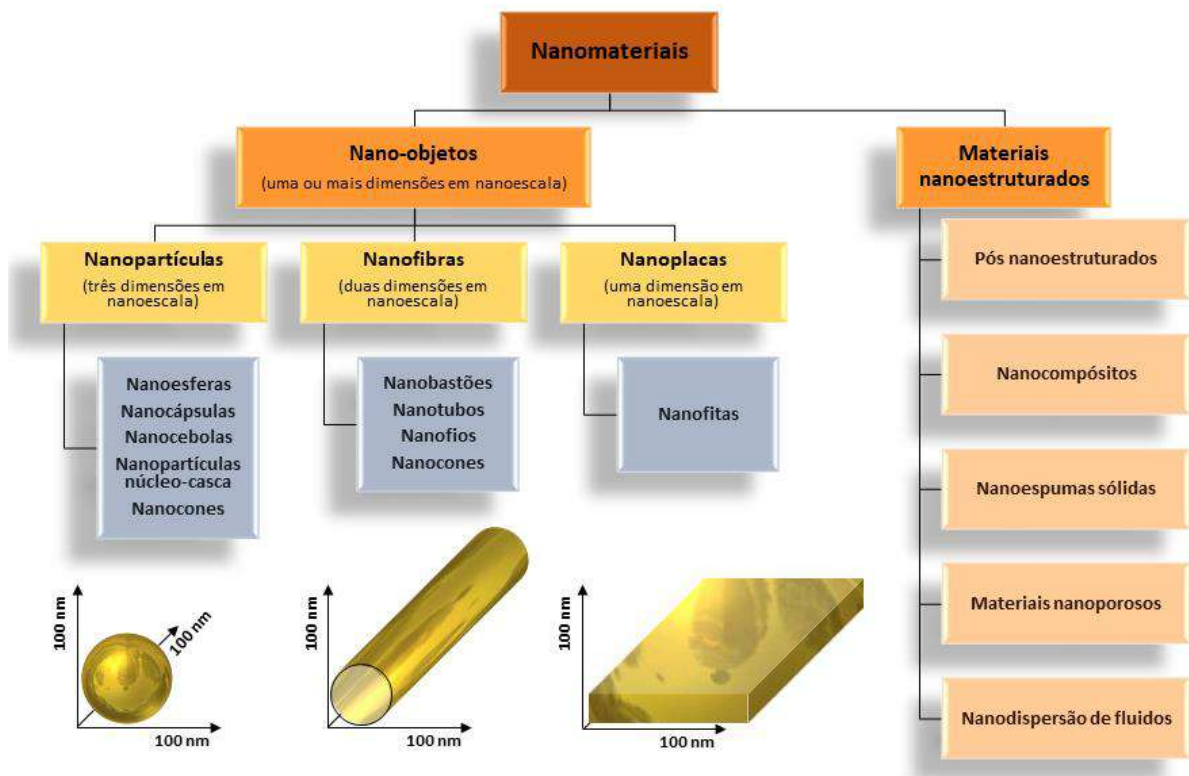
Pode-se considerar como marco inicial da nanociência, a palestra do físico americano Richard Feynman em 1959 intitulada de “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”, onde foi introduzido o conceito de manipulação e arranjo da matéria em escala atômica (HULLA; SAHU; HAYES, 2015). A partir das ideias expostas, a ciência dos nanomateriais tornou-se uma área científica em ascensão exponencial. Segundo a Organização Internacional de Padronização (do inglês, *International Organization for Standardization* – ISO), os nanomateriais possuem duas características definidoras: a) exibir ao menos uma dimensão em escala nanométrica (1 a 100 nm); e b) apresentar propriedades dependentes exclusivamente do tamanho, não observadas na matéria macroscópica (GUBALA et al., 2018).

Atualmente, numerosos tipos de nanomateriais foram sintetizados e aplicados à construção de ferramentas biotecnológicas (Figura 13). Citam-se:

- Nanopartículas: correspondem a nano-objetos com todas as três dimensões em nanoescala, onde os comprimentos dos eixos mais longos e mais curtos não diferem significativamente. Mencionam-se como exemplos de nanopartículas, as nanoesferas (estrutura interna sólida), nanocápsulas (estrutura interna oca), nanocebolas (estrutura concêntrica de múltiplas camadas), nanopartículas núcleo-casca e nanocones (nanopartículas ou nanofibras em forma de cone).
- Nanofibras: referem-se a nano-objetos com duas dimensões externas em nanoescala e a terceira dimensão expressivamente maior, não necessariamente em escala nanométrica.
- Nanobastões: considerados nanofibras sólidas.

- Nanotubos: considerados nanofibras ocas.
- Nanofios: considerados nanofibras condutoras de eletricidade.
- Nanoplacas: equivalem a nano-objetos com uma dimensão externa em nanoescala e as outras duas dimensões significativamente maiores.
- Nanocristais: relacionados a nano-objetos com estrutura cristalina.
- Materiais nanoestruturados: caracterizados por possuírem estruturas internas ou estruturas externas em nanoescala. Cinco categorias de materiais nanoestruturados são descritas, a saber, pó nanoestruturado, nanocompósito, nanoespuma sólida, material nanoporoso e nanodispersão de fluido. Em adição, os materiais nanoestruturados podem ser especificados, alternativamente, como nano-agregados (associação de nano-objetos, frequentemente sólidos, estabilizados por forças fortes) e nano-aglomerados (associação de nano-objetos, frequentemente sólidos, estabilizados por forças fracas) (ISO, 2011; ISO, 2015; GUBALA et al., 2018).

Figura 13 – Classificação dos nanomateriais segundo à Organização Internacional de Padronização.



Fonte: A autora (2021).

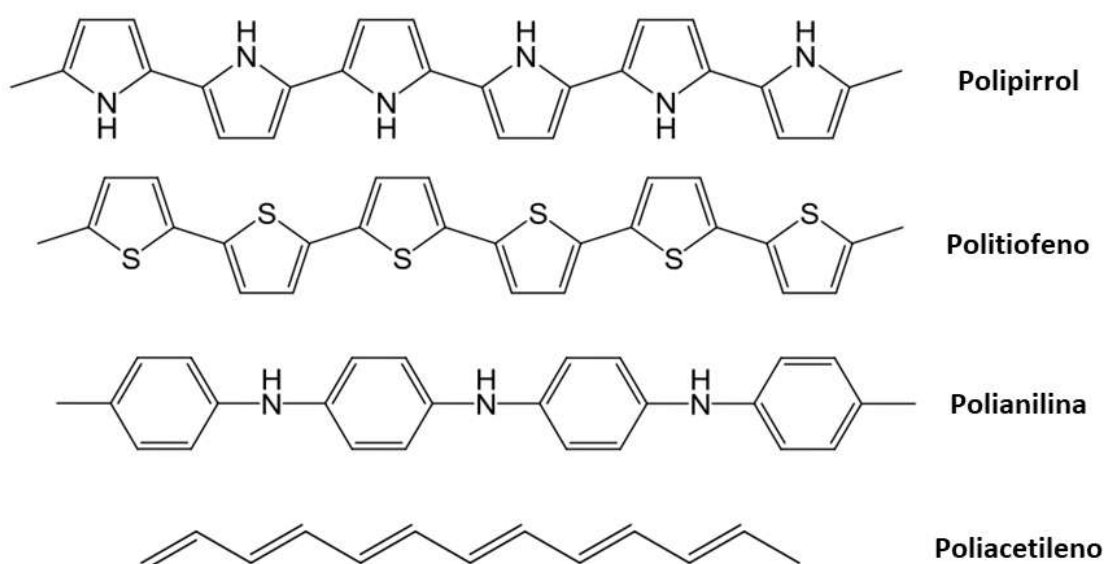
Os nanomateriais projetados com distintas composições, tamanhos e formas, habitualmente revelam propriedades emergentes e descontínuas. Estas características podem ser associadas à condutividade elétrica, magnetismo, luminescência, atividade catalítica, química de superfície, elevada área superficial, porosidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e estabilidade química (JIA; DONG; WANG, 2016; MANDAL et al., 2018). Em razão destas singularidades, nanomateriais têm sido largamente utilizados para a projeção de plataformas nanoestruturadas de biodeteção, as quais podem ser associadas a diferentes tipos de constituintes funcionais (moléculas ligantes, biomoléculas, biopolímeros e polímeros sintéticos). No desenvolvimento de biossensores, estas plataformas atuam como interfaces entre as moléculas de reconhecimento e as superfícies transdutoras, fornecendo alternativas inovadoras para modificação eletródica, amplificação do sinal analítico e aumento de sensibilidade dos dispositivos tecnológicos (SHETTI et al., 2019). Em adição, podem apresentar grupos químicos funcionais que direcionam a ancoragem de moléculas biorreceptoras (PEÑA-BAHAMONDE et al., 2018; YE; ZUO; FAN, 2018). Logo, em razão das características referenciadas e diversidade estrutural, um estudo minucioso deve ser realizado acerca das nanoestruturas e materiais funcionais que podem compor as plataformas nanométricas, a fim de assegurar a efetividade dos sistemas sensores (FRÍAS et al., 2015).

3.3.1 Polímeros intrinsecamente condutores: polianilina e polipirrol

Polímeros condutores, como por exemplo PANI, PPy, poliacetileno, politiofeno, poli-(p-fenileno) e poli-(fenileno vinileno), são considerados materiais funcionais para a nanoestruturação de plataformas sensoras, viabilizando novas possibilidades tecnológicas no design de biossensores (JAIN, R.; JADON, N.; PAWAIYA, 2017). Apesar destes policonjugados exibirem características mecânicas e processabilidade de polímeros convencionais, são capazes de assumir um caráter intrinsecamente condutor, sendo por isso, denominados metais sintéticos (MACDIARMID, 2001; KAUR et al., 2015). Em geral, ligações alternadas simples (σ) e duplas (π) estão presentes na cadeia polimérica principal, contribuindo para as propriedades físicas e químicas inerentes a estes materiais (Figura 14). O sistema conjugado σ - π favorece a mobilidade de carga ao longo da estrutura da molécula, cooperando para a redução do potencial de ionização, transição óptica de baixa energia (também chamada de transição interbandas, na qual ocorre transferência de elétrons da banda de valência para a banda de condução a partir da absorção de um fóton) e alta afinidade

eletrônica, o que por sua vez, oportunizam à condutividade nestes polímeros. Os polímeros condutores em suas formas neutras ou não dopadas podem ser materiais isolantes ou semicondutores. No entanto, através de processos de dopagem são transformados em portadores de carga deslocalizados, possibilitando o transporte elétrico e o aumento de condutividade em várias ordens de magnitude. Enfatiza-se que a dopagem corresponde a ampliação da capacidade de transporte de carga por meio da adição de elétrons na banda de condução (uso de agentes redutores, dopagem do tipo n) ou pela remoção de elétrons na banda de valência (uso de agentes oxidantes, dopagem do tipo p) (ATKINS; JONES; LAVERMAN, 2018; PRAJAPATI; KANDASUBRAMANIAN, 2019).

Figura 14 – Estruturas moleculares dos principais polímeros condutores.



Fonte: A autora (2021).

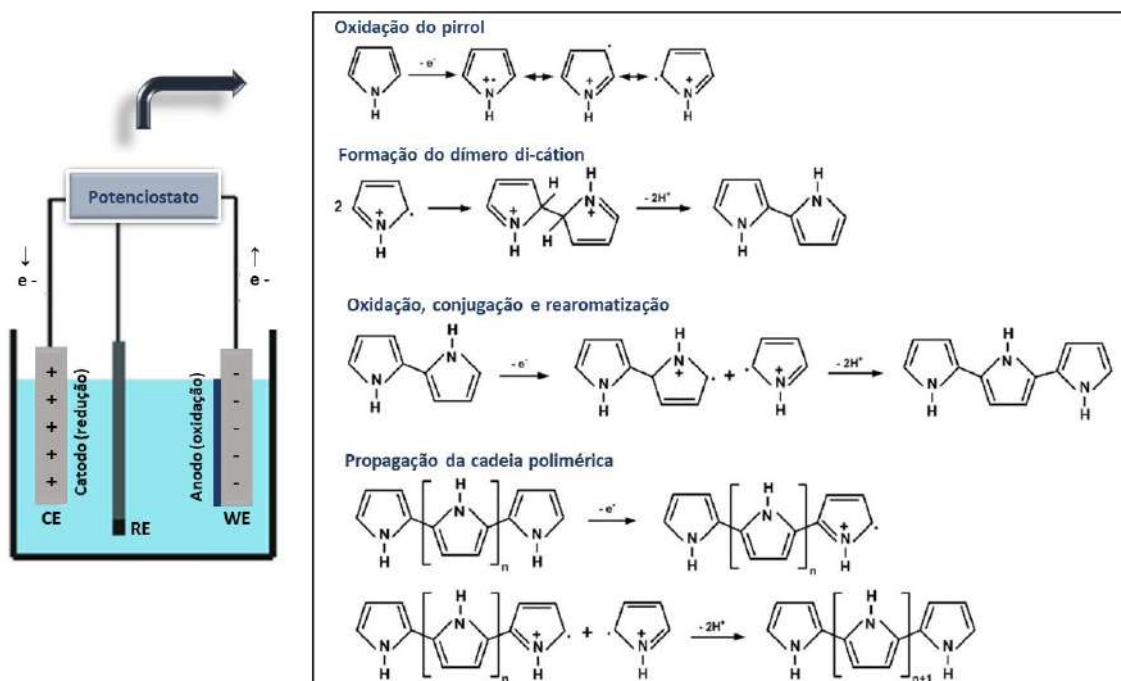
É perceptível que os elementos poliméricos ampliaram as estratégias de modificação superficial de eletrodos, propiciando o desenvolvimento de dispositivos ultrasensíveis com elevada seletividade, baixos limites de detecção e propriedades aprimoradas (TELES; FONSECA, 2008; ATES, 2013; SHOAIE et al., 2019). Exemplificam-se a elevada condutividade, alta cinética de transferência de elétrons na interface eletrodo/solução, capacidade de armazenamento de carga, reversibilidade redox, flexibilidade estrutural, relativa biocompatibilidade, estabilidade ambiental, baixo custo, fáceis protocolos sintéticos e presença de grupos químicos funcionais para ancoragem de biomoléculas (JAIN; JADON;

PAWAIYA, 2017; SHOAIE et al., 2019). Infere-se que estas características contribuem significativamente para a melhoria do desempenho analítico e robustez dos sistemas de biodeteção (WANG et al., 2015; SHRESTHA et al., 2017).

Entre os principais polímeros intrinsecamente condutores utilizados para a construção de aparatos eletroquímicos biotecnológicos, estão a PANI e PPy com condutividades elétricas próximas à 1×10^3 e 1×10^2 S.cm⁻¹, respectivamente (GERMAN, et al., 2019). O polímero PANI é caracterizado pelo arranjo de unidades monoméricas de anilina, um composto orgânico cuja estrutura molecular corresponde a um aminobenzeno de fórmula C₆H₇N (Figura 14). Já o polímero PPy é constituído por anéis heterocíclicos insaturados de quatro carbonos, C₄H₅N, denominados de pirrol (Figura 14). Estas substâncias macromoleculares frequentemente são sintetizadas através de métodos químicos e eletroquímicos. Entretanto, devido ao interesse crescente em biossensores miniaturizados, a rota de síntese eletroquímica destaca-se por suas singularidades (GVOZDENOVIC et al., 2014).

Por exemplo, para a eletropolimerização de PPy, o monômero pirrol disperso em solução eletrolítica é submetido a uma variação de potencial ou corrente em uma célula eletroquímica. Como consequência da polarização anódica e catódica, a unidade monomérica sofre oxidação, originando um radical cátion primário (SHOAIE et al., 2019). Este produto, reage com outro radical cátion primário, levando a formação de um dímero di-cátion. Este dímero di-cátion sofre estabilização molecular com reconstituição do sistema aromático através da perda de dois prótons. Subsequentemente, esta substância intermediária será oxidada e se conjugará com um radical cátion primário (gerando um trímero) ou com um outro dímero (gerando um tetrâmero). A reação de eletropolimerização prossegue com o acoplamento de cátions de monômeros e cátions de oligômeros até que o filme polimérico de PPy seja estruturado (Figura 15). Salienta-se que as propriedades físicas e químicas de materiais eletrossintetizados são influenciadas pelas condições de síntese, tais como a concentração do monômero, natureza do meio eletrolítico e temperatura (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002; MOGHADDAM et al., 2009; GERMAN et al., 2019).

Figura 15 – Mecanismo de síntese eletroquímica de polipirrol.



A imagem apresenta uma célula eletroquímica convencional composta pelo eletrodo de trabalho (WE), eletrodo de referência (RE) e contra eletrodo (CE). A oxidação do monômero pirrol e o crescimento da cadeia polimérica ocorre à nível do anodo, representado pelo eletrodo de trabalho. Fonte: adaptada de GVOZDENOVIC et al., 2014.

De maneira semelhante a síntese eletroquímica, ocorre a rota química. A principal diferença metodológica consiste no uso de agentes oxidantes em meio reacional para formação de radicais cátions primários. Entretanto, verifica-se que características como a microestrutura, defeitos moleculares, morfologia, homogeneidade e reticulação polimérica dependem das metodologias de síntese aplicadas (MAIA et al., 2000). Como vantagens específicas da síntese eletroquímica de PPy, acentuam-se a deposição direta do filme polimérico sobre a superfície eletródica, mediante a oxidação do monômero pirrol em potenciais relativamente baixos à temperatura ambiente (ATES, 2013). Ademais, esta estratégia de polimerização possibilita a obtenção de filmes poliméricos uniformes e reprodutíveis com espessura controlável através do número aplicado de ciclos de potenciais ou ciclos de corrente. O processo de dopagem é simples, com uma ampla diversidade de íons dopantes (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002; ATEH; NAVSARIA; VADGAMA, 2006).

Apesar dos polímeros intrinsecamente condutores serem notórios no campo de biossensores de DNA (KHODADADI et al., 2019; KHODER; KORRI-YOUSSEFI, 2020),

sua aplicação em dispositivos de detecção para papilomavírus é limitada. Em 2011, Tran et al. propôs um imunoarranjo eletroquímico livre de rótulos para a pesquisa de anticorpos anti-HPV16. A plataforma sensora foi obtida a partir de aptâmeros peptídicos imobilizados em eletrodos de platina interdigitados modificados com filmes eletrodepositados de polianilina e nanotubos de carbono de múltiplas paredes. Mediante mudanças na eletroatividade do polímero condutor, a formação dos complexos aptâmero peptídico/anticorpo anti-HPV16 foi analisada. Os ensaios exibiram sensibilidade de $1,75 \pm 0,2 \mu\text{A nM}^{-1}$ em uma faixa linear de resposta de 10 a 50 nM, com limite de detecção de 490 pM (Tran et al., 2011). Sob outra perspectiva, o estudo realizado por Li e Shi (2005), demonstrou que o PPy é um excelente material a ser usado como substrato para a eletrodeposição de AuNPs. Especificamente, os filmes orgânicos de PPy fornecem um substrato ideal para a síntese de partículas com dimensões nanométricas e baixo grau de agregação (LI; SHI, 2005). Diante do exposto, verifica-se que o uso de polímeros condutores e sua combinação com nanopartículas metálicas, através de deposição eletroquímica ou síntese de compósitos híbridos, é uma tática inovadora para a produção de biossensores funcionais com diversas aplicações clínicas.

3.3.2 Nanopartículas de ouro

Nanomateriais metálicos, tais como partículas de ouro, platina, prata, titânio, zinco e ferro, representam uma das principais classes de constituintes utilizados em plataformas de interfaceamento biológico (LUO et al., 2006). As AuNPs são elementos notáveis para a elaboração de biossensores nanoestruturados em razão de suas propriedades únicas dependentes do tamanho (KUMAR et al., 2015). As características pertinentes as AuNPs incluem a multiplicidade de formas e tamanhos controlada experimentalmente, elevada área de contato, elevada energia superficial, atividade catalítica, condutividade elétrica, efeito quântico, fluorescência, compatibilidade biológica, não toxicidade e elevado coeficiente de adsorção (GILJOHANN et al., 2010; ELAHI; KAMALI; BAGHERSAD, 2018).

Em sistemas eletroquímicos de bioanálise, as AuNPs podem intensificar a migração de elétrons entre o eletrodo de trabalho e as substâncias eletroativas, contribuindo para a amplificação do sinal analítico. Detalhadamente, a reação de óxido-redução gera transferência interfacial de elétrons, a qual é relativa à concentração da substância alvo. A mensuração direta da reação, sem a presença de nanomateriais e marcadores eletroquímicos, é difícil de alcançar em decorrência da limitada condutividade das biomoléculas imobilizadas no

transdutor. Como alternativa, as AuNPs podem ser utilizadas para melhoria do processo eletroquímico de transferência de carga e desenvolvimento de protocolos metodológicos livres de rótulos (PINGARRÓN; YANEZ-SEDENO; GONZÁLEZ-CORTÉS, 2008; KUMAR et al., 2015). Todavia, em alguns ensaios de diagnóstico, as AuNPs não constituem as plataformas sensoras nanoestruturadas, mas sim, atuam como indicadores eletroquímicos de biodeteção baseados na reação redox entre o Au^{3+} e Au^0 (JIANG et al., 2018).

Além disso, a elevada área de superfície e a facilidade de conjugação com biomoléculas e compostos de interesse tornam as AuNPs matrizes efetivas para ancoragem molecular. Especificamente, estas nanoestruturas contribuem para o acréscimo da área de detecção através do aumento da quantidade de moléculas de biorreconhecimento imobilizadas, favorecendo assim, o aperfeiçoamento da sensibilidade de sistemas sensores. Nota-se que as dimensões das AuNPs podem ser comparáveis ao tamanho de enzimas, imunoglobulinas e fragmentos de DNA, conferindo uma compatibilidade estrutural entre estas categorias de materiais (ALDEWACHI et al., 2018). Ressalta-se também que as AuNPs apresentam atividade catalítica extraordinária ao reduzir o sobrepotencial e aumentar a velocidade de reações eletroquímicas. Como consequência, pode-se inferir que esta capacidade de catálise contribui adicionalmente para o aumento da sensibilidade de ferramentas de diagnóstico (JIANG et al., 2018). Portanto, diante das descrições verifica-se que as nanoestruturas de ouro são materiais de escolha para o desenvolvimento de dispositivos de sensoriamento com elevada estabilidade e performance analítica (RASHEED; SANDHYARANI, 2017; JIANG et al., 2018).

3.3.3 Métodos de síntese de nanopartículas de ouro

Além das propriedades apreciáveis citadas anteriormente, os nanomateriais de ouro exibem facilidade de síntese, possibilitando a produção efetiva de instrumentos de biodeteção. Em linhas gerais, os nanomateriais podem ser obtidos por meio de duas estratégias metodológicas distintas, denominadas de *top-down* e *bottom-up*. Os métodos *top-down* fundamentam-se na síntese de nanomateriais por intermédio de estruturas originalmente maiores (material *bulk*). No entanto, técnicas com resoluções limitadas e restrições físicas, tais como abrasão por laser, *sputtering* a vácuo, pulverização catódica, impressão de microcontato e litografia de nanoimpressão, exibem obstáculos para a produção eficaz e economicamente viável de nanoestruturas através de métodos *top-down* (WANG et al., 2016). Nos métodos

bottom-up, materiais são produzidos mediante a auto-organização de componentes em escala atômica (SANTHOSHKUMAR; RAJESHKUMAR; KUMAR, 2017; OLIVEIRA et al., 2020). Nesta abordagem, explora-se as interações físico-químicas e a automontagem de moléculas e blocos de construção em nanoescala. Nota-se que os métodos *bottom-up* correspondem as estratégias predominantes para a projeção de biossensores nanoestruturados devido a possibilidade de síntese de materiais nanométricos hierárquicos e ordenados (WANG et al., 2016).

Os métodos convencionais *bottom-up* usados para a síntese de AuNPs têm como princípio a redução de precursores de ouro metálico, como o ácido tetracloroáurico, HAuCl_4 (fonte de íons Au^{3+}). Para o processamento da reação $\text{Au}^{3+} \rightarrow \text{Au}^0$ e obtenção de átomos de ouro reduzidos (Au^0), são utilizados agentes químicos doadores de elétrons, como por exemplo, o citrato de sódio, borohidreto de sódio, ascorbato de sódio, ácido ascórbico e hidroquinona. A formação preliminar de AuNPs ocorre através da associação de átomos, caracterizada pela geração de núcleos metálicos estáveis. Em um processo adicional a etapa de nucleação, as nanopartículas aumentam em tamanho através de vias diferentes, como a coalescência e adição atômica. Nesta fase, há depósito de materiais sobre a partícula, contribuindo para o acréscimo de volume (SENGANI, M.; GRUMEZESCU, A. M.; RAJESWARI, 2017; OLIVEIRA et al., 2020). Com a finalidade de minimizar a agregação molecular e contribuir para a termodinâmica estável do sistema coloidal, frequentemente são usados agentes estabilizadores, como surfactantes, polímeros solúveis e substâncias modificadoras de superfície. Os agentes estabilizadores, também denominados elementos passivadores, formam uma monocamada molecular sobre a superfície das nanopartículas, impedindo o contato entre elas por meio de forças eletrostáticas ou impedimento estérico. Em adição, enfatiza-se que as substâncias estabilizadoras podem contribuir para a funcionalização química das AuNPs, permitindo a ancoragem de variáveis biomoléculas, como peptídeos, proteínas, anticorpos, enzimas e ácidos nucleicos (SLEPIČKA et al., 2020; XIAO et al., 2020).

Abordagens usais para a preparação de biossensores baseados em AuNPs frequentemente envolvem a conjugação de nanopartículas pré-formadas sobre a superfície de transdutores. Entretanto, a formação direta de nanopartículas metálicas sobre áreas eletródicas por meio de métodos eletroquímicos vem destacando-se notavelmente (LI; LU; KAN, 2017; SHARIATI et al., 2019; ELEWI; WADOOD; SAMMARRAIE, 2020). As técnicas de eletrossíntese fundamentam-se na aplicação de potenciais fixos, potenciais cíclicos de

varredura ou correntes fixas. Como resultado comum, os íons de Au^{3+} em solução são reduzidos no eletrodo atuando como cátodo (polo positivo), o qual recebe o fluxo de elétrons provenientes do ânodo (polo negativo, local que se processa a oxidação) (XIAO et al., 2020). Destaca-se que o tamanho, morfologia e densidade de partículas sobre áreas eletroativas podem ser controlados através de parâmetros e condições experimentais. Por exemplo, tempo de eletrossíntese, densidade de corrente, composição da solução, material do eletrodo, temperatura e concentração de surfactante. Foi proposto que protocolos metodológicos baseados em potenciais cíclicos de varredura possibilitam um melhor controle sobre o processo de nucleação e crescimento de nanopartículas (STINE, 2019). Consequentemente, obtém-se uma deposição espaçada e uniforme de AuNPs sobre substratos sólidos. Em adição, os limites de potencial, taxa de varredura e número de ciclos de eletrodeposição podem ser ajustados de acordo com o objetivo científico (STINE, 2019). Diante do exposto, verifica-se que métodos eletroquímicos para manufatura de nanopartículas têm propiciado o desenvolvimento de plataformas nanoestruturadas com elevado grau de recobrimento, reprodutibilidade de resposta e rapidez de montagem (CHIANG et al., 2019; ZHOU et al., 2020).

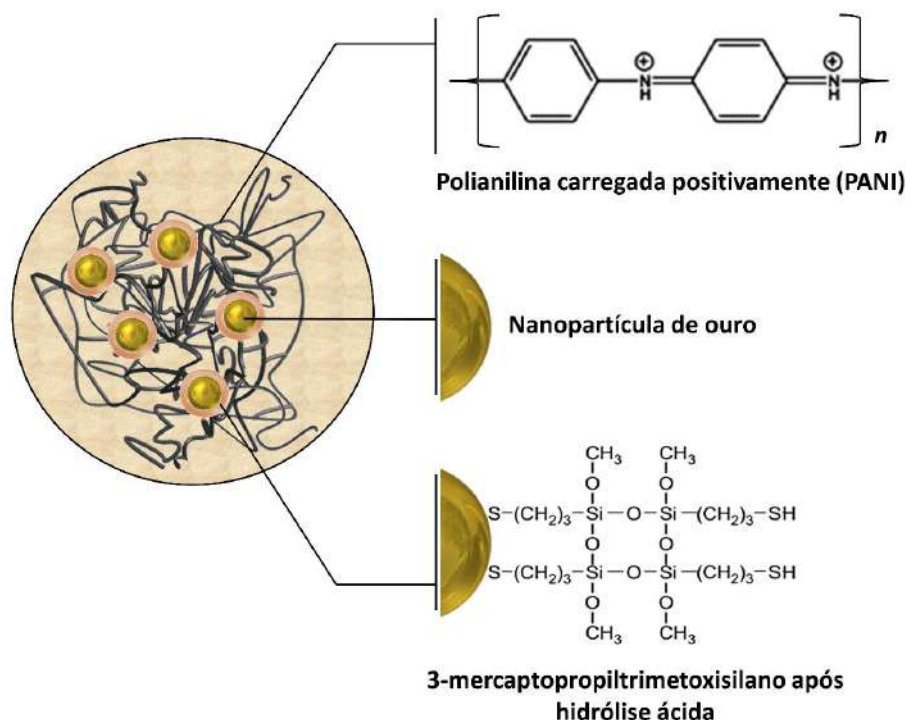
Partindo do princípio da aplicação tecnológica de nanoestruturas eletrodepositadas, Shariati et al. (2019) desenvolveram um biossensor livre de rótulos para a detecção impedimétrica do genoma de HPV16. O sistema proposto foi arquitetado a partir da deposição eletroquímica de nanotubos de ouro sobre uma superfície de nanoporos de policarbonato. Por meio da imobilização de sondas de DNA tioladas, o dispositivo bioanalítico foi capaz de identificar o alvo biológico em uma faixa de linearidade de 0,01 pM a 1 μM com um limite de detecção de 1 fM (SHARIATI et al., 2019). Em adição, Jampasa et al. elaboraram uma plataforma sensora para a detecção simultânea de genótipos de HPV16 e 18 a partir da ancoragem química de sondas de ácido nucleico peptídico pirrolidinil. A modificação do eletrodo impresso de carbono foi realizada por eletrodeposição de AuNPs e quimissorção de Cys. O uso do repórter eletroquímico antraquinona possibilitou a pesquisa dos papilomavírus em concentrações de 0,5 a 100 nM com limites de detecção de 150 pM e 153 pM para os genótipos de HPV16 e 18, respectivamente (JAMPASA et al., 2018). Deste modo, observa-se o potencial de aplicação de métodos eletroquímicos de síntese para a concepção de biossensores inovativos à base de AuNPs.

3.3.4 Nanocompósito híbrido de ouro e polianilina

Objetivando combinar as notáveis propriedades das nanoestruturas de ouro com outros elementos funcionais de interesse, nanocompósitos têm sido sintetizados e largamente utilizados para a idealização de aparatos eletroquímicos de diagnóstico biomédico (RASHEED; SANDHYARANI, 2017; ANIK et al., 2018; MAHMOODI et al., 2020). Por definição, o termo nanocompósito refere-se a uma mistura de dois ou mais materiais separados por fase, sendo uma ou mais fases em escala nanométrica (ISO, 2020). Estes materiais nanoestruturados exibem características únicas e sinérgicas de seus constituintes e versatilidade de composição. Inúmeros nanocompósitos baseados em ouro foram desenvolvidos para aplicações eletroquímicas, tais como nanocompósitos de ouro e nanotubos de carbono, nanocompósitos de ouro e óxido de grafeno ou grafeno, nanocompósitos de ouro e óxidos metálicos, nanocompósito de ouro e biopolímeros e nanocompósitos de ouro e polímeros intrinsecamente condutores (XIAO et al., 2020).

Dentre estes nanocompósitos, a conjugação de nanoestruturas de ouro em matrizes poliméricas condutoras é evidenciada por apresentar características aprimoradas para o biossensoriamento (SHRIVASTAVA; JADON; JAIN, 2016; SHOAIE et al., 2019). Mencionam-se o tamanho, estabilidade e distribuição ajustável das nanopartículas dispersas, alta afinidade eletrônica, qualidades ópticas, eletroquímicas e mecânicas distintas, elevada área de contato e facilidade de biofuncionalização (NASERI; FOTOUHI; EHSANI, 2018; ZAFERANI, 2018). Em especial, ressalta-se o nanocompósito híbrido de AuNPs e PANI por possibilitar o desenvolvimento de plataformas de detecção com alto desempenho analítico (Figura 16). O uso deste material nanoestruturado tem possibilitado a obtenção de dispositivos de DNA robustos e reprodutíveis com limites de detecção na ordem de femtomolar (LIU et al., 2014; SHOAIE; FOROUZANDEH; OMIDFAR, 2018) e atomolar (AVELINO et al., 2016). Portanto, o emprego de nanocompósitos de ouro e polímeros intrinsecamente condutores em sistemas biomoleculares é uma estratégia atraente capaz de proporcionar propriedades notórias a biossensores eletroquímicos.

Figura 16 – Representação do compósito híbrido de nanopartículas de ouro e polianilina.



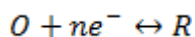
Durante a síntese do compósito híbrido de AuNPs e PANI, substâncias químicas adicionais podem ser utilizadas, como o mercaptopropiltrimetoxissilano, capaz de fornecer grupos sulfidrilas para a adsorção química do nanocompósito em superfícies de ouro, além de evitar a agregação das nanopartículas metálicas no interior da matriz polimérica. Fonte: adaptada de Avelino et al., 2020.

3.4 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

3.4.1 Voltametria cíclica

A VC é uma das principais ferramentas utilizadas para a compreensão dos processos eletroquímicos interfaciais. Esta técnica destaca-se por sua eficiência em proporcionar informações sobre a cinética de transferência de carga, reversibilidade de reações eletroquímicas e potenciais redox de substâncias eletroativas (ENENGL, 2017; JARA-PALACIOS, 2017). Na pesquisa de biossensores, a VC é considerada uma técnica de ampla funcionalidade, podendo ser utilizada diretamente para construção de dispositivos tecnológicos de bioanálise, por exemplo, através dos métodos de eletropolimerização e eletrodeposição (NIA et al., 2015; KISS et al., 2016). Além disso, possibilita a caracterização de fenômenos físico-químicos associados à imobilização de moléculas sobre substratos transdutores e ao processo de biorreconhecimento a nível molecular (ZOUARI et al., 2020).

A VC baseia-se nos eventos eletroquímicos que ocorrem na interface entre o eletrodo de trabalho e a camada adjacente de solução eletrolítica. Os sinais de corrente mensurados pela voltametria estão associados às espécies eletroquímicas que realizam reações de oxirredução (Equação 1) (PACHECO et al., 2013). Como resultado, estas reações fornecem elétrons para a passagem da corrente elétrica. No entanto, diversos fatores podem alterar a magnitude deste fluxo de carga, como o consumo ou a geração de espécies eletroquímicas e a presença de substâncias e nanoestruturas adsorvidas no eletrodo de trabalho, interferindo assim, na condutividade do sistema (RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010; DAUBINGER et al., 2014). Logo, discriminando os principais fatores que influenciam na intensidade de corrente, informações específicas sobre o analito podem ser obtidas por meio de variações nas respostas voltamétricas (SEMENOVA et al., 2018; PARMIN et al., 2019).



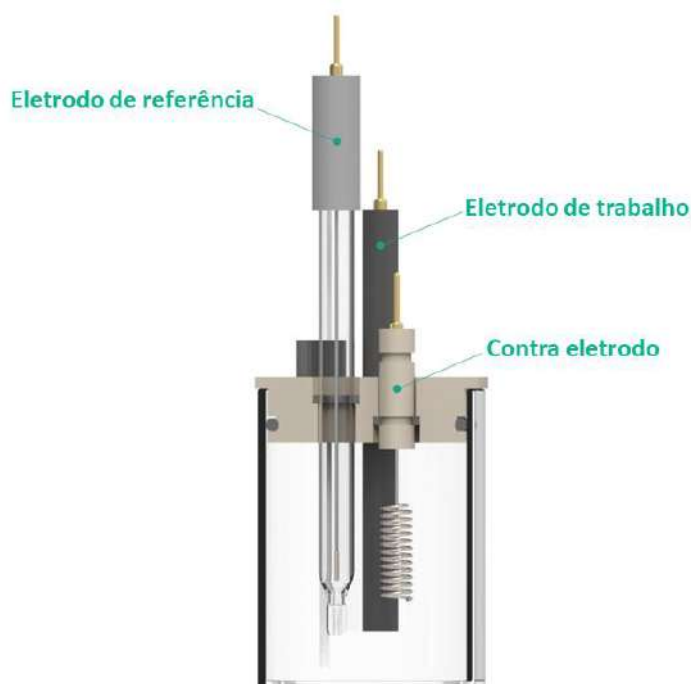
Equação 1

Onde *O* é a forma oxidada da espécie eletroativa, *R*, a forma reduzida e ne^- corresponde ao número de elétrons envolvido no processo de oxirredução.

Os experimentos voltamétricos são realizados em uma célula eletroquímica composta por três eletrodos: eletrodo de trabalho, eletrodo auxiliar (também denominado de contra eletrodo) e eletrodo de referência (Figura 17). A corrente gerada no sistema é mensurada entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar, enquanto diferentes potenciais são aplicados entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. Logo, o parâmetro ajustado é o potencial (*E*) e o parâmetro medido é a corrente resultante (*i*) (GRIESHABER et al., 2008). Por fim, os resultados de VC são representados graficamente por voltamogramas cíclicos (corrente vs potencial).

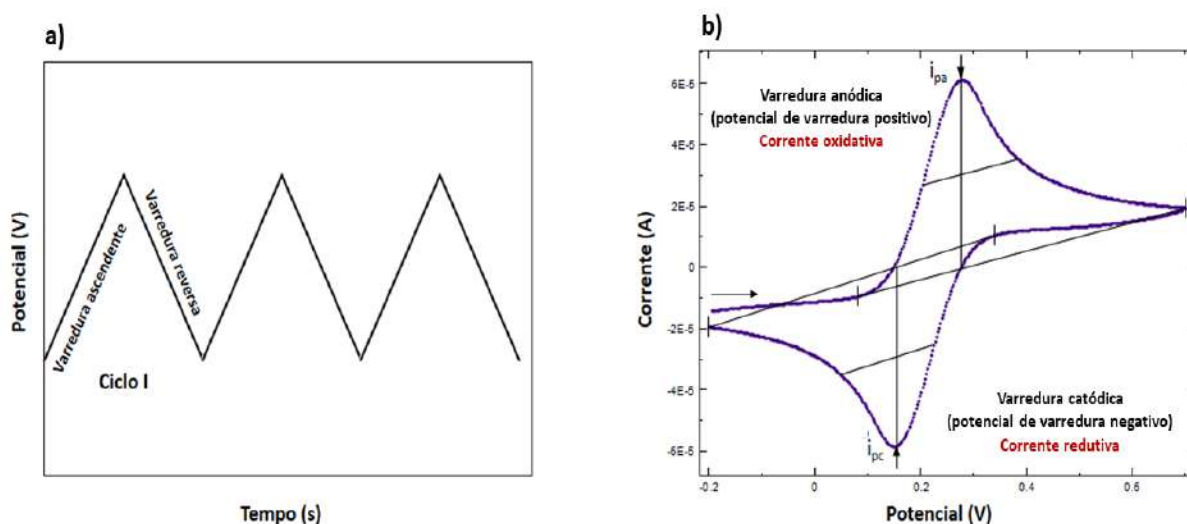
O que diferencia a VC das outras técnicas voltamétricas (como a voltametria de varredura linear, voltametria de pulso reverso, voltametria de pulso diferencial, voltametria de pulso normal, voltametria de redissolução e voltametria de onda quadrada) é a maneira como o potencial é aplicado ao sistema (GUPTA, 2011). Na VC, o potencial é varrido linearmente na forma de uma onda triangular em função do tempo (Figura 18a). A depender da finalidade do estudo eletroquímico, pode-se realizar ciclos simples ou ciclos múltiplos (PACHECO et al., 2013).

Figura 17 – Representação esquemática de uma célula eletroquímica de compartimento único composta por três eletrodos: eletrodo de trabalho, eletrodo de auxiliar e eletrodo de referência.



Fonte: adaptada de <https://redox.me/products/bec-50-ml-basic-electrochemical-cell>.

Figura 18 – Exemplo de aplicação de um potencial em forma triangular (a) para geração de um voltamograma cíclico (b).



Fonte: A autora (2021).

A diferença de potencial existente entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência atua como uma força motriz para a reação eletroquímica. Inicialmente o potencial é varrido

linearmente ao longo do tempo, resultando em uma espécie química que sofre oxidação ou redução quando o potencial atingir um valor suficientemente negativo ou positivo na superfície do eletrodo de trabalho, gerando uma corrente elétrica. Esta corrente é medida durante a varredura de potencial para mensurar a quantidade de espécies químicas que estão passando por um processo redox na unidade de tempo. Para uma reação de oxidação, como o potencial do eletrodo é varrido em uma direção positiva, a oxidação das espécies redox ocorre na interface eletrodo/solução, resultando em uma corrente oxidativa (ou anódica). Como o potencial continua a aumentar, a oxidação se torna mais termodinamicamente favorável e a corrente aumenta consequentemente. Entretanto, quando o processo de oxidação se torna limitado pela difusão das espécies eletroativas para a superfície do eletrodo, há formação de uma cauda difusional caracterizada por um decréscimo de corrente. A varredura de potencial do eletrodo é então revertida e varrida na direção oposta até que o potencial inicial seja alcançado. Para um processo de transferência de elétrons quimicamente reversível, a redução das espécies geradas eletroquimicamente resulta em uma corrente catódica (redutiva), levando ao voltamograma exibido na Figura 18b. Variando a taxa na qual o potencial é varrido e monitorando as diferenças na resposta de corrente, parâmetros cinéticos valiosos podem ser obtidos, tais como a corrente de pico anódica (*ipa*) e corrente de pico catódica (*ipc*) (SANDFORD et al., 2019).

Diante das informações descritas, verifica-se que o potencial exerce uma influência direta sobre o estado de oxirredução das espécies eletroativas próximas à superfície do eletrodo. À medida em que o potencial adquire um valor mais positivo, a oxidação das espécies é favorecida. Em oposição, em potenciais mais negativos, o eletrodo torna-se uma fonte de elétrons, favorecendo a redução das espécies químicas. Por esta razão, quando se faz uma varredura de potencial no sentido positivo usa-se a denominação de varredura anódica, enquanto que uma varredura de potencial no sentido negativo é chamada de varredura catódica (ELGRISHI et al., 2018).

Através de inúmeros trabalhos descritos na literatura, constata-se que a VC é uma técnica substancial para a eletroanálise de sistemas biológicos (MAHMOODI et al., 2020; NIE et al., 2020). Por exemplo, um microssistema portátil com 98 biossensores integrados foi projetado por Urrego et al. (2015) para a detecção de HPV16. Os biossensores consistem em anticorpos monoclonais imobilizados sobre substrato de polimetilmetacrilato previamente modificado com nanocamada de ouro e 4-aminotiofenol. A caracterização voltamétrica, em uma faixa de potencial de -0,2 a 0,6 V e velocidade de varredura de 100 mV/s, demonstrou

que o microssistema é eficaz para identificação do HPV16 em amostras clínicas (URREGO et al., 2015). Sob outra aplicabilidade, Mahmoodi et al. (2020) descreveu o uso do método de VC para a eletrodeposição conjunta de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e óxido de grafeno reduzido sobre eletrodo de carbono serigrafado. Dez ciclos voltamétricos com faixa de potencial de -1,0 a 0 V e velocidade de varredura de 50 mV/s foram realizados para a eletrodeposição do nanocompósito. A referida modificação eletródica foi utilizada para a construção de um biossensor de DNA eletroquímico capaz de reconhecer o genótipo de HPV18 a um limite de detecção de 0,05 fM e faixa linear de resposta entre 0,01 nM a 0,01 fM (MAHMOODI et al., 2020). Portanto, verifica-se a potencialidade da técnica de VC para a construção e caracterização de dispositivos tecnológicos de biodetecção.

3.4.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A EIE é uma valiosa técnica para a investigação de superfícies modificadas e monitoramento de processos interfaciais (KHAN et al., 2020; NIE et al., 2020). Este método é capaz de fornecer um grande número de informações sobre as propriedades físico-químicas de sistemas em análise. Inúmeras são suas aplicações, como por exemplo, estudos de reações eletroquímicas, soluções iônicas, semicondutores, materiais dielétricos, biossensores, baterias, processos corrosivos e mecanística (TURK; WALTERS; ROY, 2017; ZHANG et al., 2017).

A EIE fundamenta-se na aplicação de um estímulo elétrico a um sistema de eletrodos dispostos em uma célula eletroquímica e a observação da resposta resultante. Este estímulo frequentemente é um potencial contínuo de pequena amplitude na forma senoidal. Através da aplicação de um potencial de valor reduzido, o sistema sofrerá uma perturbação mínima, o que torna possível a investigação de fenômenos próximos ao estado de equilíbrio (DAMOS; MENDES; KUBOTA, 2004). No mesmo sistema de eletrodos é sobreposto um sinal alternado na forma de diferentes valores de frequência (MACDONALD, 1990; MACDONALD, 1992; BOTT, 2001). Consequentemente, uma corrente alternada de natureza senoidal é gerada na célula eletroquímica (SUNI, 2008). Mediante a monitorização das relações entre o potencial aplicado e a corrente resultante, a impedância do sistema é calculada. A partir de análises de EIE é possível avaliar a taxa de transferência de carga, condutividade de materiais, capacitância da dupla camada elétrica e cinética de eletrodos (MUÑOZ; MONTES; BAEZA, 2017).

A impedância é definida como a capacidade de um elemento do circuito elétrico em resistir ao fluxo de corrente, sendo expressa na mesma unidade de resistência (Ω). Logo, a impedância de um circuito elétrico é originalmente composta por três componentes: componente resistiva (ou simplesmente resistência), componente capacitiva (capacitância) e componente indutiva (indutância). A componente resistiva está associada a um elemento resistor responsável pela perda de energia elétrica na forma de calor. A componente capacitiva é originária de um elemento capacitor que armazena carga (energia eletrostática) em uma região específica do sistema, dificultando a passagem da corrente elétrica. A componente indutiva, resultante de um elemento indutor, é responsável pelo acúmulo de energia em um campo magnético (MUÑOZ; MONTES; BAEZA, 2017). A impedância (Z) é calculada como uma razão entre a voltagem e a corrente, ambas em função do tempo e levando em consideração as diferentes frequências de excitação (frequências angulares) (Equação 2) (KATZ; WILLNER, 2003; LISDAT; SCHÄFER, 2008).

$$Z = \frac{V(t)}{i(t)}$$

Equação 2

Os valores de impedância correspondem a números complexos compostos por uma componente real (Z') e uma componente imaginária ($-Z''$), estando relacionadas, respectivamente, à resistência e a capacitância do circuito elétrico (MACDONALD, 1990; SUNI, 2008; KATZ; WILLNER, 2003). Estes valores correlacionam-se de acordo com as equações 3 e 4 descritas abaixo.

$$Z' = R_s + \frac{R_{CT}}{1 + \omega^2 C_{dl}^2 R_{CT}^2}$$

Equação 3

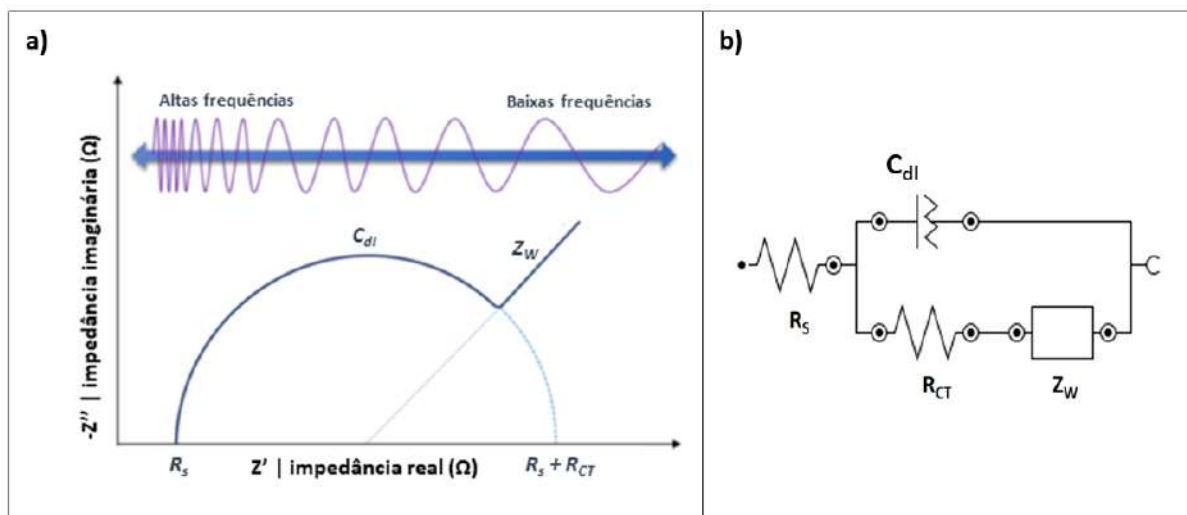
$$-Z'' = \frac{\omega C_{dl} R_{CT}^2}{1 + \omega^2 C_{dl}^2 R_{CT}^2}$$

Equação 4

Onde, R_s - resistência da solução, R_{CT} - resistência à transferência de carga, ω - frequência angular e C_{dl} - capacitância da dupla camada elétrica (BARD et al., 2001).

A representação gráfica frequentemente utilizada na literatura para o estudo da cinética de transferência de elétrons são os diagramas de Nyquist, ao permitirem uma fácil previsão de elementos do circuito. Nestes diagramas, também denominados de semicírculos de Cole-Cole, a componente real da impedância é plotada contra sua componente imaginária (Figura 19a). No diagrama de Nyquist, cada ponto representa a impedância total do sistema em uma dada frequência. Em regiões de frequências mais altas forma-se um semicírculo que caracteriza os processos limitantes de transferência de carga, como a R_s e R_{CT} . Em regiões de frequências mais baixas observa-se uma linha reta que correlaciona-se com o processo difusional na dupla camada elétrica. Em processos muito rápidos de transferência de elétrons, o espectro de impedância inclui apenas a parte linear. Em contrapartida, os processos muito lentos de transferência de elétrons são caracterizados por uma grande região semicircular, na qual o diâmetro do semicírculo é igual à resistência à transferência de elétrons (BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2016; MUÑOZ; MONTES; BAEZA, 2017).

Figura 19 – Esquema geral de um gráfico de Nyquist (a) cujos valores teóricos podem ser simulados por meio de um circuito equivalente de Randles (b).



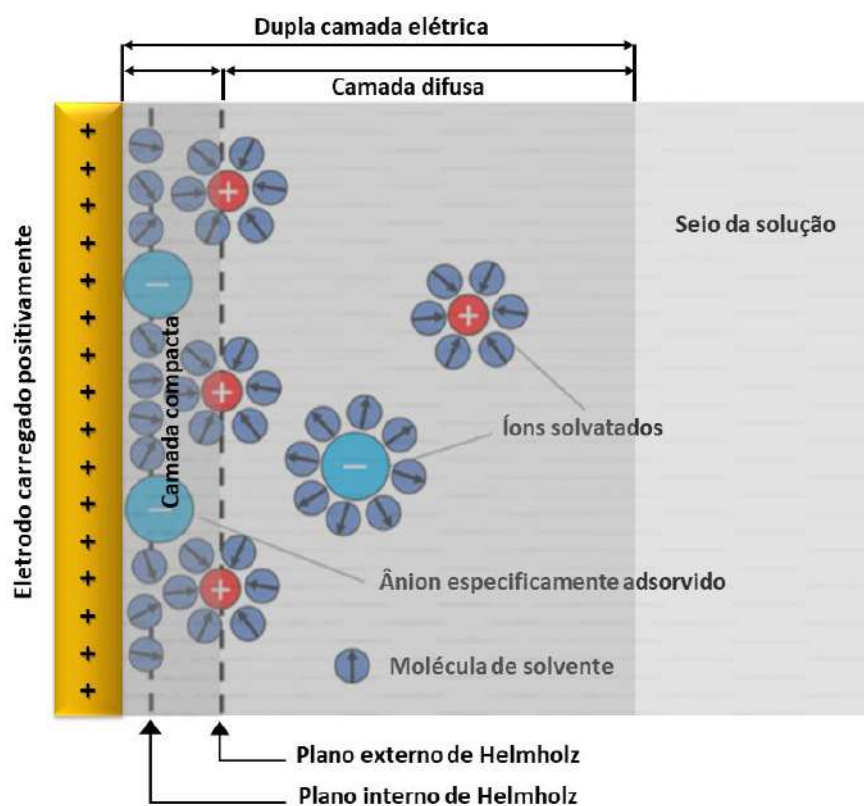
Um gráfico de Nyquist emerge da plotagem dos componentes imaginários (capacitivos) contra componentes reais (resistivos) de impedância. As características mais relevantes são: resistência da solução (R_s); resistência à transferência de carga (R_{CT}); capacitância de camada dupla (C_{dl}); e a impedância de Warburg (Z_W). Circuito equivalente de Randles representando um circuito elétrico. Fonte: adaptada de LEVA-BUENO; PEYMAN; MILLNER, 2020.

Em estudos de espectroscopia de impedância, informações adicionais podem ser determinadas através do uso de circuitos elétricos ou modelos matemáticos. Em razão dos

sistemas eletroquímicos apresentarem constituintes similares a capacitores, resistores e indutores elétricos, os circuitos equivalentes podem ser utilizados para a simulação teórica dos dados experimentais e interpretação dos espectros de impedância (Figura 19b). Um dos circuitos equivalentes mais utilizados em estudos de biossensores é o circuito de Randles (Figura 19b). Através da aplicação deste circuito é possível analisar alguns elementos que estão associados aos processos físico-químicos que ocorrem na dupla camada elétrica. O circuito de Randles é constituído por: R_s , resistência da solução eletrolítica proporcionada pela concentração de íons e a geometria da célula; R_{CT} , resistência à transferência de carga, associada aos processos de modificação na superfície do transdutor que influenciam a passagem de elétrons na interface eletrodo/solução; Z_w , impedância de Warburg, que representa a impedância de difusão iônica associada a resistência à transferência de massa do sistema eletroquímico; e C_{dl} , capacitância da dupla camada resultante da distribuição de cargas na interface eletrodo/solução (LISDAT; SCHÄFER, 2008; LEVA-BUENO, J.; PEYMAN, S. A.; MILLNER, 2020).

Conforme apresentado na Figura 20, a interface eletrodo/solução possui um desempenho similar a um capacitor de placas paralelas devido à distribuição de íons na dupla camada elétrica (TONG et al., 2017). Em decorrência do potencial aplicado, o eletrodo de trabalho adquire uma carga positiva ou negativa, a qual direciona a organização interfacial dos eletrólitos em meio líquido. De acordo com o modelo de Gouy-Chapman-Stern, a dupla camada elétrica é composta por duas regiões de ordenação de íons, a camada compacta (também chamada de camada de Stern) e a camada difusa. Na camada compacta, sobre a superfície metálica carregada eletricamente, há íons de carga oposta (contra-íons) fortemente adsorvidos, delimitando o plano interno de Helmholtz, e íons não especificamente adsorvidos, caracterizando o plano externo de Helmholtz. A partir deste plano inicia-se a camada difusa, caracterizada pela presença de contra-íons e co-íons (íons com a mesma carga da superfície do eletrodo), cuja distribuição e concentração são igualmente afetadas pelo potencial eletródico. No seio da solução encontram-se os íons livres que são responsáveis pela condutividade iônica (ZHANG; ZHAO, 2009).

Figura 20 – Esquema da distribuição de íons na dupla camada elétrica.



Fonte: adaptada de TONG et al., 2017.

No desenvolvimento de ensaios bioeletroquímicos, a EIE possui destaque inestimável. Esta técnica analítica possibilita a mensuração de propriedades físico-químicas com elevada sensibilidade, viabilizando a caracterização de sensores biológicos e a compressão de fenômenos interfaciais, como processos de reconhecimento a nível molecular (BERTOK et al., 2019; KHAN et al., 2020). Por estas razões, Huang et al. (2015) desenvolveram um biossensor impedimétrico baseado em eletrodo de carbono vítreo modificado com grafeno, nanobastões de ouro e politionina para a pesquisa de HPV16 em amostras do soro humano. Diagramas de Nyquist foram obtidos para cada etapa de montagem da plataforma nanoestruturada, através da aplicação de um potencial de perturbação de 0,1 V em uma faixa de frequência de 0,1 Hz a 0,1 MHz. Assim, as características eletroquímicas de cada material foram analisadas. Após a realização de testes de bioatividade, mediante o uso de uma sonda oligonucleotídica de captura, duas sondas auxiliares e um marcador eletroquímico ($[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$), foi possível estimar um limite de detecção de 40,5 fM para o genoma alvo (HUANG et al., 2015).

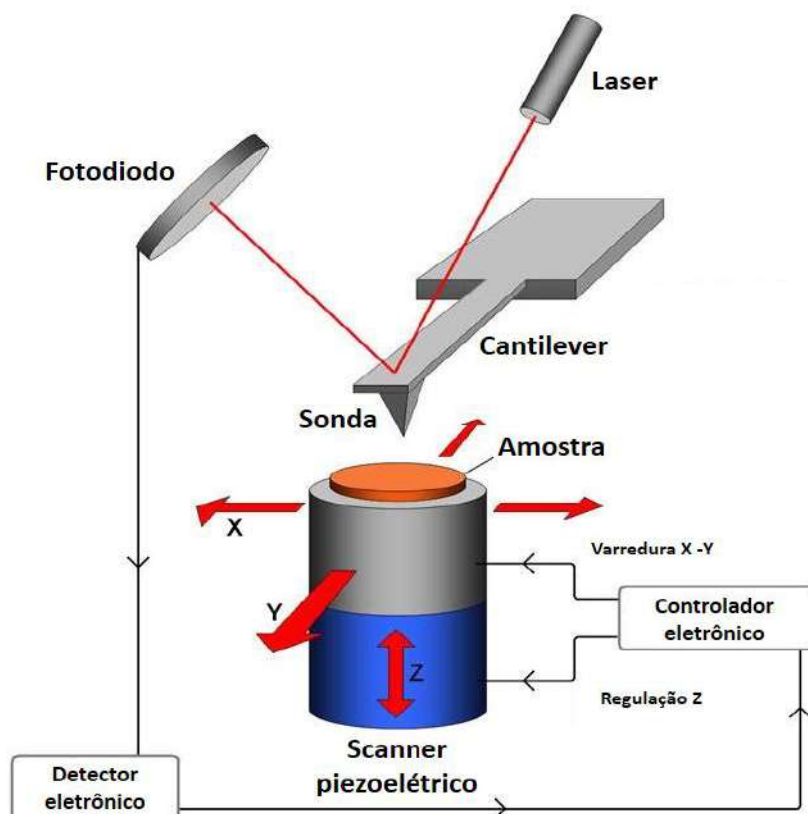
3.5 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS BIODISPOSITIVOS NANOESTRUTURADOS

3.5.1 Microscopia de força atômica

A técnica AFM foi desenvolvida por Binning, Quate e Gerber em 1986 e até os dias atuais é considerada uma ferramenta valiosa para caracterização de superfícies à nível atômico, podendo ser aplicada ao estudo de inúmeras amostras, tais como materiais condutores, semi-condutores e dielétricos, biomoléculas, nanoestruturas, vidros, cerâmicas, polímeros e filmes orgânicos (HODEL et al., 2016; SILVA, et al., 2016). Em comparação a outras técnicas microscópicas, as principais vantagens da AFM são a maior resolução espacial aproximando-se de dimensões atômicas, obtenção de imagens reais em três dimensões em condições nativas, alta relação sinal-ruído, não exigência de métodos específicos para a preparação de amostras nem a necessidade de recobrimento condutor, medição direta da rugosidade superficial, determinação da espessura de filmes ultrafinos depositados em superfícies sólidas e caracterização de superfícies e sistemas biológicos imersos em líquidos; (EATON; WEST, 2010; DUFRÊNE, et al., 2017; GROSS et al., 2018). Todas estas vantagens apresentadas pela técnica de AFM possibilitam sua aplicação em diferentes áreas de conhecimento, como a ciência dos materiais, nanobiotecnologia, biologia celular e engenharia de macromoléculas (CALZADO-MARTIN et al., 2016; MIYAGI et al., 2016).

Os principais componentes de um microscópio de força atômica são a) o cantilever com uma sonda integrada, b) o laser que está focalizado na parte posterior do cantilever, c) o fotodiodo capaz de detectar mudanças no feixe do laser e d) o scanner piezoelétrico responsável pelo posicionamento tridimensional da amostra com alta resolução (Figura 21). O princípio de funcionamento desta técnica microscópica baseia-se nas forças de interação (atrativas ou repulsivas) entre os átomos da superfície da amostra e os átomos que constituem a ponta da sonda (também denominada de “*tip*”). Quando a sonda se aproxima da amostra, os átomos de sua ponta interagem com os átomos que compõe a superfície da amostra. Ao longo da varredura, o cantilever sofre deflexões por causa da interação atômica, desviando o feixe do laser incidente. Este desvio é detectado por um fotodiodo que conduz a informação para um computador, onde a topografia digitalizada da superfície é construída (ALSTEENS et al., 2017; KONTOMARIS; STYLIANOU, 2017).

Figura 21 – Ilustração do mecanismo de funcionamento de um microscópio de força atômica.



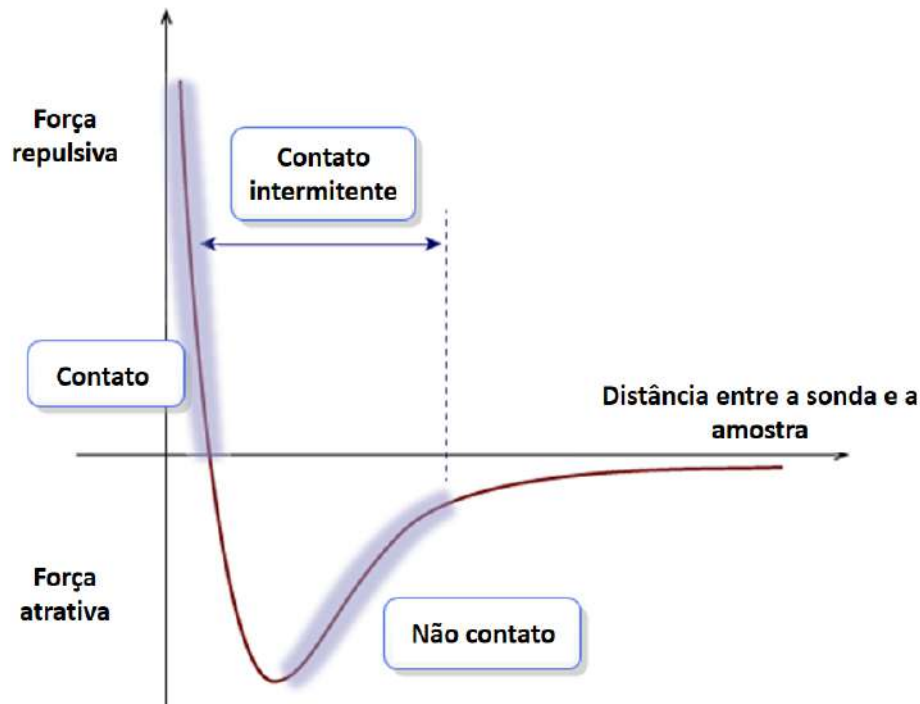
Fonte: adaptada de DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY/UNIVERSITY OF VIRGINIA SCHOOL OF MEDICINE, 2017.

Quando a ponta da sonda está próxima da amostra, ela é primeiramente atraída pela superfície devido a existência de forças atrativas na região, como as forças de Van der Waals, interações eletrostáticas e interações químicas. À medida que esta distância diminui, há o predomínio de forças repulsivas que ocasionam o enfraquecimento das forças atrativas. O fenômeno de repulsão acontece quando os átomos que constituem a ponta da sonda e os átomos da amostra estão tão próximos que seus orbitais eletrônicos começam a se repelir. As forças anulam-se quando a distância entre os átomos está na ordem de alguns ângströms (a qual corresponde a distância característica que uma ligação química) (KONTOMARIS; STYLIANOU, 2017; DENG et al., 2018).

Na Figura 22 está descrita a curva teórica para a energia potencial resultante das interações entre os átomos da sonda e os átomos da amostra em função da distância de separação. Uma força de interação positiva corresponde a uma força repulsiva que empurra a ponta da sonda para longe da amostra. Neste caso, o cantilever sofrerá deflexão positiva em uma direção vertical. Em oposição, uma força de interação negativa representa uma força

atrativa que puxa a ponta da sonda em direção à amostra, o que resulta em uma deflexão negativa do cantilever (CAPPELLA, 2016).

Figura 22 – Efeito da distância entre a sonda e a amostra sobre o regime de forças do sistema.



Fonte: adaptada de SPM TRAINING GUIDE, 2011.

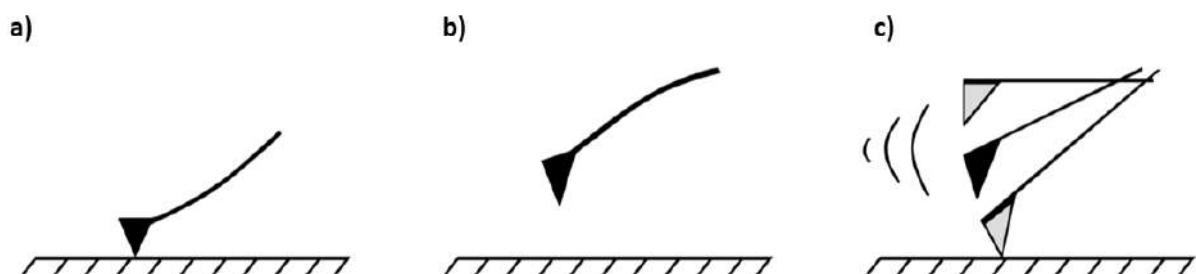
O microscópio de força atômica funciona em três modos distintos de operação: modo de contato, modo de não contato e modo de contato intermitente. As forças de interação entre a sonda e a amostra variam de acordo com o modo de operação em uso, como será destacado a seguir (DENG et al., 2018).

- a) Modo de contato: a ponta da sonda é colocada em contato físico com a amostra, de tal forma que o regime de forças é repulsivo. Por esta razão, a constante elástica do cantilever utilizado neste modo de operação deve ter o menor valor possível para conseguir uma boa flexão e não danificar a amostra. O modo de contato pode ser realizado de duas formas diferentes para obtenção da imagem. Na primeira forma, a distância relativa entre a ponta da sonda e a superfície da amostra é mantida constante durante o processo de análise. Através de deflexões no cantilever (resultante de variações nas forças de interação atômica) e por meio do registro das coordenadas x e

y, a imagem topográfica é construída. Na segunda forma, o cantilever é mantido a uma deflexão constante e a amostra é movida ao longo do plano x e y, de tal maneira que a altura (distância) e os valores de x e y são registrados para a montagem da topografia da amostra (Figura 23a) (MAVER et al., 2016; ALSTEENS et al., 2017).

- b) Modo de não contato: quando operado neste modo, a ponta da sonda oscila a uma distância na ordem de nanômetros entre a superfície da amostra. O cantilever vibra em uma frequência de ressonância com baixa amplitude para garantir que a amostra não seja tocada. Neste tipo de operação prevalecem as forças atrativas, logo, o cantilever deve ser suficientemente rígido com uma constante elástica de alto valor (Figura 23b) (MORITA et al., 2015).
- c) Modo de contato intermitente: neste modo de operação, também denominado de modo dinâmico ou *tapping mode*, o cantilever oscila em sua frequência natural de ressonância, sendo posto em contato intermitente com a amostra (a superfície da amostra é tocada de forma periódica). Assim, o microscópio atua em dois regimes de forças: ora atrativa e ora repulsiva. Em cada ciclo, a ponta da sonda entra em contato com a amostra durante um tempo finito. Quando a ponta da sonda varre diferentes alturas ocorre uma variação na amplitude de oscilação, possibilitando a formação da imagem (Figura 23c) (JONES et al., 2016).

Figura 23 – Modos de operação de um microscópio de força atômica: modo de contato (a), modo de não contato (b) e modo de contato intermitente (c).



Fonte: Adaptada de WIKIMEDIA COMMONS, 2016.

Apesar da AFM ser uma técnica de caracterização precisa e com elevada sensibilidade para monitorização de superfícies, alguns aspectos podem interferir na qualidade da imagem.

Por exemplo, cita-se a presença de impurezas na amostra, a umidade relativa do ar, tipos de constituintes que compõem a amostra e a sonda, bem como a geometria e as dimensões da sonda. Logo, todos estes fatores em associação com a experiência do analista irá determinar a qualidade da micrografia. Em casos de baixa qualidade, podem aparecer artefatos na imagem que encobrem a verdadeira morfologia da superfície da amostra (MORITA et al., 2015).

Estudos de AFM para o desenvolvimento de ferramentas de biodeteção, tais como os biossensores, têm sido realizados amplamente. Estas análises são capazes de possibilitar a caracterização topográfica de eletrodos biomodificados, observação direta de plataformas nanoestruturadas e avaliação de processos de biorreconhecimento (BOUGRINI et al., 2016; NGUYEN et al., 2016; POVEDANO et al., 2017). Neste sentido, Karimizefreh et al. (2017) utilizaram a AFM para a determinação da espessura de nanofolhas de ouro em superfície de carbono vítreo, a qual exibiu um valor de aproximadamente 15 a 20 nm. Ao imobilizar sondas oligonucleotídicas tioladas, o sistema sensor foi capaz de discriminar entre o genoma de HPV16 e segmentos gênicos não complementares e com incompatibilidades de pares de bases. O biossensor foi capaz de responder ao gene alvo na faixa de concentração de 1 μ M a 1 mM com limite de detecção de 0,15 pM (KARIMIZEFREH et al., 2017). Com um objetivo distinto, Lin et al. (2016) utilizaram a técnica de AFM nos modos de contato e contato intermitente para observar a ultraestrutura de amostras de pacientes infectados por HPV16. Por meio da ancoragem química de anticorpos anti-HPV16 sobre a ponta do cantilever, foi possível estimar o tamanho de vírions de HPV ($51,6 \pm 1,8$ nm) e diferenciar entre espécimes positivas e negativas para papilomavírus (LIN et al., 2016). Diante destas aplicações, constata-se o potencial da AFM para a concepção de dispositivos clínicos biossensíveis (KIM et al., 2015; PENG et al., 2019).

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

ITO, pirrol, anilina, ácido tetracloroáurico (HAuCl_4), 3-mercaptopropil-trimetoxissilano (MPTMS; $\text{HS}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$), Cys, BSA, ácido clorídrico (HCl), ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), glutaraldeído, pasta de alumina a 0,05 μm ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$), fosfato de sódio monobásico e dibásico foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). O trizol foi obtido da Invitrogen Co. Ltd. (Carlsbad, CA, EUA). Água deionizada obtida de um sistema de purificação Milli-Q plus (Billerica, MA, EUA) foi usada em todas as preparações de soluções aquosas.

4.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Para o desenvolvimento dos sistemas de biodeteção foram utilizados diferentes tipos de sondas de DNA funcionalizadas com grupo amino terminal. A saber: a) sonda MY11; b) sondas específicas para a detecção de famílias de HPV baseadas em similaridades filogenéticas do gene L1 (sondas BSH6, BSH16, BSH18, BSH26, BSH53 e BSH61), cujos genótipos identificados por cada sonda são descritos na Tabela 2; e c) sonda para identificação do gene p53. Todas as sequências gênicas foram adquiridas da Invitrogen Co. Ltd. (Carlsbad, CA, EUA).

Tabela 2 – Descrição dos genótipos de HPV pertencentes às famílias de biorreconhecimento das sondas específicas de DNA.

Sondas de DNA	Famílias de biorreconhecimento
Sonda BSH06	HPV6, 11, 44 e 55
Sonda BSH16	HPV16, 31, 33, 35, 52 e 58
Sonda BSH18	HPV18, 39, 45, 59 e 68
Sonda BSH26	HPV26, 51 e 82
Sonda BSH53	HPV53, 56 e 66
Sonda BSH61	HPV61, 62, 72, 81, 83, 84, 87 e 89

Plasmídeos recombinantes contendo o gene L1 de diferentes tipos de HPV (HPV6, 11, 16, 18, 33, 45, 51, 53, 58, 61, 62, 66, 72, 81 e 84) foram obtidos a partir da subclonagem em vetor pTA e utilizados posteriormente em testes de bioatividade. O sequenciamento dos plasmídeos recombinantes foi realizado usando *primers* complementares para confirmar a subclonagem do gene L1 de papilomavírus.

As amostras clínicas foram coletadas com o consentimento dos pacientes e o protocolo correspondente foi aprovado pelo comitê de ética local (processo nº CAAE 23698513.0.0000.5190) (Anexo A). Amostras de cDNA foram obtidas a partir da transcrição reversa de segmentos de mRNA presentes em espécimes cervicais de mulheres infectadas com HPV. Os segmentos de mRNA (RNA total) foram isolados de células cervicais usando o reagente Trizol. Todas as amostras clínicas foram validadas pela técnica de PCR e eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. As amostras de cDNA foram caracterizadas por PCR com a finalidade de especificar as amostras positivas (com identificação do genótipo) e amostras negativas para HPV. As diluições das amostras biológicas foram preparadas com solução salina de tampão fosfato (PBS) a 10 mM, pH 7,4 e mantidas congeladas.

4.3 METODOLOGIA DE OBTENÇÃO DAS SONDAS DE BIORRECONHECIMENTO

A construção das sondas de DNA para diagnóstico e identificação dos tipos de HPV consideraram a classificação do banco de dados “*Human Papillomavirus T cell Antigen Database*” desenvolvido pelo *Bioinformatics Core at Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute* da Universidade de Harvard. As sequências completas do gene L1 dos diferentes genótipos mostrados no banco de dados foram baixados do site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>. O número de acesso de cada sequência a ser utilizada nos alinhamentos subsequentes estão listadas na tabela abaixo (Tabela 3).

O alinhamento das sequências do gene L1 dos tipos virais pertencentes a cada família foi realizado utilizando os parâmetros padrão (*default*) do programa MEGA 5 (<http://www.megasoftware.net/>). A partir de blocos de similaridades entre as sequências alinhadas, degenerações em alguns oligonucleotídeos foram incluídas, de modo que a sonda resultante é capaz de identificar todos os tipos virais dentro da mesma família de HPV. Blocos de semelhanças de oligonucleotídeos para mais de uma família de HPV foram descartados. As

sequências selecionadas tiveram 22 nucleotídeos de tamanho e, dentro do possível, até cinco posições degeneradas.

Tabela 3 – Número de acesso do gene L1 para cada genótipo de HPV utilizado para construção das sondas de DNA.

Família	Tipo HPV	Nº Acesso	
F16	HPV 16	FJ006723.1	
	HPV 31	HQ537668.1	
	HPV 33	HQ537694.1	
	HPV 35	GQ479039.1	M74117.1
	HPV 52	JN874436.1	HQ537751.1
	HPV 58	EU918765.1	
F18	HPV 18	GQ180791.1	
	HPV 39	JN104070.1	KC470249.1
	HPV 45	KC470260.1	
	HPV 59	X77858.1	
	HPV 68	EU918769.1	
F26	HPV 26	NC_001583.1	
	HPV 51	GQ487711.1	
	HPV 82	AB027021.1	
F34	HPV 34	NC_001587.1	
	HPV 73	X94165.1	
F53	HPV 53	NC_001593.1	
	HPV 56	EF177180.1	
	HPV 66	EF177190.1	
F6	HPV 6	AF092932.1	
	HPV 11	JQ773412.1	
	HPV 44	HE963128.1	
	HPV 55	HE963177.1	
F7	HPV 7	NC_001595.1	
	HPV 40	X74478.1	
	HPV 91	AF419318.1	
F32	HPV 32	NC_001586.1	
	HPV 42	GQ472847.1	
F54	HPV 54	U37488.1	
F61	HPV 61	U31793.1	
	HPV 72	X94164.1	
	HPV 81	AJ620209.1	
	HPV 83	AF151983.1	
	HPV 84	AF293960.1	
	HPV 62	AY395706.1	
	HPV 87	AJ400628.2	

	HPV 89	AF436128.1
F71	HPV 71	AY330623.1
F64	HPV 64	U12495.1
F70	HPV 70	U22461.1
F85	HPV 85	AF131950.1
F86	HPV 86	AF349909.1

4.4 PREPARAÇÃO DO COMPÓSITO HÍBRIDO AuNP/PANI

Inicialmente, a anilina (0,03 M), MPTMS (64,6 mM) e HAuCl₄ (0,81 M) foram usados para preparar o compósito híbrido AuNP/PANI em solução de etanol sob agitação magnética (1100 rpm) a temperatura ambiente por 48 horas. Posteriormente, a mistura foi submetida a um processo de centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos para segregação de grandes aglomerados moleculares. O pH do meio foi ajustado com uma solução de HCl a 0,1 M para promover a protonação da PANI e hidrólise de MPTMS em excesso (SANTOS et al., 2013).

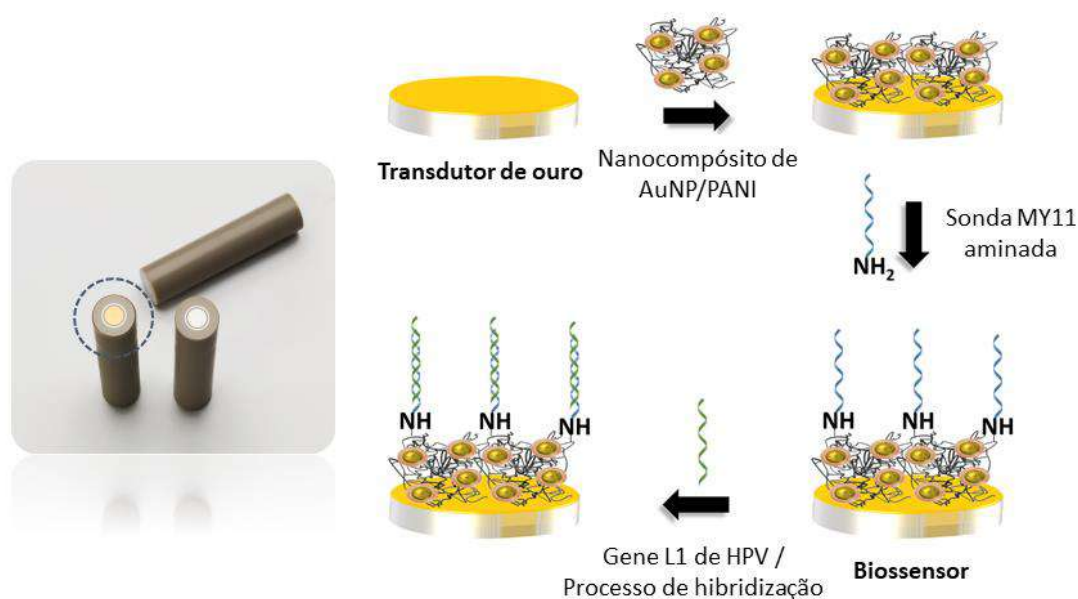
A etapa inicial da síntese do nanocompósito híbrido AuNP/PANI é baseada na liberação de prótons (H⁺) do HAuCl₄, responsáveis por produzir cátions de anilinium (PhNH₃⁺), a partir do monômero anilina. O [AuCl₄]⁻ atua como um agente oxidante, promovendo a oxidação dos íons PhNH₃⁺. Como consequência da formação destes radicais cátions, a reação de polimerização da PANI é desencadeada. Durante este processo, ocorre a liberação de elétrons que reduzem o [AuCl₄]⁻, levando a síntese de AuNPs. Por conseguinte, estas nanopartículas metálicas são então incorporadas à matriz polimérica. Além disso, o MPTMS é utilizado como um agente estabilizador capaz de prevenir a agregação molecular das AuNPs. Com o uso de MPTMS, o material nanoestruturado passa a apresentar grupos sulfidrilas em sua composição, o que possibilita a quimissorção do nanocompósito híbrido AuNP/PANI em superfícies metálicas (AVELINO et al., 2016).

4.5 CONSTRUÇÃO DO BIOCSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM NANOCOMPÓSITO AuNP/PANI

A plataforma nanoestruturada baseada em compósito híbrido AuNP/PANI foi projetada em eletrodo de ouro através de modificação química. Primariamente, a área transdutora foi submetida a um protocolo de limpeza para a remoção de partículas

indesejadas. O eletrodo de trabalho foi polido em um disco de feltro com uma suspensão aquosa de alumina ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) a uma granulação de $0,05\ \mu\text{m}$. Em seguida, foi enxaguado com água ultrapura, submetido a um banho de ultrassom durante 10 minutos e seco ao ar. O método de automontagem foi utilizado para estruturação do compósito híbrido AuNP/PANI em superfície eletródica através de interações químicas estabelecidas entre os grupos tióis ($-\text{SH}$) do nanomaterial e os átomos de ouro do eletrodo. Nesta etapa, o eletrodo foi imerso em solução etanólica de AuNP/PANI com fator de diluição de 1:750 (AuNP/PANI: etanol; v/v) durante 2 minutos à temperatura ambiente. Prontamente, o eletrodo modificado com AuNP/PANI foi enxaguado em água ultrapura para retirar as partículas não adsorvidas. Posteriormente, a sonda aminada MY11 foi imobilizada na plataforma nanoestruturada através do método *drop-coating* (revestimento por gota). Para tal, $2\ \mu\text{L}$ de glutaraldeído e $2\ \mu\text{L}$ da solução de oligonucleotídeos a $20\ \text{mM}$ foram adicionadas ao substrato nanoestruturado. O glutaraldeído (agente de reticulação bifuncional) foi usado para formação de bases Schiff entre as moléculas de DNA e os grupos amino do polímero PANI. Assim, por meio desta estratégia, o biossensor AuNP/PANI-Sonda MY11 foi projetado (Figura 24) (AVELINO et al., 2020).

Figura 24 – Processo de fabricação de biossensor eletroquímico de DNA baseado em nanocompósito AuNP/PANI.

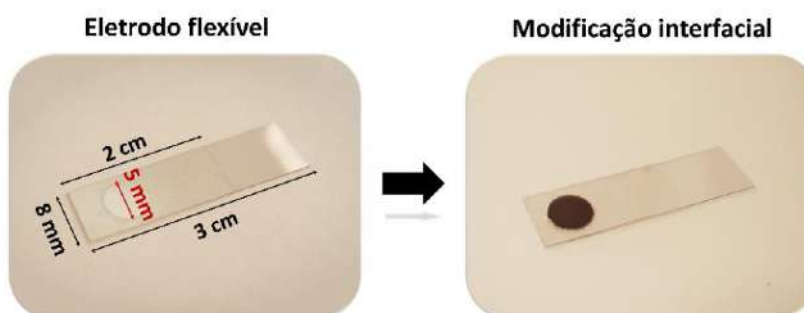


Fonte: Adaptada de AVELINO et al., 2020.

4.6 FABRICAÇÃO DE ELETRODOS MINIATURIZADOS FLEXÍVEIS

Com a finalidade de otimizar sistemas de diagnóstico fundamentados em eletrodos convencionais, suportes miniaturizados de ITO foram desenvolvidos e utilizados como transdutores eletroquímicos em biossensores de DNA. O protótipo foi baseado em tiras flexíveis de ITO com dimensões de 3 cm de altura por 8 mm de largura. Para padronizar a área eletroativa, uma folha adesiva de policloreto de vinila (PVC) com orifício circular (diâmetro de 5 mm) foi sobreposta sobre a superfície de ITO. Assim, foi possível obter um efeito de blindagem em regiões específicas do substrato de ITO condutor. Como resultado, uma área específica para a montagem do biossensor de DNA ($0,2 \text{ cm}^2$) e uma área disponível para o contato elétrico ($0,8 \text{ cm}^2$) foram delineadas (Figura 25).

Figura 25 – Imagens do eletrodo flexível miniaturizado antes e após o processo de biofuncionalização.



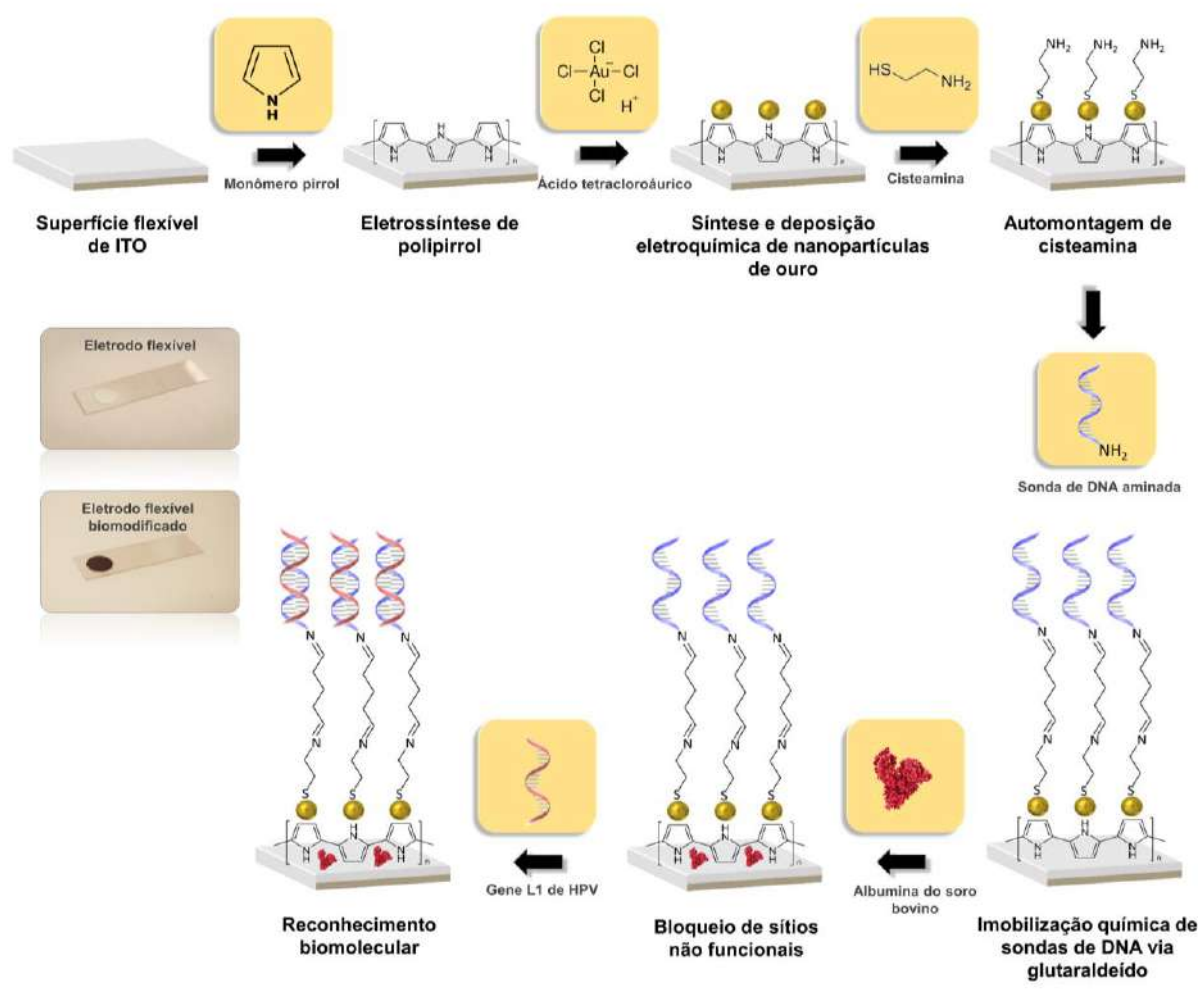
Fonte: AVELINO et al., 2020 sob proteção intelectual (Patente BR 10 2019 021496 1).

4.7 CONSTRUÇÃO DE BIOCENSORES DE DNA BASEADOS EM PLATAFORMA DE PPy-AuNP-Cys

A primeira etapa de montagem dos biossensores eletroquímicos baseados em plataforma nanoestruturada de PPy-AuNP-Cys consiste na eletropolimerização de filmes de PPy. Para tal, os eletrodos de trabalho (eletrodo convencional de ouro e eletrodo miniaturizado flexível) foram imersos em uma solução de ácido clorídrico a 0,5 M contendo o monômero pirrol a uma concentração de 30 mM. Através de medidas voltamétricas, foram aplicados seis ciclos de polimerização em uma faixa de potencial de -0,4 a +1 V com velocidade de varredura de 100 mV.s^{-1} . A segunda etapa compreende a síntese e deposição eletroquímica de AuNPs sobre o substrato orgânico polimérico. Utilizando uma solução de

ácido tetracloroáurico a 0,25 mM, foram realizados dez ciclos de VC em uma faixa de potencial de +0,2 a -1 V com velocidade de varredura de 50 mV.s⁻¹. A terceira etapa refere-se a quimissorção de moléculas organossulfuradas, a Cys, sobre as estruturas nanométricas, mediante o estabelecimento de ligações covalentes do tipo tiol-ouro. Nesta etapa, foram adicionados 5 µL de solução de Cys a 2 mg/mL (proporção volumétrica de etanol:água igual a 3:1) por 30 minutos. Após obter a plataforma nanoestruturada de PPy-AuNP-Cys, foi realizada a quarta etapa que se reporta a ancoragem de sondas de DNA. Primeiramente, 5 µL de glutaraldeído a 0,5% foram adicionados sobre a plataforma nanoestruturada por 10 minutos. Posteriormente, 5 µL da solução de oligonucleotídeos a 10 mM foram acrescentados por 15 minutos para a construção dos biossensores. Ressalta-se que, nesta etapa, diferentes tipos de sondas foram utilizados separadamente para a obtenção dos sistemas sensores, como por exemplo, a sonda MY11, sondas específicas para a detecção de famílias de HPV (sondas BSH6, BSH16, BSH18, BSH26, BSH53 e BSH61) e sonda para identificação do gene p53. Por fim, a quinta etapa compreende o bloqueio dos sítios inespecíficos dos sistemas sensores com moléculas de BSA. Nesta etapa, foram acrescentados 5 µL de uma solução de BSA a 1% (pH 7,4) sobre a superfície dos eletrodos modificados por 30 segundos. Logo, através deste processo metodológico, biossensores eletroquímicos baseados em plataforma nanoestruturada de PPy-AuNP-Cys foram desenvolvidos em eletrodos convencionais de ouro e eletrodos flexíveis miniaturizados (Figura 26).

Figura 26 – Representação esquemática das etapas de montagem do sistema sensor baseado em polipirrol, nanopartículas de ouro, cisteamina, sonda oligonucleotídica e albumina sérica bovina para a biodetecção de papilomavírus.



Fonte: Adaptada de AVELINO et al., 2021.

4.8 AVALIAÇÃO DE BIOATIVIDADE

Com a finalidade de avaliar a especificidade e sensibilidade dos dispositivos nanotecnológicos, estudos de hibridização molecular foram realizados com plasmídeos recombinantes contendo o gene L1 de diferentes genótipos de HPV (HPV6, 11, 16, 18, 33, 45, 51, 53, 58, 61, 62, 66, 72, 81 e 84) e espécimes cervicais (amostras de cDNA) obtidas de mulheres infectadas por papilomavírus. A seletividade dos sistemas sensores foi estudada perante ensaios com sequências de oligonucleotídeos não-complementares às sondas de biorreconhecimento. Em cada análise, os biossensores nanoestruturados foram expostos a 5

μL da amostra a ser testada por 15 minutos para promover a biodetecção. As diluições de todas as amostras biológicas foram preparadas com PBS (pH 7,4) e mantidas congeladas.

4.9 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

As medidas de VC e EIE foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT 128N controlado por um computador através de um software de interfaceamento NOVA 1.11 (MetrohmAutolab, The Netherlands). Em adição, foi utilizada uma célula eletroquímica convencional contendo três eletrodos imersos em 20 mL de solução de ferro-ferricianeto de potássio $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) a 10mM em PBS (pH 7,4), atuando como sonda redox. O eletrodo de ouro biomodificado ou substrato flexível de ITO atuou como eletrodo de trabalho, o eletrodo de Ag/AgCl saturado com KCl a 3M e o eletrodo de platina foram usados, respectivamente, como eletrodo de referência e contra eletrodo. Os voltamogramas cíclicos foram registrados em uma faixa de potencial de -0,2 a +0,7 V com velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} . Os espectros de impedância foram obtidos em uma faixa de frequência de 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV. Todas as análises eletroquímicas foram realizadas em triplicatas, a temperatura ambiente e no interior de uma gaiola de Faraday.

4.10 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

As imagens moleculares com mapeamento topográfico foram registradas em um microscópio de força atômica SPM-9500 (Shimadzu Corporation, Japão). Um cantilever com sonda de silício revestida por alumínio (Nanoworld, Japão, frequência ressonante = 300 kHz, constante de mola = 42 N.m^{-1}) foi utilizado para obter imagens de AFM em um modo de não contato ao ar. As imagens de AFM foram adquiridas com resolução lateral de 512×512 pixels e área de varredura de $5 \times 5 \mu\text{m}$. No mínimo três áreas separadas macroscopicamente foram analisadas em cada amostra pelo software AFM Gwyddion para a obtenção de imagens multiparamétricas. As imagens de SEM foram fornecidas por um microscópio eletrônico de varredura (Vega 3XM Tescan) a uma tensão de aceleração de 20 kV.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ARTIGO 1

Artigo publicado na revista *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*

(fator de impacto: 3,935)

Metal-polymer hybrid nanomaterial for impedimetric detection of human papillomavirus in cervical specimens



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba

Metal-polymer hybrid nanomaterial for impedimetric detection of human papillomavirus in cervical specimens

Karen Y.P.S. Avelino^{a,b}, Léony S. Oliveira^b, Norma Lucena-Silva^{c,d}, Celso Pinto de Melo^e, César A.S. Andrade^{a,b}, Maria D.L. Oliveira^{a,b,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^c Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), 50670-420 Recife, PE, Brazil

^d Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Oncologia Pediátrica, Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), 50070-550 Recife, PE, Brazil

^e Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 October 2019

Received in revised form 28 February 2020

Accepted 8 March 2020

Available online 9 March 2020

Keywords:

Biosensor

Polyaniline

Gold nanoparticle

Human papillomavirus

Electrochemical impedance spectroscopy

ABSTRACT

The human papillomavirus (HPV) is one of the main sexually transmitted pathogens that infect the anogenital epithelium and mucous membranes. HPV genotypes can be classified as high and low oncogenic risk, with infection by the former resulting in cervical cancer in approximately 100 % of the cases. In this work, we developed an ultrasensitive electrochemical biosensor for the detection and identification of different HPV genotypes. A nanostructured platform based on a matrix of polyaniline (PANI) containing gold nanoparticles (AuNPs) was designed for the chemical immobilization of a DNA probe capable of recognizing different HPV types. Cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS), and atomic force microscopy (AFM) were used to characterize the genosensor. The impedimetric responses indicate that the proposed sensor was able to detect HPV (types 6, 11, 16, 31, 33, 45, and 58) in cervical specimens (cDNA samples). We obtained different profiles of electrochemical responses for the high and low-risk HPV genotypes. By adopting a three-dimensional quantitative analysis of impedance response variables, it was possible to identify the existence of a pattern of association for samples of high oncogenic risk, which may lead to the differential diagnosis of HPV. The biosensor demonstrated an excellent analytical performance for the detection of HPV genotypes with high sensibility and selectivity. The genosensor exhibited a linear range of response in the $1 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ to $100 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ range. Besides, a limit of detection (LOD) of $2.74 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ and $7.43 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ was obtained for HPV11 and HPV16, respectively, with regression coefficients of 99.88 % and 99.47 %. Thus, the proposed sensor may serve as a good prognostic indicator for patients infected with papillomavirus.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

HPV is a non-enveloped double-stranded DNA virus responsible for infections in the mucous membranes and anogenital epithelium. This pathogen, which presents high incidence and prevalence among youths and adults, is the most common sexually transmitted virus [1]. Currently, more than 200 HPV genotypes are known and subdivided according to their oncogenic potential. While low-risk HPV types (6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73, and 81) are associated with the appearance of genital warts, high-risk HPV types

(16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68) are responsible for cytogenetic changes associated to the development of cancers such as cervical, penile, vaginal, vulvar, and anal cancer. Epidemiological studies have demonstrated that approximately 93–100 % of the cases of invasive cervical cancer are correlated to HPV type 16 and 18 [2].

The identification of the HPV type in clinical samples could provide for better patient prognosis and the subsequent implementation of therapeutic strategies to obtain satisfactory results. The molecular methods used for HPV screening can be classified into nucleic acid-hybridization assays (southern blotting, *in situ* hybridization and dot-blot hybridization), signal amplification assays (Hybrid Capture® 2 and Cervista® HPV) and nucleic-acid amplification assays (quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR), PapilloCheck® and Cobas® 4800) [3]. Although

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

E-mail address: m.danielly@yahoo.com.br (M.D.L. Oliveira).

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113249>

0731-7085/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

these tools are high-quality, they present limitations for extensive use in hospitals and laboratories, such as high acquisition costs for equipment, large amounts of purified DNA, limited sensitivity, and complex experimental protocols with extended analysis time [4]. The development of molecular assays for HPV detection with high accuracy and bioanalytical performance is of great relevance for the promotion of the health of infected patients.

Researchers in nanoscience and biotechnology have made significant progress in the development of new electronic devices such as biosensors. The functional strategy of these devices is based on the specificity of biological molecules and the analytical capacity of signal transduction methods. Also, electrochemical genosensors are based on the immobilization of nucleic acid segments on electrochemical transducers, with the response being related to the hybridization between a single-stranded DNA fragment and its complementary strand [5]. The electrochemical genosensors are potentially useful for clinical diagnosis due to their advantageous characteristics, such as low cost, sensitive detection, the possibility of real-time analysis and small sample requirement, requiring simple instrumentation that allows for miniaturization, portability, and automation [6].

Nanostructured platforms are effective interfaces between biomolecules and electrode surfaces that provide stable anchoring for recognition molecules without loss of biological activity. Numerous materials can be used to obtain nanostructured platforms, such as nanoparticles, nanotubes, nanowires, nanorods, nanopores, and quantum dots. Hybrid nanocomposites composed of the nanoparticles and conjugated polymers have become increasingly prominent in the field of electrochemical genosensors [7]. Gold nanoparticles and polyaniline (AuNp/PANI) hybrid composites have shown unique characteristics for the development of high-performance sensing platforms [8].

AuNps are a nanomaterial extensively used for the construction of biological sensors. AuNps are a well-known nanomaterial due to quantum size effect, shape-related optoelectronic characteristics, single-electron transition, surface plasmon band, fluorescence, magnetism, electric conductivity, and electrochemical characteristics [9]. Previous studies have shown that these metallic nanoparticles are essential components for interfacing biological recognition. Besides, AuNps exhibit high surface energy, enable the direct and effective transfer of electrons between the electrode and the biomolecule, and have a high relation between surface area and volume that provides a larger electrochemical area [10].

Of note, several approaches have been described for the incorporation of AuNps into polymer matrices to obtain hybrid nanocomposites with synergistic properties [11]. In this context, we highlight PANI, a polymer whose conductivity is sensitive to its oxidation state and pH of the microenvironment. The conductive form of PANI is the protonated polyemeraldine or polyemeraldine salt, whose conductivity is around 15 S cm^{-1} . PANI is an exciting material for use in biosensor interfaces since it can act as an effective mediator for electron transfer in redox or enzymatic reactions that contribute to the amplification of the analytical signal, leading to an increased sensitivity of the detection devices. Also, PANI can also be used as immobilization support for biological molecules that allow the preservation of their conformational properties [12].

In recent years, several innovative improvements have been made in DNA biosensors for the detection of papillomavirus and single nucleotide polymorphism. Electrochemical signal conversion methods are among the main types of transducers used in HPV biosensors [4]. Electrochemical markers, such as methylene blue, ferrocene, horseradish peroxidase, anthraquinone, and 1,10-phenanthroline ruthenium dichloride, have been used to evidence target recognition. Of note, nanomaterials associated with sensor devices enable a label-free ultrasensitive detection of HPV. Although significant advances have been obtained in electrochemi-

cal biosensors for HPV, most analyzes are performed with synthetic modeled DNA sequences (recombinant plasmids) due to the complexity of the human samples [3].

In this work, we developed a nanoelectrode based on AuNp/PANI hybrid composite for the sensitive diagnosis of HPV in cervical specimens. A degenerate DNA probe was attached on an AuNp/PANI-modified gold electrode through chemical interactions. We used atomic force microscopy (AFM) to examine the topographic characteristics of the nanostructured platform. We performed the ultrasensitive detection of different HPV genotypes (6, 11, 16, 31, 33, 45, and 58) in patients' clinical samples through cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). To the best of our knowledge, this study provides the first label-free sensor based on degenerate oligonucleotide sequence able to verify differences in electrochemical responses to HPV groups of high and low risk. Thus, the proposed DNA biosensor can be considered a promising system for the differential diagnosis of HPV with oncogenic prediction.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Tetrachloroauric acid (HAuCl_4) and 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTMS - $\text{HS}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$) were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Aniline, potassium ferricyanide ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), potassium ferrocyanide ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), glutaraldehyde, sodium phosphate and alumina ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) were obtained from VETEC (SP, Brazil). Aniline was previously distilled under reduced pressure before use. All other reagents were of analytical grade and used as received. Deionized water was obtained using a Millipore system (Milli-Qplus, Billerica, USA).

2.2. Biological samples

The cervical samples were collected after the consent of the women patients. The study was previously approved by a research ethics committee (process n° CAAE 23698513.0.0000.5190). HPV genotypes recognition was based on the use of an MY11 probe with sequence (5' to 3') amine-GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG, purchased from Invitrogen (USA). The recognition site of this degenerate primer is a conserved region of the HPV L1 gene. mRNA segments were extracted from cervical cells using Trizol and converted by reverse transcriptase to complementary DNA (cDNA). Positive (with genotype discrimination) or negative samples were previously characterized through real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).

2.3. Preparation of the AuNp/PANI hybrid nanocomposite

Initially, aniline (0.03 mol L^{-1}), MPTMS ($6.46 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), and HAuCl_4 (0.81 mmol L^{-1}) were added to a round bottom flask containing ethanol under magnetic stirring (1100 rpm) for 48 h for obtaining AuNp/PANI hybrid nanocomposites. Subsequently, the AuNp/PANI hybrid nanocomposites were subjected to a centrifugation process at 12 000 rpm for 10 min for the segregation of large agglomerates. After, 500 μL of HCl (0.1 M) was added to AuNp/PANI solution to obtain positive electrical charges on PANI (via protonation reaction) and hydrolysis of the excess MPTMS [13].

2.4. Immobilization of the DNA probe in the AuNp/PANI hybrid nanocomposite

The bare gold electrode ($\varphi = 2 \text{ mm}$) was carefully polished with abrasive paper and Al_2O_3 paste (0.05 μm) and then rigorously

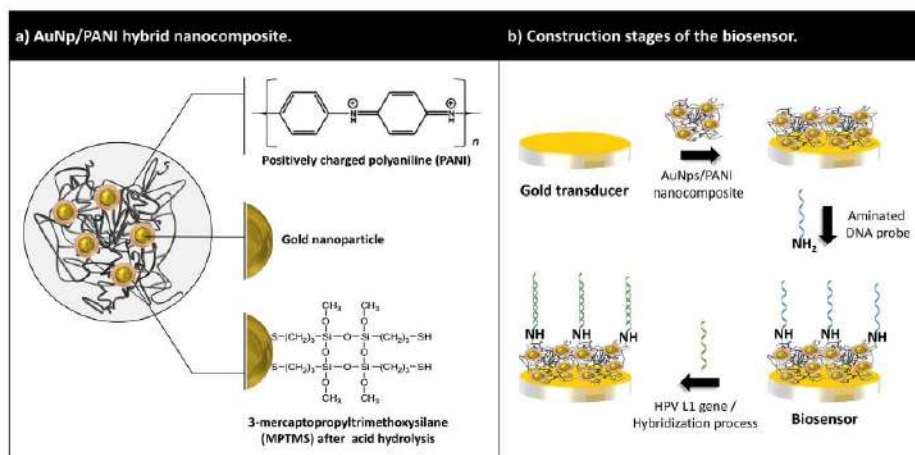


Fig. 1. Schematic representation of the AuNP/PANI hybrid nanocomposite (a) and the biosensor fabrication process (b). Glutaraldehyde is a bifunctional crosslinking agent and was used to form Schiff bases between the aminated DNA probe and the PANI amino groups.

rinsed and sonicated in deionized water for 10 min to remove residual particles. The self-assembly method was used to structure the AuNP/PANI hybrid nanocomposite on the electrode surface. This procedure was based on chemical interactions established between the thiol groups ($-\text{SH}$) of the nanocomposite and the gold electrode. In this step, the electrode was immersed in an ethanolic solution of AuNP/PANI with a dilution factor of 1:750 (AuNP/PANI:ethanol, v/v) for 2 min at room temperature. Subsequently, the AuNP/PANI-modified electrode was rinsed with deionized water to remove non-bonded particles.

Aminated DNA probes were immobilized on the nanostructured platform using the drop-coating method. 2 μL of glutaraldehyde (0.5%) and 2 μL of the oligonucleotide solution (20 μM) were added to AuNP/PANI-modified electrode. Glutaraldehyde, a bifunctional crosslinking agent, was used to form Schiff bases between the aminated DNA probe and the PANI amino groups [14]. The assembly process is schematically shown in Fig. 1.

2.5. Bioactivity study

Biodetection assays were performed with cDNA obtained from patients infected with different HPV types (genotypes 6, 11, 16, 31, 33, 45, and 58). Sensitivity and specificity studies were performed using variable concentrations (1, 25, 50, 75, and 100 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$) of cDNA samples containing the viral genome. Besides, cDNA samples from uninfected patients were used to evaluate selectivity. The experimental protocol was based on the exposure of the biosensor to 2 μL of each sample for 15 min. Before use, cDNA samples were heated to 94 $^{\circ}\text{C}$ for DNA denaturation.

2.6. Electrochemical measurements

Electrochemical measurements were performed using a conventional three-electrode system interfaced with a PGSTAT 128 N potentiostat/galvanostat (Metrohm Autolab Inc., Netherlands). The electrical circuit analysis was performed with the NOVA 1.11 software. The working electrode was a bare gold electrode and platinum wire and Ag/AgCl electrode saturated with KCl (3 M) were used as counter and reference electrodes, respectively. The impedance spectra were recorded in the 100 mHz and 100

kHz frequency range with an alternating voltage adjusted to an amplitude of 10 mV.

The CV analysis was performed in the -0.2 V and $+0.7$ V potential range at a scan rate of 50 mV s^{-1} . The electrolytic solution was 10 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (1:1, v/v) in 20 mM PBS (pH 7.4). All electrochemical measurements were performed in triplicate ($n = 3$) using three independent electrodes to evaluate the reproducibility. The electrochemical experiments were performed at room temperature inside a Faraday cage.

2.7. Atomic force microscopy measurements

Topographic measurements were performed using an SPM-9500 atomic force microscope (Shimadzu, Japan). AFM images were acquired through an aluminum-coated silicon cantilever with a resonance frequency of 75 kHz and a force constant of 3 N m^{-1} (Multi 75AL, NCHR) in a non-contact mode. The lateral resolution was set to 512×512 pixels in a scan area of $5 \times 5 \mu\text{m}$. Also, the images were processed and analyzed using Gwyddion software.

3. Results and discussion

3.1. Topographic analyses

Two and three-dimensional AFM images of the electrode surface modifications are shown in Fig. 2. A well-distributed AuNP/PANI self-assembled monolayer was chemisorbed on the electrode surface (Fig. 2a). The immobilization process occurs as a result of the chemical interaction between the gold electrode surface and the terminal thiol groups ($-\text{SH}$) from MPTMS. The average roughness of the AuNP/PANI nanocomposite film was 8 nm. According to Dey et al. [15], AuNPs are uniformly distributed on the PANI matrix due to the electrostatic interactions between positively-charged PANI and negatively-charged AuNPs. After immobilization of the recognition probe, a maximum height of 13 nm was observed (Fig. 2b). The difference of 5 nm between the heights of the AuNP/PANI and AuNP/PANI-Probe_{HPV} films corresponds to the approximate size of DNA sequences composed of 20 nucleotides [16].

In Figs. 2c-d, we present the topography of the biosensor after its exposure to clinical samples from patients infected with HPV11 and 16, respectively. A noticeable increase in the height and roughness

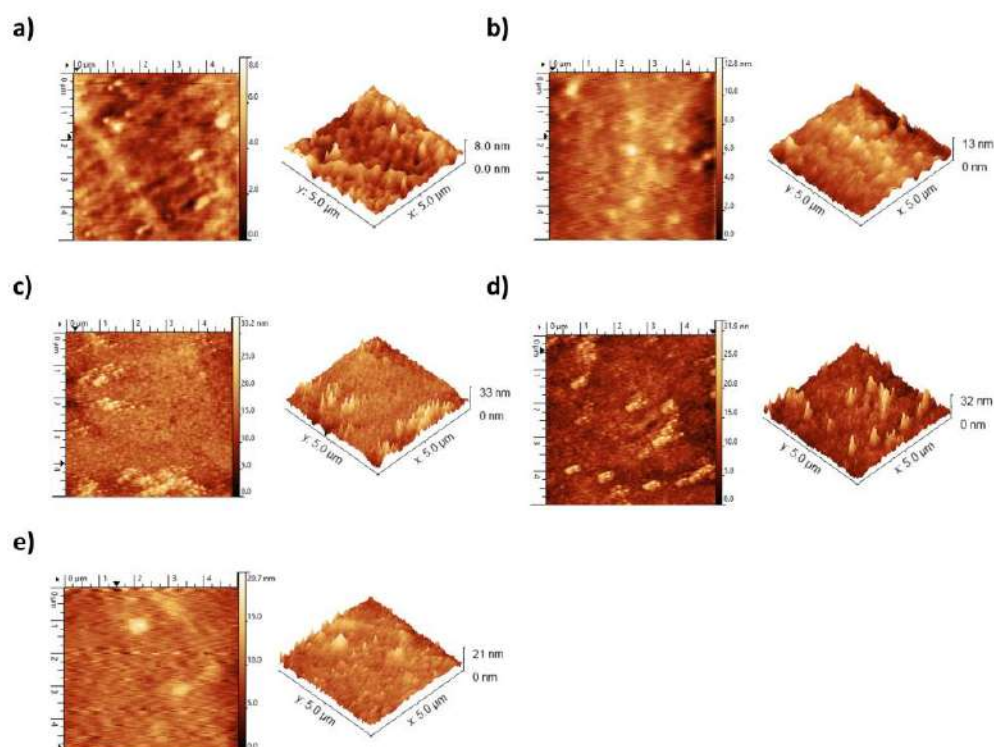


Fig. 2. AFM topographic images of the AuNP/PANI nanocomposite (a), AuNP/PANI-ProbeHPV (b), AuNP/PANI-ProbeHPV-HPV11 (c), AuNP/PANI-ProbeHPV-HPV16 (d), AuNP/PANI-ProbeHPV-uninfected sample, with the corresponding cross-section. Scan area of $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$.

of the sensor system was observed. The presence of peaks with 33 nm (Fig. 2c) and 32 nm (Fig. 2d) heights demonstrate the ability of the biodevice to detect different HPV genotypes. The biosensor interaction with a clinical sample from uninfected patients does not cause significant morphological alterations (Fig. 2e). The difference of height between the AuNP/PANI-ProbeHPV and AuNP/PANI-ProbeHPV-uninfected sample films can be attributed to non-specific adsorption on the sensor surface [8]. Morphological characterization of the AuNP/PANI nanocomposite using transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) can be seen in our previous works [17,18].

3.2. Electrochemical characterization

Fig. 3 shows the electrochemical responses of the bare gold electrode, AuNP/PANI-modified electrode, and AuNP/PANI-ProbeHPV-modified electrode. The gold electrode presents well-defined anodic/cathodic peaks with a reversible charge transfer rate in the presence of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ solution (Fig. 3a). The voltammetric response is decreased (33.28 to 21.94 μA) after adding AuNP/PANI nanocomposite on the electrode surface. The partial blockage of the oxidation-reduction process is related to the formation of a hybrid composite monolayer on the electroactive area.

Subsequently, a DNA probe for the detection of different HPV genotypes was chemically immobilized on the AuNP/PANI-modified electrode. The immobilization process was based on chemical bonds between terminal amine groups of the functionalized DNA probe ($5'-\text{NH}_2$) and PANI. The conjugation reaction was performed using glutaraldehyde as a bifunctional cross-linking

agent [14]. A reduction in the anodic current signal (21.94 to 15.09 μA) was observed after the electrode modification with the biorecognition probe. This behavior is due to electrostatic repulsion between the negatively charged DNA phosphates and the negative redox probe.

Impedance spectra were recorded in the 100 mHz to 100 kHz frequency range. A modified Randles equivalent circuit (inset of Fig. 3b) was used for the theoretical simulation through the NOVA 1.11 software. The circuit includes (i) the solution (ohmic) resistance, R_s , (ii) the Warburg impedance Z_w , (iii) the constant phase element CPE, and (iv) the charge transfer resistance R_{CT} . R_s and Z_w are related to the bulk properties of the redox solution and diffusion of the electroactive species, which are not affected by biochemical reactions that occur in the electrode surface, while R_{CT} and CPE are associated with the dielectric characteristics of the electrode/electrolyte interface. The diameter of the Cole-Cole semi-circle is related to the value of the R_{CT} related to electron transfer kinetics of the redox probe at the electrode interface. The values of the equivalent circuit elements obtained from the fitting of the impedance results are shown in Table S1.

The bare gold electrode spectrum is characterized by a small semi-circle at a high-frequency domain and a low R_{CT} value ($R_{CT} = 0.24 \text{ k}\Omega$) (Fig. 3b). An increase in the impedimetric response ($R_{CT} = 2.64 \text{ k}\Omega$) was observed after the modification of the electrode surface with AuNP/PANI nanocomposite. The magnitude of the impedimetric response for AuNP/PANI-ProbeHPV electrode increased ($R_{CT} = 5.04 \text{ k}\Omega$), revealing a hindrance in the charge transfer due to the insulating behavior of the DNA probe. The immobilization of oligonucleotide sequences can cause conformational

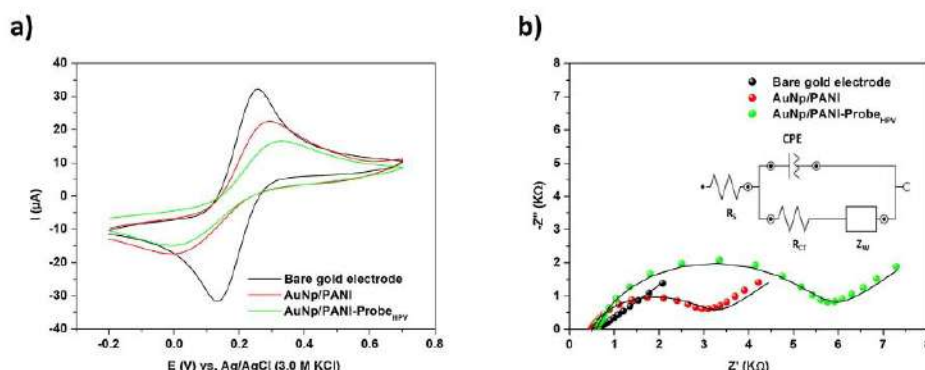


Fig. 3. Cyclic voltammograms (a) and impedance spectra (b) for each step of assembly of the biosensor. Inset: Randle's equivalent circuit used to fit the impedance measurements.

changes associated with the variation in the conductivity of the PANI, which contributes to the increase of interfacial resistance. In our previous studies [13,19,20], FT-IR spectra show PANI characteristic peaks at 1303 cm^{-1} (CN— stretching band), 1566 cm^{-1} (CC= stretching of the quinoid ring) and 1479 cm^{-1} (CC= stretching of the benzenoid ring). Evidence of the interaction between PANI and DNA is associated with the peaks at 1599 cm^{-1} (CO= stretching of cytosine/thymine nitrogenous bases and in-plane vibration of thymine) and 1642 cm^{-1} (CO= stretch of guanine/thymine and NH— stretching of thymine).

A substantial amount of research has been conducted in the biomedical field using nanocomposite materials. In 2013, Santos et al. [13] reported a simple method to prepare colloidal particles of AuNP/PANI with noticeable fluorescence in the blue and green regions of the visible spectrum. This optical characteristic revealed the potential use of the nanocomposite as a fluorescent marker for the identification of biological molecules. In addition, AuNP/PANI hybrid composite has been incorporated into nanostructured platforms for the obtaining of electrochemical biosensors with high analytical performance, selectivity and sensitivity. Recently, AuNP/PANI hybrid composite was employed for the molecular diagnosis of cancer, specifically, chronic myelogenous leukemia and acute lymphocytic leukemia, through the identification of the BCR/ABL fusion gene with a LOD in order of attomolar [8]. Furthermore, transducers modified with AuNP/PANI hybrid composite were used for label-free biodetection of dengue virus serotypes and viral glycoproteins [17], with recognition time of 10–15 min. Given these applications, the bioactivity of the proposed device in this paper will be presented below, aiming at the detection and identification of different HPV genotypes.

3.3. Sensitivity and selectivity assays

The sensitivity of the biosensor was evaluated through its exposure to different concentrations of cDNA samples from patients infected with HPV11 and HPV16 (1, 25, 50, 75, and $100\text{ pg }\mu\text{L}^{-1}$). A reduction in the voltammetric responses associated with a decrease in the oxidation/reduction currents was observed after the biorecognition process (Fig. 4a-b). These results confirm the formation of a hybrid DNA-complex between the probe and the HPV11/HPV16 L1 gene. The decrease in the voltammetric response corresponds to an insulating effect caused by the structure of the double helix on the biosensor surface.

The bioactivity of the sensor system against samples containing the HPV11 and HPV16 genotypes can be represented by the

percentage of the relative deviation of the anodic current variation (ΔI) [8].

$$\Delta I(\%) = \frac{I_b - I_a}{I_b} \times 100 \quad (1)$$

Where I_b and I_a correspond to the anodic peak current before and after the hybridization process, respectively. The voltammetric anodic shift for the biosensor after its interaction with different concentrations of the clinical samples is shown in Table S2. An increase in the magnitude of the ΔI was observed due to the increase of the concentrations of the analyzed samples.

The selectivity was evaluated using cDNA sample from a non-HPV infected patient at a concentration of $100\text{ pg }\mu\text{L}^{-1}$. An insignificant change in ΔI ($\Delta I = 7.75\%$) was observed after the interaction of the biosensor with the test sample. ΔI for the biosensor exposed to the HPV-negative sample ($\Delta I = 7.75\%$) was significantly lower than the ΔI obtained during assays with HPV positive clinical specimens at the same concentration ($\Delta I_{\text{HPV11}} = 69.98\%$ and $\Delta I_{\text{HPV16}} = 79.32\%$) (Table S2). These results indicate that HPV-negative samples may produce a low variation in the voltammetric response. The discrete decrease in the oxidation current is probably due to the physical adsorption of non-complementary DNA sequences [8]. The selectivity of the biosensor to HPV is associated with the higher electrochemical response.

In Fig. 4c-d we show the Nyquist diagrams after the biosensor was exposed to cDNA samples from patients infected with HPV11 and HPV16. The interaction of the biosensor with the patient samples results in increasing the diameter of the Cole-Cole semicircles. The relative variation of the R_{CT} (ΔR_{CT}) was used to characterize the analytical performance of the impedimetric biosensor, as follows [16].

$$\Delta R_{CT}(\%) = \frac{R_{CT(\text{Biosensor-HPV})} - R_{CT(\text{Biosensor})}}{R_{CT(\text{Biosensor})}} \times 100, \quad (2)$$

Where $R_{CT(\text{Biosensor-HPV})}$ is the measured value after recognition of the target DNA, and $R_{CT(\text{Biosensor})}$ corresponds to the initial response of the biosensor (AuNP/PANI-Probe_{HPV}) (Table S1). Of note, ΔR_{CT} is commonly employed to calculate calibration plots of electrochemical biosensors. ΔR_{CT} values (%) are accurate to evaluate the biorecognition process [21].

A linear sensitivity response ranging from 1 to $100\text{ pg }\mu\text{L}^{-1}$ was obtained for the biosensor. The linear regression equations were expressed as $y = 61.32062 + 1.77607 \cdot x$ for HPV11 ($R^2 = 0.9988$) and $y = 100.32791 + 2.07034 \cdot x$ for HPV16 ($R^2 = 0.9947$) (inset of Fig. 4c-d). The y values correspond to ΔR_{CT} and the x values to the concentration ($\text{pg }\mu\text{L}^{-1}$) of the cDNA sample from a patient infected with HPV.

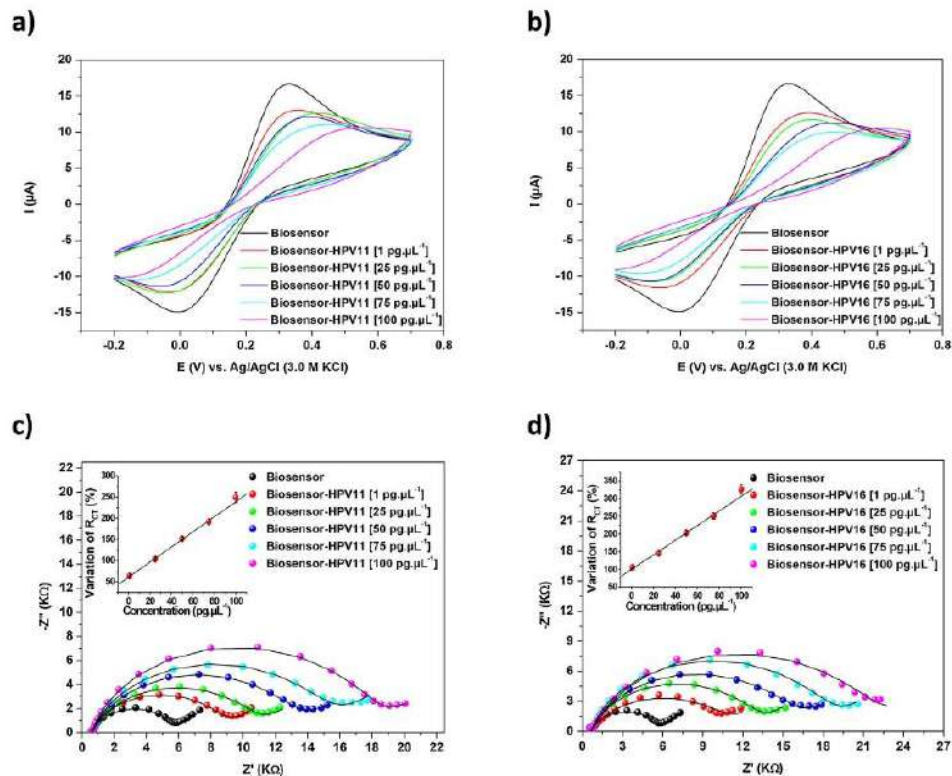


Fig. 4. Cyclic voltammograms (a and b) and impedance spectra (c and d) obtained after exposure of the biosensor to clinical samples from patients infected with HPV11 and HPV16 in variable concentrations (1, 25, 50, 75, and 100 pg μL⁻¹). Inset: Calibration plot of the biosensor for HPV11 (c) and HPV16 (d). Three replicates for each experimental condition were used. Experimental values are described as the mean values $\pm$ their half-deviation.

The LOD of the biosensor was estimated as 2.74 pg μL⁻¹ and 7.43 pg μL⁻¹ for HPV11 and HPV16, respectively. The LOD may be expressed as $3.3\sigma/\text{slope}$, where σ is the standard deviation of blank measurement and the slope corresponds to the angular coefficient of the linear regression equation [22]. We emphasize that reproducibility was expressed as a percentage value of the standard deviation for three individual biosensors obtained under the same experimental conditions. The relative standard deviation was equivalent to 7.74 % (Table S1). This value indicated that the reproducibility of the biosensors was feasible. The repeatability was confirmed by a relative standard deviation of 4.43 % and 6.09 % for HPV11 and HPV16, respectively. The analysis was performed for three times in a single day, using samples with a concentration of 100 pg μL⁻¹.

The selectivity was also evaluated in terms of ΔR_{CT} , where a value of 14.09 % was obtained after the exposition of the biosensor to cDNA sample from non-HPV infected patients. The interaction of the biosensor with non-complementary DNA results in low impedimetric response due to non-specific recognition. Compared to ΔR_{CT} obtained during tests with HPV positive clinical specimens at the same concentration ($\Delta R_{CT(\text{HPV11})} = 249.21$ % and $\Delta R_{CT(\text{HPV16})} = 326.59$ %), the variation of 14.09 % is very small. This fact reflects the selectivity of the analytical system for HPV detection.

3.4. HPV identification in cervical specimens

Recognition probe design is a crucial step for the success of the genomic screening. As described in the literature, MY11 degenerate

probe has been extensively used in conventional diagnostic techniques, such as RT-PCR or qRT-PCR, to demonstrate the positivity for HPV [23]. Of note, MY11 probe can detect all HPV genotypes in biological samples; however, it is not capable of distinguishing them. In this work, MY11 probe was used to identify the HPV L1 gene in electrochemical biosensing assays.

Also, tests were performed with HPV6, HPV31, HPV33, HPV45, and HPV58 to verify the specificity of the DNA biosensor with other HPV genotypes. Quantification of the apparent electrode coverage (θ) after exposure of the DNA biosensor to clinical samples can be calculated by the following equation [16]:

$$\theta = 1 - \frac{R_{CT(\text{Biosensor})}}{R_{CT(\text{Biosensor-HPV})}} \quad (3)$$

where $R_{CT(\text{Biosensor})}$ is the R_{CT} value of the biosensor (AuNP/PANI-ProbeHPV) and $R_{CT(\text{Biosensor-HPV})}$ is the corresponding value for the biosensor after exposure to clinical samples. The surface coverage is related to the number of HPV L1 gene sequences hybridized with a DNA probe on the sensor surface. The bioactivity of the sensor with different HPV genotypes and θ values were presented in Fig. S1. The degree of electrode coverage ranged from 63.50 ± 1.85 % to 80.31 ± 1.15 % for clinical samples from patients infected with HPV. These results can be correlated with the detection capacity of the biosensor for HPV types. θ value of 12.21 ± 4.28 % was obtained for the uninfected sample. Thus, this result demonstrates low non-specific adsorption of oligonucleotide sequences, indicating the specificity of the biosensor for HPV genotypes.

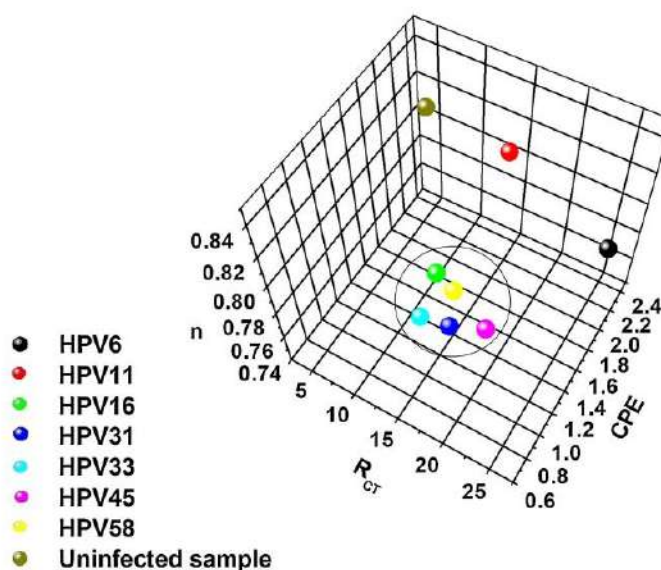


Fig. 5. Three-dimensional plot for the R_{CT} , CPE, and n variables obtained from the theoretical simulation of the Nyquist spectra.

Table 1

Analytical comparison between the proposed biosensor and other genosensors reported in the literature for HPV detection.

Biosensitive system	DNA target	Analytical technique	Detection strategy	Detection time	Detection range	Limit of detection	Reference
Gold surface – AuNP/PANI – probe	HPV11/HPV16	CV and EIS	Label-free electrochemical	15 min	1 pg/ μ L to 100 pg/ μ L	2.74 pg/ μ L, 7.43 pg/ μ L	This work
Pencil graphite surface – HPV 16 E6 probe	HPV16	DPV	Label-free electrochemical	5 min	5 pg/ μ L to 40 pg/ μ L	16 pg/ μ L	[26]
Pencil graphite surface – probe	HPV (L1 gene)	SWV	Labeled electrochemical (methylene blue)	3 min	1.2 ng/ μ L to 50 ng/ μ L	1.2 ng/ μ L	[27]
IDE chip – ZnO Nanorods – AuNP – probe	HPV16	EIS	Label-free electrochemical	10 min	10^{-7} M to 10^{-15} M	1 fM	[30]
Copper oxide nanoparticles functionalized with streptavidin – biotinylated capture probe	HPV16	SERS	Optical	10 min	5 nM to 100 nM	1 nM	[28]
Magnetic glass particles – probe	HPV	Fluorescence spectrophotometry	Optical (CdTe/ZnSe core/shell quantum dots used as fluorescence label)	90 min	–	0.0125 ng/ μ L	[29]

DPV – Differential pulse voltammetry.

SWV – Square wave voltammetry.

SERS – Surface-enhanced Raman scattering.

The interpolation of the R_{CT} , CPE and n variables obtained from the theoretical simulation of the Nyquist spectra enabled the construction of a 3D plot (Fig. 5). The sensor showed distinct electrochemical responses for HPV genotypes of high (HPV16, HPV31, HPV33, HPV45, and HPV58) and low oncogenic risk (HPV6 and HPV11). The recognition profiles were associated with phylogenetic characteristics of the papillomavirus. Of note, HPV genotypes of high and low oncogenic risk are related to different phylogenetic branches [24]. Conserved regions of the viral genome (e.g., L1 gene) can undergo substitution of nucleotide bases in the same viral family.

Degenerate DNA probes provide only positive or negative responses to the presence of HPV in clinical specimens [25] and

can be used for the simultaneous detection of different viral strains. To the best of our knowledge, this is the first time that an electrochemical biosensor for HPV genotypes is capable of differentiating high and low oncogenic risk using a degenerate DNA probe. HPV genotypes are characterized by subtle genome dissimilarities and, therefore, different electrochemical responses can be obtained.

3.5. Comparative study

Table 1 shows an analytical comparison between the proposed biosensor and the other DNA biosensors reported in the literature for HPV detection. PCR and hybrid capture assays are the main molecular techniques for HPV research in clinical labora-

tories. However, these methodologies present disadvantages as false-positive results due to contamination with previously amplified material, time-consuming procedures, and limited sensitivity. In particular, we can highlight the Hybrid Capture® 2 assay (QIA-GEN, Gaithersburg, MD, USA) based on the use of two DNA probes to distinguish between high-risk and low-risk HPV groups [3].

Currently, a wide variety of optical and electrochemical biosensors has been developed for the detection of HPV genotypes [26–29]. However, genotype discrimination is possible with the use of specific oligonucleotides for each papillomavirus [23]. The present report demonstrates that the degenerate MY11 probe is useful for the detection and identification of HPV genotypes through electrochemical techniques.

4. Conclusions

In this paper, we used a degenerate DNA probe for the development of a label-free biosensor, allowing the detection and genotyping of HPV strains in clinical specimens.

A degenerate oligonucleotide sequence was successfully immobilized on the AuNP/PANI nanocomposite. The proposed biosensor is the only described in the literature that suggests an electrochemical differentiation of high and low-risk genotypes through a degenerate DNA probe. This differentiation between HPV strains is relevant to assess potentially oncogenic infections and prevent the development of cervical cancer. Commonly, degenerate probes are applied in conventional molecular methods to analyze the virus presence, without identifying the particular strain. The association between PANI and AuNPs provides an innovative hybrid material with improved physicochemical properties, large surface area, biological compatibility and easy biofunctionalization. A new DNA biosensor was obtained with wide detection range ($1 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ to $100 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$), high sensitivity ($\text{LOD}_{\text{HPV11}} = 2.74 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$; $\text{LOD}_{\text{HPV16}} = 7.43 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$), selectivity, and specificity. The obtained nanosensor can be considered a valid alternative for HPV diagnosis in the clinical specimens with distinction of phylogenetic characteristics.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there are no competing interests for publication of this paper. Statement

Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development/CNPq [grant numbers 302885/2015-3, 310364/2015-9, 302930/2015-9, 314894/2018-7 and 314756/2018-3]; the Brazilian Health Ministry Project DECIT-FINEP-CNPq [grant numbers 1299/2013 and 401700/2015-1]; and the FACEPE-PPSUS-APQ [grant number 0040-4.00/13]. Avelino would like to thank CAPES for a Ph.D. scholarship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113249>.

References

- [1] B. Serrano, M. Brotons, F.X. Bosch, L. Bruni, Epidemiology and burden of HPV-related disease, *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 47 (2018) 14–26.
- [2] H. Huang, W. Bai, C. Dong, R. Guo, Z. Liu, An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on graphene/Au nanorod/polythionine for human papillomavirus DNA detection, *Biosens. Bioelectron.* 68 (2015) 442–446.
- [3] E. Rasouli, Z. Shahnava, W.J. Basirun, M. Rezayi, A. Avan, M. Ghayour-Mobarhan, et al., Advancements in electrochemical DNA sensor for detection of human papilloma virus? a review, *Anal. Biochem.* (2018).
- [4] P. Mahmoodi, M. Fani, M. Rezayi, A. Avan, Z. Pasdar, E. Karimi, et al., Early detection of cervical cancer based on high-risk HPV DNA-based genosensors: a systematic review, *BioFactors* 45 (2019) 101–117, <http://dx.doi.org/10.1002/biof.1465>.
- [5] D. Sadighbayan, K. Sadighbayan, A.Y. Khosroushahi, M. Hasanazadeh, Recent advances on the DNA-based electrochemical biosensing of cancer biomarkers: analytical approach, *Trac Trends Anal. Chem.* 119 (2019) 1–29, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2019.07.020>.
- [6] E.E. Ferapontova, DNA electrochemistry and electrochemical sensors for nucleic acids, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 11 (2018) 197–218.
- [7] S. Shrivastava, N. Jadon, R. Jain, Next-generation polymer nanocomposite-based electrochemical sensors and biosensors: a review, *Trac Trends Anal. Chem.* 82 (2016) 55–67.
- [8] K.Y.P.S. Avelino, I.A.M. Frias, N. Lucena-Silva, R.G. Gomes, C.P. de Melo, M.D.L. Oliveira, et al., Attomolar electrochemical detection of the BCR/ABL fusion gene based on an amplifying self-signal metal nanoparticle-conducting polymer hybrid composite, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 148 (2016) 576–584.
- [9] N. Elahi, M. Kamali, M.H. Baghersad, Recent biomedical applications of gold nanoparticles: a review, *Talanta* 184 (2018) 537–556, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.088>.
- [10] S. Kumar, W. Ahlawat, R. Kumar, N. Dilbaghi, Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare, *Biosens. Bioelectron.* 70 (2015) 498–503.
- [11] F. Ran, Y. Tan, W. Dong, Z. Liu, L. Kong, L. Kang, In situ polymerization and reduction to fabricate gold nanoparticle-incorporated polyaniline as supercapacitor electrode materials, *Polym. Adv. Technol.* 29 (2018) 1697–1705.
- [12] C. Dhand, M. Das, M. Datta, B. Malhotra, Recent advances in polyaniline based biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 2811–2821.
- [13] R.F.S. Santos, C.A.S. Andrade, C.G. dos Santos, C.P. de Melo, Visible luminescence in polyaniline/gold nanoparticle composites, *J. Nanoparticle Res.* 15 (2013) 1408.
- [14] R. Singh, C. Dhand, G. Sumana, R. Verma, S. Sood, R.K. Gupta, et al., Polyaniline/carbon nanotubes platform for sexually transmitted disease detection, *J. Mol. Recognit.* 23 (2010) 472–479.
- [15] A. Dey, A. Kaushik, S.K. Arya, S. Bhansali, Mediator free highly sensitive polyaniline–gold hybrid nanocomposite based immunosensor for prostate-specific antigen (PSA) detection, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 14763–14772.
- [16] M.P. Costa, C.A.S. Andrade, R.A. Montenegro, F.L. Melo, M.D.L. Oliveira, Self-assembled monolayers of mercaptobenzoic acid and magnetite nanoparticles as an efficient support for development of tuberculosis genosensor, *J. Colloid Interface Sci.* 433 (2014) 141–148.
- [17] K.Y.P.S. Avelino, C.A.S. Andrade, C.P. de Melo, M.L. Nogueira, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, et al., Biosensor based on hybrid nanocomposite and Cramoll lectin for detection of dengue glycoproteins in real samples, *Synth. Met.* 194 (2014) 102–108.
- [18] M.F.K.d.S. Garcia, C.A.S. Andrade, C.P. de Melo, D.S. Gomes, L.G. Silva, R.V. Dias, et al., Impedimetric sensor for Leishmania infantum genome based on gold nanoparticles dispersed in polyaniline matrix, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (2016) 2810–2816.
- [19] G.C. Pedro, F.D. Gorza, R.J. da Silva, K.T. do Nascimento, J.C. Medina-Illamas, A.E. Chávez-Guajardo, et al., A novel nucleic acid fluorescent sensing platform based on nanostructured films of intrinsically conducting polymers, *Anal. Chim. Acta* 1047 (2019) 214–224.
- [20] S.V. de Lima, H.P. de Oliveira, C.A. Andrade, C.P. de Melo, A dielectric study of interpolymer complexes of polyaniline and DNA, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 471 (2015) 139–147.
- [21] A. Butterworth, E. Blues, P. Williamson, M. Cardona, L. Gray, D.K. Corrigan, SAM composition and electrode roughness affect performance of a DNA biosensor for antibiotic resistance, *Biosensors* 9 (2019) 22.
- [22] P. Supraja, S. Tripathy, S.R.K. Vanjan, V. Singh, S.G. Singh, Electrospun tin (IV) oxide nanofiber based electrochemical sensor for ultra-sensitive and selective detection of atrazine in water at trace levels, *Biosens. Bioelectron.* (2019), 111441.
- [23] Z. Chen, L.B. De Freitas, R.D. Burk, Evolution and classification of oncogenic human papillomavirus types and variants associated with cervical cancer, in: *Cervical Cancer*, Springer, 2015, pp. 3–26.
- [24] M. Schiffman, R. Herrero, R. DeSalle, A. Hildesheim, S. Wacholder, A.C. Rodriguez, et al., The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution, *Virology* 337 (2005) 76–84.
- [25] D. Dell'Atti, M. Zavaglia, S. Tombelli, G. Bertacca, A.O. Cavazzana, G. Bevilacqua, et al., Development of combined DNA-based piezoelectric biosensors for the simultaneous detection and genotyping of high risk Human Papilloma virus strains, *Clin. Chim. Acta* 383 (2007) 140–146.
- [26] D.S. Campos-Ferreira, E.V. Souza, G.A. Nascimento, D.M. Zanforlin, M.S. Arruda, M.F. Beltrão, et al., Electrochemical DNA biosensor for the detection of human papillomavirus E6 gene inserted in recombinant plasmid, *Arab. J. Chem.* 9 (2016) 443–450.
- [27] R. Sabzi, B. Sehatnia, M. Pournaghi-Azar, M. Hejazi, Electrochemical detection of human papilloma virus (HPV) target DNA using MB on pencil graphite electrode, *J. Iran. Chem. Soc.* 5 (2008) 476–483.

- [28] Z. Yang, C. Yi, S. Lv, Y. Sheng, W. Wen, X. Zhang, et al., Development of a lateral flow strip biosensor based on copper oxide nanoparticles for rapid and sensitive detection of HPV16 DNA, *Sens. Actuators B Chem.* 285 (2019) 326–332.
- [29] A.M.J. Jimenez, A. Moulick, S. Bhowmick, V. Strmiska, M. Gagic, Z. Horakova, et al., One-step detection of human papilloma viral infection using quantum dot-nucleotide interaction specificity, *Talanta* 205 (2019), 120111.
- [30] T. Ramesh, K.L. Foo, R. Haarindraprasad, A.J. Sam, M. Solayappan, Gold-Hybridized Zinc oxide nanorods as Real-time Low-cost nanoBiosensors for Detection of virulent DNA signature of HPV-16 in cervical carcinoma, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–17.

Electronic Supporting Material

**METAL-POLYMER HYBRID NANOMATERIAL FOR IMPEDIMETRIC
DETECTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN CERVICAL SPECIMENS**

Karen Y.P.S. Avelino^{1,2}, Léony S. Oliveira², Norma Lucena-Silva^{3,4}, Celso Pinto de Melo⁵,
César A.S. Andrade^{1,2}, Maria D.L. Oliveira^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

²Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

³Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), 50670-420 Recife, PE, Brazil.

⁴Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Oncologia Pediátrica, Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), 50070-550 Recife, PE, Brazil.

⁵Laboratório de Polímeros Não-Convencionais, Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

*To whom correspondence should be addressed.

Maria D.L. Oliveira, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil

Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547

E-mail: m_danielly@yahoo.com.br

Table S1. Values of the equivalent circuit elements obtained from the fitting of the impedance results for each assembly step of the biosensor and its bioactivity after exposure to clinical samples (cDNA) of infected patients with different subtypes of HPV and uninfected clinical samples. Three replicates for each experimental condition were used. The experimental values are described as the mean values $\pm$ their half-deviation.

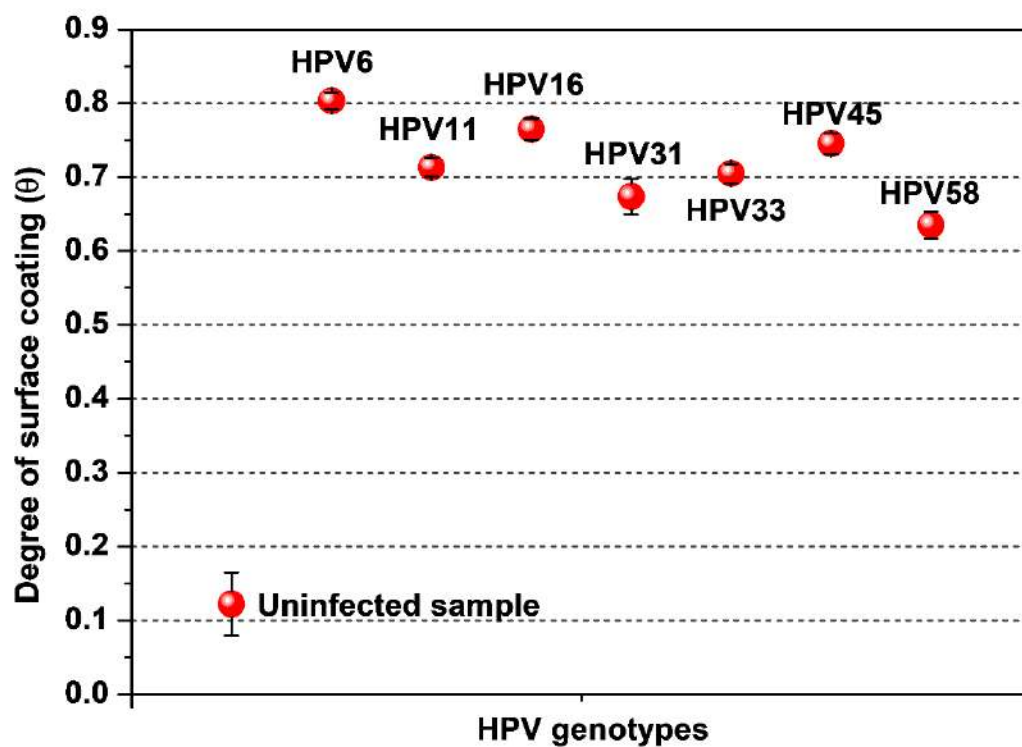
Modified electrode	Clinical sample (pg μL^{-1})	R_s (Ω)	CEP (μF)	R_{CT} ($k\Omega$)	W	n	ΔR_{CT} (%)
Bare gold electrode	-	501 $\pm$ 3.78	11.48 $\pm$ 2.30	0.24 $\pm$ 0.003	517 $\pm$ 2.08	0.48 $\pm$ 0.02	-
AuNp/PANI	-	496 $\pm$ 0.58	5.99 $\pm$ 0.11	2.64 $\pm$ 0.08	655 $\pm$ 1.53	0.79 $\pm$ 0.005	-
AuNp/PANI-Probe _{HPV}	-	609 $\pm$ 1	2.27 $\pm$ 0.03	5.04 $\pm$ 0.39	518 $\pm$ 7.02	0.83 $\pm$ 0.002	-
Biosensor-HPV16	1	616 $\pm$ 2.67	6.68 $\pm$ 0.12	10.40 $\pm$ 0.67	630 $\pm$ 13.21	0.71 $\pm$ 0.003	106.35 $\pm$ 3.87
Biosensor-HPV16	25	654 $\pm$ 4.66	2.56 $\pm$ 0.02	12.40 $\pm$ 0.78	413 $\pm$ 10.74	0.82 $\pm$ 0.002	146.03 $\pm$ 4.32
Biosensor-HPV16	50	623 $\pm$ 2.31	2.47 $\pm$ 0.03	15.30 $\pm$ 0.83	375 $\pm$ 5.84	0.80 $\pm$ 0.002	203.57 $\pm$ 5.89
Biosensor-HPV16	75	647 $\pm$ 6.87	2.25 $\pm$ 0.03	17.70 $\pm$ 0.74	379 $\pm$ 5.45	0.84 $\pm$ 0.003	251.19 $\pm$ 8.92
Biosensor-HPV16	100	616 $\pm$ 5.43	4.04 $\pm$ 0.08	21.50 $\pm$ 1.31	670 $\pm$ 12.84	0.79 $\pm$ 0.001	326.59 $\pm$ 12.45
Biosensor-HPV11	1	625 $\pm$ 7.58	2.44 $\pm$ 0.01	8.26 $\pm$ 0.54	457 $\pm$ 9.88	0.81 $\pm$ 0.003	63.89 $\pm$ 2.13
Biosensor-HPV11	25	609 $\pm$ 2.41	3.09 $\pm$ 0.02	10.27 $\pm$ 0.49	509 $\pm$ 11.47	0.79 $\pm$ 0.002	103.77 $\pm$ 2.68
Biosensor-HPV11	50	636 $\pm$ 5.89	2.23 $\pm$ 0.01	12.70 $\pm$ 0.51	416 $\pm$ 13.68	0.81 $\pm$ 0.003	151.98 $\pm$ 4.51
Biosensor-HPV11	75	614 $\pm$ 6.01	1.95 $\pm$ 0.01	14.70 $\pm$ 0.56	322 $\pm$ 8.92	0.83 $\pm$ 0.003	191.67 $\pm$ 6.93
Biosensor-HPV11	100	609 $\pm$ 2.45	1.76 $\pm$ 0.02	17.60 $\pm$ 0.78	440 $\pm$ 15.63	0.85 $\pm$ 0.002	249.21 $\pm$ 12.56
Biosensor-HPV6	100	519 $\pm$ 0	0.88 $\pm$ 0.01	25.67 $\pm$ 1.50	332 $\pm$ 3.51	0.78 $\pm$ 0.001	409.26 $\pm$ 29.78
Biosensor-HPV31	100	586 $\pm$ 1	1.28 $\pm$ 0.02	15.50 $\pm$ 1.15	457 $\pm$ 17	0.76 $\pm$ 0.002	207.54 $\pm$ 22.88

Biosensor-HPV33	100	542 ± 0.58	0.75 ± 0.01	17.10 ± 0.75	345 ± 3.51	0.82 ± 0,001	239.28 ± 14.98
Biosensor-HPV45	100	559 ± 0.58	1.22 ± 0.02	19.83 ± 1.11	417 ± 2.31	0.78 ± 0.001	293.52 ± 21.94
Biosensor-HPV58	100	499 ± 4.58	1.56 ± 0.53	13.83 ± 0.71	468.6 ± 23.75	0.76 ± 0.04	174.47 ± 14.08
Biosensor-uninfected sample	100	647 ± 4.76	2.23 ± 0.74	5.75 ± 0.28	463 ± 19.24	0.820 ± 0.03	14.09 ± 1.14

Table S2. The amperometric anodic shift for the biosensor after exposure to clinical samples (cDNA) of infected patients with HPV11 and HPV16 genotypes and uninfected clinical sample.

Modified electrode	Clinical sample (pg μL^{-1})	Before (I_b μA)	After (I_a μA)	ΔI (%)
Biosensor	-	15.09	-	-
Biosensor-HPV11	1	-	11.11	26.43
Biosensor-HPV11	25	-	9.29	38.44
Biosensor-HPV11	50	-	8.91	41.03
Biosensor-HPV11	75	-	7.41	50.99
Biosensor-HPV11	100	-	4.53	69.98
Biosensor-HPV16	1	-	9.63	36.18
Biosensor-HPV16	25	-	8.78	41.81
Biosensor-HPV16	50	-	6.75	55.26
Biosensor-HPV16	75	-	5.64	62.62
Biosensor-HPV16	100	-	3.12	79.32
Biosensor-uninfected sample	100	-	13.92	7.75

Figure S1. Apparent electrode coverage (Θ) after exposure of the DNA biosensor to clinical samples. Three replicates for each experimental condition were used. The experimental values are described as the mean values $\pm$ their half-deviation.



5.2 ARTIGO 2

Artigo submetido na revista *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*

(fator de impacto: 5,469)

***Impedimetric sensing platform for human papillomavirus and p53 tumor suppressor gene
in cervical samples***

IMPEDIMETRIC SENSING PLATFORM FOR HUMAN PAPILLOMAVIRUS AND P53 TUMOR SUPPRESSOR GENE IN CERVICAL SAMPLES

Karen Y.P.S. Avelino^{a,b}, Léony S. Oliveira^{a,b}, Helinando P. de Oliveira^c, Norma Lucena-Silva^{d,e}, César A.S. Andrade^{a,b}, Maria D.L. Oliveira^{a,b*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

^bLaboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

^cInstituto de Pesquisa em Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Juazeiro, Brazil.

^dInstituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), 50670-420 Recife, PE, Brazil.

^eLaboratório de Biologia Molecular, Departamento de Oncologia Pediátrica, Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), 50070-550 Recife, PE, Brazil.

*To whom correspondence should be addressed.

Maria D.L. Oliveira, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil

Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547

E-mail: m_danielly@yahoo.com.br

Abstract

The oncogenic human papillomavirus (HPV) is an excellent biomarker for cervical cancer screening. Biomarkers are effective for disease prevention, diagnosis, and treatment. The present research details the construction of an integrated sensor platform (biosensor_{MY11} and biosensor_{p53}) for the impedimetric detection of the HPV L1 sequence and p53 tumor suppressor gene. The nanostructured transducer was developed through electrochemical polymerization of polypyrrole (PPy) associated with the electrosynthesis of gold nanoparticles (AuNPs). Methodological strategies based on cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS), scanning electron microscopy (SEM), and atomic force microscopy (AFM) were employed. The exposure of the genetic biosensors to molecular targets triggered changes in the analytical signals, indicating the biorecognition process. Calibration plots for the biosensor_{MY11} showed a linear range between 0.001 to 100 pg μL^{-1} for all analyzed genotypes (HPV6, 11, 16, 18, 45, 53, 54, and 58). The detection limits were measured between 0.11 to 0.61 pg μL^{-1} and limits of quantification between 0.33 to 1.86 pg μL^{-1} . The sensors exhibited reproducibility with a relative standard deviation of 4.21% and high repeatability (2.5%) for all tests at variable concentrations. Two electrochemical profiles were obtained for high and low-risk HPV groups, suggesting the differential diagnosis using a degenerate oligonucleotide probe. Through biosensor_{p53} it was possible to correlate the p53 gene expression in clinical samples infected with papillomavirus. Therefore, the proposed sensing device represents an emerging and technological trend for the integrated monitoring of biomarkers related to cervical cancer with ultra-sensitive analytical performance.

Keywords: Biosensor; cervical cancer; electrochemical impedance; HPV; polypyrrole; p53 gene.

1. Introduction

Human papillomavirus (HPV) is a double-stranded DNA virus coated with a protein capsid that infects the stratified epithelium's basal cell layer by integrating the genome into the host's DNA [1]. Although more than 200 HPV genotypes have been recognized to date, only a small group is responsible for the predominance of the viral disease. Most HPV infections are asymptomatic and spontaneously extinguished. The International Agency for Research on Cancer (IARC) describes 12 HPV genotypes as carcinogenic to humans (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, and 59). High-risk oncogenic HPVs are responsible for approximately 100% of cervical cancer cases and a portion of the vulva, vagina, penis, anus, head, and neck cancers. In contrast, low-risk oncogenic HPVs (HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, and 81) entail anogenital warts and recurrent respiratory papillomatosis [2].

HPV plays a critical function in the etiology of cervical cancer [1]. HPV life cycle causes cell multiplication and, occasionally, immortalization and malignant transformation. The action mechanism is mainly associated with the biological activity of two HPV genes: E6 and E7, whose products interfere with the cell cycle control. The p53 and Rb (retinoblastoma) proteins are the main targets of the E6 and E7 oncogenic proteins, respectively. Because of the proteolytic degradation of the p53 protein, the organism can increase the expression of the p53 gene to maintain its regulatory activities [3]. The p53 gene expression in cervical keratinocytes is used to evaluate the advancement of precancerous lesions to cervical cancer. However, the prognostics based only on the p53 protein may be inaccurate [4].

The existence of a strong relationship between high-risk HPV infection and cervical carcinogenesis emphasizes the relevance of early diagnosis. The commercially available molecular protocols are mainly based on signal amplification assays (Hybrid Capture® 2, Cervista® HPV HR and Cervista® HPV16/18) and nucleic acid amplification assays (PapilloCheck®, Cobas® HPV test, CLART® HPV and Aptima HPV Assay) [5]. These tests allow the identification of the HPV genetic material but do not monitor its oncogenic activity. The real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and hybrid capture are presumptive techniques for HPV diagnostic. Both methods present high specificity; however, they require increased investments to acquire equipment and reagents, professional qualification, laborious experimental protocols with an extended analysis time, and large amounts of the purified biological sample [6]. It is emphasized that the simultaneous clinical investigation of papillomavirus and p53 gene is not routine in primary health units and medical complexes. However, it can be deduced that the combined strategy of genetic

monitoring would enable better management, prognostic evaluation, and therapeutic decision for the disease.

New methodologies for gene screening with high bioanalytical performance, accuracy, and simplicity are essential for the molecular diagnosis and staging of HPV infection [7]. Genosensors are a technological apparatus based on oligonucleotide sequences' hybridization process, widely applicable to clinical and laboratory research. Remarkably, electrochemical genosensors are highly specific and discriminate DNA segments with single nucleotide polymorphism. This attractive feature associated with the genetic design of the biorecognition probes can lead to viral genotyping and identification of multiple genes [8].

Analyte-sensitive polymeric supports are explored for the prospection of biosensors with advanced electrochemical qualities [9]. Polypyrrole (PPy) is a conductive organic polymer used to construct sensitive and selective sensor devices. This polyconjugate has electronic properties of metals and mechanical characteristics and processibility of conventional polymers. Additionally, PPy exhibits high conductivity, environmental stability, relative biocompatibility, and low cost [10]. In this aspect, viral biosensors based on electropolymerized films have been extensively used due to simplicity, controllable film thickness, easy doping process, and the use of relatively low oxidation potentials for the deposition of PPy [11]. However, the application of polypyrrole in detection devices for papillomaviruses is limited.

In addition to polymeric materials, gold nanoparticles (AuNPs) also stand out due to their excellent biocompatibility, conductivity, high surface-to-volume ratio, catalytic properties, and size and shape experimentally controlled. AuNPs provide a stable surface for the immobilization of biomolecules with high electron transfer kinetics. Also, electrochemical measurements can be performed without the presence of molecular labels [12]. AuNPs offer prospects to increase the effectiveness and robustness of biodetection systems [13].

Carbon nanotubes [14], graphene [15], AuNPs [14], gold nanorods [15], zinc oxide nanorods [16], chitosan [17], and polyaniline [18] have been applied for surface functionalization and improvement of the sensing characteristics in HPV biodevices. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) [15, 16], cyclic voltammetry (CV) [19], square wave voltammetry (SWV) [17], and differential pulse voltammetry (DPV) [6, 15] are the main electroanalytical techniques employed for biosensors.

In the present study, an integrated sensor platform (biosensor_{MY11} and biosensor_{p53}) based on PPy, AuNPs, and cysteamine (Cys) was designed to analyze the HPV L1 sequence

and p53 tumor suppressor gene. The nanostructured sensor system exhibited superior analytical parameters for the sensitive, selective, and specific detection of target genes in cervical specimens. Different electrochemical profiles were obtained for high and low-risk HPV groups, suggesting a differential diagnosis of HPV with oncogenic prediction. Also, biological samples positive for high-risk HPV were correlated with the expression of the p53 gene to assess neoplastic development.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Pyrrole (98%), tetrachloroauric acid (HAuCl_4) ($\geq 49.0\%$), Cys ($\sim 95\%$), bovine serum albumin (BSA) ($\geq 98\%$), hydrochloric acid (HCl) (37%), potassium ferricyanide ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) ($\geq 99.0\%$), potassium ferrocyanide ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) (98.5-102.0%), glutaraldehyde (25%), sodium phosphate monobasic and dibasic ($\geq 99.0\%$), and alumina paste ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Trizol was acquired from Invitrogen Co. Ltd. (Carlsbad, CA, USA). Tridistilled water (Milli-Q water) was obtained from a Milli-Q plus purification system (Billerica, MA, USA).

2.2. Oligonucleotide probes and biological samples

Two different types of DNA probes functionalized with terminal amino groups were used in the biodetection assays. MY11 probe with sequence 5'-amine-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3' [22] and probe for p53 gene identification with sequence 5'-amine-TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA-3' [23] were purchased from Invitrogen Co. Ltd. (Carlsbad, CA, USA). The MY11 probe is a degenerate oligonucleotide used to detect a conserved region in the HPV L1 gene. Samples of recombinant plasmids were obtained by subcloning the L1 gene sequence of different types of HPV (HPV6, 11, 16, 18, 45, 53, 54, and 58) in a pTA vector. The sequencing of recombinant plasmids was performed using primers complementary to the plasmid backbones to confirm the subcloning of the HPV L1 gene. Total RNA was extracted from cervical cells using Trizol reagent. Then, the reverse transcription of the RNA samples was performed to obtain the cDNA, using a random primer. The biological material was collected with the patients' informed consent. The local ethics committee approved the project (process n° CAAE 23698513.0.0000.5190). PCR assays and agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide were used for routine detection of

the samples. As a result, identifying the HPV genotypes in the biological material was obtained and its description as a positive or negative sample for papillomavirus. Serial dilutions of the samples were made in 10 mM phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4 and kept frozen.

2.3. Construction of the nanostructured sensor system

DNA biosensors based on a polymeric nanostructured platform were constructed on a metal transducer. The bare gold electrode ($\phi = 2$ mm) was polished using a felt disk with alumina suspension (0.05 μm) followed by ultrasonication in deionized water for 10 min. The assembly of the sensor system was performed in five steps as described below. Electrochemical polymerization of pyrrole corresponds to the initial step. In this first step, the working electrode was immersed in a 0.5 M HCl solution containing the pyrrole monomer at a concentration of 30 mM. Six cycles of voltammetric polymerization were applied in a potential range from -0.2 to +0.7 V with a scan rate of 100 mV s^{-1} . The electrosynthesis of AuNPs on the PPy comprises the second step. For this purpose, a 0.25 mM HAuCl₄ solution was used. Ten voltammetric cycles in the potential range from +0.2 to -1 V and scan rate of 50 mV s^{-1} were applied to the electrode previously modified with PPy. The chemisorption process of Cys molecules on the AuNPs reports the third step. This phenomenon is established from the strong chemical attraction between the sulfur atoms of the thiol groups (-SH) of the Cys molecules and the gold atoms of the metallic nanostructures. Thus, covalent bonds are formed. For this surface modification, 2 μL of a 2 mg/mL Cys solution (ethanol:water, 3:1) was added by the drop coating method for 30 min to anchor the biorecognition sequences chemically.

After, the nanostructured electrode was exposed to 2 μL of 0.5% glutaraldehyde for 10 min. Then, 10 mM oligonucleotide solution ($v = 2$ μL) was added for 15 min. Schiff bases were formed by a chemical reaction between the aldehyde groups of the cross-linking agent (glutaraldehyde) and the amino groups of the Cys molecules and modified DNA probes. A degenerate oligonucleotide sequence for recognizing the HPV L1 gene (commonly called MY11 probe) and an oligonucleotide sequence for the p53 gene detection were used to obtain the sensor. Finally, the blocking of non-functional sites on the electrode was accomplished by the incorporation of BSA molecules. In this step, 2 μL of a 1% BSA solution (pH 7.4) were added for 30 seconds. The construction of the sensor system is illustrated in Fig. 1.

2.4. Studies of biodetection and evaluation of the cervical tumorigenesis

Sensitivity and selectivity studies were conducted after exposure of the biosensor_{MY11} to recombinant plasmids containing the HPV L1 gene at variable concentrations and HPV positive clinical samples. Non-complementary DNA sequences and cDNA samples from HPV-negative patients having the genome of *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*, and Hepatitis C virus (HCV) were used for specificity tests. The monitoring of the p53 tumor suppressor gene was performed in clinical specimens to assess cervical tumorigenesis. HPV and p53 gene diagnoses were performed by dropping 2 μL of each sample on the sensor surface for 15 min. The biological samples were heated at 94°C for denaturation of the double-stranded DNA molecules (dsDNA).

2.5. Electrochemical measurements

The electrochemical characterization was carried out in a PGSTAT 128N potentiostat/galvanostat (Metrohm Autolab, The Netherlands) interfaced with the NOVA 1.11 software. A three-electrode cell in potentiostatic mode was used to perform the CV and EIS experiments. A gold electrode was used as a working electrode, platinum wire as a counter electrode, and Ag/AgCl electrode saturated with KCl (3 M) as a reference electrode. CV and EIS measurements were performed in PBS (10 mM, pH 7.4) containing 10 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1, v/v). The potential was ranged from -0.2 to 0.7 V at a scan rate of 50 mV s^{-1} to perform the voltammetric experiments. The impedance spectra were obtained from a sinusoidal potential perturbation with an amplitude of 0.01 V and a number of frequencies equal to 30, logarithmically distributed over a range from 100 mHz to 100 kHz. Triplicate measurements were performed at room temperature ($24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) and inside a Faraday cage.

2.6. Microscopy measurements

A topographical evaluation was conducted using an SPM-9500 atomic force microscope (Shimadzu Corporation, Japan). AFM images were recorded in a non-contact mode in the air at room temperature. Cantilevers with aluminum-coated silicon probe were used (Nanoworld, Japan, resonant frequency = 300 kHz, spring constant = 42 N m^{-1}). The image acquisition resolution was 512 pixels per line (512×512 pixels/image) in a scan area of $5 \times 5 \mu\text{m}$. The Gwyddion® software was employed to evaluate the AFM pictures collected

from macroscopically separated regions of each sample. SEM images were provided by a scanning electron microscope (Vega 3XM Tescan) at an accelerating voltage of 20 kV.

3. Results and discussion

3.1. Microscopic analysis

SEM and AFM analyzes were performed to evaluate the surface morphology of the sensor system (Fig. 2). PPy film exhibited “cauliflower” structures, which is the expected morphology for PPy films prepared by electropolymerization methodology (Fig. 2a) [24]. In the topographic image, a nodular polymeric matrix with a maximum height of 322 nm was visualized. The number and size of the PPy globular structures can vary depending on the oxidation and reduction state of the polymer, pyrrole concentration, nature of the doping ions, and electrosynthesis parameters employed, such as potential value and number of scan cycles [25]. The electrochemical deposition of AuNPs on the PPy surface was evidenced by SEM characterization, where the presence of spherical structures distributed along the electrode surface was observed (Fig. 2b). The functionalization of AuNPs with organosulfur Cys molecules is shown in Fig. 2c. SEM micrograph shows the homogeneity of the nanostructured platform based on PPy-AuNPs-Cys with topographic peaks of up to 456 nm. The chemisorption was coordinated by the interaction between the Cys’ thiol groups and the AuNPs [27]. The MY11 probe immobilization was mediated through glutaraldehyde. BSA was used to block non-specific sites. Microscopic analysis revealed that the biosensor_{MY11} has a distinct morphological profile, characterized by a robust nanoarchitecture with greater surface roughness (Fig. 2d). AFM shows well-defined peaks and valleys with a maximum height of 579 nm, where spherical aggregates possibly related to globular proteins (BSA) can be observed. A granular topology with a maximum peak of 1.62 μm was obtained after exposure of the biosensor_{MY11} to the HPV33 L1 gene (Fig. 2e).

3.2. Electrochemical characterization of the sensing platform

CV and EIS are effective techniques to evaluate the interfacial properties of the biosensors. EIS is an electroanalytical method whose measurements are commonly presented as Nyquist plots. The semicircle diameter is equal to the resistance to charge transfer (R_{CT}) associated with the electron transfer kinetics between the electrolyte solution and the electrode surface. Electrical circuits, such as Randle’s circuit (Fig. 3b), can be used to

determine additional parameters, such as solution resistance (R_s), constant phase element (CPE), and Warburg impedance (Z_w). The impedimetric variables of the developed system, obtained by theoretical simulation, were presented in the supplementary material (Tables S1 and S2).

The physical-chemical characterization of the modified transducer is shown in Fig. 3. Well-defined redox peaks were observed for the oxidation and reduction of electrochemical species on the bare gold electrode ($I_{PA} = 45.53 \pm 0.53 \mu A$). The impedimetric investigation also evidenced a typical diffusion-limited behavior ($R_{CT} = 0.17 \pm 0.001 k\Omega$). Cyclic voltammogram for the gold substrate coated with PPy revealed a high current density ($I_{PA} = 62.62 \pm 0.87 \mu A$) due to its inherently conductive feature. Impedance spectrum exhibited a low R_{CT} ($0.02 \pm 0.001 k\Omega$) with a high electron transport rate, favoring the development of the nanostructured platform with high analytical sensitivity [9].

Subsequently, the PPy matrix was decorated with gold nanoparticles (AuNPs) to increase the adsorption area of biomolecules and amplify the output signal. AuNPs induced a slight decrease in the voltammetric signal ($I_{PA} = 53.75 \pm 0.42 \mu A$) with a reduced charge distribution in the electrical double layer ($R_{CT} = 0.78 \pm 0.023 k\Omega$). This interfacial phenomenon is possibly related to the interference of AuNPs in the doping/de-doping reactions of the PPy film, leading to changes in the oxidation-reduction process of the conjugated polymer [28].

The functionalization of AuNPs with organosulfur molecules was performed to anchor oligonucleotide probes. The formation of a self-assembled Cys layer increases the peak currents ($I_{PA} = 60.35 \pm 1.62 \mu A$) and a reduction in the electrochemical resistivity ($R_{CT} = 0.62 \pm 0.02 k\Omega$). The mentioned event is attributed to the electrostatic interaction between the negative charge of the $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ electrolytes and the positively charged amino-terminal group of the Cys molecule [29].

Amperometric measurements decreased after chemical immobilization of the DNA sequences ($I_{PA} = 44.62 \pm 1.63 \mu A$). Furthermore, an enlargement of the high-frequency region was observed in the EIS graph ($R_{CT} = 2.74 \pm 0.08 k\Omega$), indicating the proper formation of the biorecognition layer. The observed electrochemical effect is due to the blocking of single-stranded DNA (ssDNA) molecules on the permeability of electroactive species [30]. The filling of non-functional sites in the biosensitive system by BSA molecules caused a decrease in the conductivity ($I_{PA} = 38.88 \pm 1.30 \mu A$) and an increase in the impedimetric resistance

($R_{CT} = 4.30 \pm 0.18 \text{ k}\Omega$). This result is due to an additional kinetic barrier for the redox pair [31].

As shown in Fig. S1, the reduction and oxidation potentials of the biomodified transducer move in the negative and positive directions, respectively. Peak currents of the anode and cathode increased linearly with increasing scanning speed (10 to 150 mV s^{-1}). Therefore, it is suggested that the sensing platform has a reversible electron transfer rate on the transducer surface.

3.3. Optimization of experimental conditions

3.3.1. Study of electrochemically polymerized PPy

The potentiodynamic electropolymerization of pyrrole monomers was presented in Fig. S2. The nucleation loop was observed predominantly in the initial deposition stage, and the reproducible and uniform growth follows at the later stage. The voltammograms demonstrated an anodic peak at about 0.9 V, indicating the formation of the PPy film after the oxidation of the polymeric species (Fig. S2a). Six polymerization cycles were ideal for covering the gold electrode with PPy, resulting in a maximum current response (Fig. S2b). The I_{PA} decrease after six voltammetric cycles is related to the trapping of oxidation products, oxidative degradation (superoxidation) of the polymeric film, and consumption of pyrrole monomers at each voltammetric scan [32]. The uniformity, conductivity, and adherence observed for the PPy film, associated with the simplicity and reproducibility of the electrochemical polymerization method, results in the electrosynthesized polymeric film as an excellent substrate for sensor devices.

3.3.2. Concentration study of the recognition probe

The effects of the bioreceptor concentration (10, 20, 30, 40, 50, 60, and $70 \text{ }\mu\text{M}$) on the electrochemical profile were studied (Fig. S3). We verified that the voltammetry curves became more sigmoid with a profile of quasi-reversibility, and the impedance values increased after the concentration of $10 \text{ }\mu\text{M}$. For this reason, the optimal deposition concentration for assay operation was $10 \text{ }\mu\text{M}$. Higher DNA concentrations caused significant changes in the electrochemical system profile associated with disordered molecular conformations [33].

3.4. Analytical performance with synthetic DNA samples

The hybridization assay was conducted with the L1 gene from different HPV genotypes (HPV6, 11, 16, 18, 45, 53, 54, and 58) at variables concentrations (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The absolute current intensity decreased with increasing analytical concentration for all cyclic curves obtained for the biosensor_{MY11} against synthetic DNA samples (Fig. S4). This electrochemical event is related to capturing the target oligonucleotide on the sensor surface, causing electrostatic repulsion between the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ electroactive anions and the hybrid DNA structure's phosphate groups. Consequently, changes in voltammetric records can be associated with the biospecific interaction mechanism [34].

R_{CT} values are electrochemical parameters closely related to the concentration of molecular targets, capable of providing a quantitative detection assay for the papillomavirus. The impedance spectra recorded the bioanalysis process for the L1 gene of different HPV genotypes (Fig. S5). The nanostructured device's interfacial impedance gradually became more significant as the analyte concentration increased, attributed to the oligonucleotide anchoring. Specifically, this fact is evidenced by the broader semicircular regions under high frequencies. As previously mentioned, the dsDNA molecules formed on the receptor layer hinder the transit of electrons between the transducer and the redox species, causing an increase in the resistive properties. Thus, the accuracy of the diagnostic test was verified through the proposed tool's performance to recognize truly positive samples.

The validation parameters of the proposed electrochemical methodology were extrapolated from the R_{CT} values for the gene identification tests. The nanostructured system showed reproducibility with a variation of 4.21%. During the experiments, three independent biosensors were constructed via the same set of experimental procedures. Repeatability less than 2.5% was estimated considering the relative standard deviation for all molecular tests with the target oligonucleotide using variable concentrations. The degree of agreement between successive analytical measurements was evaluated at least three times in a single day. Calibration plots exhibited a linear correlation with the logarithmic value of the L1 gene concentrations from (0.001 to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Fig. S5). Linear regression equations, correlation coefficients (R^2), and standard deviations (SD) for the biosensor_{MY11} against each HPV genotype (HPV 6, 16, 18, 45, 53, 54, and 58) were presented in the supplementary information (inset of Fig. S5).

Additionally, limits of quantitation (at $10\text{SD}/\alpha$), limits of detection (at $3.3\text{SD}/\alpha$), and sensitivities (at $\alpha/(\text{area of the electrode})$) were described in Table 1. In these equations, SD is

defined as the standard deviation of the blank measurement, and α corresponds to the linear regression slope [21]. The calculations revealed that the detection limits are between 0.11 to 0.61 pg μL^{-1} and the quantification limits between 0.33 to 1.86 pg μL^{-1} . Our genetic recognition device exhibited interesting analytical performance parameters comparable to the previous electrochemical HPV biosensors reported in the literature (Table 1).

3.5. Electrochemical detection profiles for HPV genotypes based on degenerate DNA probe

Degenerate sequences can detect the presence or absence of papillomavirus and are used in routine diagnoses, such as the MY11/MY09 primer set [35]. Thus, electrochemical recognition profiles of the MY11 degenerate probe for the L1 sequence of different viral genomes were evaluated. The detection principle was detailed in terms of the variation of R_{CT} (ΔR_{CT}) concerning the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redox shuttle pair after complementary hybridization in the presence of the HPV target gene. The following equation calculated the ΔR_{CT} :

$$\Delta R_{CT} (\%) = \frac{R_{CT(\text{Biosensor-target gene})} - R_{CT(\text{Biosensor})}}{R_{CT(\text{Biosensor})}} \times 100 \quad (1)$$

where $R_{CT(\text{Biosensor-target gene})}$ and $R_{CT(\text{Biosensor})}$ are the values of electrochemical resistance before and after bioactivity assays. The superior sensing capacity of the biosensor_{MY11} for the HPV L1 gene at variable concentrations is evident (Fig. 4a). As predicted, significant impedimetric variations were recorded at higher oligonucleotide concentrations due to the more substantial number of identified genetic molecules. The magnitude of the measured responses was divergent for HPV genotypes belonging to distinct phylogenetic branches [36]. The low-risk genotypes (HPV6, 53, and 54) exhibited higher values of ΔR_{CT} compared to the high-risk genotypes (HPV16, 18, 45, and 58) (Table S1). Furthermore, the biosensor_{MY11} also demonstrated higher detection sensitivity for low-risk genotypes (sensitivity ranging from 93.88 to 242.28 $\mu\text{A/pg } \mu\text{L}^{-1} \text{ cm}^2$) concerning high-risk genotypes (sensitivity ranging from 29.52 to 36.31 $\mu\text{A/pg } \mu\text{L}^{-1} \text{ cm}^2$) (Table 1).

The multivariable functional interpolation based on impedance parameters (R_{CT} , CPE, and n) modulated in Randle's equivalent circuit allowed creating a three-dimensional graph. As shown in Fig. 4b, two detection groups have been identified for HPV genotypes of high and low oncogenic risk, with non-complementary DNA segments grouped in a separate graphical region.

HPVs are a very heterogeneous group of viruses. Although the nucleotide sequence of the open reading frame (ORF) of the L1 gene corresponds to the most conserved region of the viral genome, dissimilarities are common [37]. For comparison, the homology of the L1 gene for different HPV genotypes is shown in Table S3. In a specific segment of the viral genome, the prevalence of nitrogenous base cytosine for low-risk HPVs and adenine for high-risk HPVs was verified. The adenine base is electroactive and can be electrochemically oxidized, distinctly from the cytosine base [38]. The impedimetric responses for high-risk genotypes are lower due to the adenine molecules that favor the oxidation-reduction reactions. In contrast, low-risk genotypes with a predominance of cytosine show greater interfacial resistivity. Of note, the intermolecular interaction energies (hydrogen bonds) established by nitrogenous bases is different for cytosine-guanine pair ($-25.4 \text{ kcal mol}^{-1}$) and adenine-thymine pair ($-12.4 \text{ kcal mol}^{-1}$) [39].

3.6. Combined diagnosis of cervical cancer biomarkers in clinical specimens

Molecular diagnosis with a single level of biomarkers usually cannot accurately predict the occurrence and prognosis of cervical cancer. Given this, the genetic screening of multiple biomarkers will strongly improve the predictive capacity of neoplastic disorders, enabling the adoption of effective therapeutic approaches to promote the health of patients infected with HPV [40]. From this perspective, the electrochemical identification of papillomavirus and p53 tumor suppressor gene was studied using the proposed sensor system. Cervical samples obtained from women infected with HPV were evaluated for clinical applicability. As predicted, the detection of different HPV genotypes was possible in all biological samples through changes in the impedance signals induced by the L1 target gene. According to the response patterns for synthetic viral DNA, higher ΔR_{CT} values were also obtained for low-risk oncogenic genotypes (HPV6 and 11) than high-risk (HPV16, 31, 33, 45, and 58). All clinical samples were previously diagnosed by qPCR, and the positivity for papillomavirus was observed.

The biosensor_{p53} after bioactivity assays proved to be sensitive to variations in expression levels of the p53 gene during active HPV infections (Fig. 5a). Specimens with low-risk HPV (HPV6 and 11) exposed a resistance variation from $3.57 \pm 0.35\%$ to $12.01 \pm 2.45\%$ (Table S2). The low impedimetric response is related to detecting the p53 gene, present at physiological levels in humans. In opposition, cervical infections with high-risk HPV (HPV16, 31, 33, 45, and 58) induced overexpression of the p53 gene, significantly associated

with a worse prognosis [41]. This fact may be evidenced through electrochemical measurements with ΔR_{CT} values ranging from $46.49 \pm 4.59\%$ to $100.25 \pm 0.27\%$.

The hybridization process with non-complementary sequences, clinical samples from the non-infected patients (cDNA sample), and clinical samples containing *Candida albicans*' genome *Mycobacterium tuberculosis* and hepatitis C virus (HCV) was investigated. The result shown in Fig. 5b revealed a low relative variation in the electrochemical resistance after bioactivity tests with the mentioned samples (ΔR_{CT} ranging from $1.63 \pm 0.23\%$ to $5.27 \pm 0.18\%$). It is emphasized that these analytical responses were insignificant compared to the clinical sample infected with HPV. The high specificity found for the sensor device enables its applicability in complex biological fluids with reduced false-positive results.

4. Conclusions

Detection of the papillomavirus genome and p53 biomarker is essential to diagnose HPV-related malignant cell transformations. A label-free presumptive tool for the precise and specific research of genetic analytes with high specificity and fast response time was successfully reported in this article. The integrated sensing system allowed the evaluation of the HPV L1 gene in clinical samples to monitor the p53 tumor suppressor gene expression. The nanostructured platform based on conductive polymer conjugated to metallic nanoparticles showed an excellent electrochemical interface and amplification of the output signal. Stable immobilization of the oligonucleotide sequences on the electrosynthesized polymeric matrix was successfully obtained. The analytical performance of the biosensor is superior to conventional diagnostic methods, with limits of detection ranging from 0.11 to 0.61 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ and limits of quantification from 0.33 to 1.86 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$. Also, the sensor showed high reproducibility, a relative standard deviation value of 4.21%, and a repeatability of less than 2.5%. Furthermore, p53 gene detection in high-risk papillomavirus infections was observed. Finally, the proposed sensing strategy allowed the electrochemical screening of DNA segments related to the HPV and p53 gene in cervical specimens, contributing to the early identification of cancer, oncogenic prediction, and accurate predictive decision.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this paper.

CRedit authorship contribution statement

Karen Y.P.S. Avelino: Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - Original Draft. **Léony S. Oliveira:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - Original Draft. **Helinando Pequeno de Oliveira:** Conceptualization, Writing - Review & Editing, Supervision, Funding acquisition. **Norma Lucena-Silva:** Conceptualization, Writing - Review & Editing, Supervision, Funding acquisition. **César A.S. Andrade:** Conceptualization, Writing - Review & Editing, Supervision, Funding acquisition. **Maria D.L. Oliveira:** Conceptualization, Writing - Review & Editing, Supervision, Funding acquisition.

Acknowledgments

The authors are grateful for the support provided by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development/CNPq (grant numbers grant numbers 314894/2018-7 and 314756/2018-3); Brazilian Health Ministry Project DECIT-FINEP-CNPq (grant numbers 1299/2013 and 401700/2015-1); Pernambuco State Foundation for Research Support, FACEPE-PPSUS-APQ (grant number 0040-4.00/13); and PROPESQ/UFPE. Karen Y. P. S. Avelino and Léony S. Oliveira would like to thank CAPES and FACEPE for their respective scholarships.

References

- [1] R. Ghittoni, R. Accardi, S. Chiocca, M. Tommasino, Role of human papillomaviruses in carcinogenesis, *Ecanermedicalscience* 9 (2015).
- [2] B. Serrano, M. Brotons, F.X. Bosch, L. Bruni, Epidemiology and burden of HPV-related disease, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 47 (2018) 14-26.
- [3] Y. Kawamata, A. Mitsuhashi, Y. Unno, S. Kado, Y. Shino, K. Uesugi, O. Eguchi, J. Ishii, K. Seki, S. Sekiya, HPV 16-E6-mediated degradation of intrinsic p53 is compensated by upregulation of p53 gene expression in normal cervical keratinocytes, *International journal of oncology* 21(3) (2002) 561-567.
- [4] E.M. Smith, D. Wang, L.M. Rubenstein, W.A. Morris, L.P. Turek, T.H. Haugen, Association between p53 and human papillomavirus in head and neck cancer survival, *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 17(2) (2008) 421-427.
- [5] A. Bordigoni, A. Motte, H. Tissot-Dupont, P. Colson, C. Desnues, Development and validation of a multiplex qPCR assay for detection and relative quantification of HPV16 and HPV18 E6 and E7 oncogenes, *Scientific reports* 11(1) (2021) 1-10.
- [6] D.S. Campos-Ferreira, E.V. Souza, G.A. Nascimento, D.M. Zanforlin, M.S. Arruda, M.F. Beltrao, A.L. Melo, D. Bruneska, J.L. Lima-Filho, Electrochemical DNA biosensor for the detection of human papillomavirus E6 gene inserted in recombinant plasmid, *Arabian Journal of Chemistry* 9(3) (2016) 443-450.

- [7] E. Rasouli, Z. Shahnava, W.J. Basirun, M. Rezayi, A. Avan, M. Ghayour-Mobarhan, R. Khandanlou, M.R. Johan, Advancements in electrochemical DNA sensor for detection of human papilloma virus? A review, *Analytical biochemistry* (2018).
- [8] R. Huang, N. He, Z. Li, Recent progresses in DNA nanostructure-based biosensors for detection of tumor markers, *Biosensors and Bioelectronics* 109 (2018) 27-34.
- [9] R. Jain, N. Jadon, A. Pawaiya, Polypyrrole based next generation electrochemical sensors and biosensors: A review, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 97 (2017) 363-373.
- [10] B.K. Shrestha, R. Ahmad, S. Shrestha, C.H. Park, C.S. Kim, Globular shaped polypyrrole doped well-dispersed functionalized multiwall carbon nanotubes/naion composite for enzymatic glucose biosensor application, *Scientific reports* 7(1) (2017) 1-13.
- [11] M. Fani, M. Rezayi, H.R. Pourianfar, Z. Meshkat, M. Makvandi, M. Gholami, S.A. Rezaee, Rapid and label-free electrochemical DNA biosensor based on a facile one-step electrochemical synthesis of rGO-PPy-(I-Cys)-AuNPs nanocomposite for the HTLV-1 oligonucleotide detection, *Biotechnology and Applied Biochemistry* (2020).
- [12] S. Kumar, W. Ahlawat, R. Kumar, N. Dilbaghi, Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare, *Biosensors and Bioelectronics* 70 (2015) 498-503.
- [13] P. Jiang, Y. Wang, L. Zhao, C. Ji, D. Chen, L. Nie, Applications of gold nanoparticles in non-optical biosensors, *Nanomaterials* 8(12) (2018) 977.
- [14] S. Wang, L. Li, H. Jin, T. Yang, W. Bao, S. Huang, J. Wang, Electrochemical detection of hepatitis B and papilloma virus DNAs using SWCNT array coated with gold nanoparticles, *Biosensors and Bioelectronics* 41 (2013) 205-210.
- [15] H. Huang, W. Bai, C. Dong, R. Guo, Z. Liu, An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on graphene/Au nanorod/polythionine for human papillomavirus DNA detection, *Biosensors and Bioelectronics* 68 (2015) 442-446.
- [16] T. Ramesh, K.L. Foo, R. Haarindraprasad, A.J. Sam, M. Solayappan, Gold-Hybridized Zinc oxide nanorods as Real-time Low-cost nanoBiosensors for Detection of virulent DNA signature of HPV-16 in cervical carcinoma, *Scientific reports* 9(1) (2019) 1-17.
- [17] S. Jampasa, W. Wonsawat, N. Rodthongkum, W. Siangproh, P. Yanatatsaneejit, T. Vilaivan, O. Chailapakul, Electrochemical detection of human papillomavirus DNA type 16 using a pyrrolidinyl peptide nucleic acid probe immobilized on screen-printed carbon electrodes, *Biosensors and Bioelectronics* 54 (2014) 428-434.
- [18] P. Teengam, W. Siangproh, A. Tuantranont, C.S. Henry, T. Vilaivan, O. Chailapakul, Electrochemical paper-based peptide nucleic acid biosensor for detecting human papillomavirus, *Analytica chimica acta* 952 (2017) 32-40.
- [19] K.Y. Avelino, L.S. Oliveira, N. Lucena-Silva, C.P. de Melo, C.A. Andrade, M.D. Oliveira, Metal-polymer hybrid nanomaterial for impedimetric detection of human papillomavirus in cervical specimens, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 185 (2020) 113249.
- [20] M. Shariati, M. Ghorbani, P. Sasanpour, A. Karimizefreh, An ultrasensitive label free human papilloma virus DNA biosensor using gold nanotubes based on nanoporous polycarbonate in electrical alignment, *Analytica chimica acta* 1048 (2019) 31-41.
- [21] P. Mahmoodi, M. Rezayi, E. Rasouli, A. Avan, M. Gholami, M.G. Mobarhan, E. Karimi, Y. Alias, Early-stage cervical cancer diagnosis based on an ultra-sensitive electrochemical DNA nanobiosensor for HPV-18 detection in real samples, *Journal of Nanobiotechnology* 18(1) (2020) 1-12.
- [22] P. Gravitt, C. Peyton, T. Alessi, C. Wheeler, F. Coutlee, A. Hildesheim, M. Schiffman, D. Scott, R. Apple, Improved amplification of genital human papillomaviruses, *Journal of clinical microbiology* 38(1) (2000) 357-361.
- [23] O. Nunobiki, M. Ueda, M. Yamamoto, E. Toji, N. Sato, S. Izuma, Y. Okamoto, K. Torii, S. Noda, Polymorphisms of p53 codon 72 and MDM2 promoter 309 and the risk of endometrial cancer, *Human cell* 22(4) (2009) 101-106.

- [24] J. Wang, C. Wu, P. Wu, X. Li, M. Zhang, J. Zhu, Polypyrrole capacitance characteristics with different doping ions and thicknesses, *Physical Chemistry Chemical Physics* 19(31) (2017) 21165-21173.
- [25] T. Patois, B. Lakard, S. Monney, X. Roizard, P. Fievet, Characterization of the surface properties of polypyrrole films: Influence of electrodeposition parameters, *Synthetic Metals* 161(21-22) (2011) 2498-2505.
- [26] K.J. Stine, Biosensor applications of electrodeposited nanostructures, *Applied Sciences* 9(4) (2019) 797.
- [27] Y. Ma, L. Jiang, Y. Mei, R. Song, D. Tian, H. Huang, Colorimetric sensing strategy for mercury (II) and melamine utilizing cysteamine-modified gold nanoparticles, *Analyst* 138(18) (2013) 5338-5343.
- [28] W. Chen, C.M. Li, P. Chen, C. Sun, Electrosynthesis and characterization of polypyrrole/Au nanocomposite, *Electrochimica Acta* 52(8) (2007) 2845-2849.
- [29] R. Elshafey, A.C. Tavares, M. Sij, M. Zourob, Electrochemical impedance immunosensor based on gold nanoparticles–protein G for the detection of cancer marker epidermal growth factor receptor in human plasma and brain tissue, *Biosensors and Bioelectronics* 50 (2013) 143-149.
- [30] E. Dinckaya, Ö. Kınık, M.K. Sezgintürk, Ç. Altuğ, A. Akkoca, Development of an impedimetric aflatoxin M1 biosensor based on a DNA probe and gold nanoparticles, *Biosensors and Bioelectronics* 26(9) (2011) 3806-3811.
- [31] Z. You, Q. Qiu, H. Chen, Y. Feng, X. Wang, Y. Wang, Y. Ying, Laser-induced noble metal nanoparticle-graphene composites enabled flexible biosensor for pathogen detection, *Biosensors and Bioelectronics* 150 (2020) 111896.
- [32] M. Mahmoudian, W. Basirun, Y. Alias, A.K. Zak, Electrochemical characteristics of coated steel with poly (N-methyl pyrrole) synthesized in presence of ZnO nanoparticles, *Thin Solid Films* 520(1) (2011) 258-265.
- [33] D. Ye, X. Zuo, C. Fan, DNA nanotechnology-enabled interfacial engineering for biosensor development, *Annual Review of Analytical Chemistry* 11 (2018) 171-195.
- [34] C. Srisomwat, P. Teengam, N. Chuaypen, P. Tangkijvanich, T. Vilaivan, O. Chailapakul, Pop-up paper electrochemical device for label-free hepatitis B virus DNA detection, *Sensors and Actuators B: Chemical* 316 (2020) 128077.
- [35] R. Senapati, B. Nayak, S.K. Kar, B. Dwibedi, HPV genotypes co-infections associated with cervical carcinoma: Special focus on phylogenetically related and non-vaccine targeted genotypes, *PLoS One* 12(11) (2017) e0187844.
- [36] M. Schiffman, R. Herrero, R. DeSalle, A. Hildesheim, S. Wacholder, A.C. Rodriguez, M.C. Bratti, M.E. Sherman, J. Morales, D. Guillen, The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution, *Virology* 337(1) (2005) 76-84.
- [37] L.S.A. Mühr, C. Eklund, J. Dillner, Towards quality and order in human papillomavirus research, *Virology* 519 (2018) 74-76.
- [38] H. Karimi-Maleh, F. Karimi, M. Alizadeh, A.L. Sanati, Electrochemical sensors, a bright future in the fabrication of portable kits in analytical systems, *The Chemical Record* 20(7) (2020) 682-692.
- [39] Y. Mo, Probing the nature of hydrogen bonds in DNA base pairs, *Journal of molecular modeling* 12(5) (2006) 665-672.
- [40] G. Sun, X. Dong, X. Tang, H. Qu, H. Zhang, E. Zhao, The prognostic value of HPV combined p16 status in patients with anal squamous cell carcinoma: a meta-analysis, *Oncotarget* 9(8) (2018) 8081.
- [41] P. Ernoux-Neufcoeur, M. Arafa, C. Decaestecker, A. Duray, M. Remmelink, X. Leroy, M. Herfs, J. Somja, C.E. Depuydt, P. Delvenne, Combined analysis of HPV DNA, p16, p21 and p53 to predict prognosis in patients with stage IV hypopharyngeal carcinoma, *Journal of cancer research and clinical oncology* 137(1) (2011) 173-181.
- [42] R. Sabzi, B. Sehatnia, M. Pournaghi-Azar, M. Hejazi, Electrochemical detection of human papilloma virus (HPV) target DNA using MB on pencil graphite electrode, *Journal of the Iranian Chemical Society* 5(3) (2008) 476-483.

Figure Captions

Figure 1. Conceptual illustration of the fabrication process of the integrated sensor platform.

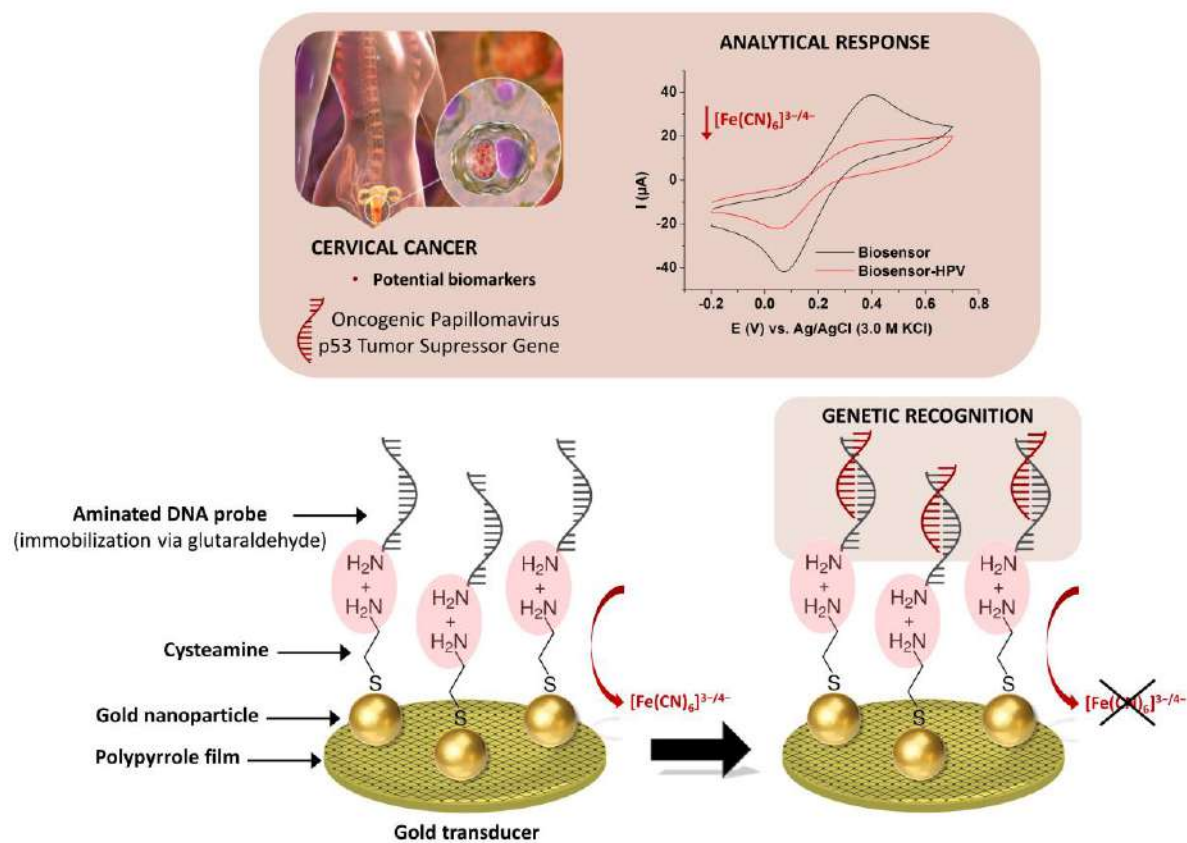


Figure 2. AFM (2D and 3D) and SEM images: PPy (a), PPy-AuNP (b), PPy-AuNP-Cys (c), Biosensor_{MY11} (d), and Biosensor_{MY11}-HPV33 (e). Microscopic characterization of the Biosensor_{p53} after the detection assay in a clinical sample from a patient infected with HPV33 (f).

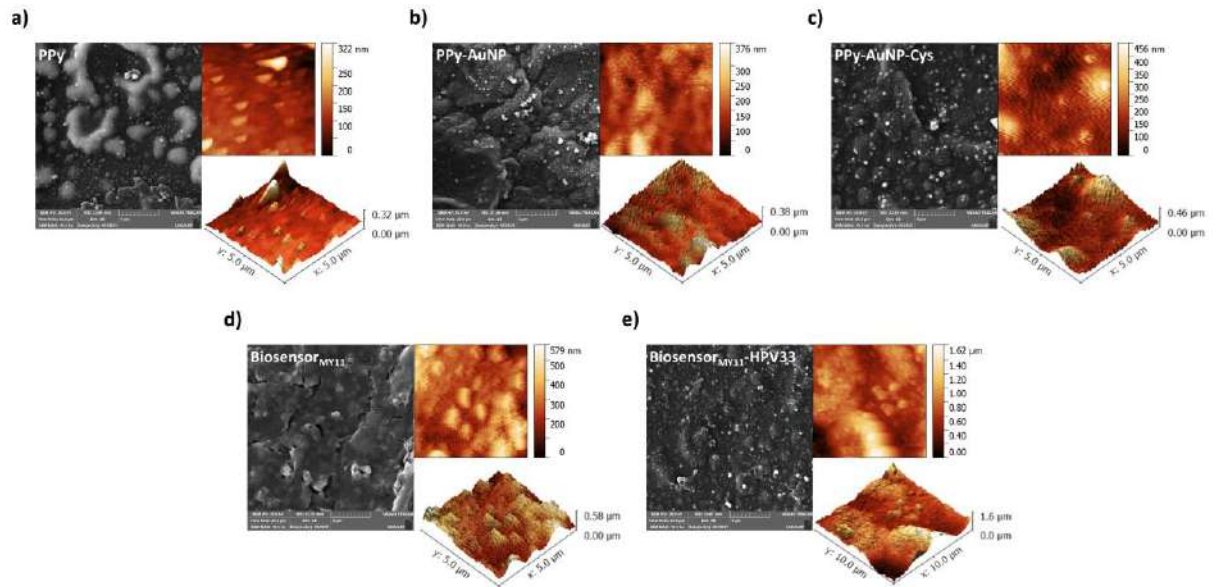


Figure 3. Cyclic voltammograms (a) and Nyquist diagrams (b) for each assembly step of the biosensor. Inset: Anodic peak currents (a) and Randle's circuit model used to fit the impedance measurements (b). All experiments were performed using 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ in PBS (10 mM, pH 7.4).

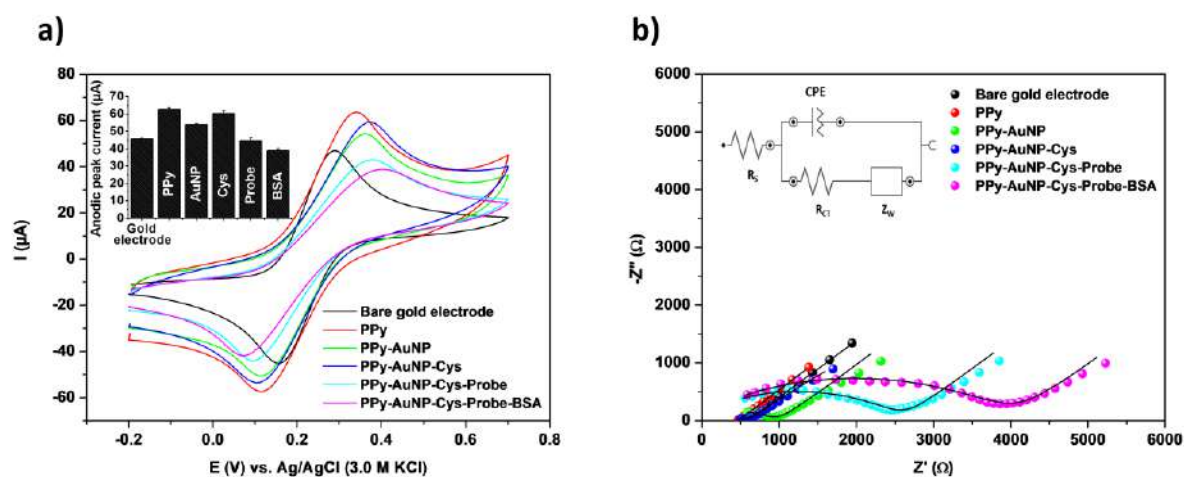


Figure 4. ΔR_{CT} values after the interaction of the biosensor_{MY11} with plasmid samples containing the HPV L1 gene at variable concentrations (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) (a). A three-dimensional plot for the R_{CT} , CPE, and n variables was obtained from the Nyquist spectra' theoretical simulation (b). Three repetitions were processed for each biological assay, where the experimental measurements are presented as the mean values $\pm$ their standard deviation.

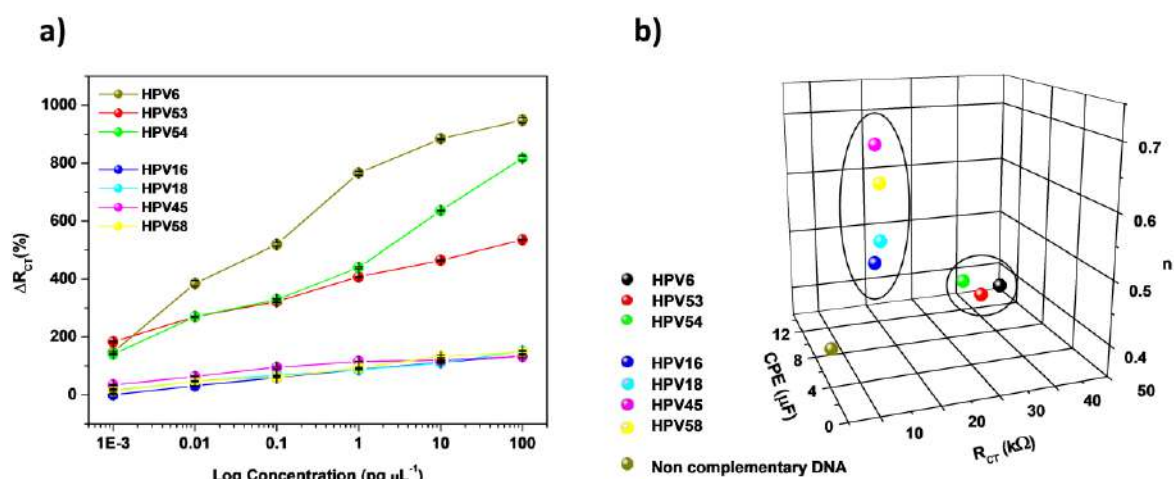


Figure 5. ΔR_{CT} (%) values for bioactivity tests with the biosensor_{MY11} and biosensor_{p53} after exposure to clinical specimens from patients infected with different HPV types (HPV 6, 11, 16, 31, 33, 45, and 58) (a). Specificity study with oligonucleotide sequences not complementary to the biodetection probes (plasmid sample), cDNA sample from a patient not infected with HPV, and cDNA samples containing the genome of *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*, and hepatitis C virus (b). The samples were tested at a concentration of $100 \text{ pg}\mu\text{L}^{-1}$ (total cDNA concentration). Three repetitions were processed for each biological assay, where the experimental measurements are presented as the mean values $\pm$ their standard deviation.

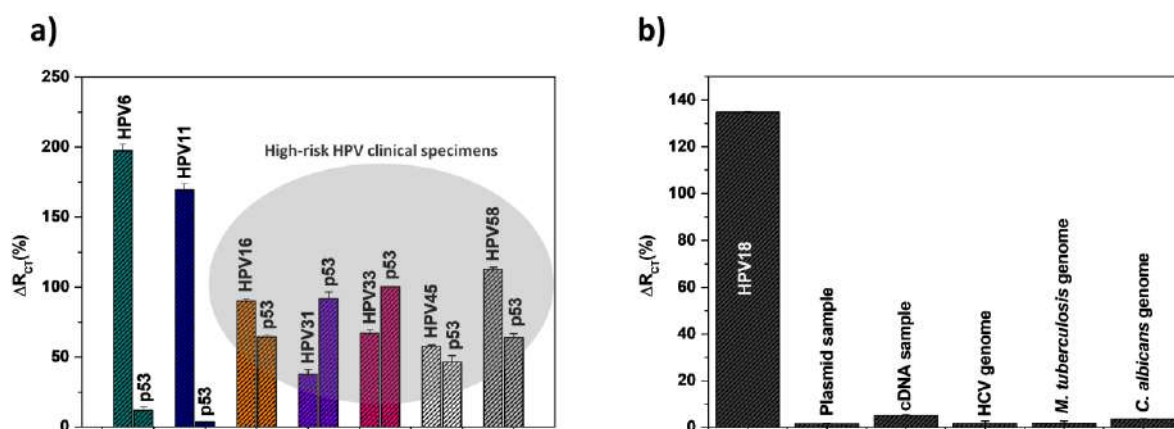


Table Captions

Table 1. Comparison of analytical parameters between electrochemical DNA biosensors for the diagnosis of papillomavirus.

Electrode modification	Molecular target	Analytical method	Electrochemical marker	Detection time	Detection range (pg μL^{-1})	Limit of detection (pg μL^{-1})	Limit of quantification (pg μL^{-1})	Sensitivity ($\mu\text{A}/\text{pg } \mu\text{L}^{-1} \text{ cm}^2$)	Reference
Gold electrode / PPy / AuNP / Cys / Probe _{MY11} / BSA	HPV6	CV and EIS	Label-free	15 min	0.001 to 100	0.37	1.12	242.28	This work
	HPV16					0.11	0.33	36.61	
	HPV18					0.30	0.91	29.52	
	HPV45					0.18	0.54	34.17	
	HPV53					0.15	0.46	93.88	
	HPV54					0.58	1.75	161.60	
	HPV58 (L1 gene)					0.61	1.86	34.88	
Gold electrode / nanocomposite of AuNP and polyaniline / Probe _{MY11}	HPV11	CV and EIS	Label-free	15 min	1 to 100	2.74	--	--	[19]
	HPV16 (L1 gene)					7.43	--	--	
Pencil graphite surface / HPV probe	HPV16 (E6 gene)	DPV	Label-free	5 min	40 to 5000	16	--	--	[6]
Pencil graphite surface / HPV probe	HPV (L1 gene)	SWV	Methylene blue	3 min	1200 to 50000	1200	--	--	[42]

SWV - square wave voltammetry

DPV - differential pulse voltammetry

Electronic Supporting Material

IMPEDIMETRIC SENSING PLATFORM FOR HUMAN PAPILLOMAVIRUS AND P53 TUMOR SUPPRESSOR GENE IN CERVICAL SAMPLES

Karen Y.P.S. Avelino^{a,b}, Léony S. Oliveira^{a,b}, Helinando P. de Oliveira^c, Norma Lucena-Silva^{d,e}, César A.S. Andrade^{a,b}, Maria D.L. Oliveira^{a,b*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

^bLaboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

^cInstituto de Pesquisa em Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Juazeiro, Brazil.

^dInstituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), 50670-420 Recife, PE, Brazil.

^eLaboratório de Biologia Molecular, Departamento de Oncologia Pediátrica, Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), 50070-550 Recife, PE, Brazil.

*To whom correspondence should be addressed.

Maria D.L. Oliveira, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil

Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547

E-mail: m_danielly@yahoo.com.br

Figure S1. Cyclic voltammograms for the electrochemical biosensor obtained under variable sweep speeds (10 to 150 mV.s^{-1}).

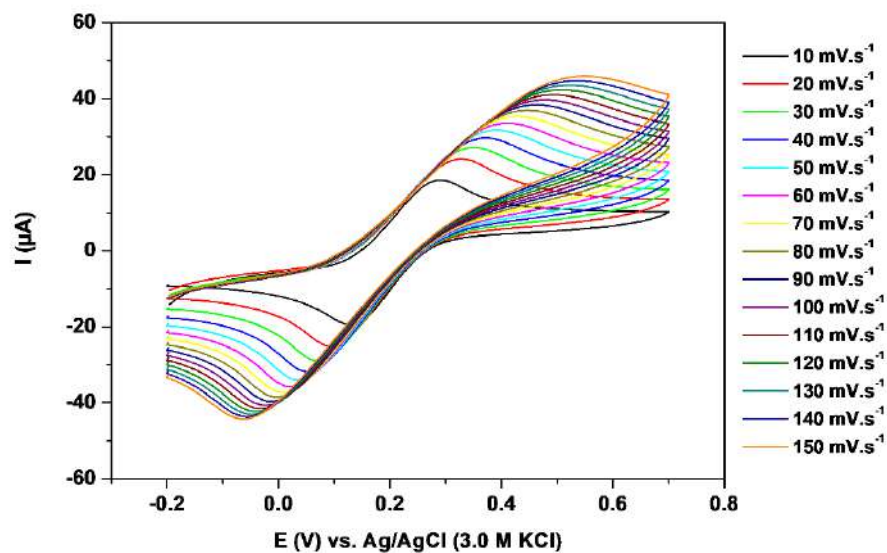


Figure S2. Cyclic voltammograms (a) and anodic peak currents (b) obtained during the electrochemical polymerization of pyrrole (PPy).

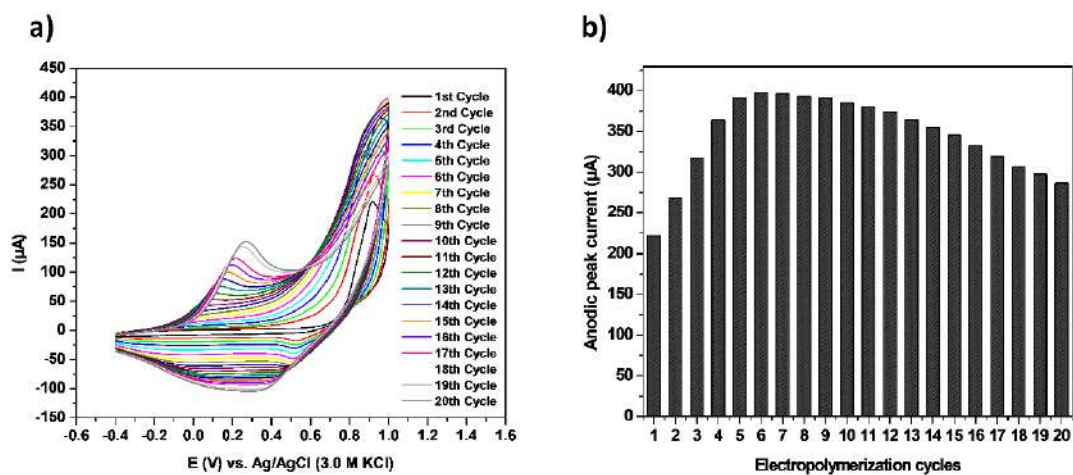


Figure S3. Cyclic voltammograms (a) and impedance spectra (b) for the immobilization of the MY11 probe on the nanostructured platform at variable concentrations (10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70 μM).

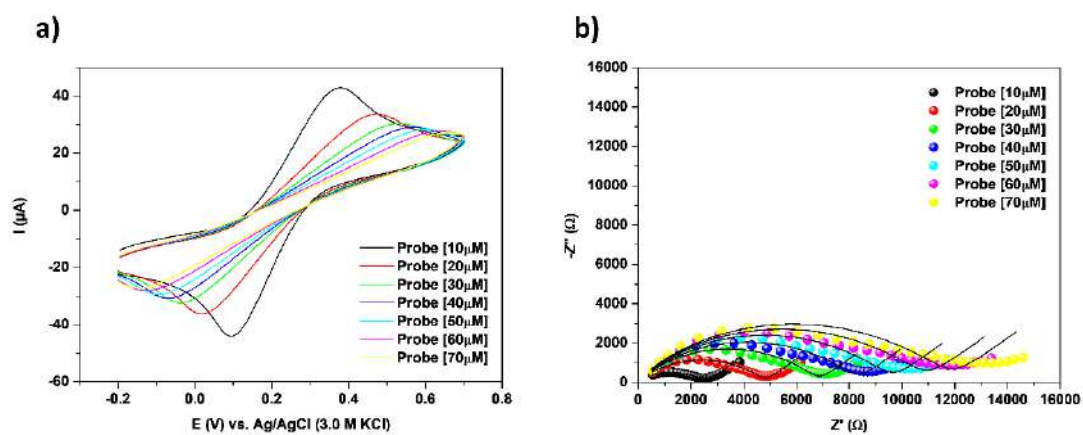


Figure S4. Cyclic voltammograms for the bioanalysis process with the L1 gene of low-risk (HPV6, 11, 53 and 54) and high-risk (HPV16, 18, 45 and 58) oncogenic genotypes at variables concentrations (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

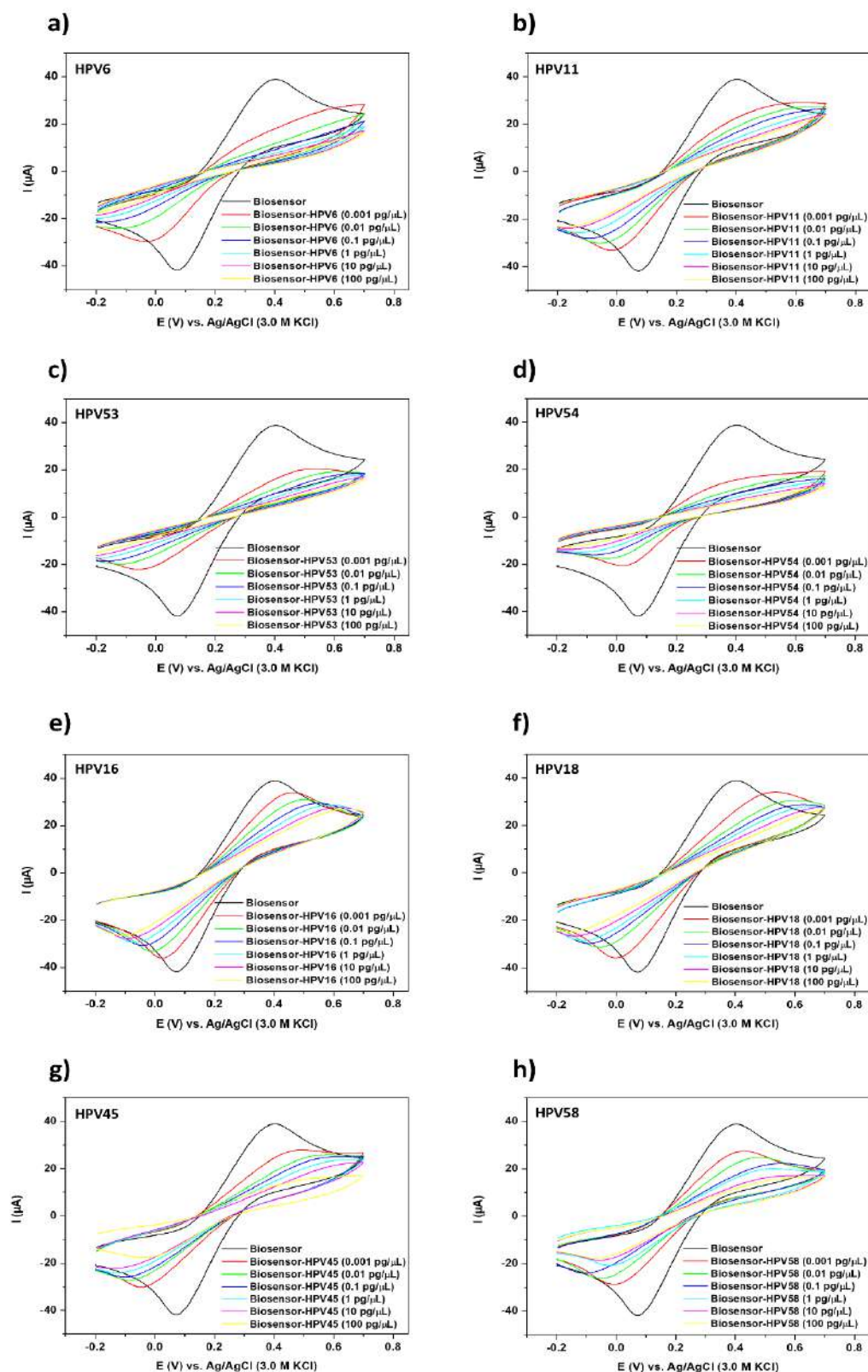


Figure S5. Impedance spectra for the bioanalysis process with the L1 gene of low-risk (HPV6, 11, 53 and 54) and high-risk (HPV16, 18, 45 and 58) oncogenic genotypes at variables concentrations (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$). Inset: calibration plots of the biosensor_{MY11}. Three replicates for each experimental condition were used; experimental values are described as the mean values $\pm$ their half-deviation.

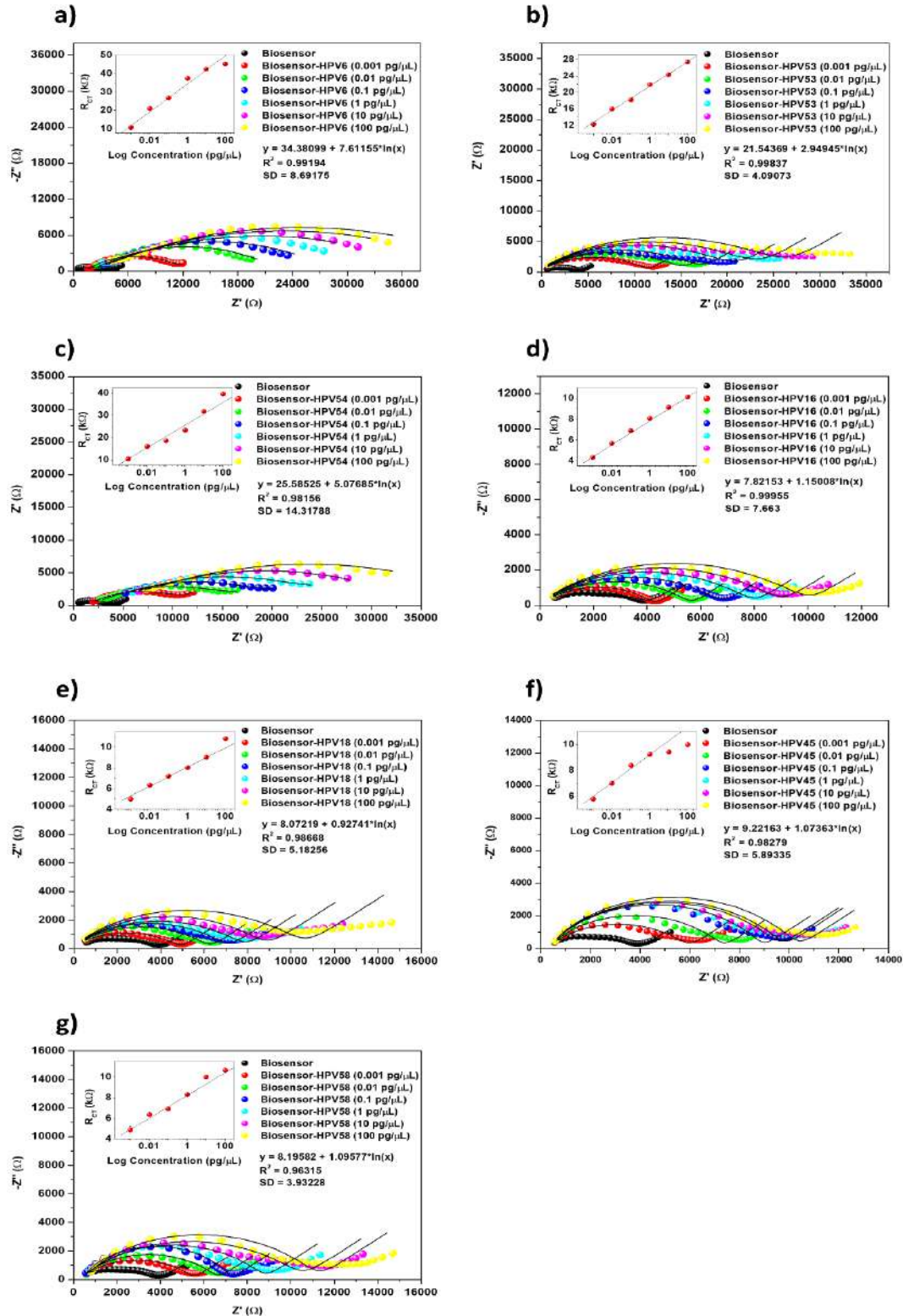


Table S1. Values of the equivalent circuit elements obtained from the fitting of the impedance results derived from hybridization with HPV L1 gene inserted into plasmids or present in cervical specimens (cDNA samples). Non-complementary DNA sequences were used in selectivity assays. Three replicates for each experimental condition were used; experimental values are described as the mean values $\pm$ their half-deviation.

Modified electrode	Sample concentration (pg. μ L ⁻¹)	CPE (μ F)	n	R _{CT} (k Ω)	Δ R _{CT} (%)
Bare gold electrode	-	93.87 $\pm$ 0.850	0.46 $\pm$ 0.004	0.17 $\pm$ 0.001	-
PPy	-	102 $\pm$ 3.570	0.60 $\pm$ 0.018	0.02 $\pm$ 0.001	-
PPy-AuNP	-	16.7 $\pm$ 0.668	0.34 $\pm$ 0.013	0.78 $\pm$ 0.023	-
PPy-AuNP-Cys	-	130 $\pm$ 1	0.16 $\pm$ 0.006	0.62 $\pm$ 0.025	-
PPy-AuNP-Cys-Probe _{MY11}	-	4.26 $\pm$ 1.699	0.39 $\pm$ 0.043	2.74 $\pm$ 0.081	-
PPy-AuNP-Cys-Probe _{MY11} -BSA	-	3.38 $\pm$ 0.496	0.42 $\pm$ 0.014	4.30 $\pm$ 0.181	-
Low-risk oncogenic HPV (plasmid samples)					
HPV6					
Biosensor-HPV6	0.001	10 $\pm$ 0.549	0.54 $\pm$ 0.003	10.60 $\pm$ 0.200	146.34 $\pm$ 4.648
Biosensor-HPV6	0.01	10.87 $\pm$ 0.351	0.47 $\pm$ 0.001	20.87 $\pm$ 0.416	384.93 $\pm$ 9.675
Biosensor-HPV6	0.1	10.53 $\pm$ 0.451	0.46 $\pm$ 0.005	26.63 $\pm$ 0.252	518.95 $\pm$ 5.848
Biosensor- HPV6	1	12.57 $\pm$ 0.702	0.39 $\pm$ 0.009	37.27 $\pm$ 0.289	766.06 $\pm$ 6.709
Biosensor- HPV6	10	11.60 $\pm$ 0.3	0.39 $\pm$ 0.003	42.37 $\pm$ 0.153	884.58 $\pm$ 3.549
Biosensor-HPV6	100	11.27 $\pm$ 0.305	0.39 $\pm$ 0.003	45.10 $\pm$ 0.360	948.11 $\pm$ 8.379
HPV53					
Biosensor-HPV53	0.001	1.09 $\pm$ 0.011	0.48 $\pm$ 0.001	12.17 $\pm$ 0.115	182.75 $\pm$ 2.683
Biosensor-HPV53	0.01	0.89 $\pm$ 0.010	0.49 $\pm$ 0.001	15.90 $\pm$ 0.100	269.51 $\pm$ 2.324
Biosensor-HPV53	0.1	0.87 $\pm$ 0.028	0.49 $\pm$ 0.001	18.17 $\pm$ 0.153	322.19 $\pm$ 3.549
Biosensor- HPV53	1	0.82 $\pm$ 0.009	0.49 $\pm$ 0.001	21.83 $\pm$ 0.058	407.39 $\pm$ 1.342
Biosensor- HPV53	10	0.76 $\pm$ 0.004	0.49 $\pm$ 0.001	24.30 $\pm$ 0.100	464.72 $\pm$ 2.324
Biosensor-HPV53	100	0.67 $\pm$	0.49 $\pm$	27.33 $\pm$	535.21 $\pm$

		0.007	0.001	0.058	1.342
HPV54					
Biosensor-HPV54	0.001	10.13 ± 0.779	0.50 ± 0.008	10.33 ± 0.153	140.14 ± 3.549
Biosensor-HPV54	0.01	11.03 ± 0.586	0.44 ± 0.007	15.93 ± 0.058	270.28 ± 1.342
Biosensor-HPV54	0.1	9.18 ± 0.347	0.48 ± 0.004	18.47 ± 0.115	329.16 ± 2.683
Biosensor- HPV54	1	9.87 ± 0.286	0.46 ± 0.002	23.23 ± 0.153	439.93 ± 3.549
Biosensor- HPV54	10	12.50 ± 0.458	0.41 ± 0.004	31.67 ± 0.115	635.92 ± 2.683
Biosensor-HPV54	100	13.27 ± 0.208	0.39 ± 0.001	39.50 ± 0.346	817.96 ± 8.050
High-risk oncogenic HPV (plasmid samples)					
HPV16					
Biosensor-HPV16	0.001	0.71 ± 0.017	0.56 ± 0.002	4.32 ± 0.010	0.39 ± 0.232
Biosensor-HPV16	0.01	0.69 ± 0.009	0.56 ± 0.002	5.66 ± 0.035	31.46 ± 0.816
Biosensor-HPV16	0.1	0.71 ± 0.017	0.55 ± 0.002	6.86 ± 0.021	59.35 ± 0.484
Biosensor- HPV16	1	0.69 ± 0.001	0.55 ± 0.001	8.05 ± 0.030	87.00 ± 0.709
Biosensor- HPV16	10	0.69 ± 0.003	0.55 ± 0.001	9.10 ± 0.020	111.48 ± 0.465
Biosensor-HPV16	100	0.63 ± 0.011	0.56 ± 0.002	10.10 ± 0.006	134.79 ± 0.134
HPV18					
Biosensor-HPV18	0.001	1.14 ± 0.102	0.51 ± 0.009	4.97 ± 0.150	15.42 ± 3.496
Biosensor-HPV18	0.01	0.55 ± 0.007	0.56 ± 0.001	6.31 ± 0.032	46.72 ± 0.747
Biosensor-HPV18	0.1	0.46 ± 0.010	0.58 ± 0.001	7.18 ± 0.030	66.94 ± 0.709
Biosensor- HPV18	1	0.51 ± 0.008	0.57 ± 0.001	7.99 ± 0.020	85.68 ± 0.465
Biosensor- HPV18	10	0.36 ± 0.009	0.59 ± 0.002	9.01 ± 0.061	109.47 ± 1.419
Biosensor-HPV18	100	0.37 ± 0.004	0.59 ± 0.001	10.80 ± 0.100	150.99 ± 2.324
HPV45					
Biosensor-HPV45	0.001	0.57 ± 0.023	0.61 ± 0.005	5.78 ± 0.091	34.32 ± 2.129
Biosensor-HPV45	0.01	0.26 ± 0.009	0.66 ± 0.002	7.00 ± 0.042	62.75 ± 0.967
Biosensor-HPV45	0.1	0.16 ± 0.017	0.70 ± 0.009	8.38 ± 0.178	94.75 ± 4.131
Biosensor- HPV45	1	0.163 ± 0.014	0.70 ± 0.008	9.24 ± 0.010	114.73 ± 0.232
Biosensor- HPV45	10	0.15 ± 0.015	0.71 ± 0.015	9.42 ± 0.015	118.92 ± 0.015

		0.013	0.002	0.100	2.324
Biosensor-HPV45	100	0.134 ±	0.72 ±	9.98 ±	131.93 ±
		0.015	0.002	0.200	4.648
HPV58					
Biosensor-HPV58	0.001	0.66 ±	0.59 ±	4.88 ±	13.49 ±
		0.092	0.011	0.100	2.324
Biosensor-HPV58	0.01	0.34 ±	0.64 ±	6.34 ±	47.34 ±
		0.003	0.0005	0.070	1.627
Biosensor-HPV58	0.1	0.08 ±	0.76 ±	6.89 ±	60.27 ±
		0.010	0.004	0.045	1.048
Biosensor- HPV58	1	0.21 ±	0.66 ±	8.29 ±	92.66 ±
		0.012	0.004	0.105	2.448
Biosensor- HPV58	10	0.33 ±	0.62 ±	9.99 ±	132.24 ±
		0.023	0.005	0.181	4.217
Biosensor-HPV58	100	0.18 ±	0.67 ±	10.63 ±	147.11 ±
		0.011	0.005	0.208	4.838
Assays with cervical specimens (cDNA samples)					
Biosensor-HPV6	100	0.11 ±	0.71 ±	12.80 ±	197.47 ±
		0.001	0.001	0.200	4.648
Biosensor-HPV11	100	26.47 ±	0.45 ±	11.60 ±	169.58 ±
		3.163	0.016	0.173	4.025
Biosensor-HPV16	100	0.12 ±	0.74 ±	8.18 ±	90.10 ±
		0.001	0	0.070	1.627
Biosensor-HPV31	100	0.18 ±	0.68 ±	5.92 ±	37.58 ±
		0.011	0.004	0.151	3.509
Biosensor-HPV33	100	0.08 ±	0.73 ±	7.19 ±	67.02 ±
		0	0	0.105	2.441
Biosensor-HPV45	100	0.26 ±	0.67 ±	6.78 ±	57.64 ±
		0.017	0.005	0.047	1.098
Biosensor-HPV58	100	0.12 ±	0.73 ±	9.16 ±	112.95 ±
		0.001	0.001	0.055	1.279
Selectivity assays					
Biosensor- non complementary DNA	100	3.08 ±	0.42 ±	4.37 ±	1.63 ±
		1.086	0.032	0.010	0.232
Biosensor-cDNA sample (HPV negative)	100	4.07 ±	0.44 ±	4.53 ±	5.27 ±
		2.400	0.046	0.158	0.184
Biosensor-cDNA sample (<i>C. albicans</i>)	100	0.69 ±	0.58 ±	4.46 ±	3.65 ±
		0.269	0.031	0.156	0.127
Biosensor-cDNA sample (<i>M. tuberculosis</i>)	100	13.87 ±	0.57 ±	4.38 ±	1.79 ±
		1.607	0.009	0.042	0.99
Biosensor-cDNA sample (HCV)	100	18.37 ±	0.32 ±	4.38 ±	1.71 ±
		0.058	0.001	0.045	1.048

Biosensor = PPy-AuNP-Cys-Probe_{MY11}-BSA

Table S2. Values of the equivalent circuit elements obtained from the fitting of the impedance results derived from assays for p53 gene detection in cDNA samples. Three replicates for each experimental condition were used; experimental values are described as the mean values $\pm$ their half-deviation.

Modified electrode	Sample concentration ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)	CPE (μF)	n	R_{CT} ($\text{k}\Omega$)	ΔR_{CT} (%)
PPy-AuNP-Cys-Probe _{p53} -BSA	-	0.58 ± 0.048	0.55 ± 0.004	4.72 ± 0.232	-
p53 gene detection assays (cDNA samples)					
Biosensor _{p53} -HPV6	100	1.47 ± 0.216	0.46 ± 0.014	4.82 ± 0.105	12.01 ± 2.448
Biosensor _{p53} -HPV11	100	0.30 ± 0.009	0.60 ± 0.002	4.46 ± 0.015	3.57 ± 0.355
Biosensor _{p53} -HPV16	100	0.41 ± 0.044	0.58 ± 0.008	7.07 ± 0.055	64.38 ± 1.279
Biosensor _{p53} -HPV31	100	0.27 ± 0.012	0.62 ± 0.004	8.25 ± 0.215	91.73 ± 5
Biosensor _{p53} -HPV33	100	0.84 ± 0.145	0.51 ± 0.015	8.62 ± 0.011	100.25 ± 0.268
Biosensor _{p53} -HPV45	100	0.35 ± 0.072	0.61 ± 0.016	6.30 ± 0.197	46.49 ± 4.591
Biosensor _{p53} -HPV58	100	3.06 ± 0.509	0.38 ± 0.016	7.06 ± 0.115	64.07 ± 2.680

Biosensor = PPy-AuNP-Cys-Probe_{p53}-BSA

Table S3. Sequences of nitrogenous bases of the L1 gene for different HPV genotypes.

Low risk genotypes																				L1 gene sequence									
HPV6	G	C	C	C	A	G	G	G	A	C	A	T	A	A	C	A	A	T	G	G									
HPV 53	G	C	C	C	A	G	G	G	A	C	A	T	A	A	T	A	A	T	G	G									
HPV54	G	C	C	C	A	G	G	G	T	C	A	A	A	A	C	A	A	T	G	G									
High risk genotypes																				L1 gene sequence									
HPV16	G	C	A	C	A	G	G	G	C	C	A	C	A	A	T	A	A	T	G	G									
HPV18	G	C	A	C	A	G	G	G	T	C	A	T	A	A	C	A	A	T	G	G									
HPV45	G	C	C	C	A	G	G	G	C	C	A	T	A	A	C	A	A	T	G	G									
HPV58	G	C	A	C	A	A	G	G	T	C	A	T	A	A	C	A	A	T	G	G									

C = cytosine

G = guanine

A = adenine

T = thymine

5.3 ARTIGO 3

Artigo publicado na revista *Talanta*

(fator de impacto: 6,057)

Flexible sensor based on conducting polymer and gold nanoparticles for electrochemical screening of HPV families in cervical specimens



Flexible sensor based on conducting polymer and gold nanoparticles for electrochemical screening of HPV families in cervical specimens

Karen Y.P.S. Avelino^{a,b}, Léony S. Oliveira^b, Norma Lucena-Silva^{c,d}, César A.S. Andrade^{a,b}, Maria D.L. Oliveira^{a,b,*}

^a Programa de Pós-Graduação Em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

^b Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

^c Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), 50670-420, Recife, PE, Brazil

^d Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Oncologia Pediátrica, Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), 50070-550, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Flexible biosensor
Papillomavirus
Polypyrrole
Gold nanoparticle
Impedance spectroscopy
p53 gene

ABSTRACT

Considering the low sensitivity of cytological exams and high costs of the molecular methods, the development of diagnostic tests for effective diagnosis of HPV infections is a priority. In this work, biosensor composed of polypyrrole (PPy) films and gold nanoparticles (AuNPs) was obtained for specific detection of HPV genotypes. The biosensor was developed by using flexible electrodes based on polyethylene terephthalate (PET) strips coated with indium tin oxide (ITO). Polymeric films and AuNPs were obtained by electrosynthesis. Oligonucleotides sequences modified with functional amino groups were designed to recognize HPV gene families strictly. The modified oligonucleotides were chemically immobilized on the nanostructured platform. Cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were used for the analysis of the electrode modification and monitoring of molecular hybridization. Electrochemical changes were observed after exposure of the biosensors to plasmid samples and cervical specimens. The biosensor based on the BSH16 probe showed a linear concentration range for target HPV16 gene detection of 100 pg μL^{-1} to 1 fg μL^{-1} . A limit of detection (LOD) of 0.89 pg μL^{-1} and limit of quantification (LOQ) of 2.70 pg μL^{-1} were obtained, with a regression coefficient of 0.98. Screening tests on cervical specimens were performed to evaluate the sensibility and specificity for HPV and its viral family. The expression of a biomarker for tumorigenesis (p53 gene) was also monitored. In this work, a flexible system has been successfully developed for label-free detection of HPV families and p53 gene monitoring with high specificity, selectivity, and sensitivity.

1. Introduction

The human papillomavirus is a non-enveloped DNA virus and the oncogenic infectious agent responsible for causing infections in the mucosal and anogenital epithelium [1]. The HPV can lead to a variety of clinical conditions, like warts caused by viral types of low oncogenic risk (HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, and 81). In addition, neoplasms can result from cytogenetic changes caused by viral types of high oncogenic risk (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, and 82). Of note, HPV16 and 18 are responsible globally for ~70% of the cases of cervical carcinoma [2]. Co-infections between HPV16 and 18 with other viral types, such as HPV45 and 31, can cause serious clinical conditions. Furthermore, persistent HPV infections are intrinsically

related to the development of cancers, such as cervical, penile, vaginal, vulvar, and anal cancer [3].

Neoplastic disorders are mainly associated with the expression of two HPV genes (E6 and E7). The products of the E6 and E7 genes interfere with the cell cycle control through the degradation of the p53 and Rb (retinoblastoma) proteins. The p53 tumor suppressor gene regulates the growth arrest and apoptosis after DNA damage. The transcription of the p53 gene can be intensified in HPV infections to maintain cellular homeostasis [4].

Early diagnosis of HPV infections and identification of viral serotypes in clinical samples can prevent about 93% of cervical cancers [5]. The main techniques used for molecular diagnosis of HPV include hybrid capture assays and nucleic acid amplification assays, such as

* Corresponding author. Programa de Pós-Graduação Em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil.
E-mail address: m.danielly@yahoo.com.br (M.D.L. Oliveira).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122118>

Received 28 October 2020; Received in revised form 10 January 2021; Accepted 11 January 2021

Available online 21 January 2021

0039-9140/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). Hybrid capture assays have become the standard method in many countries and are widely used in FDA-approved clinical trials. On the other hand, hybrid capture assays do not allow specific identification of HPV genotypes, identifying only high-risk and low-risk groups. Hybrid capture assays have lower sensitivity than PCR techniques. Also, positive results can be obtained from cross-hybridization with other HPV types [6]. The PCR method has a laborious procedure and needs to perform multiple type-specific reactions for detecting HPV genotype in a single sample. Besides, expensive reagents/equipment, appropriate laboratories, and qualified professionals are required [7]. Thus, we can highlight the importance of the development of new effective molecular methods for HPV diagnosis.

Genosensors allow a rapid analysis of the analyte using small sample volumes, low cost, simple operation, miniaturization, reusability, and stability in adverse environmental conditions [8]. Genosensors present broad applicability for laboratory HPV diagnosis. Nanomaterials have been used to avoid loss of the recognition capacity after DNA anchoring, reproducibility of the analytical signal, manufacturing scalability, and long-term stability [9]. Also, AuNPs present a high contact area, electrical conductivity, quantum size effect, biological compatibility, non-toxicity, molecular adsorption ability, and others. Therefore, the incorporation of AuNPs into detection systems can increase the analytical effectiveness and robustness of the sensor devices [10].

Conducting polymers are considered functional materials for the development of sensor platforms [11]. The PPY polymer has been investigated because of its potential for the manufacturing of ultrasensitive biosensors. Among the properties that contribute significantly to the improvement of the analytical performance and robustness of the biodection systems are the high conductivity, high electron transfer kinetics at the electrode/solution interface, charge storage capacity, redox reversibility, relative biological compatibility, and presence of functional chemical groups for directed anchoring of biomolecules [12]. In addition, this organic polymer exhibits structural flexibility, environmental stability, low cost and easy synthetic protocols, favoring new biotechnological applications. Previous studies have shown that PPY is an excellent material to be used as a substrate or matrix for the electrodeposition of AuNPs with reduced molecular aggregation and increased surface area [13,14].

Flexible plastic substrates such as polyethylene naphthalene, polytetrafluoroethylene, polyimide, and polyethylene terephthalate (PET) have been investigated as supports of biosensing platforms [15]. In particular, conductive ITO layers are oxide films used for the development of transparent electrodes, liquid crystal displays, solar cells, optoelectronic, and bioanalytical devices [16]. This high-performance plastic substrate is used in biosensors due to their high electrical conductivity, low capacitive current, electrochemical activity over a wide range of potential, and a possibility for surface modifications [17].

Flexible electrochemical biosensors allow a high selectivity, sensitivity, low power requirement, and miniaturization [15]. Flexible electrochemical devices have been developed for the diagnosis of different diseases [18,19]. However, flexible electrochemical biosensors for HPV are still limited [20]. The approaches employed are based on gold electrode [21], pencil graphite surface [22], paper [20], Si substrate [23], screen-printed carbon electrode [24], glassy carbon electrode [25], and interdigitated platinum electrodes [26].

The present study described a methodological process for obtaining label-free flexible electrochemical biosensors used to identify HPV families, correlating positive diagnoses for viral infection with the potential development of cervical cancer. The flexible ITO electrode was modified with PPY, AuNPs, and cysteamine (Cys). Furthermore, a novel specific oligonucleotide sequences for papillomavirus families were designed. DNA probes were anchored covalently on the nanostructured platform. The proposed flexible system may also be used for purposes other than HPV detection, varying the nature of the bioreceptor.

2. Materials and methods

2.1. Materials

ITO, PPY, tetrachloroauric acid (HAuCl_4), Cys, and bovine serum albumin (BSA), hydrochloric acid (HCl), potassium ferricyanide ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), potassium ferrocyanide ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), glutaraldehyde, sodium phosphate monobasic and dibasic were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Trizol reagent was purchased from Invitrogen Co. Ltd. (Carlsbad, CA, USA). Milli-Q plus purification system was used to obtain deionized water (Billerica, MA, USA).

2.2. DNA probes and biological samples

Probes specific for the detection of HPV families and DNA probe for detection of the p53 gene were purchased from Invitrogen Co. Ltd. (Carlsbad, CA, USA). Methodology for obtaining the biorecognition probes and the access numbers downloaded from the site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> to be used in sequence alignment were presented in supplementary information and listed in Table S1.

Samples of recombinant plasmids containing L1 gene of different HPV types (HPV6, 11, 16, 18, 33, 45, 51, 53, 58, 61, 62, 66, 72, 81, and 84) were obtained from subcloning in a pTA vector. Oligonucleotide primers (complementary to linker region of the plasmid vector) were used for the sequencing of the recombinant plasmids. cDNA samples were obtained from the reverse transcription of mRNA segments present in cervical specimens of women infected with HPV. The mRNA (total RNA) segments were isolated from cervical cells using Trizol reagent. DNA probes specific for HPV families and the genotypes that each oligonucleotide can recognize are described in Table S2.

The clinical samples were collected under the consent of the patients, and the corresponding protocol was approved by the local ethics committee (process n° CAAE 23698513.0.0000.5190). All samples and biorecognition probes were validated with RT-PCR and agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide (Fig. S1). RT-PCR previously characterized cDNA samples as positive samples (with genotype identification) or negative samples for HPV. Dilutions of the biological samples were prepared with 10 mM phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4 and kept frozen.

2.3. Fabrication of the flexible electrodes and assembly of the oligonucleotides

The prototypes were obtained from flexible ITO strips measuring 3 cm in height by 8 mm in width. To standardize the electroactive work area, a polyvinyl chloride (PVC) adhesive sheet with a circular hole ($\phi = 5 \text{ mm}$) was superimposed over the ITO surface. Thus, a specific area for mounting the biosensor (0.2 cm^2) and an area for electrical contact (0.8 cm^2) were obtained.

The first stage of the sensor assembly consists of the electropolymerization of pyrrole. First, the flexible working electrodes were immersed in a solution of 0.5 M HCl containing the pyrrole monomer at a concentration of 30 mM. Six cycles of polymerization were applied in a potential range of -0.2 to $+0.7 \text{ V}$ at a scan rate of 100 mV s^{-1} . The second step comprises the synthesis and electrochemical deposition of AuNPs on the PPY film. After, ten voltammetric cycles were performed using a 0.25 mM solution of HAuCl_4 under a potential range of $+0.2$ to -1 V and a scan rate of 50 mV s^{-1} to obtain AuNPs [27]. The third step refers to the chemisorption of Cys molecules on the AuNPs. This step, $2 \mu\text{L}$ of 2 mg mL^{-1} Cys hydroalcoholic solution (ethanol:water, 3:1) was dropped on the electrode surface for 30 min.

The chemical immobilization of the DNA probes was performed after obtaining the PPY-Cys-AuNPs nanostructured platform. Specific probes for the detection of HPV families and probe for detection of the p53 gene were used. Initially, $2 \mu\text{L}$ of 0.5% glutaraldehyde was added onto the nanostructured platform for 10 min. Subsequently, $2 \mu\text{L}$ of a 10 mM

oligonucleotide solution was added for 15 min. Nonspecific sites of the DNA flexible biosensors were blocked with BSA molecules. In this step, 2 μ L of 1% BSA solution (pH 7.4) was added over the surface of the modified electrodes for 30 s. The assembly process is schematically shown in Fig. 1.

2.4. Evaluation of the bioactivity and monitoring of p53 gene

Initially, the biological samples were heated to 94 °C for DNA denaturation. The genosensors were exposed to 2 μ L of the biological samples for 15 min to hybridization. The specificity, sensitivity, and selectivity of the genosensors were evaluated by using a) recombinant plasmids containing the L1 gene nucleotide sequence for specific types of HPV; and b) mixtures of plasmids containing the HPV L1 gene not belonging to the probe recognition family (mixed samples used as negative control). Besides, cervical specimens (cDNA samples) were used to explore the detection capacity of the genosensors and to monitor the p53 gene.

2.5. Electrochemical measurements

The voltammetric and impedimetric analyses were performed on a PGSTAT 128 N potentiostat/galvanostat interfaced with NOVA 1.11 software (Metrohm Autolab, The Netherlands). The experiments were

performed in a three-electrode electrochemical cell system. The electrochemical analysis was conducted in 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ (1:1, v/v) in PBS (10 mM, pH 7.4). The flexible ITO substrate was used as a working electrode. A platinum electrode and Ag/AgCl electrode saturated with KCl (3 M) were used as counter and reference electrodes, respectively. Cyclic voltammograms were obtained in a potential range of -0.2 to $+0.7$ V with a scan rate of 50 $mV s^{-1}$. The electrochemical spectra were recorded in a frequency range between 100 mHz and 100 kHz with an alternating amplitude potential of 10 mV. All electrochemical analyses were performed in triplicates at room temperature and inside a Faraday cage.

2.6. Atomic force microscopy measurements

The molecular images with topographic mapping were recorded from an SPM-9500 atomic force microscope (Shimadzu Corporation, Japan). Cantilevers with aluminum-coated silicon probe (Nanoworld, Japan, resonant frequency = 300 kHz, spring constant = 42 $N m^{-1}$) were used to obtain the AFM images in a non-contact mode in air. Topographic images were acquired with a lateral resolution of 512×512 pixels and a scan area of $5 \times 5 \mu m$. Three macroscopically separated areas were analyzed in each sample by the AFM Gwyddion software to obtain the multiparametric images.

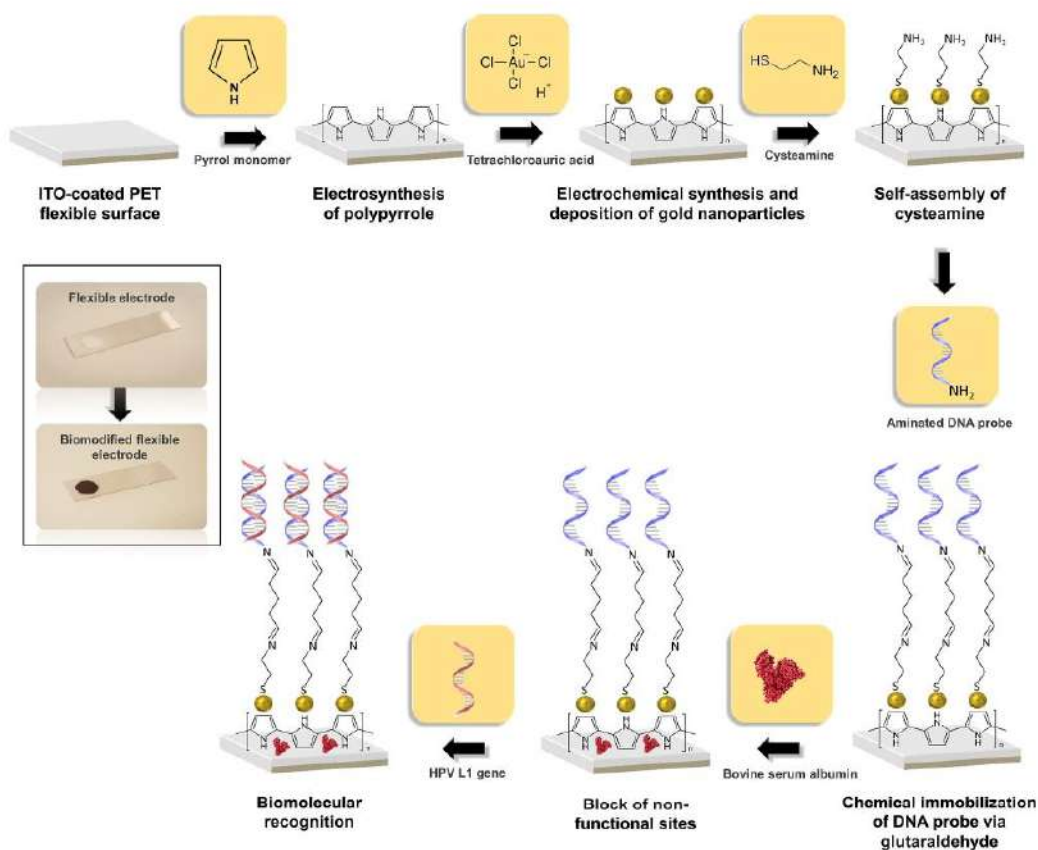


Fig. 1. Schematic representation of the fabrication stages of the electrochemical biosensor and images of the flexible miniaturized electrode before and after the biofunctionalization process.

3. Results and discussion

3.1. Topographic analyses

The functionalization of the flexible electrode and hybridization process were evaluated by the AFM technique (Fig. 2a-f). Fig. 2a shows 2D and 3D topographic images for the PPy film electrochemically deposited on the electrode surface. The morphology of the PPy film is globular, with a maximum height of 308 nm. The polymer particles synthesized on the electrode surface are globular-shaped. Our results are according to the literature [28,29]. Metallic nanoparticles were homogeneously deposited on the PPy polymer, where the PPy-AuNPs film has a maximum height of 372 nm (Fig. 2b). The height difference of the PPy and PPy-AuNPs films suggests that the AuNPs have a maximum diameter of 64 nm. Chen et al. [30] related that the PPy is a facilitating material for the nucleation and growth process of AuNPs during electrosynthesis. For this reason, the electrodeposited AuNPs exhibit a high affinity for modified electrodes with PPy.

We observed the presence of peaks up to 494 nm after Cys immobilization on the PPy-AuNPs film (Fig. 2c). The Cys chemisorption occurs through a thermodynamically favorable process between the thiols groups of the Cys and the gold atoms [31]. The morphology for the PPy-AuNP-Cys-Probe_{BSH16} film is shown in Fig. 2d. The topographical analysis shows the presence of structures on the electrode surface with a maximum height of 603 nm. A rougher surface with increased morphological heterogeneity is observed after the addition of BSA

(Fig. 2e). To prevent non-specific adsorption, BSA molecules were used. Fig. 2f presents the topographic characterization of the biosensor after its exposure to clinical samples from a patient infected with HPV. An increase in the density of molecules immobilized on the biomodified electrode was observed after hybridization with the complementary DNA target. The roughness increased to 892 nm after the sensor captured HPV L1 gene, suggesting the biorecognition capability.

3.2. Electrochemical characterization of the biosensor

Fig. 3a shows cyclic voltammograms for each step of assembly of the flexible biosensor. The cyclic voltammogram of the ITO electrode after the pyrrole electropolymerization presents a high current density with a significant amperometric response ($i_{pa} = 194.36 \pm 10.27 \mu A$) (Fig. 3a). Accordingly, the PPy film exhibited a low charge transfer resistance ($R_{CT} = 0.02 \pm 0.007 k\Omega$) (Fig. S2).

In this work, we employed the Randles circuit composed of R_{CT} , constant-phase element (CPE), Warburg impedance (Z_w), and ohmic resistance (R_s). The R_{CT} is related to the faradaic process of charge transfer between the redox species $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$, whose values can be calculated from a modified Randles circuit (inset of Fig. S2). A CPE, a non-faradaic capacitance, represents the accumulation of charge on the flexible electrode surface. Warburg impedance is related to mass diffusion of electroactive species in the bulk solution to the electrode surface. The ohmic resistance of the electrolyte solution is mentioned as R_s . The values of the equivalent circuit elements are

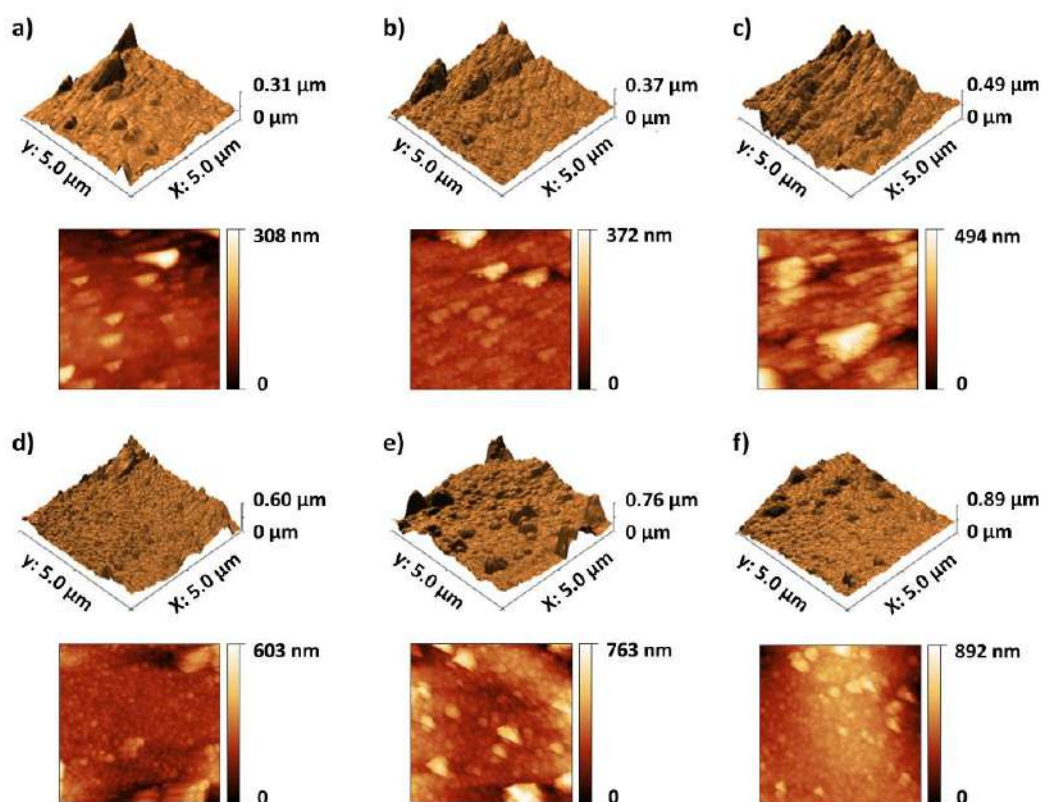


Fig. 2. 2D and 3D AFM images of the PPy-AuNP-Cys-ProbeBSH16 film (a), PPy-AuNP-Cys-ProbeBSH16-BSA film (b) PPy-AuNP-Cys-ProbeBSH16-BSA-HPV film, with the corresponding cross-section. Scan area of $5 \mu m \times 5 \mu m$.

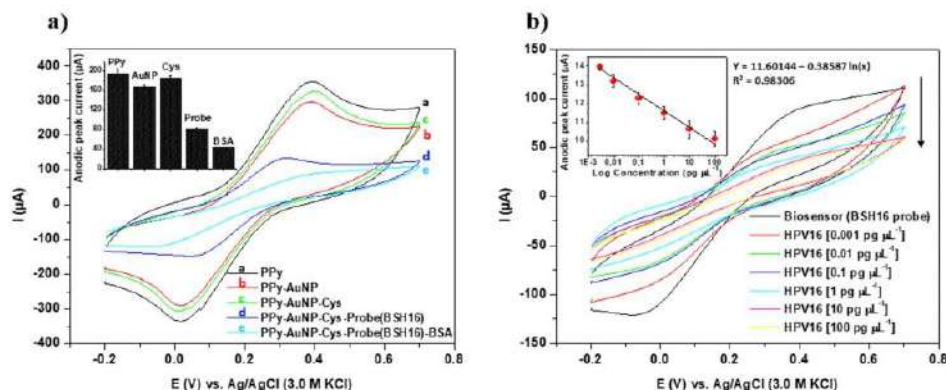


Fig. 3. Voltammetric characterization (a) of each step of assembly of the flexible biosensor. Cyclic voltammograms for the biosensorBSH16 exposed to different concentrations of recombinant plasmids containing the HPV16 L1 gene (DNA target: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (b). Inset: anodic peak currents obtained during the biosensor construction (a) and calibration plot of the biosensor and histograms for anodic peak current (b). Three replicates for each experimental condition were used. Experimental values are described as the mean values $\pm$ their half-deviation.

reported in the supplementary material (Table S3). Of note, the oxidation process on the working electrode surface results in the formation of a stable polymeric film with controllable thickness and high electrical conductivity.

A decrease in the anodic oxidation ($I_{pa} = 166.84 \pm 5.74 \mu\text{A}$) (Fig. 3a) and an increase in the resistive properties ($R_{CT} = 0.05 \pm 0.003 \text{ k}\Omega$) (Fig. S2) were obtained after electrosynthesis of AuNPs. The PPy films provide a significant number of nucleation sites for the formation of nanostructures. Thus, AuNPs are synthesized with nanometric dimensions and in a state of non-aggregation [13]. Organosulfur Cys molecules were chemisorbed on the AuNPs surface resulting in a higher conductivity response ($I_{pa} = 185.50 \pm 4.70 \mu\text{A}$) (Fig. 3a) and lower interfacial resistance ($R_{CT} = 0.03 \pm 0.01 \text{ k}\Omega$) (Fig. S2). The covalent binding occurs due to the thiol functional group of the Cys molecule. Besides, Cys acts as a molecular spacer in the nanostructured platforms that contribute to the increase of the sensitivity [10].

The immobilization of the DNA probe (BSH16 probe) on the PPy-AuNP-Cys-modified electrode results in a reduction of the current signal (Fig. 3a) ($I_{pa} = 80.78 \pm 3.07 \mu\text{A}$). Also, an increase in the impedimetric response ($R_{CT} = 0.66 \pm 0.07 \text{ k}\Omega$) is obtained (Fig. S2). The blockage of the redox process in the electrical double layer is due to electrostatic repulsion between the oligonucleotide phosphate groups and the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ anions [32]. For blocking of nonfunctional regions were used BSA molecules. These protein molecules caused a decrease in the voltammetric measurement ($I_{pa} = 42.95 \pm 0.11 \mu\text{A}$) (Fig. 3a) and an increase in the resistivity ($R_{CT} = 0.68 \pm 0.007 \text{ k}\Omega$) (Fig. S2).

3.3. Analytical performance of the biosensor

Cyclic voltammograms of the biosensor exposed to different concentrations of recombinant plasmids containing the L1 gene of the HPV16 genotype are shown in Fig. 3b. The concentrations evaluated of DNA target were 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The hybridization process results in a decrease in the oxidation and reduction peaks due to lower electron transfer. The amperometric current is inversely proportional to the sample concentration. Also, alterations in voltammetric signals suggest the presence of dielectric elements or negatively charged molecules, such as DNA molecules [33].

The detection degree of an electrochemical biosensor can be defined according to the percentage of the relative deviation of the anodic current variation (ΔI), as follow:

$$\Delta I(\%) = \frac{I_b - I_a}{I_b} \times 100 \quad (1)$$

where I_b and I_a correspond to the anodic peak current before and after the hybridization process, respectively. The amperometric anodic shift for the biosensorBSH16 after its interaction with different concentrations of plasmid samples is shown in Fig. S3. A gradual increase in the magnitude of the ΔI (%) values was observed that correlate with the rise of the concentrations of the analyzed samples. A linear variation of ΔI (%) ranging from $208.04 \pm 3.92\%$ to $325.34 \pm 18.69\%$ was obtained after HPV16 specific recognition (Table S4).

The mathematical models were based on the confidence limits of the straight regression line applied to a linear portion of the calibration curve [34]. The LOD, LOQ, and sensitivity were expressed as $3.3 \sigma/\text{slope}$, $10\sigma/\text{slope}$, and $\text{slope}/(\text{area of the electrode})$, respectively, where σ is the standard deviation of the blank measurement [35]. The biosensorBSH16 presents a sensitivity of $1.93 \mu\text{A}/\text{pg } \mu\text{L}^{-1} \text{ cm}^2$ with a detection range varying from 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 1 $\text{fg } \mu\text{L}^{-1}$. The LOD and LOQ of the proposed biosensor are found to be $0.89 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ and $2.70 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$, respectively, with a regression coefficient of 0.98 (inset of Fig. 3b).

3.4. Voltammetric characterization of the bioactivity of DNA probes against HPV families

We obtained different biosensors based on DNA probes specific for HPV families, as follow: biosensorBSH6 (Fig. 4a), biosensorBSH16 (Fig. 4b), biosensorBSH18 (Fig. 4c), biosensorBSH26 (Fig. 4d), biosensorBSH53 (Fig. 4e), and biosensorBSH61 (Fig. 4f). The specificity of the DNA probes for each genotype is detailed in Table S2. Biosensors were exposed to plasmids containing the L1 viral gene. The presence of double-stranded DNA (dsDNA) on the sensor surface causes a significant reduction of the amperometric response [36]. The anodic peak was reduced due to partial blockage of the oxide-reduction processes (see insets of Fig. 4).

Also, electrochemical biosensors were exposed to plasmid mixtures containing the HPV L1 gene not belonging to the probe recognition family (mixed samples used as negative control). The HPV types present in the mixed samples are described in Table S5. Changes in the ΔI values ($0.33 \pm 0.01\%$ to $22.14 \pm 0.80\%$) were observed after exposure of the biodevices to negative samples. These voltammetric variations indicate the physical adsorption of non-complementary DNA sequences. Of note, the ΔI values for the biosensor exposed to negative samples are

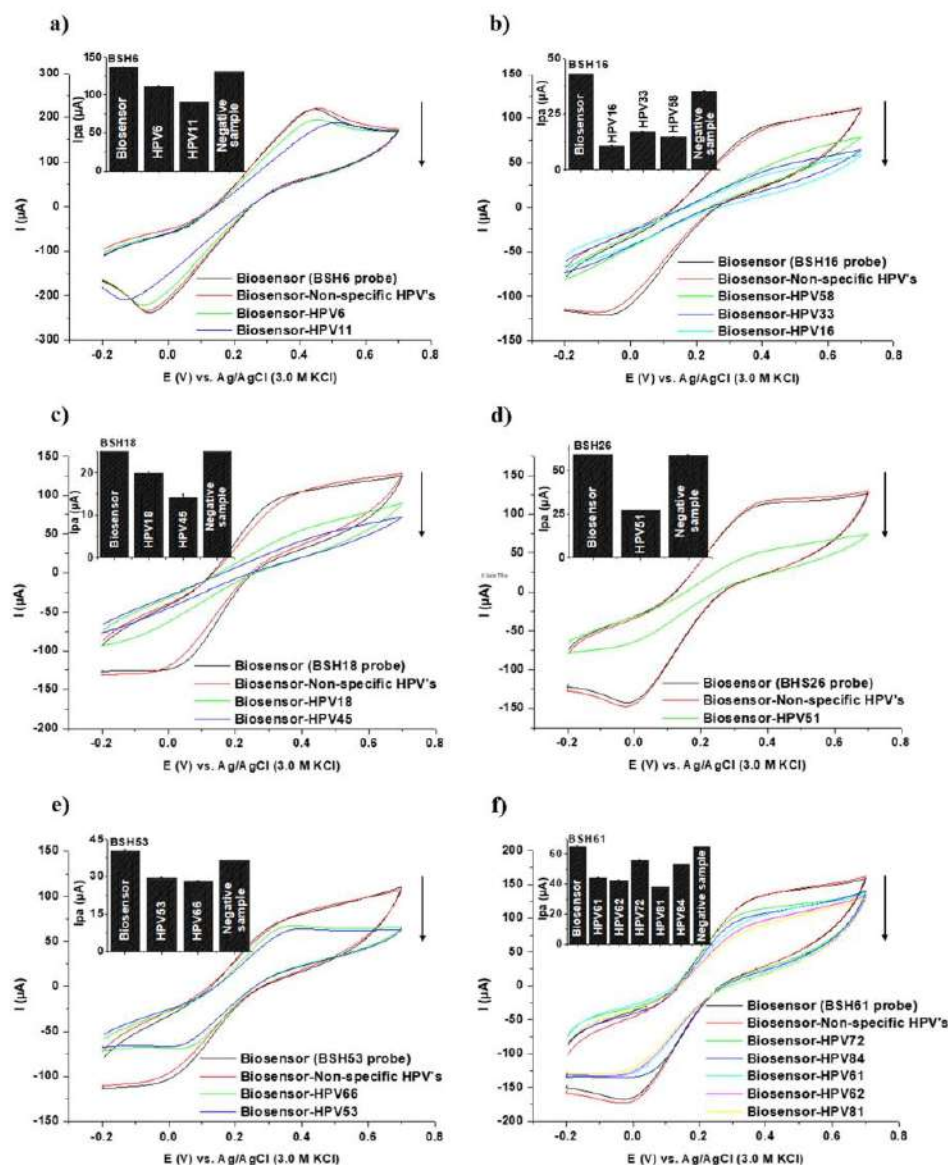


Fig. 4. Voltammetric characterization of the flexible biosensors based on the use of DNA probes specific for HPV families: BSH6 (a), BSH16 (b), BSH18 (c), BSH26 (d), BSH53 (e) and BSH61 probe (f). Each biosensor was exposed to plasmids containing the L1 viral gene whose HPV type is included in the biorecognition family and plasmid mixtures containing the HPV L1 gene (used as negative control). Inset: histograms for anodic peak current. The concentration of all samples is $100 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$.

significantly lower than the ΔI values obtained during assays with complementary DNA sequences (see Table S4).

3.5. p53 gene monitoring and HPV families identification in cervical specimens

The existence of the relationship between high-risk HPV infection and cervical carcinogenesis highlights the importance of early cancer

diagnosis. The p53 gene is a biomarker for carcinogenicity, and its increased expression may be associated with the establishment of malignant lesions [4]. Thus, a DNA probe for p53 gene was used in biosensing assays.

Fig. 5a shows the voltammetric characterization for the biosensor_{p53} after bioactivity tests with cervical specimens obtained from women infected with different types of HPV (HPV6, 11, 16, 31, 33, 45, and 58). After the exposure of the sensor to clinical samples occurs a reduction in

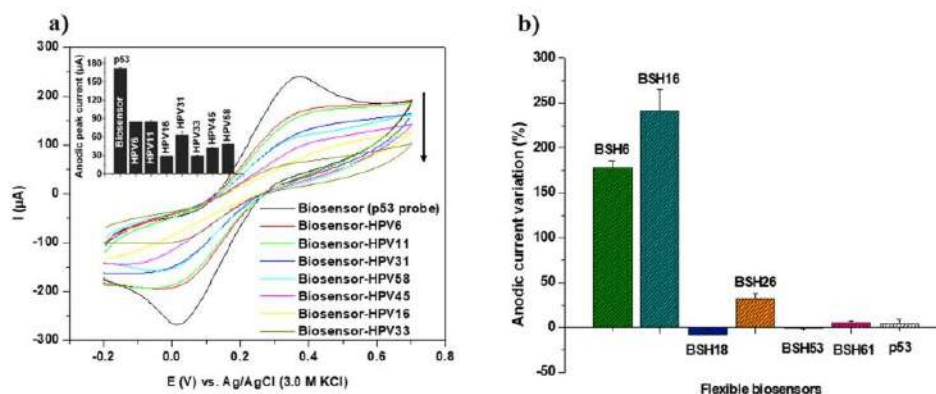


Fig. 5. Voltammetric characterization for the biosensor p53 exposed to cervical specimens obtained from women infected with different types of HPV (HPV6, 11, 16, 31, 33, 45, and 58) (a). Screening test in the clinical sample using flexible biosensors (b). Inset: histograms for anodic peak current. The concentration of all samples is 100 pg μL^{-1} .

the voltammetric areas (inset of Fig. 5a), indicating the capture of the target gene on the flexible transducer. A detailed analysis reveals that the biosensor_{p53} is sensitive to detect variations in the p53 gene expression in women with high-risk HPV (oncogenic) (HPV16, 31, 33, 45, and 58). A decrease in voltammetric current was obtained (Table S6), with ΔI values ranging from $171.72 \pm 25.46\%$ to $491.02 \pm 3.52\%$. This fact may be related to a supposed overexpression of p53 gene (associated with predisposition to cervical cancer).

Specimens with low-risk HPV (HPV6 and 11) presented ΔI values ranging from $102.68 \pm 5.33\%$ to $103.22 \pm 0.40\%$. These data suggest that samples with low-risk HPV may not have overexpression of the p53 gene. This molecular profile is expected because oncogenic proteins (E6 and E7 proteins) from low-risk genotypes cause incompetent degradation of the p53 protein [37]. Thus, the expression of the p53 gene is not intensified.

The electrochemical results for a screening test in a cervical specimen using flexible biosensors are shown in Fig. 5b. Seven electrodes differentiated by the nature of the biorecognition probes (BSH6, BSH16, BSH18, BSH26, BSH53, BSH61, and p53 probes) were used to evaluate

the clinical samples. The biosensor results were associated with current variation after exposure to clinical samples.

We used HPV mixed samples as a negative control. The HPV mixed samples contain the HPV L1 gene not belonging to the probe recognition family. The screening test exhibited positive results for HPV families associated with the BSH6 and 16 probes. A positive response was observed for the BSH26 probe. Of note, irrelevant amperometric results for BSH18, BSH53, BSH61, and p53 probes were obtained.

The specificity of the biosensing system was evaluated with oligonucleotide sequences not complementary to the biorecognition probes (plasmid sample), clinical sample from a non-HPV infected patient, and clinical samples containing the genome of one of the following external infecting agents; hepatitis C virus (HCV), *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*. In Fig. S4 can be observed that the variation of the electrochemical responses after the biorecognition assays is insignificant compared to clinical sample infected with HPV. Therefore, the high specificity of the biosensor and the low capacity to produce false positive results are suggested. A comparison of the proposed biosensor with other reported biosensors developed for the identification of HPV is

Table 1

Analytical comparison between the biosensor presented in this work and the other sensor systems reported in the literature for the oligonucleotide detection.

Biosensitive platform	DNA target	Analytical technique	Hybridization marker	Detection time	Detection range	Limit of detection	Limit of quantification	Reference
ITO surface/PPy/AuNP/Cys/Probe _{BSH6} /BSA	HPV16 HPV31 HPV33 HPV35 HPV52 HPV58	CV and EIS	Label-free	15 min	6.42 pM to 64.2 nM	57.14 fM	173.34 fM	This work
Screen-printed carbon electrode/nanocomposite of reduced graphene oxide and multivalued carbon nanotubes/AuNPs/cysteine/HPV probe	HPV18	DPV	anthraquinone-2-sulfonic acid monohydrate sodium salt	15 min	0.01 nM to 0.01 fM	0.05 fM	–	[39]
Polycarbonate surface/gold nanotubes/HPV probe	HPV16	EIS	Label-free	–	0.01 pM to 1 μM	1 fM	–	[5]
Gold surface/L-cysteine/HPV probe	HPV16	DPV	Methylene blue	10 min	18.75 nM to 1 pM	18.13 nM	–	[21]
IDE chip/ZnO-Nanorods/AuNP/HPV probe	HPV16	EIS	Label-free	10 min	0.1 μM to 1 fM	1 fM	–	[40]
Electrokinetic membrane sensor associated with a microfluidic detection chip	microRNAs	Piezoelectric detection based on surface acoustic wave	Label-free	30 min	–	1 pM	–	[41]

DPV - differential pulse voltammetry.

shown in Table 1.

The PCR and hybrid capture techniques can be considered gold standard methods for the molecular diagnosis of HPV [7]. Noteworthy, the PCR technique exhibits a superior performance in terms of sensitivity, specificity and quantification capacity compared to other molecular methods [38]. However, these methods require expensive instrumentation, qualified professionals, and a long time for multiple analyses [6]. Electrochemical biosensors have been developed to detect the HPV genome (Table 1) since the virus identification is essential for the treatment and early diagnosis of cervical cancer. The proposed sensor was able to identify HPV families at minimal concentrations with LOD of 0.89 pg μL^{-1} and LOQ of 2.70 pg μL^{-1} . The analytical results were obtained in a fast time of analysis (15 min) with high sensitivity, specificity, and selectivity. The developed degenerate probes were able to recognize the HPV L1 gene and discriminate strains in viral families. Also, the specific identification of the HPV genotypes can be performed through a decision tree between positive and negative results for different probes used simultaneously (Table S7). The proposed biosensor is a useful alternative for the rapid screening of HPV in clinical specimens.

4. Conclusions

The present study provides a simple process for obtaining flexible electrodes constructed from the electrochemical polymerization of PPy, followed by AuNPs electrosynthesis. Conductive PPy film is a promising substrate for the synthesis of metallic nanoparticles in a non-aggregate state. The association of these functional materials allowed obtaining a platform with improved electrochemical properties and high surface area. Oligonucleotide probes were developed for the specific recognition of HPV families. Thus, it was possible to construct label-free biosensors for the differential diagnosis of papillomavirus. The electrochemical results reveal the ability of the biosensor to identify specific types of HPV at minimal concentrations. The innovative aspect of this study is the combination of HPV screening with p53 gene monitoring. To the best of our knowledge is the first time that this approach is reported in electrochemical biosensors for HPV. The suggested analysis strategy is essential to evaluate the oncogenic potential of HPV infections and prevent cervical cancer. In particular, the proposed electrode is an economically viable model with the simplicity of construction. These characteristics enable its use in the sensitive, selective, and rapid diagnosis of clinical diseases.

CRediT authorship contribution statement

Karen Y.P.S. Avelino: Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - Original Draft. **Léony S. Oliveira:** Investigation, Formal analysis. **Norma Lucena Silva:** Validation, Formal analysis, Funding acquisition. **César A.S. Andrade:** Conceptualization, Formal analysis, Writing - Review & Editing, Supervision, Funding acquisition. **Maria D. L. Oliveira:** Conceptualization, Formal analysis, Writing - Review & Editing, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors are grateful for the support from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development/CNPq (grant numbers 314894/2018-7 and 314756/2018-3); Brazilian Health Ministry Project DECIT-FINEP-CNPq (grant numbers 1299/2013 and 401700/2015-1); Pernambuco State Foundation for Research Support,

FACEPE-PPSUS-APQ (grant number 0040-4.00/13); and PROPESQ/UFPE. Karen Y. P. S. Avelino and Léony S. Oliveira would like to thank CAPES and FACEPE for their scholarships.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122118>.

References

- [1] S. de Sanjosé, M. Brotons, M.A. Pavón, The natural history of human papillomavirus infection, *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 47 (2018) 2–13.
- [2] H. Huang, W. Bai, C. Dong, R. Guo, Z. Liu, An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on graphene/Au nanorod/polythionine for human papillomavirus DNA detection, *Biosens. Bioelectron.* 68 (2015) 442–446.
- [3] R. Khoury, S. Sauter, M. Butsch Kovacic, A. Nelson, K. Myers, P. Mehta, S. Davies, S. Wells, Risk of human papillomavirus infection in cancer-prone individuals: what we know, *Viruses* 10 (1) (2018) 47.
- [4] S.M. Gupta, J. Mania-Pranamik, Molecular mechanisms in progression of HPV-associated cervical carcinogenesis, *J. Biomed. Sci.* 26 (1) (2019) 28.
- [5] M. Shariati, M. Ghorbani, P. Sasanpour, A. Karimzadeh, An ultrasensitive label free human papilloma virus DNA biosensor using gold nanotubes based on nanoporous polycarbonate in electrical alignment, *Anal. Chim. Acta* 1048 (2019) 31–41.
- [6] E. Razouli, Z. Shahnava, W.J. Basirun, M. Rezaei, A. Avan, M. Ghayour-Mobarhan, R. Khandanlou, M.R. Johan, Advancements in electrochemical DNA sensor for detection of human papilloma virus? A review, *Anal. Biochem.* 556 (2018) 136–144, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.07.002>.
- [7] P. Mahmoodi, M. Fani, M. Rezaei, A. Avan, Z. Pasdar, E. Karimi, I.S. Amiri, M. Ghayour-Mobarhan, Early detection of cervical cancer based on high-risk HPV DNA-based biosensors: a systematic review, *Biofactors* 45 (2016) 101–117.
- [8] J. Chao, D. Zhu, Y. Zhang, L. Wang, C. Fan, DNA nanotechnology-enabled biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 76 (2016) 68–79.
- [9] D. Ye, X. Zuo, C. Fan, DNA nanotechnology-enabled interfacial engineering for biosensor development, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 11 (2018) 171–195.
- [10] N. Wang, M. Lin, H. Dai, H. Ma, Functionalized gold nanoparticles/reduced graphene oxide nanocomposites for ultrasensitive electrochemical sensing of mercury ions based on thymine-mercury-thymine structure, *Biosens. Bioelectron.* 79 (2016) 320–326.
- [11] B. Dalshayini, K.R. Reddy, A. Mishra, N.P. Shetti, S.J. Malode, S. Basu, S. Naveen, A.V. Raghu, Role of conducting polymer and metal oxide-based hybrids for applications in amperometric sensors and biosensors, *Microchem. J.* 147 (2019) 7–24.
- [12] R. Jain, N. Jadon, A. Pawaiya, Polypyrrole based next generation electrochemical sensors and biosensors: a review, *Trac. Trends Anal. Chem.* 97 (2017) 363–373.
- [13] Y. Li, G. Shi, Electrochemical growth of two-dimensional gold nanostructures on a thin polypyrrole film modified ITO electrode, *J. Phys. Chem. B* 109 (50) (2005) 23787–23793.
- [14] L. Devkota, L.T. Nguyen, T.T. Vu, B. Piro, Electrochemical determination of tetracycline using AuNP-coated molecularly imprinted overoxidized polypyrrole sensing interface, *Electrochim. Acta* 270 (2018) 535–542.
- [15] A. Economou, C. Koldinas, M. Prodromidis, Flexible plastic, paper and textile lab-on-a-chip platforms for electrochemical biosensing, *Lab Chip* 18 (13) (2018) 1812–1830.
- [16] C.G. Granqvist, A. Hultåker, Transparent and conducting ITO films: new developments and applications, *Thin Solid Films* 411 (1) (2002) 1–5.
- [17] M.N.S. Karaboga, M.K. Sergintürk, A novel silanization agent based single used biosensing system: detection of C-reactive protein as a potential Alzheimer's disease blood biomarker, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 154 (2018) 227–235.
- [18] R. Atchudan, N. Muthukanny, T.N.J. Edison, S. Perumal, R. Vinodh, K.H. Park, Y. R. Lee, An ultrasensitive photoelectrochemical biosensor for glucose based on bio-derived nitrogen-doped carbon sheets wrapped titanium dioxide nanoparticles, *Biosens. Bioelectron.* 126 (2019) 160–169.
- [19] M.N.S. Karaboga, Ç.S. Şimşek, M.K. Sergintürk, AuNPs modified, disposable, ITO based biosensor: early diagnosis of heat shock protein 70, *Biosens. Bioelectron.* 84 (2016) 22–29.
- [20] P. Teengam, W. Siangproh, A. Tuantranont, C.S. Henry, T. Vilhavan, O. Chailapakul, Electrochemical paper-based peptide nucleic acid biosensor for detecting human papillomavirus, *Anal. Chim. Acta* 952 (2017) 32–40.
- [21] D.S. Campos-Ferreira, G.A. Nascimento, E.V.M. Souza, M.A. Souto-Maior, M. S. Arruda, D.M.L. Zanforlin, M.H.F. Ekert, D. Brunetto, J.L. Lima-Filho, Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16 detection in real samples, *Anal. Chim. Acta* 804 (2013) 258–263.
- [22] R. Sabzi, B. Sehamia, M. Pouranghi-Azari, M. Hejazi, Electrochemical detection of human papilloma virus (HPV) target DNA using MB on pencil graphite electrode, *J. Iran. Chem. Soc.* 5 (3) (2008) 476–483.
- [23] S. Wang, L. Li, H. Jin, T. Yang, W. Bao, S. Huang, J. Wang, Electrochemical detection of hepatitis B and papilloma virus DNAs using SWCNT array coated with gold nanoparticles, *Biosens. Bioelectron.* 41 (2013) 205–210.
- [24] S. Jampasa, W. Wongsawat, N. Rodthongkum, W. Siangproh, P. Yanatatansejit, T. Vilhavan, O. Chailapakul, Electrochemical detection of human papillomavirus

- DNA type 16 using a pyrrolidyl peptide nucleic acid probe immobilized on screen-printed carbon electrodes, *Biosens. Bioelectron.* 54 (2014) 428–434.
- [25] F. Chekin, K. Bagga, P. Subramanian, B. Jijie, S.K. Singh, S. Kuningot, R. Boukherroub, S. Szunerits, Nucleic aptamer modified porous reduced graphene oxide/MoS₂ based electrodes for viral detection: application to human papillomavirus (HPV), *Sensor. Actuator. B Chem.* 262 (2018) 991–1000.
- [26] L. Dai Tran, D.T. Nguyen, B.H. Nguyen, Q.P. Do, H. Le Nguyen, Development of interdigitated arrays coated with functional polyaniline/MWCNT for electrochemical biodetection: application for human papilloma virus, *Talanta* 85 (3) (2011) 1560–1565.
- [27] M. Lin, A dopamine electrochemical sensor based on gold nanoparticles/over-oxidized polypyrrole nanotube composite arrays, *RSC Adv.* 5 (13) (2015) 9848–9851.
- [28] T. Sillu, Q. Hong, J. Tamm, R.G. Compton, AFM studies of polypyrrole film surface morphology I. The influence of film thickness and dopant nature, *Synth. Met.* 93 (1) (1998) 59–64.
- [29] A.M. Kumar, N. Rajendran, Influence of zirconia nanoparticles on the surface and electrochemical behaviour of polypyrrole nanocomposite coated 316L SS in simulated body fluid, *Surf. Coating. Technol.* 213 (2012) 155–166.
- [30] W. Chen, Z. Lu, C.M. Li, Sensitive human interleukin 5 impedimetric sensor based on Polypyrrole–pyrrolepropyllic Acid–gold nanocomposite, *Anal. Chem.* 80 (22) (2008) 8485–8492.
- [31] M. Manzano, S. Viezzi, S. Mazerat, R.S. Marks, J. Vidic, Rapid and label-free electrochemical DNA biosensor for detecting hepatitis A virus, *Biosens. Bioelectron.* 100 (2016) 89–95.
- [32] K.Y.P. dos Santos Avelino, I.A.M. Frías, N. Lucena-Silva, C.A.S. de Andrade, M.D. L. de Oliveira, Impedimetric gene assay for ECR/ABL transcripts in plasmids of patients with chronic myeloid leukemia, *Microchimica Acta* 185 (9) (2018) 415.
- [33] N.A. Pannula, U. Hashim, S.C. Gopinath, S. Nadzirah, Z. Rejail, A. Afzan, M. Uda, V. Hong, R. Rajapaksha, Voltammetric determination of human papillomavirus 16 DNA by using interdigitated electrodes modified with titanium dioxide nanoparticles, *Microchimica Acta* 186 (5) (2019) 336.
- [34] I. Lavagnini, R. Antiochia, F. Magno, A calibration-base method for the evaluation of the detection limit of an electrochemical biosensor, *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis* 19 (11) (2007) 1227–1230.
- [35] P. Supraja, S. Tripathy, S.R.K. Vanjari, V. Singh, S.G. Singh, Electrospun tin (IV) oxide nanofiber based electrochemical sensor for ultra-sensitive and selective detection of atrazine in water at trace levels, *Biosens. Bioelectron.* (2019) 111441.
- [36] A. Benvidi, A. Dehghani Firoozabadi, M. Dehghan Tazerjani, S.M. Moshaghiani, M. Mazloum-Ardakani, A. Ansarin, A highly sensitive and selective electrochemical DNA biosensor to diagnose breast cancer, *J. Electroanal. Chem.* 750 (2015) 57–64.
- [37] K. Mürger, A. Baldwin, K.M. Edwards, H. Hayakawa, C.L. Nguyen, M. Owens, M. Grace, K. Huh, Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis, *J. Virol.* 78 (21) (2004) 11451–11460.
- [38] S.S. Shah, S. Senapati, F. Klamann, D.L. Miller, J.J. Johnson, H.-C. Chang, M. S. Stack, Current technologies and recent developments for screening of HPV-associated cervical and oropharyngeal cancers, *Cancers* 8 (9) (2016) 85.
- [39] P. Mahmoodi, M. Rezayi, E. Rasouli, A. Avram, M. Gholami, M.G. Mobarhan, E. Karimi, Y. Alias, Early-stage cervical cancer diagnosis based on an ultra-sensitive electrochemical DNA nanobiosensor for HPV-18 detection in real samples, *J. Nanobiotechnol.* 18 (1) (2020) 1–12.
- [40] T. Ramesh, K.L. Foo, R. Haanindraprasad, A.J. Sam, M. Soleymanpour, Gold-Hybridized Zinc oxide nanorods as Real-time Low-cost nanoBiosensors for Detection of virulent DNA signature of HPV-16 in cervical carcinoma, *Sci. Rep.* 9 (1) (2019) 1–17.
- [41] Z. Romdhani, C. Zhang, K. Richards, L. Chen, G. Xu, B.L. Stiles, R. Hill, S. Senapati, D.B. Go, H.-C. Chang, Extracellular vesicle microRNA quantification from plasma using an integrated microfluidic device, *Communications Biology* 2 (1) (2019) 1–9.

Electronic Supporting Material

Flexible sensor based on conducting polymer and gold nanoparticles for electrochemical screening of HPV families in cervical specimens

Karen Y.P.S. Avelino^{a,b}, Léony S. Oliveira^b, Norma Lucena-Silva^{c,d}, César A.S. Andrade^{a,b}, Maria D.L. Oliveira^{a,b*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

^bLaboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

^cInstituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), 50670-420 Recife, PE, Brazil.

^dLaboratório de Biologia Molecular, Departamento de Oncologia Pediátrica, Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), 50070-550 Recife, PE, Brazil.

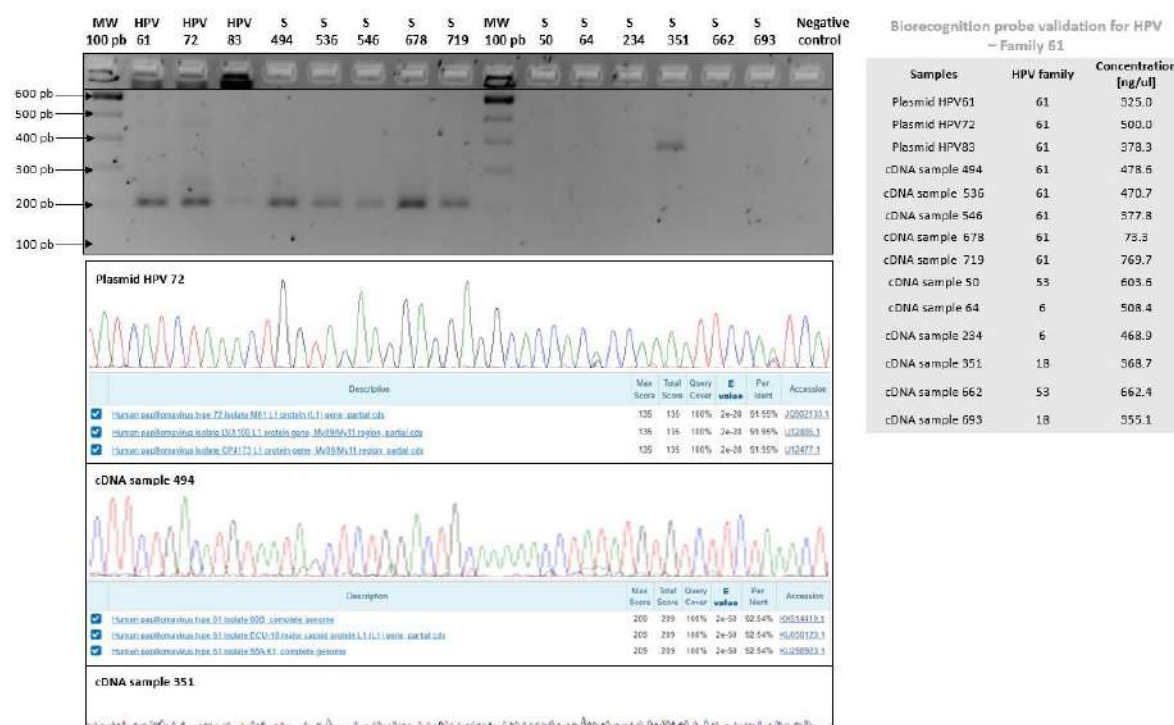
*To whom correspondence should be addressed.

Maria D.L. Oliveira, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil

Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547

E-mail: m_danielly@yahoo.com.br

Figure S1. Electrophoretic gel run and genetic sequence analysis of PCR products using as primer the BSH61 probe. Viral DNA present in recombinant plasmids (HPV61, 72 and 83) and cervical samples (cDNA samples 494, 536, 546, 678, 719, 50, 64, 254, 351, 662, and 693) were tested.



RT-PCR amplification is shown in Fig. S1. The primer of the family 61 amplifies 200 bp oligonucleotide fragments from viral DNA present in recombinant plasmids (HPV61, 72, and 83) and cervical samples (cDNA samples 494, 536, 546, 678, and 719). On the other hand, the BSH61 probe is not able to amplify the viral DNA of genotypes that not belong to the biorecognition family (e.g., cDNA samples 50, 64, 234, 662 and 693). The electrophoretic gel reveals an amplified band of 400 bp for the cDNA sample 351 infected with HPV belonging to family 18. Genetic sequence analysis using the BSH61 probe shows that the amplified DNA sequences correspond to genotypes 61 and 72.

Figure S2. Impedimetric characterization of each step of assembly of the flexible biosensor. Inset: Randle's equivalent circuit used to fit the impedance measurements.

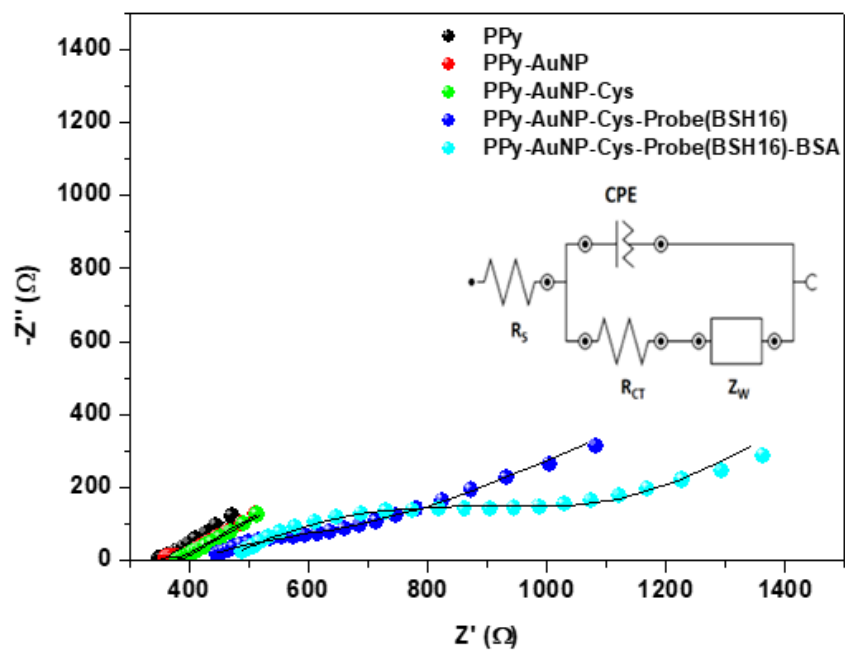


Figure S3. Amperometric anodic shift for the biosensor_{BSH16} after hybridization with recombinant plasmids containing the L1 gene of HPV16 in different concentrations (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$). Three replicates for each experimental condition were used. Experimental values are described as the mean values $\pm$ their half-deviation.

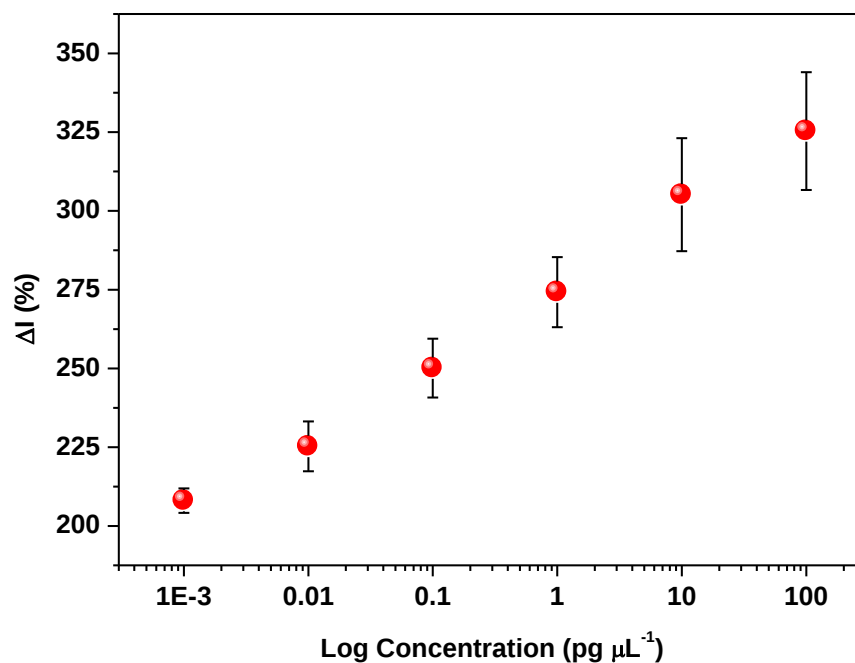


Figure S4. ΔR_{CT} values (%) for the selectivity assay with oligonucleotide sequences not complementary to the biorecognition probes (plasmid sample and different cDNA samples). All samples were tested at a concentration of $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

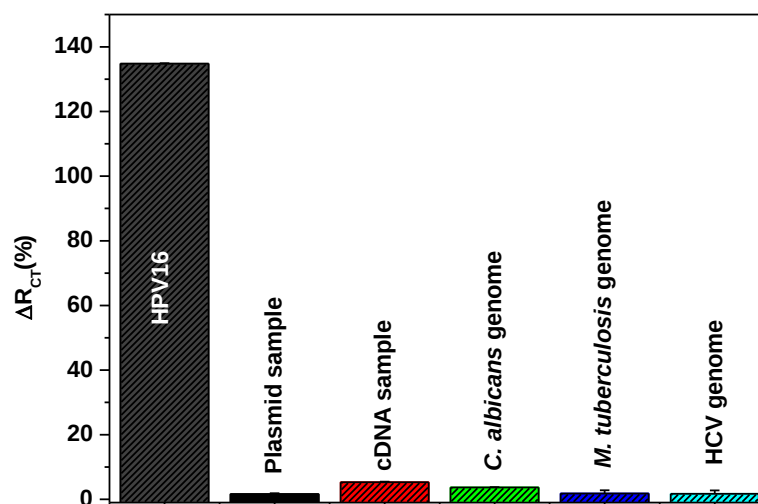


Table S1. Reference sequences of the L1 gene of the HPV types used in the construction of the probes for the development of the biosensors.

Family	Type of HPV	Access number
F16	HPV 16	FJ006723.1
	HPV 31	HQ537668.1
	HPV 33	HQ537694.1
	HPV 35	GQ479039.1 M74117.1
	HPV 52	JN874436.1 HQ537751.1
	HPV 58	EU918765.1
F18	HPV 18	GQ180791.1
	HPV 39	JN104070.1 KC470249.1
	HPV 45	KC470260.1
	HPV 59	X77858.1
	HPV 68	EU918769.1
F26	HPV 26	NC_001583.1
	HPV 51	GQ487711.1
	HPV 82	AB027021.1
F34	HPV 34	NC_001587.1
	HPV 73	X94165.1
F53	HPV 53	NC_001593.1
	HPV 56	EF177180.1
	HPV 66	EF177190.1
F6	HPV 6	AF092932.1
	HPV 11	JQ773412.1
	HPV 44	HE963128.1
	HPV 55	HE963177.1
F7	HPV 7	NC_001595.1
	HPV 40	X74478.1
	HPV 91	AF419318.1
F32	HPV 32	NC_001586.1
	HPV 42	GQ472847.1
F54	HPV 54	U37488.1
F61	HPV 61	U31793.1
	HPV 72	X94164.1
	HPV 81	AJ620209.1
	HPV 83	AF151983.1
	HPV 84	AF293960.1
	HPV 62	AY395706.1
	HPV 87	AJ400628.2
	HPV 89	AF436128.1
F71	HPV 71	AY330623.1
F64	HPV 64	U12495.1
F70	HPV 70	U22461.1

F85	HPV 85	AF131950.1
F86	HPV 86	AF349909.1

The construction of the DNA probes for diagnosis and identification of HPV types considered the classification of the "Human Papillomavirus T Cell Antigen Database" data source developed by the Bioinformatics Core Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute of the Harvard University. The complete L1 gene sequences of the different genotypes shown in the database were downloaded from the site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>. The access number of each sequence to be used in subsequent alignments was listed in Table S2. The alignment of the L1 gene sequences of the viral types belonging to each family was performed using the standard parameters (default) of the MEGA 5 program (<http://www.megasoftware.net/>). From blocks of similarity between the aligned sequences, degenerations in some oligonucleotides were included, so that the resulting probe was able to identify all viral types within the HPV family. Blocks of oligonucleotide similarities to more than one HPV family were discarded. The selected oligonucleotide sequences had 22 nucleotides in size and, as far as possible, up to five degenerate positions. Probes constructed to identify the family of HPV types can determine the genotype from a decision tree between positive and negative results for different probes used simultaneously.

Table S2. Description of the HPV genotypes that are identified by each DNA probe.

DNA probe	Biorecognition families
Probe BSH06	HPV6, 11, 44 and 55
Probe BSH16	HPV16, 31, 33, 35, 52 and 58
Probe BSH18	HPV18, 39, 45, 59 and 68
Probe BSH26	HPV26, 51 and 82
Probe BSH53	HPV53, 56 and 66
Probe BSH61	HPV61, 62, 72, 81, 83, 84, 87 and 89

Table S3. Values of the equivalent circuit elements obtained from the fitting of the impedance results for each step of assembly of the flexible biosensor. Three replicates for each experimental condition were used. Experimental values are described as the mean values $\pm$ their half-deviation.

Modified electrode	CPE (μMho)	n	R_{CT} ($k\Omega$)	R_s (Ω)	Z_w (μMho)
PPy	1.86 ± 0.88	0.55 ± 0.07	0.02 ± 0.007	370.00 ± 25.24	5.75 ± 0.70
PPy-AuNP	450.00 ± 102.68	0.41 ± 0.02	0.05 ± 0.003	370.33 ± 32.87	6.36 ± 0.15
PPy-AuNP-Cys	1014.00 ± 36.77	0.32 ± 0.05	0.03 ± 0.011	373.00 ± 8.48	5.64 ± 0.20
PPy-AuNP-Cys-Probe _{BSH16}	661.00 ± 142.83	0.32 ± 0.02	0.66 ± 0.074	401.50 ± 3.53	1.70 ± 0.35
PPy-AuNP-Cys-Probe _{BSH16} -BSA	123.33 ± 9.45	0.49 ± 0.01	0.68 ± 0.007	457.00 ± 1.00	3.08 ± 0.11

Table S4. Amperometric anodic shift for the biosensor after hybridization with recombinant plasmids containing the L1 gene of HPV specific types and mixtures of plasmids containing the HPV L1 gene not (negative control). Three replicates for each experimental condition were used. Experimental values are described as the mean values $\pm$ their half-deviation.

Modified electrode	Sample concentration ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	Before ($I_b \mu\text{A}$)	After ($I_a \mu\text{A}$)	ΔI (%)
PPy	-	194.36 ± 10.27	-	-
PPy-AuNP	-	166.84 ± 5.74	-	-
PPy-AuNP-Cys	-	185.50 ± 4.70	-	-
PPy-AuNP-Cys-Probe _{B_{SH}16}	-	80.78 ± 3.07	-	-
PPy-AuNP-Cys-Probe _{B_{SH}16} -BSA	-	42.95 ± 0.11	-	-
Biosensor _{B_{SH}16}	-	42.95 ± 0.11		
Biosensor _{B_{SH}16} -HPV16	0.001		13.94 ± 0.176	208.04 ± 3.92
Biosensor _{B_{SH}16} -HPV16	0.01		13.21 ± 0.324	225.25 ± 7.91
Biosensor _{B_{SH}16} -HPV16	0.1		12.27 ± 0.32	250.10 ± 9.35
Biosensor _{B_{SH}16} -HPV16	1		11.48 ± 0.35	274.21 ± 11.13
Biosensor _{B_{SH}16} -HPV16	10		10.62 ± 0.48	305.15 ± 17.95
Biosensor _{B_{SH}16} -HPV16	100		10.11 ± 0.45	325.34 ± 18.69
Biosensor _{B_{SH}6}	-	136.69 ± 0.81	-	-
Biosensor _{B_{SH}6} -HPV6	100	-	111.30 ± 0.14	22.81 ± 0.16
Biosensor _{B_{SH}6} -HPV11	100	-	90.18 ± 0.22	51.58 ± 0.37
Biosensor _{B_{SH}6} -Mix of non-specific HPV's	100	-	130.86 ± 0.58	4.46 ± 0.46
Biosensor _{B_{SH}16}	-	42.95 ± 0.11	-	-
Biosensor _{B_{SH}16} -HPV16	100	-	21.22 ± 0.14	102.45 ± 1.36
Biosensor _{B_{SH}16} -HPV33	100	-	16.90 ± 0.21	154.16 ± 3.13
Biosensor _{B_{SH}16} -HPV58	100	-	14.61 ± 0.35	194.11 ± 7.03
Biosensor _{B_{SH}16} -Mix of non-specific HPV's	100	-	35.17 ± 0.23	22.14 ± 0.80
Biosensor _{B_{SH}18}	-	56.71 ± 1.54	-	-
Biosensor _{B_{SH}18} -HPV18	100	-	19.91 ± 0.37	184.84 ± 5.33

Biosensor _{B_{SH18}} -HPV45	100	-	14.19 ± 0.83	300.45 ± 23.25
Biosensor _{B_{SH18}} -Mix of non-specific HPV's	100	-	51.43 ± 1.24	10.28 ± 2.63
Biosensor _{B_{SH26}}	-	59.01 ± 0.01	-	-
Biosensor _{B_{SH26}} -HPV51	100	-	27.23 ± 0.14	116.71 ± 1.14
Biosensor _{B_{SH26}} -Mix of non-specific HPV's	100	-	58.71 ± 0.09	0.51 ± 0.15
Biosensor _{B_{SH53}}	-	40.01 ± 0.88	-	-
Biosensor _{B_{SH53}} -HPV53	100	-	29.24 ± 0.44	36.85 ± 2.05
Biosensor _{B_{SH53}} -HPV66	100	-	28.03 ± 0.45	42.74 ± 2.32
Biosensor _{B_{SH53}} -Mix of non-specific HPV's	100	-	36.42 ± 0.11	9.84 ± 0.33
Biosensor _{B_{SH61}}	-	64.81 ± 0.84	-	-
Biosensor _{B_{SH61}} -HPV61	100	-	44.17 ± 0.24	46.72 ± 0.81
Biosensor _{B_{SH61}} -HPV62	100	-	42.36 ± 0.66	53.01 ± 2.37
Biosensor _{B_{SH61}} -HPV72	100	-	56.11 ± 0.30	15.51 ± 0.62
Biosensor _{B_{SH61}} -HPV81	100	-	37.73 ± 0.28	71.79 ± 1.27
Biosensor _{B_{SH61}} -HPV84	100	-	53.21 ± 0.12	21.79 ± 0.29
Biosensor _{B_{SH61}} -Mix of non-specific HPV's	100	-	64.60 ± 0.01	0.33 ± 0.01

Table S5. Description of the HPV genotypes present in the mixed samples used as a negative control for each DNA probe.

DNA probe	HPV genotypes present in mixed plasmid sample
Probe BSH06	HPV16, 18, 33, 45, 51, 53, 54, 58, 61, 62, 66, 72, 81 and 84.
Probe BSH16	HPV6, 11, 18, 45, 51, 53, 54, 61, 62, 66, 72, 81 and 84.
Probe BSH18	HPV6, 11, 16, 33, 51, 53, 54, 58, 62, 61, 66, 72, 81 and 84.
Probe BSH26	HPV6, 11, 16, 18, 33, 45, 53, 54, 58, 61, 62, 66, 72, 81 and 84.
Probe BSH53	HPV6, 11, 16, 18, 33, 45, 51, 58, 61, 62, 72, 81 and 84.
Probe BSH61	HPV6, 11, 16, 18, 33, 45, 51, 54, 53, 58 and 66.

Table S6. Amperometric anodic shift for the biosensor after hybridization with cervical specimens (cDNA samples) at a concentration of $100 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$. Three replicates for each experimental condition were used. Experimental values are described as the mean values $\pm$ their half-deviation.

Modified electrode	Before ($I_b \text{ } \mu\text{A}$)	After ($I_a \text{ } \mu\text{A}$)	$\Delta I \text{ (%)}$
Biosensor _{p53}	171.36 ± 2.07	-	-
Biosensor _{p53} -HPV6	-	84.32 ± 0.16	103.22 ± 0.40
Biosensor _{p53} -HPV11	-	84.57 ± 2.22	102.68 ± 5.33
Biosensor _{p53} -HPV16	-	28.99 ± 0.17	491.02 ± 3.52
Biosensor _{p53} -HPV31	-	63.21 ± 5.92	171.72 ± 25.46
Biosensor _{p53} -HPV33	-	29.22 ± 0.89	485.52 ± 17.90
Biosensor _{p53} -HPV45	-	41.75 ± 0.76	310.45 ± 7.48
Biosensor _{p53} -HPV58	-	48.32 ± 0.29	254.63 ± 2.13

Table S7. Identification of viral type using a decision tree.

Primers	16	16 ^a	16B	16C	6	6A	6B	18	18A	18B	26	53	53A	61	61A	61B	61C
Types																	
16	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
31	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

54	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
59	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
61	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
72	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+

85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

5.4 PATENTE

Número do pedido de depósito de patente - INPI: BR 10 2019 021496 1

Biossensor baseado em filme polimérico e nanoestruturas metálicas e seu uso em aplicações biomédicas

11/10/2019 870190102779
18:45

29409161811250865

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2019 021496 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959

Email: patentes_dine.propesq@ufpe.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 11/10/2019 às 18:45, Petição 870190102779

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): BIOSSENSOR BASEADO EM FILME POLIMÉRICO E NANOESTRUTURAS METÁLICAS E SEU USO EM APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Resumo: BIOSSENSOR BASEADO EM FILME POLIMÉRICO E NANOESTRUTURAS METÁLICAS E SEU USO EM APLICAÇÕES BIOMÉDICAS é resultado de uma metodologia simples para a fabricação de sistemas utilizáveis na identificação de genótipos de papilomavírus humano (HPV). O método descreve a construção de eletrodos flexíveis baseados em ITO com baixo custo de produção e eficácia transdutora para aplicação em biossensores de DNA. Objetivando-se aprimorar a performance analítica dos eletrodos, uma plataforma nanoestruturada foi elaborada sobre a área ativa do eletrodo flexível e seu procedimento metodológico exposto. A plataforma nanoestruturada foi baseada em polipirrol (PPy), nanoestruturas de ouro (AuNs) e cisteamina (Cys). Pode-se verificar que os filmes de PPy atuam como substratos ideais para a eletrossíntese de AuNs com reduzido grau de agregação molecular. Por sua vez, as AuNs demonstram biocompatibilidade e elevada área de superfície para a imobilização de biomoléculas receptoras. Assim, constata-se que a associação dos materiais funcionais supracitados é uma estratégia inovadora para a obtenção de sistemas sensores ultrasensíveis. Portanto, a fim de tornar os sistemas transdutores aplicáveis ao diagnóstico de HPV, sequências curtas de DNA (denominadas de sondas de DNA) foram desenhadas para reconhecer estritamente famílias de papilomavírus. Posteriormente, estes oligonucleotídeos de cadeia curta modificados com grupos amino funcionais foram imobilizados quimicamente sobre os transdutores nanoestruturados. A técnica de voltametria cíclica foi utilizada para a análise das etapas de modificação dos eletrodos e o monitoramento da hibridação molecular. O sistema sensor proposto nesta patente é capaz de detectar genótipos de HPV com elevada especificidade, seletividade e sensibilidade (na ordem de picograma por microlitro), além de possuir rápida resposta analítica (15 minutos).

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 11/10/2019 às 18:45, Petição 870190102779

Dados do Inventor (72)**Inventor 1 de 6****Nome:** KAREN YASMIM PEREIRA DOS SANTOS AVELINO**Inventor 2 de 6****Nome:** LÉONY SOARES DE OLIVEIRA**Inventor 3 de 6****Nome:** MAÍRA DE ARRUDA LIMA**Inventor 4 de 6****Nome:** NORMA LUCENA CAVALCANTI LICÍNIO DA SILVA**Inventor 5 de 6****Nome:** CÉSAR AUGUSTO SOUZA DE ANDRADE**Inventor 6 de 6****Nome:** MARIA DANIELLY LIMA DE OLIVEIRA**Documentos anexados**

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU e comp - COA 273.pdf
Relatório Descritivo	Relatorio Descritivo - COA 273.pdf
Reivindicação	Reivindicações - COA 273.pdf
Desenho	Figuras - COA 273.pdf
Resumo	Resumo - COA 273.pdf

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 11/10/2019 às 18:45, Petição 870190102779

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Positiva de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Lei 13.123 de 20 de maio de 2015, informando ainda:

Número da Autorização de Acesso: A4A1F05

Acesso:

Data da Autorização de Acesso: 05/09/2019

Origem do material genético e do conhecimento tradicional associado, quando for o caso

O material biológico foi obtido de material de raspado ou biópsia cervical, ou seja, do colo uterino realizado durante exame de rotina com indicação médica e autorização prévia da paciente que assinou o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). As mulheres que forneceram o material biológico foram atendidas no ambulatório do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) e no Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros (CISAM) da Universidade de Pernambuco (UPE). O estudo foi aprovado previamente pelo comitê de ética em pesquisa com número de processo CAAE 23698513.0.0000.5190.

Espécie

HHV 1-8, HPV, HCV

Candida spp

Aspergillus spp

Mycobacterium spp

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 11/10/2019 às 18:45, Petição 870190102779

BIOSSENSOR BASEADO EM FILME POLIMÉRICO E NANOESTRUTURAS METÁLICAS E SEU USO EM APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Campo técnico

01. Segundo a Organização Mundial de Saúde, o câncer cervical é o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres de todo o mundo. De acordo com estudos clínicos e epidemiológicos, a etiologia de aproximadamente 100% dos casos de câncer cervical está relacionada às infecções por papilomavírus humano (HPV) de alto risco oncogênico. Diante destes dados, verifica-se a importância do desenvolvimento de novos métodos moleculares para o diagnóstico da infecção em fase inicial, contribuindo para a prevenção do câncer e promoção da qualidade de vida dos pacientes.

02. A presente invenção aplica-se ao campo das ciências médicas, especificamente ao setor de diagnósticos clínicos. A invenção aqui descrita refere-se a um grupo de processos inter-relacionados que resultou no desenvolvimento de um protótipo de biossensor eletroquímico aplicável ao diagnóstico clínico e laboratorial de HPV. Particularmente, a invenção faz menção ao uso de técnica eletroquímica como ferramenta para a obtenção de plataformas sensoras, as quais podem ser construídas sobre superfícies transdutoras de eletrodos e/ou chips miniaturizados.

03. Primariamente, a descoberta reporta-se a um protocolo de elaboração de eletrodos de trabalho miniaturizados baseados no uso de tiras flexíveis de óxido de índio dopado com estanho (ITO) modificadas com filmes de polipirrol (PPy), nanoestruturas de ouro (AuNs) e cisteamina (Cys). Em especial, ressalta-se a eletropolimerização de monômeros de pirrol para obtenção de filmes de PPy através da técnica de voltametria cíclica (VC). Estes filmes poliméricos podem ser sintetizados diretamente sobre transdutores eletroquímicos, atribuindo-lhes notáveis propriedades, como o aumento da

condutividade elétrica e biocompatibilidade. Em adição, os filmes de PPy possuem sítios de nucleação que possibilitam a eletrossíntese de AuNs com elevado grau de orientação. As AuNs obtidas por síntese eletroquímica apresentam um baixo grau de agregação e elevada área de contato, que contribui para a imobilização de um maior número de biomoléculas e, portanto, aumento da sensibilidade de sistemas de biodetecção. Logo, estas características tornam os filmes de PPy associados às AuNs substratos ideais para a montagem de nanoplataformas e miniaturização de biossensores.

04. O uso de filmes de PPy associados às AuNs possibilitam a ancoragem de sequências nucleotídicas para o desenvolvimento de biossensores de DNA. Adicionalmente, a invenção descreve o desenvolvimento e a validação de sequências de oligonucleotídeos (sondas de DNA) elaboradas especificamente para distinguir famílias de HPV. Mediante a imobilização covalente destas sondas de DNA sobre a superfície eletroativa dos eletrodos flexíveis, obteve-se um modelo de biossensor funcional cuja metodologia de preparação e uso foram descritas. Destaca-se o emprego de ligações químicas covalentes na ancoragem de biomoléculas por reduzirem o processo de lixiviação da camada sensora e aumentarem a estabilidade do sistema eletroquímico.

05. A associação entre materiais nanométricos, polímeros condutores e biomoléculas é uma estratégia inovadora para a obtenção de biossistemas nanoestruturados. Em particular, os biossensores propostos demonstram elevada performance analítica para a detecção diferencial de genótipos de HPV em baixas concentrações. Além disso, a engenhosidade do invento pode ser empregada para a construção de outros biossensores eletroquímicos com diferentes aplicabilidades, variando-se a especificidade da biomolécula receptora de DNA.

Estado da técnica

06. O progresso da pesquisa biotecnológica contribuiu para o desenvolvimento de dispositivos eletrônicos aplicáveis ao setor de diagnósticos clínicos. Os dispositivos sensoriais representam uma tendência emergente e tecnológica nas ciências biomédicas, contribuindo para a identificação, quantificação e monitoramento de espécies químicas específicas (ALBAREDA-SIRVENT; MERKOCI; ALEGRET, 2000; HUANG et al., 2017). Em especial, ressaltam-se os biossensores eletroquímicos por serem sistemas de detecção que apresentam como agente de reconhecimento uma molécula biológica imobilizada sobre a superfície de um transdutor eletroquímico. Nestes sistemas, o processo de biorreconhecimento é convertido em um sinal analítico mensurável e proporcional ao alvo detectado (DRUMMOND; HILL; BARTON, 2003).

07. Um fator primordial que influencia a capacidade de detecção dos biossensores é a escolha do material biológico a ser utilizado como biorreceptor. Dentre as inúmeras biomoléculas, segmentos de ácidos nucleicos, comumente chamados de sondas de DNA, são extensivamente utilizados na elaboração de sistemas biossensíveis. Os genossensores ou biossensores de DNA são baseados em sondas de biorreconhecimento para captura de genes específicos através da hibridação molecular. Esta classe de biossensores apresenta amplo potencial de aplicabilidade para o diagnóstico clínico e laboratorial, pois, são ferramentas de biodetecção que permitem uma rápida análise do analito a um baixo custo, com a possibilidade de reusabilidade e miniaturização (WU et al., 2014; ZHU et al., 2014; CHAO et al., 2016).

08. Em particular, destaca-se que estas sondas de DNA podem apresentar grupos químicos funcionais na extremidade 5' ou 3', como grupos amino (-NH₂) e tiol (-SH), que permitem o estabelecimento de ligações covalentes com o substrato. Esta estratégia de ancoragem química tem sido amplamente explorada para o desenvolvimento de novos sistemas moleculares, uma vez que minimiza o processo de lixiviação da camada sensora e permite uma orientação específica das biomoléculas, contribuindo

para o aumento da capacidade de biorreconhecimento (TEENGAM et al., 2017; JAMPASA et al., 2018; RASOULI et al., 2018).

09. Com o advento da nanotecnologia e síntese de novos materiais em nanoescala, foi possível reduzir significativamente as limitações inerentes ao processo de construção dos biossensores de DNA, tais como, perda de estabilidade após ancoragem do biorreceptor e reprodutibilidade do sinal analítico. Entre os nanomateriais, destacam-se as AuNs por possuírem características essenciais e aplicáveis ao desenvolvimento de sistemas biossensíveis. Estas apresentam elevada área de contato, elevada atividade catalítica, compatibilidade biológica, elevada condutividade, não-toxicidade e habilidade de adsorção molecular. Logo, em virtude destas propriedades físicas e químicas, a incorporação de AuNs em sistemas de biodetecção pode aumentar a eficácia analítica e a robustez dos biossensores de DNA (WANG et al., 2016).

10. Os polímeros condutores também são considerados materiais funcionais para a nanoestruturação de plataformas sensoras, viabilizando novas possibilidades tecnológicas no design de biossensores (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002). Apesar destes polímeros serem substâncias orgânicas, são capazes de assumir um caráter intrinsecamente condutor, sendo por isso, denominados de metais sintéticos. Esses materiais têm ampliado a possibilidade de modificação da superfície de eletrodos para o desenvolvimento de sensores com propriedades eletroquímicas aprimoradas, tais como elevada condutividade elétrica, capacidade de armazenamento de carga e elevada cinética de transporte de elétrons na interface eletrodo/solução. Dentre os polímeros condutores, filmes de PPy têm sido investigados devido ao potencial para a fabricação de sensores bioquímicos ultrasensíveis. Esta aplicação é devido a sua biocompatibilidade, estabilidade ambiental, presença de grupos químicos funcionais e elevada taxa de transferência de elétrons que contribui significativamente para a melhoria da sensibilidade dos sistemas de biodetecção. Ademais, a síntese eletroquímica do PPy permite a deposição

direta do filme polimérico sobre a superfície do eletrodo, mediante a oxidação do monômero pirrol em potenciais relativamente baixos (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002). Sob outra perspectiva, estudos tem demonstrado que o PPy é um excelente material a ser usado como substrato ou matriz para a eletrodeposição de AuNs com redução da agregação molecular e aumento da área de superfície para posterior imobilização de biomoléculas. Logo, a combinação de filmes de PPy com AuNs eletrodepositadas é uma estratégia inovadora para a fabricação de biossensores funcionais com distintas aplicabilidades clínicas, como por exemplo, o diagnóstico de HPV (LI; SHI, 2005).

11. Considerando-se os estudos clínicos e dados epidemiológicos que demonstram os impactos das infecções por HPV na saúde pública, o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico torna-se essencial. O HPV, um vírus de DNA não envelopado, é um agente infeccioso oncogênico responsável por causar infecções nas mucosas e no epitélio anogenital. Este patógeno pode acarretar uma variedade de condições clínicas, incluindo verrugas, causadas por tipos virais de baixo risco oncogênico (HPV6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73 e 81), e neoplasias, resultantes de alterações citogenéticas ocasionadas por tipos virais de alto risco oncogênico (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) (HUTTER; DECKER, 2016). Entre os mais de 200 genótipos de HPV descritos na literatura, os tipos 16 e 18 destacam-se por estarem relacionados a aproximadamente 100% dos casos mundiais de carcinoma cervical (CAMPOS-FERREIRA et al., 2013; HUANG et al., 2015). Estudos também relatam que co-infecções entre os genótipos de HPV16 e/ou 18 com outros tipos virais, como o HPV45 e 31, podem ocasionar quadros clínicos graves, tornando a terapêutica mais difícil e laboriosa (PITTA, 2010). Além disso, pode-se inferir que infecções persistentes por papilomavírus estão intrinsicamente relacionadas com o desenvolvimento de cânceres, como o câncer cervical, peniano, vaginal, vulvar e anal (CIVIT et al., 2012).

12. A identificação do tipo de HPV em amostras clínicas possibilita um melhor prognóstico para o paciente, um diagnóstico de câncer em estágio inicial e a implementação de estratégias terapêuticas dirigidas para a obtenção de resultados mais satisfatórios. Além disso, permite o rastreamento de genótipos virais mais frequentes em uma população (HUTTER; DECKER, 2016). As principais técnicas moleculares utilizadas para a pesquisa de HPV compreendem a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) e os ensaios de captura híbrida (CIVIT et al., 2012; HUANG et al., 2015). Apesar de serem específicos, estes métodos apresentam alguns obstáculos que limitam seu amplo uso em áreas hospitalares e laboratoriais, como os altos custos para a aquisição de equipamentos e protocolos experimentais complexos e demorados (CAMPOS-FERREIRA et al., 2016; URREGO et al., 2015). Logo, o desenvolvimento de novos ensaios moleculares para a detecção de HPV com elevada acurácia e performance bioanalítica é de grande interesse para a promoção da saúde de pacientes infectados (FRÍAS et al., 2015).

13. Diversos pesquisadores têm se dedicado ao estudo de metodologias mais eficazes para a detecção de HPV. Neste intuito, a patente PI 1106062-0 A2 se refere à construção de um biossensor eletroquímico para a detecção de genótipos de HPV de alto e baixo risco oncogênico. O sistema analítico desenvolvido é constituído por sondas de DNA imobilizadas diretamente sobre um suporte condutor sólido. Neste invento foram utilizados diferentes tipos de sondas de DNA para a detecção de genótipos de HPV através do uso de uma fita teste ou multifita que contém os eletrodos de trabalho, referência e contra referência.

14. A patente CN103602755A descreve a obtenção de sensores eletroquímicos baseados no uso de sequências de DNA ancoradas sobre a superfície de um eletrodo de ouro presente em uma placa de circuito impresso. Em adição, o sinal analítico é detectado através da marcação das sondas de biorreconhecimento com moléculas de ferroceno.

15. A patente PI 2014703411 apresenta um nanobiossensor para a detecção específica dos genótipos de HPV16 e 17. O nanochip foi baseado na imobilização covalente de sondas de oligonucleotídeos sobre um eletrodo interdigitado modificado com camadas de óxido de titânio.

16. O uso da técnica piezoelétrica é descrita na patente PI 2012700858. O invento refere-se a um biossensor construído sobre um eletrodo de ouro modificado com um filme de biotina, que atuou como um sítio de ligação covalente para oligonucleotídeos. Neste estudo, a variação da frequência da microbalança de cristal de quartzo indicou a presença de HPV de alto risco oncogênico nas amostras testadas.

17. O presente invento relata um processo metodológico para a construção de protótipos de biossensores eletroquímicos livres de marcadores utilizados na identificação de genótipos de HPV. Os sistemas de detecção são baseados no uso de tiras flexíveis de ITO, sob as quais são estruturadas nanoplataformas para a amplificação do sinal analítico. A modificação de superfície foi fundamentada em princípios de imobilização química entre os constituintes PPy, AuNs e Cys. Além disso, novas sequências de oligonucleotídeos específicas para o reconhecimento de famílias de papilomavírus são descritas nesta patente. Objetivando-se tornar o sistema protótipo funcional, estas sondas de DNA foram ancoradas covalentemente sob a plataforma nanoestruturada. Ressalta-se que o sistema aqui descrito também pode ser utilizado com outras finalidades além da detecção de HPV, variando-se a natureza do biorreceptor.

18. Apesar dos inventos descritos apresentarem semelhanças em relação a presente patente, as diferenças existentes podem ser visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação entre os componentes característicos de cada invento.

8/39

	Presente invento	PI 1106062-0 A2	CN 103602755 A	PI 201470341 1	PI 201270085 8
Substrato de ITO	Sim	Não	Não	Não	Não
Polímero polipirrol	Sim	Não	Não	Não	Não
Nanoestruturas de ouro	Sim	Não	Não	Sim	Não
Imobilização covalente das sondas de DNA	Sim	Não	Não	Sim	Sim
Uso de marcadores eletroquímicos	Não	Sim	Sim	Não	Não
Transdutor eletroquímico	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Transdutor piezoelétrico	Não	Não	Não	Não	Sim

Problemas do estado da técnica

19. As principais limitações que podem ser identificadas no desenvolvimento da técnica são a construção de eletrodos com a mesma área eletroativa, cuja variabilidade interfere diretamente na reprodutibilidade e acurácia dos biossensores eletroquímicos. Para minimizar esta problemática, moldes com diâmetros específicos foram utilizados para delimitar a superfície de trabalho. Outrossim, o número de segmentos de oligonucleotídeos imobilizados sobre o transdutor eletroquímico e a manutenção da conformação molecular das sondas de DNA são fatores que interferem diretamente na sensibilidade e capacidade de biorreconhecimento dos sistemas de detecção. Desta forma, a fim de aumentar a performance analítica dos biossensores foi empregada a associação de filmes poliméricos de PPy com nanoestruturas

metálicas. Esta estratégia possibilitou a obtenção de plataformas nanoestruturadas com atraentes propriedades eletroquímicas, tais como, elevada área de contato, condutividade elétrica e biocompatibilidade, características estas essenciais para o interfaceamento do sinal analítico.

Objetivo da Invenção

20. A presente invenção tem como objetivo apresentar uma série de inventos interconectados que resultam no desenvolvimento de um protótipo de biossensor eletroquímico aplicável a pesquisa de HPV. O escopo da invenção compreende: a) desenvolver um protocolo metodológico para obtenção de eletrodos miniaturizados baseados no uso de tiras flexíveis de ITO; b) estabelecer um processo experimental para a construção de uma nova plataforma de interfaceamento composta por filme polimérico e nanoestruturas metálicas com a finalidade de aprimorar a capacidade de transdução e a performance bioanalítica dos sistemas sensores; c) construir sondas de DNA com grupos amino funcionais para a adequada imobilização covalente e subsequente reconhecimento específico de famílias de HPV; e d) imobilizar quimicamente estes oligonucleotídeos sobre os transdutores nanoestruturados para análise de sua eficiência de biodetecção.

21. A invenção aqui proposta visa a aplicação dos protótipos de biossensores eletroquímicos no diagnóstico de papilomavírus a partir do requerimento de pequenas quantidades de amostras clínicas (2 μL). Os biossensores são capazes de detectar o analito em um curto intervalo de tempo (15 minutos), com elevada sensibilidade e um limite de detecção de 100 pg/ μL .

22. Ademais, a invenção relatada nesta patente objetiva o desenvolvimento de novos sistemas nanoestruturados com a possibilidade de portabilidade, produção em larga escala e baixo custo operacional. Em particular, ressalta-se que os biossensores evitam e dispensam o uso de

marcadores, uma vez que a técnica eletroquímica é capaz de revelar alterações nas propriedades elétricas de superfície (como a capacitância e resistência à transferência de carga), cujas respostas são representativas da presença do gene alvo.

Solução do problema

23. O invento proposto dispõe, como ato inventivo, um processo de obtenção de eletrodos flexíveis construídos a partir da polimerização eletroquímica de PPy sobre um substrato transdutor de ITO, seguido da eletrossíntese de AuNs e quimissorção de moléculas de Cys. Por intermédio do desenvolvimento de sondas de DNA capazes de reconhecer famílias específicas de HPV e sua posterior imobilização sobre os eletrodos nanoestruturados, foi possível construir novos biossensores para o diagnóstico diferencial de papilomavírus. Tal feito, ressalta os protótipos sensores como biodispositivos inovadores, apresentando diversas vantagens em relação aos métodos convencionais de detecção de HPV. Particularmente, destaca-se a elevada sensibilidade, seletividade, rápido tempo de análise e baixo custo.

Vantagens da invenção

24. A invenção proposta apresenta uma metodologia para fabricação de um protótipo de biossensor com composição singular e inovadora. Primeiramente, o eletrodo miniaturizado descrito nesta patente possui um modelo economicamente viável e uma simplicidade de construção. Estas características viabilizam seu uso no desenvolvimento de dispositivos *point of care* utilizados para o diagnóstico rápido de distintas doenças.

25. Uma das vantagens destacadas na presente patente foi a modificação química da superfície de trabalho dos eletrodos miniaturizados

através de uma série de ligações covalentes entre diferentes materiais funcionais. Sabe-se que a imobilização química de estruturas e biomoléculas sobre suportes sólidos é uma das principais técnicas utilizadas na construção de biossensores. Este tipo de ancoragem reduz o processo de lixiviação da plataforma nanoestruturada e das biomoléculas de reconhecimento, garantindo assim, uma maior estabilidade e reprodutibilidade do sistema sensor.

26. Por meio desta estratégia única, foi possível estruturar com elevada organização molecular uma plataforma baseada em filme de PPy, AuNs e Cys. Os filmes de polímero condutor (PPy) foram depositados diretamente no substrato de trabalho através de polimerização eletroquímica, a qual fundamenta-se na aplicação de baixos potenciais para oxidação do monômero pirrol e subsequente reação de polimerização. Desta forma, foi possível obter filmes poliméricos uniformes, com elevada condutividade elétrica e espessura controlável mediante o número de ciclos voltamétricos aplicados.

27. Os filmes de PPy atuam como matrizes ideais para a eletrossíntese direta de nanoestruturas metálicas, tais como as AuNs. Estes filmes orgânicos fornecem um número significativo de sítios de nucleação para o crescimento de partículas com dimensões nanométricas e baixo grau de agregação. Destaca-se que a incorporação de AuNs em sistemas de biodetecção é capaz de aumentar a sensibilidade analítica dos biossensores, uma vez que estas nanoestruturas elevam a área de superfície e possibilitam um maior número de regiões para imobilização de biomoléculas. Logo, verifica-se que a conjugação entre polímero PPy e AuNs é um método eficaz para o desenvolvimento de biossensores ultrasensíveis e reprodutíveis.

28. Moléculas organossulfuradas, como a Cys, são capazes de formar uma monocamada automontada em toda a superfície do ouro. Esta habilidade é devido ao grupo tiol (-SH) presente na estrutura da Cys, cujo átomo de enxofre liga-se covalentemente a um átomo de ouro por um processo de quimissorção. Nesta reação termodinamicamente favorável, o átomo de

hidrogênio do grupo tiol é liberado na forma de hidrogênio molecular (H_2). Por meio desta modificação de superfície, as moléculas de Cys fornecem grupos químicos funcionais (grupos carboxílicos, $-COOH$; e grupos amino, $-NH_2$) às AuNs. Desta forma, aumenta-se a possibilidade de ligações covalentes entre nanoestruturas e biomoléculas, tais como as sondas de DNA.

29. Como uma regra geral para a construção de biossensores funcionais, as sondas devem ser imobilizadas de maneira previsível, mantendo sua capacidade de biodetecção. Independente da identidade molecular, a adsorção não-específica deve ser minimizada e a estabilidade das biomoléculas ancoradas deve ser preservada. Além disso, a orientação e acessibilidade das sondas de DNA são parâmetros essenciais para assegurar sua afinidade ao alvo HPV e sua eficiência de hibridização. Nestas circunstâncias, a arquitetura do genossensor (fundamentada no uso de PPy, AuNs e Cys) e a estratégia de ancoragem covalente das moléculas de biorreconhecimento garantem um processo de bioanálise eficaz. Ressalta-se que as sondas de DNA podem conferir aos sistemas de biodetecção elevada especificidade e seletividade, uma vez que estas moléculas de biorreconhecimento podem discriminar alterações nas sequências de oligonucleotídeos na ordem de uma única base nitrogenada. Além disso, há possibilidade de reutilização dos biossensores de DNA por intermédio de protocolos experimentais que promovam a de-hibridação das sondas de biorreconhecimento.

30. Os protótipos de biossensores eletroquímicos relatados nesta invenção foram capazes de identificar genótipos de HPV em concentrações mínimas na ordem de picomolar. Além disso, as respostas analíticas foram obtidas rapidamente, em um intervalo de 15 minutos, sem marcadores adicionais e com elevada reprodutibilidade, sensibilidade, especificidade e seletividade. Portanto, verifica-se que os sistemas de detecção apresentam vantagens apreciáveis que permitem seu uso em laboratórios de análises clínicas, de ensino ou pesquisa.

A novidade e o efeito técnico alcançado

31. A novidade da presente invenção está relacionada ao processo metodológico de construção de biossensores nanoestruturados aplicáveis ao diagnóstico clínico de HPV. Por meio da inventividade de eletrodos flexíveis de ITO modificados quimicamente com polímero PPy, AuNs e moléculas de Cys, obteve-se um sistema transdutor miniaturizado com elevada robustez e desempenho analítico. Outrossim, o desenho específico de segmentos de oligonucleotídeos com grupos amino funcionais possibilitou a ancoragem ordenada das sondas de DNA sobre a superfície dos eletrodos de trabalho. Por meio desta estratégia inovadora de imobilização molecular, mediante o uso de uma plataforma de interfaceamento em nanoescala, os biorreceptores de DNA mantiveram sua capacidade de detecção frente a famílias de HPV.

Descrição Detalhada

32. Sem o intuito de limitar o escopo da invenção, os exemplos a seguir são utilizados apenas para ilustrar uma entre as inúmeras formas de se realizar a preparação dos protótipos de biossensores aos quais a presente patente se refere.

33. Em primeiro momento, consegue-se chegar à invenção através da construção de eletrodos de trabalho miniaturizados baseados em ITO, que são utilizados como transdutores para os sistemas propostos. O protótipo é baseado em tiras flexíveis de ITO com as dimensões de 3 cm de altura por 8 mm de largura. Para padronizar a área eletroativa, uma folha adesiva de policloreto de vinila (PVC) com um orifício circular (diâmetro de 5 mm) é sobreposta sobre a superfície de ITO. Assim, é possível obter um efeito de blindagem em regiões específicas do substrato de ITO condutor. Como resultado, uma área específica para a montagem do biossensor de DNA (0,2 cm²) e uma área disponível para o contato elétrico (0,8 cm²) são delineadas.

Após a obtenção dos eletrodos flexíveis, o processo de modificação de superfície é executado (Figura 1).

34. O procedimento subsequente de preparação das plataformas nanoestruturadas sobre os eletrodos flexíveis é relatado a seguir. Inicialmente, as plataformas nanoestruturas baseadas PPy, AuNs e Cys são construídas sobre os eletrodos miniaturizados de ITO, que atuam como eletrodos de trabalho. A primeira etapa de montagem consiste na eletropolimerização de pirrol. Para tal, os eletrodos de trabalho são imersos em uma solução de ácido clorídrico (HCl) a 0,5 M contendo o monômero pirrol a uma concentração de 30 mM. Através da VC são aplicados seis ciclos de polimerização em uma faixa de potencial de -0,2 a +0,7 V com uma velocidade de varredura de 100 mV.s⁻¹. A segunda etapa compreende a síntese e deposição eletroquímica de AuNs sobre o filme de PPy. Utilizando uma solução de ácido tetracloreáurico (HAuCl₄) a 0,25 mM, são realizados dez ciclos voltamétricos com uma faixa de potencial de +0,2 a -1 V e velocidade de varredura de 50 mV.s⁻¹. A terceira etapa refere-se a quimissorção de moléculas de Cys sobre as AuNs. Este processo fundamenta-se em interações covalentes estabelecidas entre os grupos tióis (-SH) das moléculas de Cys e os átomos de ouro das nanoestruturas. Nesta etapa, são adicionados 2 µL de uma solução de Cys a 2 mg/mL (proporção volumétrica de etanol:água igual a 3:1) por 30 minutos. Após obter a plataforma nanoestruturada de PPy-AuNs-Cys, é realizada a quarta etapa que reporta-se a imobilização química de sondas de DNA desenhadas especificamente para a detecção de famílias de HPV. Primeiramente, 2 µL de glutaraldeído a 0,5% são adicionados sobre a plataforma nanoestruturada por 10 minutos. Posteriormente, 2 µL de uma solução de oligonucleotídeos a 10 mM são acrescentados por 15 minutos para a construção dos nanossistemas de DNA. O glutaraldeído atua como um agente reticulante biofuncional, possibilitando a formação de bases de Schiff entre os grupos amino das moléculas de Cys e os grupos amino das sondas de DNA. Por fim, a quinta etapa compreende o bloqueio dos sítios inespecíficos

dos biossensores de DNA com moléculas de BSA. Nesta etapa, são acrescentados 2 µL de uma solução de BSA a 1% (pH 7,4) sobre a superfície dos eletrodos modificados por 30 segundos. Logo, através deste processo metodológico, os biossensores eletroquímicos baseado em PPy-AuNs-Cys-Sonda-BSA são desenvolvidos (Figura 2).

35. As sondas de DNA complementares a sequências do gene L1 do HPV utilizadas na construção dos protótipos de biossensores e os genótipos de HPV que cada oligonucleotídeo é capaz de reconhecer são descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos tipos de HPV que podem ser identificados por cada sonda de DNA.

Sondas de DNA	Famílias de biorreconhecimento
Sonda BSH06	HPV6, 11, 44 e 55
Sonda BSH16	HPV16, 31, 33, 35, 52 e 58
Sonda BSH18	HPV18, 39, 45, 59 e 68
Sonda BSH26	HPV26, 51 e 82
Sonda BSH53	HPV53, 56 e 66
Sonda BSH61	HPV61, 62, 72, 81, 83, 84, 87 e 89

36. Com a finalidade de avaliar a especificidade, sensibilidade e seletividade dos biossensores de DNA, são realizados estudos de hibridação com a) plasmídeos recombinantes contendo a sequência de nucleotídeos do gene L1 de diferentes tipos de HPV e b) amostra contendo uma mistura de diferentes tipos de plasmídeos contendo a sequência de nucleotídeos do gene L1 de tipos de HPV não pertencentes à família de reconhecimento da sonda (controle negativo). Em cada ensaio, os sistemas de detecção são expostos a 2 µL da amostra a ser testada por 15 minutos para promover o processo de

biorreconhecimento. As diluições de todas as amostras biológicas são preparadas com solução salina de tampão fosfato (PBS; pH 7,4) e mantidas congeladas.

Metodologia de obtenção das sondas de biorreconhecimento

37. A construção das sondas de DNA para diagnóstico e identificação dos tipos de HPV consideraram a classificação do banco de dados "*Human Papillomavirus T cell Antigen Database*" desenvolvido pelo *Bioinformatics Core at Cancer Vaccine Center, Dana-Farber Cancer Institute da Harvard University*. As sequências completas do gene L1 dos diferentes genótipos mostrados no banco de dados foram baixados do site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>. O número de acesso de cada sequência a ser utilizada nos alinhamentos subsequentes estão listadas na tabela abaixo (Tabela 3).

Tabela 3. Sequências referências do gene L1 dos tipos HPV utilizados na construção de sondas para desenvolvimento do genossensor.

Família	Tipo HPV	Nº Acesso
F16	HPV 16	FJ006723.1
	HPV 31	HQ537668.1
	HPV 33	HQ537694.1
	HPV 35	GQ479039.1 M74117.1
	HPV 52	JN874436.1 HQ537751.1
	HPV 58	EU918765.1
F18	HPV 18	GQ180791.1
	HPV 39	JN104070.1 KC470249.1
	HPV 45	KC470260.1
	HPV 59	X77858.1
	HPV 68	EU918769.1
F26	HPV 26	NC_001583.1

17/39

	HPV 51	GQ487711.1
	HPV 82	AB027021.1
F34	HPV 34	NC_001587.1
	HPV 73	X94165.1
	HPV 53	NC_001593.1
F53	HPV 56	EF177180.1
	HPV 66	EF177190.1
	HPV 6	AF092932.1
F6	HPV 11	JQ773412.1
	HPV 44	HE963128.1
	HPV 55	HE963177.1
	HPV 7	NC_001595.1
F7	HPV 40	X74478.1
	HPV 91	AF419318.1
F32	HPV 32	NC_001586.1
	HPV 42	GQ472847.1
F54	HPV 54	U37488.1
	HPV 61	U31793.1
	HPV 72	X94164.1
	HPV 81	AJ620209.1
F61	HPV 83	AF151983.1
	HPV 84	AF293960.1
	HPV 62	AY395706.1
	HPV 87	AJ400628.2
	HPV 89	AF436128.1
F71	HPV 71	AY330623.1
F64	HPV 64	U12495.1
F70	HPV 70	U22461.1
F85	HPV 85	AF131950.1
F86	HPV 86	AF349909.1

38. O alinhamento das sequências do gene L1 dos tipos virais pertencentes a cada família foram realizados utilizando os parâmetros padrão (default) do programa MEGA 5 (<http://www.megasoftware.net/>). A partir de blocos de similaridade entre as sequências alinhadas foi inserido degeneração em alguns oligonucleotídeos, visando que a sonda resultante fosse capaz de identificar todos os tipos dentro da família de HPV, de forma específica para a família. Blocos de similaridades de oligonucleotídeos para mais de uma família de HPV foram descartados. As sequências de oligonucleotídeos selecionadas tiveram 22 nucleotídeos de tamanho e, dentro do possível, até 5 posições degeneradas.

As estratégias de desenho dos oligonucleotídeos degenerados para separação de HPV de baixo e alto risco oncogênico são exibidas na Tabela 4. Em adição, as estratégias de desenho dos oligonucleotídeos degenerados para tipos de HPV da família 6, 16, 18, 53, 26 e 61 são apresentadas nas Tabelas 5 a 10. Por fim, as sondas construídas para identificação de família de tipos de HPV, pode identificar o genótipo a partir de uma árvore decisória entre resultados positivos e negativos para diferentes sondas utilizadas de forma simultânea, como demonstrado na Tabela 11.

19/39

Tabela 4. Estratégia de desenho dos iniciadores para separação de HPV de baixo risco (incluindo HPV6, HPV11, HPV44, HPV54, HPV55, HPV61, HPV62, HPV71, HPV72, HPV81, HPV83, HPV84, HPV87, HPV89) e de HPV de alto risco (incluindo HPV16, HPV18, HPV26, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV53, HPV56, HPV58, HPV59, HPV66, HPV68, HPV82).

R = A/G Y = C/T
M = A/C K = G/T
S = C/G W = A/T
B = C/G/T D = A/G/T
H = A/C/T V = A/C/G
N = A/C/G/T I = Inosin

Baixo Risco				Tipos																
Sequência	Início	Fim	Tamanho	Posição	6	11	44	55	61	62	72	81	83	84	87	89	54	71		
GAGGTGGCAGGGGACAGCCATTAGGT				333	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G		
				336	G	A	A	G	T	C	T	A	T	A	G	G	T	A		
				339	C	C	T	T	T	C	T	C	T	C	C	C	T	C		
				340	A	A	A	A	A	C	A	C	C	C	C	C	A	C		
				342	G	G	A	A	G	T	G	C	T	C	T	G	G	C		
				345	A	T	A	C	G	G	C	A	T	G	C	T	C	A		
				348	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G		
				351	A	T	C	C	A	A	C	T	T	T	G	C	A	T		
				352	T	T	T	C	T	C	C	T	C	T	C	T	T	T		
				354	A	A	A	G	G	G	T	G	T	A	C	G	G	A		
GARGTNGGYMGNGGNCARCCNYTNGGN				331	357	27	357	T	C	T	T	G	T	T	C	C	C	T	G	T

20/39

[illegible][illegible]

Petição 870190102779, de 11/10/2019, pág. 29/56

22/39

				1416	T	T	A	T	C	T	A	C	G	A	A	C	C	C	T	A	A
YTDGGNMGNAARTTT				1419	A	A	G	A	A	G	G	G	G	A	A	A	A	G	A	G	G

Tabela 5. Estratégia de desenho de oligonucleotídeos específicos para tipos de HPV da Família 16 (incluindo os HPV16, HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58).

Família do 16	Sequência	Início	Fim	Posição	Tipo 16	Tipo 31	Tipo 33	Tipo 35	Tipo 52	Tipo 58	Tamanho
Oligo16A -->	TTAAATAAATTGGATGACACAG	454	475	459	T	T	C	T	C	T	22
				462	A	A	A	A	G	A	
				465	G	T	T	G	T	T	
				471	C	C	C	T	T	C	
	TTAAATAAATTTGATGACACTG			474	A	T	T	T	T	T	
Oligo -->	TGGATTACAAACAAACACAATT	533	554	540	C	T	T	T	T	T	22
				543	A	A	A	A	G	A	
				549	A	A	A	A	T	A	
				552	A	A	G	A	G	A	
	TGGATTAYAAACAAACWCARYT			553	T	C	T	T	T	T	
Oligo16B -->	AGGATGGTGATATGGTTCATAC	674	695	675	G	A	G	A	G	G	22
				678	T	T	T	C	T	T	
				681	T	G	T	G	G	T	
				684	T	T	T	C	C	C	
				690	T	T	G	A	A	A	
		854	875	691	C	G	G	G	G	G	22
	AGGATGGTGAYATGGTDSAYAC			693	T	T	C	C	T	T	
				858	T	A	A	T	T	T	
				861	A	G	A	A	A	A	
	TTGTTAGACATTTATTTAATAG			864	T	T	C	T	C	C	

24/39

Oligo -->	TTGTTAGACACTTTTTAATAG			867	A	T	T	A	T	T	
	TTTTGGAGGACTGGCAATTTTGG			1290	G	G	A	G	G	G	
				1293	G	A	A	G	G	G	
				1296	C	T	T	T	C	C	
Oligo -->	TTTTGGAGGACTGGCAATTTTGG	1286	1307	1300	A	A	C	A	C	C	
	CTGCAGACCTAGATCAGTTTCC			1302	T	T	A	T	A	A	22
				1461	T	T	A	T	T	T	
				1467	C	T	T	C	T	T	
				1468	C	T	T	T	T	C	
Oligo16C -->	CTGCAGATTTAGATCAGTTTCC	1460	1481	1476	G	G	G	A	G	G	22
	GAGGCCACTGTCTACTTGCCTC			102	G	G	G	A	G	G	
				105	C	T	C	C	C	C	
				108	T	T	A	T	T	T	
				111	C	C	G	C	G	G	
				115	T	T	C	C	C	C	
				117	G	A	G	G	G	G	
Oligo16 -->	GARGCYACWGTSTACYTRCCWC	100	121	120	T	A	T	T	T	T	22

25/39

Tabela 6. Estratégia de desenho de oligonucleotídeos específicos para tipos de HPV da Família 6 (incluindo os HPV6, HPV11, HPV44, HPV55).

Família do 6	Sequência	Início	Fim	Posição	Tipo 6	Tipo 11	Tipo 44	Tipo 55	Tamanho
	GGACAGGATAACAGGGTTAATG	409	430	411	A	T	T	T	22
				417	T	T	T	C	
				420	C	T	C	C	
	GGWCAGGAYAAAGGGTWAATG			426	T	T	A	A	
Oligo 6 -->	GTGACTGCCCGCCCTTAGAACT			540	T	T	G	A	
				549	G	C	T	T	
				552	C	G	C	C	
				553	T	T	T	C	
Oligo 6A -->	GTGACTGCCCGCCCTTAGAACT	539	560	555	A	G	G	G	22
Oligo 6B -->	GTGACTGCCCGCCCTTAGAACT			559	C	C	T	T	
	TACGGAAGGAACAATGTTTGC			741	A	G	A	A	
				744	G	A	A	A	
Oligo -->	TRCRGAAGGAACRAATGTTTGC	740	761	753	A	A	G	A	22
	TTTGTTACTGTGGTAGATACCA	979	1000	990	G	G	T	T	22
Oligo -->	TTTGTTACTGTGTAGATACYA			999	C	C	T	T	
	CAGGCCATTACCTGTCAAAAGC			1275	G	C	A	A	
				1281	A	G	A	A	
Oligo -->	CAGGCCATTACMTGTCAAAARC	1264	1285	1284	G	A	G	G	22
	GAAAAGTTTTCTAGTGATTGG	1351	1372	1362	T	A	T	T	22
				1368	A	A	G	G	
Oligo -->	GAAAAGTTTTCWAGTGARTTRG			1371	G	A	G	A	

26/39

Tabela 7. Estratégia de desenho de oligonucleotídeos específicos para tipos de HPV da Família 18 (incluindo os HPV18, HPV39, HPV45, HPV59, HPV68).

Família do 18	Sequência	Início	Fim	Posição	Tipo 18	Tipo 39	Tipo 45	Tipo 59	Tipo 68	Tamanho
loop a 0	ACTGTTGGTAATCCATATTTTA	313	334	315	T	A	T	A	T	22
				318	T	G	A	T	A	
				321	T	A	C	A	C	
Oligo -->		313	334	322	A	C	A	C	C	22
loop a 0	AGTTACCTGACCCAAATAAATT			413	A	C	C	A	C	
				414	G	A	T	G	C	
		413	434	415	T	T	T	T	C	22
				417	A	G	G	A	A	
				420	T	C	C	T	T	
Oligo -->		413	434	423	C	T	T	T	T	22
loop a 0 grau	AGTGGGCATCCATTITATAATA			426	A	T	T	C	T	
				543	G	A	C	T	G	22
		538	559	546	T	C	T	T	T	
Oligo 18A -->	AGTGGSCATCCATTITATAATA			552	T	A	T	A	A	
	CCTGCTATTGGGGAACACTGGG	673	694	675	T	C	T	T	T	22
				678	T	C	T	C	C	
				684	G	G	T	A	G	
(família)		673	694	687	A	G	G	A	G	22
Oligo 1B -->	CCYGCYATTGGDGARCACTGGR			694	G	G	G	A	G	
loop a 0	GATGGTGATATGGTAGATACTG	775	796	780	T	T	T	T	C	22

27/39

Oligo --> loop a 0			787	G	A	G	G	A	
			789	A	T	G	A	T	
			792	T	T	T	C	T	
			795	T	T	A	A	A	
	TTTTTGCTAGGCATTTTGGAA		951	T	G	G	T	A	
Oligo 18B-->	TGTTTGCAAGACATTTTGGAA	950	971	957	T	A	A	C	T
	CCGACCATAGGCCCTCGCAAG			960	G	A	A	A	G
				1629	C	T	T	C	C
Oligo 18C-->				1632	C	T	C	T	T
				1638	C	T	A	C	C
				1641	T	C	T	A	C
				1644	C	A	T	C	T
	CCYACYATAGGHCHCGHAARC	1627	1648	1647	A	G	G	A	A
									22
									22

28/39

Tabela 8. Estratégia de desenho de oligonucleotídeos específicos para tipos de HPV da Família 53 (incluindo os HPV53, HPV56, HPV66).

Família do 53	Sequência	Início	Fim	Posição	Tipo 53	Tipo 56	Tipo 66	Tamanho
Oligo -->	CAACGGATGCCTATGTAAAACG	173	194	181	G	T	A	22
				183	C	C	A	
	TTGCTTACCGTGGGACATCCTTA			235	A	G	G	
				237	C	C	T	
Oligo -->		229	250	240	G	A	T	22
				243	A	A	C	
	TGCATTTCAGTATAGGGTGT			249	T	C	T	
				305	T	A	A	
(família)		300	321	309	G	A	G	22
				315	G	G	A	
	TGCATWTCARTATAGRGT			318	G	A	G	
				703	G	A	G	
Oligo 53 -->	GACATGGTGGACACAGGTTT	697	718	705	G	A	G	22
				711	A	G	C	
	GACATGGTGGACACAGGTTT			714	T	A	G	
				814	A	T	T	
Oligo 53A -->	AAATGAGTGCAGATGCCTATGG	809	830	815	G	C	C	22
				849	T	C	C	
	AAATGTCTGCAGATGCCTATGG							
	GATTCATGTGGTTTATTAC							
Oligo -->		832	853	-	-	-	-	22

Tabela 9. Estratégia de desenho de oligonucleotídeos específicos para tipos de HPV da Família 26 (incluindo os HPV26, HPV51, HPV82).

Família do 26	Sequência	Início	Fim	Posição	Tipo 26	Tipo 51	Tipo 82	Tamanho
Oligo --> (família)	GGTGTGGGCCTGTGTTGGTGT	291	312	299	C	G	G	22
				300	C	T	A	
				306	T	G	T	
				309	T	C	T	
Oligo 26 -->	TTGGCCTTAGTGGACATCCTTT	341	362	354	A	T	T	22
	TTGGCCTTAGTGGWCATCCYTT			360	T	C	T	
	TTATTGAGGATGGCGATATG			579	T	C	C	
				583	G	C	G	
Oligo -->	TTGGAGCTATGGATTTTACT	578	599	598	A	A	G	22
				615	A	A	G	
				618	T	T	C	
				628	A	G	G	
Oligo -->	TGTTTGTTACCTGTGTTGATAC	611	630	987	G	T	T	22
				991	G	A	A	
				996	C	C	T	
				1005	T	T	C	
Oligo -->	GGAATTTTGGACTAACCTTACC	986	1007	1219	C	T	T	22
				1224	C	A	A	
				1208				
Oligo -->		1208	1229	1227	A	A	G	22

Tabela 10. Estratégia de desenho de oligonucleotídeos específicos para tipos de HPV da Família 61 (incluindo os HPV61, HPV84, HPV33, HPV87, HPV89).

Família do 61	Sequência	Início	Fim	Posição	Tipo 61	Tipo 72	Tipo 81	Tipo 83	Tipo 84	Tipo 62	Tipo 87	Tipo 89	Tamanho
	CGCACCAACTTATTTTATTATG			273	C	C	C	C	C	C	C	T	
				280	T	C	C	C	T	C	T	C	
				282	A	C	T	C	A	T	A	G	
				284	T	A	T	T	T	T	T	A	
				285	T	T	T	T	T	T	T	C	
Oligo 61A –>	CGCACCAACTTATTTTATTATG	271	292	291	T	T	T	C	T	T	T	T	22
	TTGAGGTTGGTAGGGGCGAGCC			510	T	T	T	T	A	T	A	T	
				516	T	C	T	A	T	A	G	G	
				519	T	C	T	C	T	C	C	C	
				520	A	C	A	C	C	C	C	C	
				522	G	T	G	C	T	C	T	G	
Oligo 61B-->	TTGAGGTAGGCCGCGGRCAGCC	509	530	525	G	G	C	A	T	G	C	T	22
	AGGATGGCGATATGGTGGAAC			786	C	T	G	C	T	T	C	C	
				789	T	C	C	C	T	C	C	T	
				795	G	G	G	G	T	A	T	G	
				798	A	A	A	A	G	A	G	A	
				799	A	A	A	A	G	A	G	A	
Oligo 61C –>	AGGATGGYGAYATGGTGGAAC	779	800	799	A	A	A	A	G	A	G	A	22
(família)	TGGATGACTGGAACTTTGGTGT			1395	G	G	G	G	A	A	G	A	
				1401	C	C	C	T	G	G	G	A	
				1407	C	C	T	T	T	T	T	C	
Oligo 61 -->	TRGATGANTGGAAYTTTGGBGT	1394	1415	1413	T	G	T	T	C	T	G	T	22

Oligo 61R –
>

32/39

Tabela 11. Identificação do tipo viral utilizando árvore decisória.

Primers	16	16A	16B	16C	6	6A	6B	18	18A	18B	26	53	53A	61	61A	61B	61C
Tipos																	
16	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
31	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
54	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
59	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

33/39

56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
61	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
72	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
81	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
83	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
62	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
87	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
82	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Caracterização eletroquímica

39. O processo de desenvolvimento dos biossensores eletroquímicos e sua bioatividade são monitorados por meio da técnica de VC. As medidas voltamétricas são realizadas em um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT 128N controlado por um computador através de um software de interfaceamento NOVA 1.11 (MetrohmAutolab, The Netherlands). Em adição, é utilizada uma célula eletroquímica convencional contendo três eletrodos imersos em 20 mL de solução de ferro-ferricianeto de potássio $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ (1:1) a 10mM em PBS (pH 7,4), atuando como sonda redox. O protótipo flexível de ITO atuou como eletrodo de trabalho, o eletrodo de Ag/AgCl saturado com KCl a 3M e o eletrodo de platina são usados, respectivamente, como eletrodo de referência e contra-referência. Os voltamogramas cíclicos são registrados em uma faixa de potencial de -0,2 a +0,7 V com velocidade de varredura de 50 mV.s⁻¹. Todas as análises eletroquímicas são realizadas em triplicatas, a temperatura ambiente e no interior de uma gaiola de Faraday.

Estudo voltamétrico das etapas de montagem dos biossensores de DNA

40. A Figura 3 demonstra a caracterização eletroquímica das etapas de construção da plataforma nanoestruturada. Verifica-se que o voltamograma cíclico para o eletrodo de ITO após a eletropolimerização do monômero pirrol apresenta uma elevada densidade de corrente com uma expressiva resposta amperométrica. É importante ressaltar que o processo de oxidação na superfície do eletrodo de trabalho leva à formação de um filme polimérico estável com elevada condutividade elétrica. Devido estas propriedades, o PPy é capaz de aumentar a sensibilidade e seletividade de sistemas bioanalíticos (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002; MAHMOUDIAN, et al., 2011).

41. Verifica-se que após a eletrossíntese das AuNs houve um decréscimo dos picos anódico e catódico. Este resultado está relacionado às condições de síntese eletroquímica e às propriedades do filme de PPy, sobre o qual as AuNs foram depositadas. Em razão do filme polimérico ser aderente à superfície de ITO e possuir uma fina espessura, espera-se que o PPy proporcione um maior número de sítios de nucleação para a formação de nanoestruturas. De acordo com Li e Shi (2005), essas características do filme polimérico conduzem à fabricação de AuNs com dimensões nanométricas reduzidas, presentes em um estado de não-agregação, que ocasiona uma diminuição de sua condutividade e aumento da área superficial.

42. Ao realizar a quimissorção de moléculas de Cys sobre as AuNs pode-se observar uma maior resposta condutimétrica e uma maior taxa de transferência de elétrons. Sabe-se que a molécula de Cys possui grupos funcionais tiol e amino que direcionam a formação de ligações covalentes entre nanoestruturas metálicas e biomoléculas. Em especial, o grupo amino pode ser protonado, passando a apresentar carga elétrica positiva que atrai eletrólitos carregados negativamente, como o ferricianeto $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e ferrocianeto $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Este processo favorece a ocorrência de reações de oxido-redução em regiões adjacentes à superfície do eletrodo. Logo, constata-se que a Cys é um composto orgânico que atua como um espaçador molecular e contribui para o aumento da sensibilidade de sistemas eletroquímicos (WANG et al., 2016).

43. Em seguida, foi observado que a ancoragem das sondas de DNA sobre o eletrodo modificado com PPy-AuNs-Cys causou uma redução do sinal de corrente. Este resultado está relacionado a uma baixa penetração do par redox no sistema sensor. Isto ocorre devido à repulsão eletrostática entre os grupos fosfato das sondas de DNA e as cargas negativas dos eletrólitos $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ / $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, contribuindo assim, para o bloqueio do processo redox na dupla camada elétrica (AVELINO et al., 2016). Como presumido, o bloqueio dos sítios inespecíficos do nanossistema de DNA com moléculas de BSA resultou em um decréscimo da medida voltamétrica e um aumento da resistividade. Portanto,

através destas caracterizações físico-químicas, foi possível comprovar a adequada montagem do biossensor eletroquímico em superfície de ITO.

Estudo de bioatividade dos biossensores de DNA

44. Como verificado na Figura 4 biossensores eletroquímicos foram construídos a partir da imobilização de sondas de DNA (sonda BSH06, BSH16, BSH18 e BSH53) sobre diferentes eletrodos flexíveis de trabalho. Após a exposição dos sistemas de biodetecção a plasmídeos contendo o gene L1 de HPV pertencente à família de reconhecimento da sonda, houve uma redução da resposta amperométrica e um bloqueio parcial dos processos de oxido-redução na dupla camada elétrica. Desta forma, foi evidenciada a capacidade dos biossensores em identificar tipos específicos de papilomavírus em concentrações mínimas na ordem de picomolar.

45. Além disso, para todos os biossensores eletroquímicos foram realizados ensaios de seletividade com uma amostra contendo uma mistura de diferentes tipos de plasmídeos contendo o gene L1 de tipos de HPV não pertencentes à família de reconhecimento da sonda. Verifica-se que após a exposição dos sistemas à amostra supracitada não houve alterações significativas no perfil voltamétrico de cada nanossistema, indicando assim, a seletividade dos biossensores propostos. Em adição, os biossensores foram testados com DNA extraído de células cervicais de mulheres infectadas por HPV, cujo genótipo foi determinado por sequenciamento utilizando método Sanger do fragmento do gene L1 viral amplificado pelos iniciadores MY9 e MY11 (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

46. Portanto, verifica-se que protótipos de biossensores miniaturizados foram desenvolvidos com sucesso para o diagnóstico de diferentes tipos de HPV. A plataforma nanoestruturada baseada no polímero PPy, AuNs e Cys apresenta atraentes propriedades para a construção de sistemas de

biodetecção mais sensíveis, específicos e reprodutíveis. Os biossensores demonstram a capacidade de reconhecer o gene L1 de HPV com elevada seletividade, sensibilidade e um limite de detecção de 100 pg/μL. Em adição, através do uso de sondas de DNA específicas para famílias de HPV, é possível obter um diagnóstico diferencial entre os genótipos de papilomavírus. Logo, os biossensores descritos nesta patente podem ser considerados ferramentas promissoras para a pesquisa laboratorial e clínica de infecções por HPV.

Referências

ALBAREDA-SIRVENT, M.; MERKOCI, A.; ALEGRET, S. Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 69, n. 1-2, p. 153-163, 2000.

AVELINO, K. Y. P. S. et al. Attomolar electrochemical detection of the BCR/ABL fusion gene based on an amplifying self-signal metal nanoparticle-conducting polymer hybrid composite. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 148, p. 576-584, 2016.

CAMPOS-FERREIRA, D. S. et al. Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16 detection in real samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 804, p. 258- 263, 2013.

CAMPOS-FERREIRA, D. S. et al. Electrochemical DNA biosensor for the detection of human papillomavirus E6 gene inserted in recombinant plasmid. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 443-450, 2016.

CHAO, J. et al. DNA nanotechnology-enabled biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 76, p. 68-79, 2016.

CIVIT, L. et al. Electrochemical genosensor array for the simultaneous detection of multiple high-risk human papillomavirus sequences in clinical samples. **Analytica chimica acta**, v. 715, p. 93-98, 2012.

DRUMMOND, T. G.; HILL, M. G.; BARTON, J. K. Electrochemical DNA sensors. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 1192, 2003.

FRÍAS, I. A. M. et al. Trends in biosensors for HPV: identification and diagnosis. **Journal of Sensors**, v. 2015, 2015.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and bioelectronics**, v. 17, n. 5, p. 345-359, 2002

HUANG, H. et al. An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on graphene/Au nanorod/polythionine for human papillomavirus DNA detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 442-446, 2015.

HUANG, Y. et al. Disease-Related Detection with Electrochemical Biosensors: A Review. **Sensors**, v. 17, n. 10, p. 2375, 2017.

HUTTER, J. N.; DECKER, C. F. Human papillomavirus infection. **Disease-a-Month**, v. 62, n. 8, p. 294-300, 2016.

JAMPASA, S. et al. A new DNA sensor design for the simultaneous detection of HPV type 16 and 18 DNA. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 265, p. 514-521, 2018.

LI, Y.; SHI, G. Electrochemical growth of two-dimensional gold nanostructures on a thin polypyrrole film modified ITO electrode. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 50, p. 23787-23793, 2005.

MAHMOUDIAN, M. R. et al. Electrochemical characteristics of coated steel with poly (N-methyl pyrrole) synthesized in presence of ZnO nanoparticles. **Thin Solid Films**, v. 520, n. 1, p. 258-265, 2011.

PITTA, D. R. et al. Prevalência dos HPV 16, 18, 45 e 31 em mulheres com lesão cervical. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 7, p. 315-20, 2010.

RASOULI, E. et al. Advancements in electrochemical DNA sensor for detection of human papilloma virus? **A review. Analytical biochemistry**, v. 556, p. 136-144, 2018.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

URREGO, L. F. et al. Biomicrosystem design and fabrication for the human papilloma virus 16 detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 207, p. 97-104, 2015.

TEENGAM, P. et al. Electrochemical paper-based peptide nucleic acid biosensor for detecting human papillomavirus. **Analytica chimica acta**, v. 952, p. 32-40, 2017.

WANG, N. et al. Functionalized gold nanoparticles/reduced graphene oxide nanocomposites for ultrasensitive electrochemical sensing of mercury ions based on thymine–mercury–thymine structure. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, p. 320-326, 2016

WU, L. et al. Nanomaterials as signal amplification elements in DNA-based electrochemical sensing. **Nano Today**, v. 9, n. 2, p. 197-211, 2014.

ZHU, C. et al. Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures. **Analytical chemistry**, v. 87, n. 1, p. 230-249, 2014.

REIVINDICAÇÕES

01. BIOSSENSOR BASEADO EM FILME POLIMÉRICO E NANOESTRUTURAS METÁLICAS E SEU USO EM APLICAÇÕES BIOMÉDICAS caracterizado pela presença dos componentes a seguir: a) eletrodo de trabalho com superfície eletroativa de óxido de índio dopado com estanho (ITO); b) filmes condutores de polipirrol (PPy); c) nanoestruturas de ouro (AuNs); d) monocamada automontada de cisteamina (Cys); e) agente de acoplamento glutaraldeído; f) sondas de DNA; e g) moléculas de albumina do soro bovino (BSA).
02. BIOSSENSOR, conforme reivindicação 1, caracterizado por eletrodos conectados a um potenciostato para mensuração voltamétrica.
03. BIOSSENSOR, conforme reivindicações 1 e 2, caracterizado por possuir um sistema de três eletrodos dispostos em uma gaiola de Faraday.
04. BIOSSENSOR, conforme reivindicações 1 e 3, caracterizado por possuir um eletrodo flexível de ITO, eletrodo de referência Ag/AgCl saturado com KCl 3M e contra-eletrodo.
05. BIOSSENSOR, conforme reivindicações 1, 3 e 4 caracterizado por ser obtido a partir do uso de substratos de ITO com dimensões na faixa de 1 a 5 cm de altura por 4 a 12 mm de largura; sobrepostos a uma folha adesiva de policloreto de vinila (PVC) com um orifício circular para a obtenção de uma área específica para a montagem do genossensor e uma área disponível para o contato elétrico.
06. BIOSSENSOR, conforme reivindicações 1, 3, 4 e 5 caracterizado por ser sintetizado a partir da imersão dos eletrodos flexíveis em solução de ácido clorídrico (HCl) contendo o monômero pirrol, seguido da aplicação de seis ciclos de polimerização voltamétrica em uma faixa de potencial de -0,2 a +0,7 V com uma velocidade de varredura de 10 a 100 mV.s⁻¹.

07. BIOSSENSOR, conforme reivindicações 1 e 6, caracterizado pela imersão dos eletrodos flexíveis modificados com filmes de PPy em uma solução de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4), sobre os quais são realizados dez ciclos voltamétricos com uma faixa de potencial de +0,2 a -1 V e velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} .

08. BIOSSENSOR, conforme reivindicações 1, 6 e 7, caracterizado pela adição de solução de Cys sobre os eletrodos flexíveis modificados com PPy e AuNs, com posterior lavagem em água ultrapura para remoção de moléculas não ligadas.

09. BIOSSENSOR, conforme reivindicações 1, 6, 7 e 8, caracterizado pela adição de glutaraldeído sobre a plataforma nanoestruturada PPy-AuNs-Cys, com posterior acréscimo de uma solução de oligonucleotídeos para a construção dos nanossistemas de DNA.

10. BIOSSENSOR, conforme reivindicações 1, 6, 7, 8 e 9, caracterizado pela adição de uma solução de BSA sobre a superfície dos eletrodos modificados.

11. BIOSSENSOR, conforme reivindicações 1 e 4, caracterizado por ter os eletrodos imersos em uma solução de 10 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em tampão fosfato para a mensuração voltamétrica.

12. BIOSSENSOR, conforme reivindicações 1, 6, 7, 8, 9, 10 e 11, caracterizado por compreender: (a) ensaio de bioatividade; (b) inserção do sistema de biodeteção em célula eletroquímica; (c) mensuração voltamétrica do comportamento eletroquímico do sistema após sua exposição ao analito-alvo; e (d) determinação de mudanças nos valores de correntes de pico anódicas e catódicas, bem como alterações nas áreas voltamétricas, para indicar a presença ou ausência do analito-alvo na amostra teste.

13. USO DE BIOSSENSOR descrito na reivindicação 12, caracterizado por avaliar o analito-alvo que corresponde a sequências de nucleotídeos do gene L1 de diferentes tipos de HPV inseridos em plasmídeos recombinantes.

14. USO DE BIOSSENSOR descrito nas reivindicações 12 e 13, caracterizado por avaliar os diferentes tipos de HPV: HPV6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 44, 45, 51, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 72, 81, 82, 83, 84, 87 e 89.

15. USO DE BIOSSENSOR descrito nas reivindicações 12, 13 e 14, caracterizado por apresentar um limite de detecção de 100 pg/μL.

16. USO DE BIOSSENSOR descrito nas reivindicações 12, 13, 14 e 15, caracterizado pelas sequências oligonucleotídicas BSH06, BSH16, BSH18, BSH26, BSH53 e BSH21.

17. USO DE BIOSSENSOR descrito nas reivindicações 12, 13, 14, 15 e 16, caracterizado pela aplicação da sonda BSH06 para o reconhecimento dos genótipos de HPV6, 11, 44 e 55.

18. USO DE BIOSSENSOR descrito nas reivindicações 12, 13, 14, 15 e 16, caracterizado pela aplicação da sonda BSH16 para o reconhecimento dos genótipos de HPV16, HPV31, HPV33, HPV35, HPV52 e HPV58.

19. USO DE BIOSSENSOR descrito nas reivindicações 12, 13, 14, 15 e 16, caracterizado pela aplicação da sonda BSH18 para o reconhecimento dos genótipos de HPV18, 39, 45, 59 e 68.

20. USO DE BIOSSENSOR descrito nas reivindicações 12, 13, 14, 15 e 16, caracterizado pela aplicação da sonda BSH26 para o reconhecimento dos genótipos de HPV26, 51 e 82.

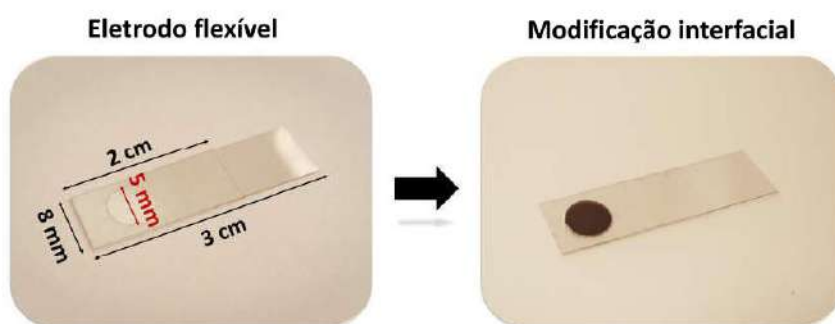
21. USO DE BIOSSENSOR descrito nas reivindicações 12, 13, 14, 15 e 16, caracterizado pela aplicação da sonda BSH53 para o reconhecimento dos genótipos de HPV53, 56 e 66.

4/4

22. USO DE BIOSSENSOR descrito nas reivindicações 12, 13, 14, 15 e 16, caracterizado pela aplicação da sonda BSH61 para o reconhecimento dos genótipos de HPV61, 62, 72, 81, 83, 84, 87 e 89.

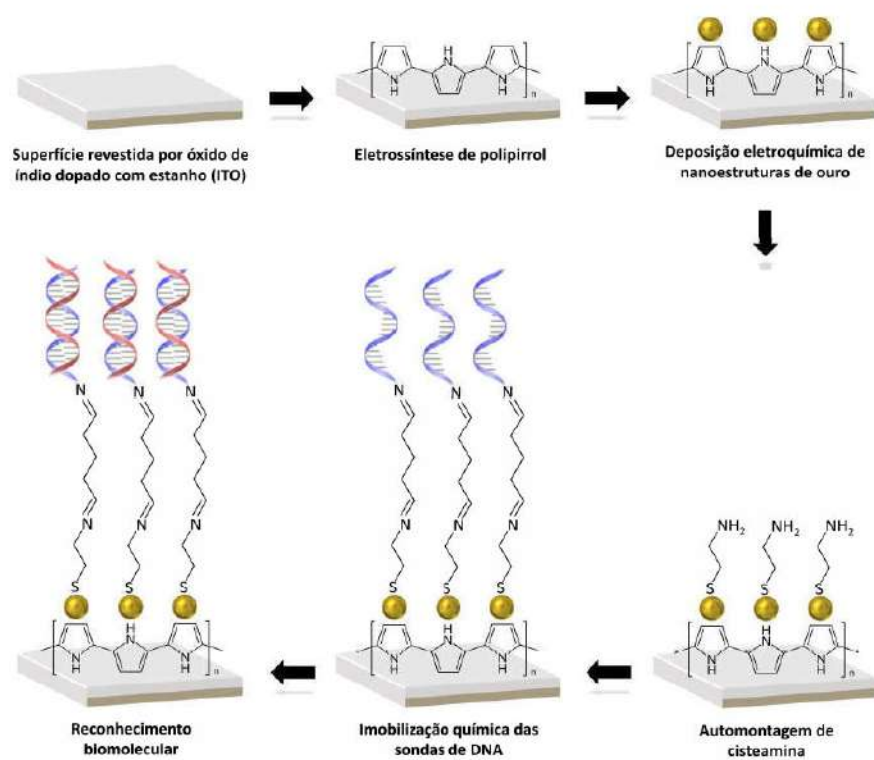
1 / 4

Figura 1



2 / 4

Figura 2



3 / 4

Figura 3

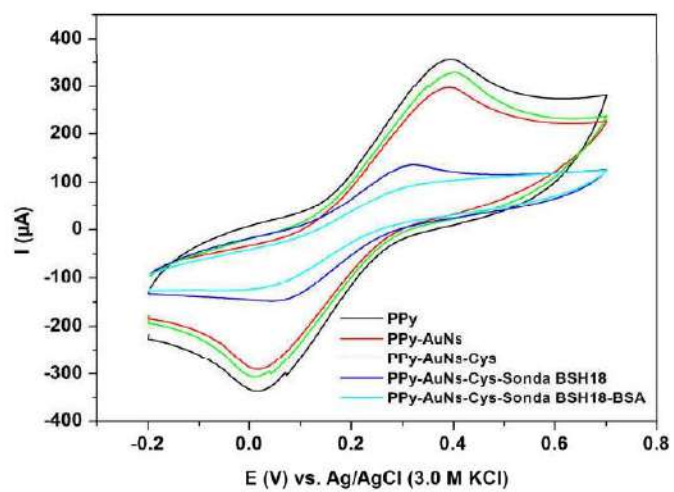
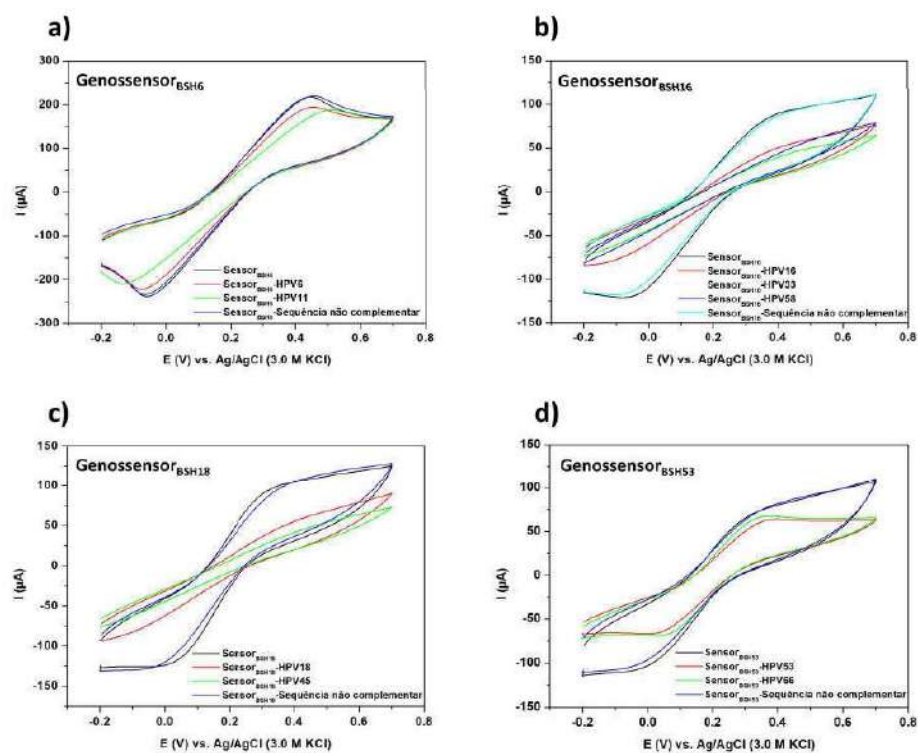


Figura 4



RESUMO

BIOSENSOR BASEADO EM FILME POLIMÉRICO E NANOESTRUTURAS METÁLICAS E SEU USO EM APLICAÇÕES BIOMÉDICAS é resultado de uma metodologia simples para a fabricação de sistemas utilizáveis na identificação de genótipos de papilomavírus humano (HPV). O método descreve a construção de eletrodos flexíveis baseados em ITO com baixo custo de produção e eficácia transdutora para aplicação em biossensores de DNA. Objetivando-se aprimorar a performance analítica dos eletrodos, uma plataforma nanoestruturada foi elaborada sobre a área ativa do eletrodo flexível e seu procedimento metodológico exposto. A plataforma nanoestruturada foi baseada em polipirrol (PPy), nanoestruturas de ouro (AuNs) e cisteamina (Cys). Pode-se verificar que os filmes de PPy atuam como substratos ideais para a eletrossíntese de AuNs com reduzido grau de agregação molecular. Por sua vez, as AuNs demonstram biocompatibilidade e elevada área de superfície para a imobilização de biomoléculas receptoras. Assim, constata-se que a associação dos materiais funcionais supracitados é uma estratégia inovadora para a obtenção de sistemas sensores ultrasensíveis. Portanto, a fim de tornar os sistemas transdutores aplicáveis ao diagnóstico de HPV, sequências curtas de DNA (denominadas de sondas de DNA) foram desenhadas para reconhecer estritamente famílias de papilomavírus. Posteriormente, estes oligonucleotídeos de cadeia curta modificados com grupos amino funcionais foram imobilizados quimicamente sobre os transdutores nanoestruturados. A técnica de voltametria cíclica foi utilizada para a análise das etapas de modificação dos eletrodos e o monitoramento da hibridação molecular. O sistema sensor proposto nesta patente é capaz de detectar genótipos de HPV com elevada especificidade, seletividade e sensibilidade (na ordem de picograma por microlitro), além de possuir rápida resposta analítica (15 minutos).

6 CONCLUSÕES

Preliminarmente, uma plataforma nanoestruturada baseada em matriz híbrida de AuNP/PANI foi projetada em eletrodo de ouro para a imobilização química da sonda de biorreconhecimento MY11. Assim, a viabilidade de uso desta molécula receptora em ensaios eletroquímicos foi comprovada. A associação entre PANI e AuNPs proporcionou a síntese de um material híbrido com propriedades físico-químicas aprimoradas, compatibilidade biológica e fácil biofuncionalização. Através do processo de quimissorção, uma camada automontada de AuNP/PANI foi obtida sobre a superfície transdutora com simplicidade e elevada reprodutibilidade. Enquanto as nanopartículas aumentaram a área eletroquimicamente ativa e mediaram a transferência de elétrons entre a interface eletrodo/solução, o polímero conjugado PANI possibilitou a ligação estável das sequências de DNA por meio de interações covalentes. Após a realização de testes de bioatividade, pode-se verificar que o biossensor proposto é capaz de detectar genótipos de HPV (HPV6, 11, 16, 31, 33, 45 e 58) em espécimes cervicais (amostras de cDNA) com alta sensibilidade. Os limites de detecção foram estimados entre 2,74 e 7,43 pg μL^{-1} para os genótipos de HPV11 e 16, respectivamente. Com uma avaliação quantitativa tridimensional de variáveis impedimétricas, foi possível identificar a existência de um padrão de associação para as amostras de alto risco oncogênico (HPV16, 31, 33, 45 e 58), o que pode levar ao diagnóstico diferencial de HPV. Sob o nosso conhecimento, a ferramenta de sensoriamento baseada em AuNP/PANI é a única descrita na literatura que sugere a diferenciação eletroquímica de genótipos de alto e baixo risco oncogênico através do emprego de uma sequência oligonucleotídica degenerada.

Sabendo-se da relevância deste achado para pesquisa de infecções potencialmente oncogênicas e prevenção do câncer cervical, uma plataforma de interfaceamento inovadora foi arquitetada para ancoragem da sonda MY11 e averiguação de sua atividade biológica. Para tal, um eletrodo de ouro biomodificado foi construído com sucesso a partir da polimerização eletroquímica de PPy, seguido de eletrossíntese de AuNPs e quimissorção de moléculas de Cys. Por meio de análises morfológicas e estudos voltamétricos e impedimétricos, constatou-se que o filme de PPy é um substrato promissor para a síntese de nanopartículas metálicas no estado não agregado. A conjunção ordenada dos materiais funcionais supracitados permitiu a

obtenção de uma plataforma com melhores características eletroquímicas, grande área de superfície e amplificação do sinal analítico. Além disso, verificou-se que as técnicas de eletropolimerização e eletrossíntese oportunizam um maior controle experimental para aquisição de aparatos biomédicos robustos. A funcionalização da plataforma nanoestruturada PPy-AuNP-Cys com a sonda MY11, propiciou a realização de testes de bioatividade em amostras de plasmídeos recombinantes contendo o gene L1 de diferentes genótipos de HPV (HPV6, 11, 16, 18, 45, 53, 54, 58) e amostras obtidas do raspado cervical de mulheres infectadas. Diante dos resultados alcançados, verifica-se que mesmo modificando a natureza das amostras biológicas (amostras plasmidiais e amostras de cDNA), a capacidade da sonda MY11 em discriminar genótipos de alto e baixo risco oncogênico é assegurada. Destarte, pode-se deduzir que o dispositivo desenvolvido é uma ferramenta valiosa para o prognóstico de pacientes infectados com papilomavírus.

Com a finalidade de otimizar o produto descrito anteriormente, um processo simples para elaboração de eletrodos de trabalho flexíveis foi executado com aptidão. A capacidade de transdução analítica dos substratos miniaturizados de ITO foi observada mediante o uso da plataforma nanoestruturada PPy-AuNP-Cys. Utilizando este protocolo, distintos sistemas sensores foram concebidos a partir da ancoragem de diferentes sondas oligonucleotídicas (sonda MY11, sondas para o reconhecimento específico de famílias de HPV e sonda para a detecção do gene p53). Os sistemas sensores elaborados exibiram como principal característica inovativa a triagem de amostras clínicas em relação ao HPV. O rastreo eletroquímico permitiu avaliar a presença ou ausência de HPV; em casos de positividade, a identificação da família de papilomavírus infectante; e por fim, o monitoramento do biomarcador oncogênico, gene p53. Em adição, ressalta-se que os biodispositivos nanoestruturados foram capazes de detectar os genótipos de HPV em concentrações mínimas na ordem fentomolar. Portanto, conclui-se que as ferramentas sensoriais propostas representam uma tendência tecnológica para análise rápida e ultrasensível de HPV, utilizando pequenos volumes de amostras, a um baixo custo e operacionalização simples com a possibilidade de portabilidade, reusabilidade e escalabilidade de produção.

7 PERSPECTIVAS

Destaca-se como perspectivas do estudo científico aprimorar o protótipo sensor e o protocolo metodológico para produção de eletrodos miniaturizados através de equipamento de corte automatizado e impressora tridimensional. A partir destas estratégias, espera-se construir transdutores em escala ampliada com áreas eletroativas mais precisas, capacidade de transdução aprimorada e design inovativo. Em adição, através da engenharia de microeletrônica e ciências dos materiais, é possível construir suportes flexíveis contendo um sistema de três eletrodos (eletrodo de trabalho, contra eletrodo e eletrodo de referência) integrado a módulos inteligentes de processamento de dados. Tal avanço permitiria a obtenção de chips eletroquímicos baseados em ITO com a possibilidade de uso em unidades de pronto atendimento. Complementarmente, infere-se que os produtos biotecnológicos propostos poderão subsidiar a elaboração de outros dispositivos sensoriais com diferentes aplicabilidades, variando-se a especificidade da biomolécula receptora. Logo, a plataforma flexível nanotecnológica elaborada para o diagnóstico de HPV poderá ser otimizada e utilizada em outras infecções virais e condições patológicas.

8 REFERÊNCIAS

ABREU, A. L. P. et al. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. **Virology Journal**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2012.

ABU-SALAH, K. M. et al. DNA-based nanobiosensors as an emerging platform for detection of disease. **Sensors**, v. 15, n. 6, p. 14539-14568, 2015.

ALDEWACHI, H. et al. Gold nanoparticle-based colorimetric biosensors. **Nanoscale**, v. 10, n. 1, p. 18-33, 2018.

ALSTEENS, D. et al. Atomic force microscopy-based characterization and design of biointerfaces. **Nature Reviews Materials**, v. 2, n. 5, p. 1-16, 2017.

ANIK, Ü. et al. Towards the electrochemical diagnostic of influenza virus: development of a graphene - Au hybrid nanocomposite modified influenza virus biosensor based on neuraminidase activity. **Analyst**, v. 143, n. 1, p. 150-156, 2018.

ARDUINI, F. et al. Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 114-126, 2016.

ARNEY, A.; BENNETT, K. M. Molecular diagnostics of human papillomavirus. **Laboratory Medicine**, v. 41, n. 9, p. 523-530, 2010.

ASAL, M. et al. An overview of biomolecules, immobilization methods and support materials of biosensors. **Sensor Review**, v. 39, p. 77-386, 2019.

ATCHUDAN, R. et al. An ultrasensitive photoelectrochemical biosensor for glucose based on bio-derived nitrogen-doped carbon sheets wrapped titanium dioxide nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, p. 160-169, 2019.

ATEH, D. D.; NAVSARIA, H. A.; VADGAMA, P. Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 3, n. 11, p. 741-752, 2006.

ATES, M. A review study of (bio) sensor systems based on conducting polymers. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 4, p. 1853-1859, 2013.

ATKINS, P.; JONES, L.; LAVERMAN, L. **Princípios de Química-: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente**. Bookman Editora, 2018.

AVELINO, K. Y. P. S. et al. Attomolar electrochemical detection of the BCR/ABL fusion gene based on an amplifying self-signal metal nanoparticle-conducting polymer hybrid composite. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 148, p. 576-584, 2016.

AVELINO, K. Y. P. S. et al. Flexible sensor based on conducting polymer and gold nanoparticles for electrochemical screening of HPV families in cervical specimens. **Talanta**, v. 226, p. 1-9, 2021.

AVELINO, K. Y. P. S. et al. Metal-polymer hybrid nanomaterial for impedimetric detection of human papillomavirus in cervical specimens. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 185, p. 1-9, 2020.

AYDEMIR, N.; MALMSTRÖM, J.; TRAVAS-SEJDIC, J. Conducting polymer based electrochemical biosensors. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 12, p. 8264-8277, 2016.

AYDIN, E. B.; AYDIN, M.; SEZGINTÜRK, M. K. Selective and ultrasensitive electrochemical immunosensing of NSE cancer biomarker in human serum using epoxy-substituted poly (pyrrole) polymer modified disposable ITO electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 306, p. 1-8, 2020.

AYDIN, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. Indium tin oxide (ITO): A promising material in biosensing technology. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, p. 309-315, 2017.

BAEK, S. H. et al. Cu-nanoflower decorated gold nanoparticles-graphene oxide nanofiber as electrochemical biosensor for glucose detection. **Materials Science and Engineering: C**, v. 107, p. 1-8, 2020.

BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. A review on impedimetric biosensors. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 248-262, 2016.

BAI, S. et al. A novel colorimetric biosensor for detecting target DNA and human alpha thrombin based on associative toehold activation concatemer induced catalyzed hairpin assembly amplification. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 239, p. 447-454, 2017.

BAKSHPOUR, M. et al. Quartz crystal microbalance biosensor for label-free MDA MB 231 cancer cell detection via notch-4 receptor. **Talanta**, v. 204, p. 840-845, 2019.

BARD, A. J. et al. Fundamentals and applications. **Electrochemical Methods**, v. 2, n. 482, p. 580-632, 2001.

BARI, S. M. I.; REIS, L. G.; NESTOROVA, G. G. Colorimetric sandwich-type immunosensor for quantification of TNF- α . **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, p. 82-87, 2019.

BAZIN, I. et al. New biorecognition molecules in biosensors for the detection of toxins. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 285-298, 2017.

BEREZA-MALCOLM, L. T.; FRANKS, A. E. Coupling anaerobic bacteria and microbial fuel cells as whole-cell environmental biosensors. **Microbiology Australia**, v. 36, n. 3, p. 129-132, 2015.

BERTOK, T. et al. Electrochemical impedance spectroscopy based biosensors: mechanistic principles, analytical examples and challenges towards commercialization for assays of protein cancer biomarkers. **ChemElectroChem**, v. 6, n. 4, p. 989-1003, 2019.

BHAGAVAN, N. V.; HA, C. E. **Essentials of medical biochemistry: with clinical cases (second edition)**. Academic Press, 2015.

BHALLA, N. et al. Opportunities and challenges for biosensors and nanoscale analytical tools for pandemics: COVID-19. **ACS Nano**, v. 14, n. 7, p. 7783-7807, 2020.

BHARDWAJ, H. et al. Electrochemical Aflatoxin B1 immunosensor based on the use of graphene quantum dots and gold nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 186, p. 1-12, 2019.

BLAIR, E. O.; CORRIGAN, D. K. A review of microfabricated electrochemical biosensors for DNA detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 134, p. 57-67, 2019.

BOCHTLER, T.; FRÖHLING, S.; KRÄMER, A. Role of chromosomal aberrations in clonal diversity and progression of acute myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 29, n. 6, p. 1243-1252, 2015.

BOTT, A. W. Electrochemical techniques for the characterization of redox polymers. **Current Separations**, v. 19, n. 3, p. 71-75, 2001.

BOUGRINI, M. et al. Development of a novel capacitance electrochemical biosensor based on silicon nitride for ochratoxin A detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 234, p. 446-452, 2016.

BRIANTI, P.; FLAMMINEIS, E.; MERCURI, S. R. Review of HPV-related diseases and cancers. **New Microbiologica**, v. 40, n. 2, p. 80-85, 2017.

BRUNI, L. et al. ICO/IARC information centre on HPV and cancer (HPV information centre). Human papillomavirus and related diseases in the world. **Summary report**, v. 22, 2019.

BURLEY, M.; ROBERTS, S.; PARISH, J. L. Epigenetic regulation of human papillomavirus transcription in the productive virus life cycle. In: **Seminars in Immunopathology**. Springer Berlin Heidelberg, p. 1-13, 2020.

CALZADO-MARTIN, A. et al. Effect of actin organization on the stiffness of living breast cancer cells revealed by peak-force modulation atomic force microscopy. **ACS Nano**, v. 10, n. 3, p. 3365-3374, 2016.

CAMPOS-FERREIRA, D. S. et al. Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16 detection in real samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 804, p. 258-263, 2013.

CAMPOS-FERREIRA, D. S. et al. Electrochemical DNA biosensor for the detection of human papillomavirus E6 gene inserted in recombinant plasmid. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 443-450, 2016.

CAPPELLA, B. Physical Principles of Force - Distance Curves by Atomic Force Microscopy. In: **Mechanical Properties of Polymers Measured through AFM Force-Distance Curves**. Springer International Publishing, p. 3-66, 2016.

CHABEDA, A. et al. Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases. **Papillomavirus Research**, v. 5, p. 46-58, 2018.

CHAO, J. et al. DNA nanotechnology-enabled biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 76, p. 68-79, 2016.

CHARBGOO, F. et al. Nanoparticles application in high sensitive aptasensor design. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 85-97, 2016.

CHEN, H. J. et al. Label-free and reagentless capacitive aptasensor for thrombin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 131, p. 53-59, 2019.

CHENG, M. S. et al. Impedimetric cell-based biosensor for real-time monitoring of cytopathic effects induced by dengue viruses. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 70, p. 74-80, 2015.

CHIANG, H. C. et al. Optimization of the electrodeposition of gold nanoparticles for the application of highly sensitive, label-free biosensor. **Biosensors**, v. 9, n. 2, p. 1-11, 2019.

CIVIT, L. et al. Electrochemical genosensor array for the simultaneous detection of multiple high-risk human papillomavirus sequences in clinical samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 715, p. 93-98, 2012.

CIVIT, L.; FRAGOSO, A.; O'SULLIVAN, C. K. Electrochemical biosensor for the multiplexed detection of human papillomavirus genes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 4, p. 1684-1687, 2010.

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.

CINCOTTO, F. H. et al. Electrochemical immunosensor for ethinylestradiol using diazonium salt grafting onto silver nanoparticles-silica-graphene oxide hybrids. **Talanta**, v. 147, p. 328-334, 2016.

CIVIT, L. et al. Electrochemical genosensor array for the simultaneous detection of multiple high-risk human papillomavirus sequences in clinical samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 715, p. 93-98, 2012.

CROSBIE, E. J. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 382, n. 9895, p. 889-899, 2013.

DAMBORSKÝ, P.; ŠVITEL, J.; KATRLÍK, J. Optical biosensors. **Essays in Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 91-100, 2016.

DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Applications of QCM, EIS and SPR in the investigation of surfaces and interfaces for the development of (bio)sensors. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970-979, 2004.

DAUBINGER, P. et al. Electrochemical characteristics of nanostructured platinum electrodes—a cyclic voltammetry study. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, n. 18, p. 8392-8399, 2014.

DE MARTEL, C. et al. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. **International Journal of Cancer**, v. 141, n. 4, p. 664-670, 2017.

DEMEKE, A. et al. Biosensor and molecular-based methods for the detection of human coronaviruses: A review. **Molecular and Cellular Probes**, v. 54, p. 1-8, 2020.

DENG, X. et al. Application of atomic force microscopy in cancer research. **Journal of nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1-15, 2018.

DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY/UNIVERSITY OF VIRGINIA SCHOOL OF MEDICINE. **Atomic Force Microscope (AFM)**. 2017. Disponível em: <<https://pharm.virginia.edu/facilities/atomic-force-microscope-afm/>>. Acesso em: 08 nov. 2020.

DONG, S. et al. Electrochemical DNA biosensor based on a tetrahedral nanostructure probe for the detection of avian influenza A (H7N9) virus. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 16, p. 8834-8842, 2015.

DRAGHI, P. F.; FERNANDES, J. C. B. Label-free potentiometric biosensor based on solid-contact for determination of total phenols in honey and propolis. **Talanta**, v. 164, p. 413-417, 2017.

DUFRENE, Y. F. et al. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. **Nature nanotechnology**, v. 12, n. 4, p. 295-307, 2017.

EATON, P.; WEST, P. **Atomic force microscopy**. Oxford University Press, 2010.

ECONOMOU, A.; KOKKINOS, C.; PRODRMIDIS, M. Flexible plastic, paper and textile lab-on-a chip platforms for electrochemical biosensing. **Lab on a Chip**, v. 18, n. 13, p. 1812-1830, 2018.

EISSA, S.; ALMTHEN, R. A.; ZOUROB, M. Disposable electrochemical immunosensor array for the multiplexed detection of the drug metabolites morphine, tetrahydrocannabinol and benzoylecgonine. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 8, p. 1-9, 2019.

ELAHI, N.; KAMALI, M.; BAGHERSAD, M. H. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. **Talanta**, v. 184, p. 537-556, 2018.

ELEWI, A. S.; WADOOD, S. A.; SAMMARRAIE, A. K. M. A. Hydrogen peroxide biosensor based on hemoglobin-modified gold nanoparticles–screen printed carbon electrode. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 28, p. 1-10, 2020.

ELGRISHI, N. et al. A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 2, p. 197-206, 2018.

ENENGL, C. et al. Explaining the cyclic voltammetry of a poly(1,4-phenylene-ethynylene)-alt-poly(1,4-phenylene-vinylene) copolymer upon oxidation by using spectroscopic techniques. **ChemPhysChem**, v. 18, n. 1, p. 93-100, 2017.

ESPINOSA, J. R. et al. DNA biosensor based on double-layer discharge for the detection of HPV type 16. **Sensors**, v. 19, n. 18, p. 1-14, 2019.

FERAPONTOVA, E. E. DNA electrochemistry and electrochemical sensors for nucleic acids. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 11, p. 197-218, 2018.

FRAAS, R.; FRANZREB, M. Reversible covalent enzyme immobilization methods for reuse of carriers. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 35, n. 5, p. 337-348, 2017.

FRÍAS, I. A. M. et al. Trends in biosensors for HPV: identification and diagnosis. **Journal of Sensors**, v. 2015, p. 1-17, 2015.

GAUDIN, V. Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin—A comprehensive review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 90, p. 363-377, 2017.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 5, p. 345-359, 2002.

GERMAN, N. et al. Enzymatic formation of polyaniline, polypyrrole, and polythiophene nanoparticles with embedded glucose oxidase. **Nanomaterials**, v. 9, n. 5, p. 1-16, 2019.

GHEIT, T. Mucosal and cutaneous human papillomavirus infections and cancer biology. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 1-22, 2019.

GHITTONI, R. et al. Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. **Ecancermedicalscience**, v. 9, p. 1-9, 2015.

GILJOHANN, D. A. et al. Gold nanoparticles for biology and medicine. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 19, p. 3280-3294, 2010.

GOODE, J. A.; RUSHWORTH, J. V. H.; MILLNER, P. A. Biosensor regeneration: a review of common techniques and outcomes. **Langmuir**, v. 31, n. 23, p. 6267-6276, 2015.

GRIESHABER, D. et al. Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1400-1458, 2008.

GROSS, L. et al. Atomic force microscopy for molecular structure elucidation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 57, n. 15, p. 3888-3908, 2018.

GUBALA, V. et al. Engineered nanomaterials and human health: Part 1. Preparation, functionalization and characterization (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 90, n. 8, p. 1283-1324, 2018.

GUIMERA, N. et al. Demonstrating the importance of different HPVs in cervical cancer and other HPV-related cancers. In: **Human Papillomavirus**. Academic Press, p. 41-51, 2020.

GUPTA, N. et al. Cell-based biosensors: Recent trends, challenges and future perspectives. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 141, p. 1-23, 2019.

GUPTA, V. K. et al. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals - a review. **Analytical Biochemistry**, v. 408, n. 2, p. 179-196, 2011.

GVOZDENOVIC, M. M. et al. Electrochemical synthesis of electroconducting polymers. **Hemijaska Industrija**, v. 68, n. 6, p. 673-684, 2014.

HARDEN, M. E.; MUNGER, K. Human papillomavirus molecular biology. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 772, p. 3-12, 2017.

HE, Y. et al. Label-free homogeneous electrochemical biosensor for HPV DNA based on entropy-driven target recycling and hyperbranched rolling circle amplification. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 320, p. 1-7, 2020.

HOBSON, D. W. The Commercialization of Medical Nanotechnology for Medical Applications. In: Intracellular Delivery III. **Springer International Publishing**, p. 405-449, 2016.

HODEL, A. W. et al. Atomic force microscopy of membrane pore formation by cholesterol dependent cytolysins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 39, p. 8-15, 2016.

HOPPE-SEYLER, K. et al. The HPV E6/E7 oncogenes: key factors for viral carcinogenesis and therapeutic targets. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 158-168, 2018.

HU, L. et al. A novel label-free bioengineered cell-based biosensor for salicin detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 238, p. 1151-1158, 2017.

HUANG, H. et al. An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on graphene/Au nanorod/polythionine for human papillomavirus DNA detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 442-446, 2015.

HUANG, K. J. et al. Aptamer/Au nanoparticles/cobalt sulfide nanosheets biosensor for 17 β -estradiol detection using a guanine-rich complementary DNA sequence for signal amplification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 67, p. 184-191, 2015.

HUANG, R.; HE, N.; LI, Z. Recent progresses in DNA nanostructure-based biosensors for detection of tumor markers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 109, p. 27-34, 2018.

HUANG, Y. et al. Disease-related detection with electrochemical biosensors: a review. **Sensors**, v. 17, n. 10, p. 1-30, 2017.

HULLA, J. E.; SAHU, S. C.; HAYES, A. W. Nanotechnology: History and future. **Human & Experimental Toxicology**, v. 34, n. 12, p. 1318-1321, 2015.

HUTTER, J. N.; DECKER, C. F. Human papillomavirus infection. **Disease-a-Month**, v. 62, n. 8, p. 294-300, 2016.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER WORKING GROUP. Human papillomaviruses. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 100B**. 2012.

ISO. 21975 Nanotechnologies - Polymeric nanocomposite films for food packaging with barrier properties - Specification of characteristics and measurement methods. **International Organisation for Standardisation**, 2020.

ISO. 80004-2 Nanotechnologies-vocabulary - part 2, nano objects. **International Organisation for Standardisation**, 2015.

ISO. 80004-4 Nanotechnologies - vocabular - part 4: Nanostructured materials. **International Organisation for Standardisation**, 2011.

JAIN, R.; JADON, N.; PAWAIYA, A. Polypyrrole based next generation electrochemical sensors and biosensors: A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, p. 363-373, 2017.

JAMPASA, S. et al. A new DNA sensor design for the simultaneous detection of HPV type 16 and 18 DNA. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 265, p. 514-521, 2018.

JAMPASA, S. et al. Electrochemical detection of human papillomavirus DNA type 16 using a pyrrolidinyll peptide nucleic acid probe immobilized on screen-printed carbon electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 54, p. 428-434, 2014.

JARA-PALACIOS, M. J. et al. Cyclic voltammetry to evaluate the antioxidant potential in winemaking by-products. **Talanta**, v. 165, p. 211-215, 2017.

JIA, X.; DONG, S.; WANG, E. Engineering the bioelectrochemical interface using functional nanomaterials and microchip technique toward sensitive and portable electrochemical biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 76, p. 80-90, 2016.

JIANG, P. et al. Applications of gold nanoparticles in non-optical biosensors. **Nanomaterials**, v. 8, n. 1-23, p. 1-23, 2018.

JONES, O. G. Developments in dynamic atomic force microscopy techniques to characterize viscoelastic behaviors of food materials at the nanometer-scale. **Current Opinion in Food Science**, v. 9, p. 77-83, 2016.

JUSTINO, C. I. L. et al. Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 68, p. 2-17, 2015.

KARABOĞA, M. N. S.; SEZGINTÜRK, M. K. A novel silanization agent based single used biosensing system: Detection of C-reactive protein as a potential Alzheimer's disease blood biomarker. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 154, p. 227-235, 2018.

KARABOĞA, M. N. S.; ŞİMŞEK, Ç. S.; SEZGINTÜRK, M. K. AuNPs modified, disposable, ITO based biosensor: Early diagnosis of heat shock protein 70. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 84, p. 22-29, 2016.

KARIMIZEFREH, A. et al. Impedimetric biosensor for the DNA of the human papilloma virus based on the use of gold nanosheets. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 6, p. 1729-1737, 2017.

KATZ, E.; WILLNER, I. Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors. **Electroanalysis**, v. 15, n. 11, p. 913-947, 2003.

KAUR, G. et al. Electrically conductive polymers and composites for biomedical applications. **Rsc Advances**, v. 5, n. 47, p. 37553-37567, 2015.

KAWAMATA, Y. et al. HPV 16-E6-mediated degradation of intrinsic p53 is compensated by upregulation of p53 gene expression in normal cervical keratinocytes. **International Journal of Oncology**, v. 21, n. 3, p. 561-567, 2002.

KHAN, M. S. et al. Electrochemical-digital immunosensor with enhanced sensitivity for detecting human salivary glucocorticoid hormone. **Analyst**, v. 144, n. 4, p. 1448-1457, 2019.

KHAN, M. Z. H. et al. Ultrasensitive detection of pathogenic viruses with electrochemical biosensor: state of the art. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 166, p. 1-13, 2020.

KHAREWAL, T. et al. Biosensors for penicillin quantification: a comprehensive review. **Biotechnology Letters**, v. 42, p. 1829-1846, 2020.

KHODADADI, A. et al. A new epirubicin biosensor based on amplifying DNA interactions with polypyrrole and nitrogen-doped reduced graphene: experimental and docking theoretical investigations. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 284, p. 568-574, 2019.

KHODER, R.; KORRI-YO USSOUFI, H. E-DNA biosensors of M. tuberculosis based on nanostructured polypyrrole. **Materials Science and Engineering: C**, v. 108, p. 1-12, 2020.

KIM, H. H. et al. Highly sensitive microcantilever biosensors with enhanced sensitivity for detection of human papilloma virus infection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 221, p. 1372-1383, 2015.

KISS, L. et al. Electropolymerized molecular imprinting on glassy carbon electrode for voltammetric detection of dopamine in biological samples. **Talanta**, v. 160, p. 489-498, 2016.

KONTOMARIS, S. V.; STYLIANOU, A. Atomic force microscopy for university students: applications in biomaterials. **European Journal of Physics**, v. 38, n. 3, p. 1-23, 2017.

KUMAR, S. et al. Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 70, p. 498-503, 2015.

LAKARD, B. Electrochemical biosensors based on conducting polymers: a review. **Applied Sciences**, v. 10, n. 18, p. 1-24, 2020.

LAYQAH, L. A.; EISSA, S. An electrochemical immunosensor for the corona virus associated with the Middle East respiratory syndrome using an array of gold nanoparticle-modified carbon electrodes. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 224, p. 1-10, 2019.

LEE, S. et al. Bi nanowire-based thermal biosensor for the detection of salivary cortisol using the Thomson effect. **Applied Physics Letters**, v. 103, n. 143114, p. 1-4, 2013.

LEVA-BUENO, J.; PEYMAN, S. A.; MILLNER, P. A. A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 209, p. 343-362, 2020.

LI, D. et al. Printable transparent conductive films for flexible electronics. **Advanced Materials**, v. 30, n. 10, p. 1-24, 2018.

LI, F. et al. DNA Hydrogels and microgels for biosensing and biomedical applications. **Advanced Materials**, v. 32, n. 3, p. 1-9, 2020.

LI, S. et al. Supramolecular imprinted electrochemical sensor for the neonicotinoid insecticide imidacloprid based on double amplification by Pt-In catalytic nanoparticles and a Bromophenol blue doped molecularly imprinted film. **Microchimica Acta**, v. 183, n. 12, p. 3101-3109, 2016.

LI, X.; LU, X.; KAN, X. 3D electrochemical sensor based on poly (hydroquinone)/gold nanoparticles/nickel foam for dopamine sensitive detection. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 799, p. 451-458, 2017.

LI, Y. et al. Highly sensitive label-free electrochemical aptasensor based on screen-printed electrode for detection of cadmium (II) ions. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 166, n. 6, p. B449-B455, 2019.

LI, Y.; SHI, G. Electrochemical growth of two-dimensional gold nanostructures on a thin polypyrrole film modified ITO electrode. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 50, p. 23787-23793, 2005.

LI, Z. et al. Multisegment nanowire/nanoparticle hybrid arrays as electrochemical biosensors for simultaneous detection of antibiotics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, p. 632-639, 2019.

LI, Z. M. et al. The colorimetric assay of DNA methyltransferase activity based on strand displacement amplification. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 238, p. 626-632, 2017.

LIM, H. J. et al. Quartz crystal microbalance-based biosensors as rapid diagnostic devices for infectious diseases. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 168, p. 1-15, 2020.

LIM, J. W. et al. Review of micro/nanotechnologies for microbial biosensors. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, p. 1-13, 2015.

LIN, J. et al. Target DNA detection of human papilloma virus-16 E7 gene by capture-target-reporter sandwich on interdigitated electrode sensor. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141, p. 564-569, 2019.

LIN, S. et al. Dynamic response of HPV16/anti-HPV16 pairs with unbinding events studied by atomic force microscopy. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 6, p. 203-208, 2016.

LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 5, p. 1-13, 2008.

LIU, C. et al. An electrochemical DNA biosensor for the detection of Mycobacterium tuberculosis, based on signal amplification of graphene and a gold nanoparticle-polyaniline nanocomposite. **Analyst**, v. 139, n. 21, p. 5460-5465, 2014.

LOWE, B. et al. HPV genotype detection using hybrid capture sample preparation combined with whole genome amplification and multiplex detection with Luminex XMAP. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 12, n. 6, p. 847-853, 2010.

LUE, C. E. et al. pH sensing reliability of flexible ITO/PET electrodes on EGFETs prepared by a roll-to-roll process. **Microelectronics Reliability**, v. 52, n. 8, p. 1651-1654, 2012.

LUO, X. et al. Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. **Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis**, v. 18, n. 4, p. 319-326, 2006.

LV, Q. et al. Human papilloma virus DNA-biomarker analysis for cervical cancer: signal enhancement by gold nanoparticle-coupled tetravalent streptavidin-biotin strategy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 354-360, 2019.

MAC, M.; MOODY, C. A. Epigenetic regulation of the human papillomavirus life cycle. **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 1-18, 2020.

MACDIARMID, A. G. "Synthetic metals": a novel role for organic polymers (Nobel lecture). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 40, n. 14, p. 2581-2590, 2001.

MACDONALD, D. D. Review of mechanistic analysis by electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 35, n. 10, p. 1509-1525, 1990.

MACDONALD, J. R. Impedance spectroscopy. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 20, n. 3, p. 289-305, 1992.

MAHMOODI, P. et al. Early detection of cervical cancer based on high-risk HPV DNA-based genosensors: A systematic review. **Biofactors**, v. 45, n. 2, p. 101-117, 2019.

MAHMOODI, P. et al. Early-stage cervical cancer diagnosis based on an ultra-sensitive electrochemical DNA nanobiosensor for HPV-18 detection in real samples. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2020.

MAIA, D. J. et al. Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras. **Química Nova**, v. 23, p. 1-12, 2000.

MANDAL, R. et al. Evolving trends in bio/chemical sensor fabrication incorporating bimetallic nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 117, p. 546-561, 2018.

MARTÍNEZ-GARCÍA, G. et al. Multiplexed electrochemical immunosensing of obesity-related hormones at grafted graphene-modified electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 202, p. 209-215, 2016.

MAVER, U. et al. Recent progressive use of atomic force microscopy in biomedical applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 96-111, 2016.

MCALPINE, M. C. et al. Highly ordered nanowire arrays on plastic substrates for ultrasensitive flexible chemical sensors. **Nature Materials**, v. 6, n. 5, p. 379-384, 2007.

MCKENNA, M. et al. Click chemistry as an immobilization method to improve oligonucleotide hybridization efficiency for nucleic acid assays. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 236, p. 286-293, 2016.

MEHROTRA, P. Biosensors and their applications - A review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, n. 2, p. 153-159, 2016.

METKAR, S. K.; GIRIGOSWAMI, K. Diagnostic biosensors in medicine—a review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 271-283, 2019.

MIRABELLO, L. et al. The intersection of HPV epidemiology, genomics and mechanistic studies of HPV-mediated carcinogenesis. **Viruses**, v. 10, p. 1-14, 2018.

MITSUBAYASHI, K. et al. Optical-transparent and flexible glucose sensor with ITO electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 1, p. 67-71, 2003.

MITTAL, S. et al. Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 88, p. 217-231, 2017.

MIYAGI, A. et al. High-speed atomic force microscopy shows that annexin V stabilizes membranes on the second timescale. **Nature nanotechnology**, v. 11, n. 9, p. 783-790, 2016.

MOGHADDAM, A. B. et al. Synthesis of ZnO nanoparticles and electrodeposition of polypyrrole/ZnO nanocomposite film. **Int J Electrochem Sci**, v. 4, n. 2, p. 247-257, 2009.

MONTEIRO, A. P. M. et al. Índio: uma visão científica e tecnológica de um metal estratégico. **Química Nova**, v. 42, n. 10, p. 1162-1171, 2019.

MORALES, M. A.; HALPERN, J. M. Guide to selecting a biorecognition element for biosensors. **Bioconjugate Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 3231-3239, 2018.

MORITA, S. et al. (Ed.). **Noncontact atomic force microscopy**. Springer, 2015.

MÜHR, L. S. A.; EKLUND, C.; DILLNER, J. Towards quality and order in human papillomavirus research. **Virology**, v. 519, p. 74-76, 2018.

MUÑOZ, J.; MONTES, R.; BAEZA, M. Trends in electrochemical impedance spectroscopy involving nanocomposite transducers: Characterization, architecture surface and bio-sensing. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, p. 201-215, 2017.

NAMDARI, P.; DARAEI, H.; EATEMADI, A. Recent advances in silicon nanowire biosensors: synthesis methods, properties, and applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2016.

NASERI, M.; FOTOUHI, L.; EHSANI, A. Recent progress in the development of conducting polymer-based nanocomposites for electrochemical biosensors applications: a mini-review. **The Chemical Record**, v. 18, n. 6, p. 599-618, 2018.

NASIRIZADEH, N. et al. Introduction of hematoxylin as an electroactive label for DNA biosensors and its employment in detection of target DNA sequence and single-base mismatch in human papilloma virus corresponding to oligonucleotide. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 5, p. 2638-2644, 2011.

NAVARRO, E. et al. Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 231-250, 2015.

NEZAKATI, T. et al. Conductive polymers: opportunities and challenges in biomedical applications. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 14, p. 6766-6843, 2018.

NG, S. P. et al. Label-free detection of 3-nitro-L-tyrosine with nickel-doped graphene localized surface plasmon resonance biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 468-476, 2017.

NGUYEN, H. H. et al. Immobilized enzymes in biosensor applications. **Materials**, v. 12, n. 121, p. 1-34, 2019.

NIA, P. M. et al. Electrodeposition of copper oxide/polypyrrole/reduced graphene oxide as a nonenzymatic glucose biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 209, p. 100-108, 2015.

NIE, Y. et al. A novel high efficient electrochemiluminescence sensor based on reductive Cu (I) particles catalyzed Zn-doped MoS₂ QDs for HPV 16 DNA determination. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 160, p. 1-7, 2020.

NIMSE, S. B. et al. A generalized probe selection method for DNA chips. **Chemical Communications**, v. 47, n. 46, p. 12444-12446, 2011.

OLIVEIRA, P. F. M. et al. Challenges and opportunities in the bottom-up mechanochemical synthesis of noble metal nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 8, n. 32, p. 16114-16141, 2020.

PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PANDEY, C. M. et al. Highly sensitive electrochemical immunosensor based on graphene-wrapped copper oxide-cysteine hierarchical structure for detection of pathogenic bacteria. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 238, p. 1060-1069, 2017.

PARK, H. J. et al. Tin-doped indium oxide films for highly flexible transparent conducting electrodes. **Thin Solid Films**, v. 615, p. 8-12, 2016.

PARMIN, N. A. et al. A Sensitive DNA Biosensor using Screen Printed Gold Electrode Interdigitated Electrode (IDE) Pattern based for Identification of Human Papillomavirus Type 18 Variants. **Journal of Futuristic Biosciences and Biomedical Engineering**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2019a.

PARMIN, N. A. et al. Voltammetric determination of human papillomavirus 16 DNA by using interdigitated electrodes modified with titanium dioxide nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 6, p. 1-9, 2019b.

PEÑA-BAHAMONDE, J. et al. Recent advances in graphene-based biosensor technology with applications in life sciences. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1-17, p. 75, 2018.

PENG, X. et al. Ultrathin Ti₃C₂ nanosheets based “off-on” fluorescent nanoprobe for rapid and sensitive detection of HPV infection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 286, p. 222-229, 2019.

PINGARRÓN, J. M.; YANEZ-SEDENO, P.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 19, p. 5848-5866, 2008.

PINIDIS, P. et al. Human papilloma virus' life cycle and carcinogenesis. **Maedica**, v. 11, n. 1, p. 48-54, 2016.

PISOSCHI, A. M. Biosensors as bio-based materials in chemical analysis: a review. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 7, n. 1, p. 19-38, 2013.

POHANKA, M. The Piezoelectric biosensors: principles and applications. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 12, p. 496-506, 2017.

POVEDANO, E. et al. Decoration of reduced graphene oxide with rhodium nanoparticles for the design of a sensitive electrochemical enzyme biosensor for 17 β -estradiol. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 343-351, 2017.

PRAJAPATI, D. G.; KANDASUBRAMANIAN, B. Progress in the development of intrinsically conducting polymer composites as biosensors. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 220, n. 10, p. 1-26, 2019.

RAFIQUE, B. et al. Electrochemical DNA biosensors: A review. **Sensor Review**, v. 39, p. 34-50, 2019.

RAHMAN, M M. et al. Electrochemical DNA hybridization sensors based on conducting polymers. **Sensors**, v. 15, n. 2, p. 3801-3829, 2015.

RAMANATHAN, M. et al. Gold-coated carbon nanotube electrode arrays: Immunosensors for impedimetric detection of bone biomarkers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 580-588, 2016.

RAMESH, T. et al. Gold-Hybridized Zinc oxide nanorods as Real-time Low-cost nanoBiosensors for Detection of virulent DNA signature of HPV-16 in cervical carcinoma. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-17, 2019.

RAMONAS, E. et al. Highly sensitive amperometric biosensor based on alcohol dehydrogenase for determination of glycerol in human urine. **Talanta**, v. 200, p. 333-339, 2019.

RAPINI, R.; MARRAZZA, G. Biosensor potential in pesticide monitoring. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 74, p. 3-31, 2016.

RASHEED, P. A.; SANDHYARANI, N. Electrochemical DNA sensors based on the use of gold nanoparticles: a review on recent developments. **Microchimica Acta**, v. 184, n. 4, p. 981-1000, 2017.

RASSAS, I. et al. Voltammetric glucose biosensor based on glucose oxidase encapsulation in a chitosan-kappa-carrageenan polyelectrolyte complex. **Materials Science and Engineering: C**, v. 95, p. 152-159, 2019.

RASHEED, P. A.; SANDHYARANI, N. Quartz crystal microbalance genosensor for sequence specific detection of attomolar DNA targets. **Analytica Chimica Acta**, v. 905, p. 134-139, 2016.

RASOULI, E. et al. Advancements in electrochemical DNA sensor for detection of human papilloma virus-A review. **Analytical Biochemistry**, v. 556, p. 136-144, 2018.

REBELO, R. et al. 3D biosensors in advanced medical diagnostics of high mortality diseases. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 130, p. 20-39, 2019.

REBOLJ, M. et al. Differential detection of human papillomavirus genotypes and cervical intraepithelial neoplasia by four commercial assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 2669-2675, 2016.

RESEARCH AND MARKETS. **Biosensors Market Size, Share & Trends Analysis Report by Application by Technology, by End-use, by Region, and Segment Forecasts, 2021-2028**, 2021.

RESEARCH AND MARKETS. **Nano Biosensors Market - Growth, Trends, Forecasts (2020 - 2025)**, 2020.

RODEN, R. B. S.; STERN, P. L. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 4, p. 1-15, 2018.

RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747-1763, 2010.

SABZI, R. E. et al. Electrochemical detection of human papilloma virus (HPV) target DNA using MB on pencil graphite electrode. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 5, n. 3, p. 476-483, 2008.

SADIGHBAYAN, D. et al. Recent advances on the DNA-based electrochemical biosensing of cancer biomarkers: Analytical approach. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 119, p. 1-29, 2019.

SAFITRI, E. et al. Fluorescence bioanalytical method for urea determination based on water soluble ZnS quantum dots. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 240, p. 763-769, 2017.

SANATI, A. et al. A review on recent advancements in electrochemical biosensing using carbonaceous nanomaterials. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 12, p. 1-22, 2019.

SANDFORD, C. et al. A synthetic chemist's guide to electroanalytical tools for studying reaction mechanisms. **Chemical Science**, v. 10, n. 26, p. 6404-6422, 2019.

SANTHOSHKUMAR, J.; RAJESHKUMAR, S.; KUMAR, S. Venkat. Phyto-assisted synthesis, characterization and applications of gold nanoparticle - a review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 11, p. 46-57, 2017.

SANTOS, R. F. S. et al. Visible luminescence in polyaniline/(gold nanoparticle) composites. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2013.

SCHIFFMAN, M. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 370, n. 9590, p. 890-907, 2007.

SEMENOVA, D. et al. Mechanistic modeling of cyclic voltammetry: A helpful tool for understanding biosensor principles and supporting design optimization. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 259, p. 945-955, 2018.

SENAPATI, R. et al. HPV genotypes co-infections associated with cervical carcinoma: Special focus on phylogenetically related and non-vaccine targeted genotypes. **PLoS One**, v. 12, n. 11, p. 1-6, 2017.

SENGANI, M.; GRUMEZESCU, A. M.; RAJESWARI, V. D. Recent trends and methodologies in gold nanoparticle synthesis - A prospective review on drug delivery aspect. **OpenNano**, v. 2, p. 37-46, 2017.

SERRANO, B. et al. Epidemiology and burden of HPV-related disease. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 47, p. 14-26, 2018.

SHABANINEJAD, Z. et al. Electrochemical-based biosensors for microRNA detection: Nanotechnology comes into view. **Analytical Biochemistry**, v. 581, p. 1-12, 2019.

SHARIATI, M. et al. An ultrasensitive label free human papilloma virus DNA biosensor using gold nanotubes based on nanoporous polycarbonate in electrical alignment. **Analytica Chimica Acta**, v. 1048, p. 31-41, 2019.

SHEIKHZADEH, E. et al. Label-free impedimetric biosensor for Salmonella Typhimurium detection based on poly [pyrrole-co-3-carboxyl-pyrrole] copolymer supported aptamer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 80, p. 194-200, 2016.

SHETTI, N. P. et al. ZnO-based nanostructured electrodes for electrochemical sensors and biosensors in biomedical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 141, p. 1-12, 2019.

SHOAIE, N. et al. Electrochemical sensors and biosensors based on the use of polyaniline and its nanocomposites: a review on recent advances. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 7, p. 1-29, 2019.

SHOAIE, N.; FOROUZANDEH, M.; OMIDFAR, K. Voltammetric determination of the Escherichia coli DNA using a screen-printed carbon electrode modified with polyaniline and gold nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 185, n. 4, p. 1-9, 2018.

SHRESTHA, B. K. et al. Globular shaped polypyrrole doped well-dispersed functionalized multiwall carbon nanotubes/nafion composite for enzymatic glucose biosensor application. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

SHRIVASTAVA, S.; JADON, N.; JAIN, R. Next-generation polymer nanocomposite-based electrochemical sensors and biosensors: A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 55-67, 2016.

SILVA, M. S. et al. Conductive atomic force microscopy characterization of PTCR-BaTiO₃ laser-sintered ceramics. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 36, n. 6, p. 1385-1389, 2016.

SILVA, R. R. et al. Optical and dielectric sensors based on antimicrobial peptides for microorganism diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 443-450, 2014.

SINGH, S. et al. Biological biosensors for monitoring and diagnosis. **In: Microbial Biotechnology: Basic Research and Applications**. Springer, Singapore, p. 317-335, 2020.

SIREESHA, M. et al. A review on carbon nanotubes in biosensor devices and their applications in medicine. **Nanocomposites**, v. 4, n. 2, p. 36-57, 2018.

SKLÁDAL, P. Piezoelectric biosensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 127-133, 2016.

SLEPIČKA, P. et al. Methods of gold and silver nanoparticles preparation. **Materials**, v. 13, n. 1, p. 1-22, 2020.

SMITH, E. M. et al. Association between p53 and human papillomavirus in head and neck cancer survival. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 17, n. 2, p. 421-427, 2008.

SOARES, J. C. et al. Detection of HPV16 in cell lines deriving from cervical and head and neck cancer using a genosensor made with a DNA probe on a layer-by-layer matrix. **Materials Chemistry Frontiers**, p. 1-9, 2020.

SONI, D. K. et al. Label-free impedimetric detection of *Listeria monocytogenes* based on poly-5-carboxy indole modified ssDNA probe. **Journal of Biotechnology**, v. 200, p. 70-76, 2015.

SPM Training Guide. **Atomic Force Microscopy**. 2011. Disponível em: <[https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/SPM%20Training%20Guide/Atomic%20Force%20Microscopy%20\(AFM\)/Atomic%20Force%20Microscopy%20\(AFM\).htm](https://www.nanophys.kth.se/nanolab/afm/icon/bruker-help/Content/SPM%20Training%20Guide/Atomic%20Force%20Microscopy%20(AFM)/Atomic%20Force%20Microscopy%20(AFM).htm)>. Acesso em: 08 nov. 2020.

STANLEY, M. A. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 215-222, 2012.

STINE, K. J. Biosensor applications of electrodeposited nanostructures. **Applied Sciences**, v. 9, n. 4, p. 1-40, 2019.

SUN, J. et al. Microbial fuel cell-based biosensors for environmental monitoring: a review. **Water Science and Technology**, v. 71, n. 6, p. 801-809, 2015.

SUNI, I. I. Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 604-611, 2008.

TRAN, L. et al. Development of interdigitated arrays coated with functional polyaniline/MWCNT for electrochemical biodetection: Application for human papilloma virus. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1560-1565, 2011.

TEENGAM, P. et al. Electrochemical paper-based peptide nucleic acid biosensor for detecting human papillomavirus. **Analytica Chimica Acta**, v. 952, p. 32-40, 2017.

TELES, F. R. R.; FONSECA, L. P. Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 8, p. 1530-1543, 2008.

THIPMANEE, O. et al. Enhancing capacitive DNA biosensor performance by target overhang with application on screening test of HLA-B* 58: 01 and HLA-B* 57: 01 genes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 82, p. 99-104, 2016.

TONG, Y. et al. Hydrophobic water probed experimentally at the gold electrode/aqueous interface. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, n. 15, p. 4211-4214, 2017.

TRIPATHY, S. et al. Flexible ITO electrode with gold nanostructures for femtomolar dna hybridization detection. **IEEE Sensors Letters**, v. 2, n. 4, p. 1-4, 2018.

TRUTA, L. A.; SALES, M. G. F. Carcinoembryonic antigen imprinting by electropolymerization on a common conductive glass support and its determination in serum samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 287, p. 53-63, 2019.

TSIKOURAS, P. et al. Cervical cancer: screening, diagnosis and staging. **Official Journal of The Balkan Union of Oncology**, v. 21, n. 2, p. 320-325, 2016.

TURK, M. C.; WALTERS, M. J.; ROY, D. Experimental considerations for using electrochemical impedance spectroscopy to study chemical mechanical planarization systems. **Electrochimica Acta**, v. 224, p. 355-368, 2017.

UNTIVEROS, K. L. et al. An electrochemical biosensor based on Hairpin-DNA modified gold electrode for detection of DNA damage by a hybrid cancer drug intercalation. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 133, p. 160-168, 2019.

URREGO, L. F. et al. Biomicrosystem design and fabrication for the human papilloma virus 16 detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 207, p. 97-104, 2015.

VALENCIA, D. P. et al. Development of a bio-electrochemical immunosensor based on the immobilization of SPINNTKPHEAR peptide derived from HPV-L1 protein on a gold electrode surface. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 770, p. 50-55, 2016.

VÁSQUEZ, G. et al. Amperometric biosensor based on a single antibody of dual function for rapid detection of *Streptococcus agalactiae*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 453-458, 2017.

VERNON, S. D. et al. Bioelectronic DNA detection of human papillomaviruses using eSensor™: a model system for detection of multiple pathogens. **BMC Infectious Diseases**, v. 3, p. 1-12, 2003.

VOKHMYANINA, D. V. et al. 'Artificial peroxidase' nanozyme-enzyme based lactate biosensor. **Talanta**, v. 208, p. 1-4, 2020.

WANG, D. et al. Multifunctionalized reduced graphene oxide-doped polypyrrole/pyrrolepropylic acid nanocomposite impedimetric immunosensor to ultrasensitively detect small molecular aflatoxin B1. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 63, p. 185-189, 2015.

WANG, L. et al. Bottom-up synthesis and sensor applications of biomimetic nanostructures. **Materials**, v. 9, n. 1, p. 1-28, 2016.

WANG, S. et al. Electrochemical detection of hepatitis B and papilloma virus DNAs using SWCNT array coated with gold nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 205-210, 2013.

WANG, S. et al. Flexible substrate-based devices for point-of-care diagnostics. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 909-921, 2016.

WANG, Y. et al. Genotyping of 30 kinds of cutaneous human papillomaviruses by a multiplex microfluidic loop-mediated isothermal amplification and visual detection method. **Virology Journal**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2020.

WANG, Z.; DAI, Z. Carbon nanomaterial-based electrochemical biosensors: an overview. **Nanoscale**, v. 7, n. 15, p. 6420-6431, 2015.

WIKIMEDIA COMMONS. **AFM modes**. 2016. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Afm_modes_12-10.svg>. Acesso em: 08 nov. 2020.

WU, P. et al. Co-infections of HPV16/18 with other high-risk HPV types and the risk of cervical carcinogenesis: A large population-based study. **Gynecologic Oncology**, v. 155, n. 3, p. 436-443, 2019.

XIAO, T. et al. Au and Au-Based nanomaterials: synthesis and recent progress in electrochemical sensor applications. **Talanta**, v. 206, p. 1-19, 2020.

XU, S. et al. Real-time reliable determination of binding kinetics of DNA hybridization using a multi-channel graphene biosensor. **Nature communications**, v. 8, p. 1-10, 2017.

YANG, J. J.; OH, H. B.; HWANG, S. H. based speedy separation of amplified DNA (PASS-DNA): Potential for molecular point-of-care testing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 286, p. 101-103, 2019.

YE, D.; ZUO, X.; FAN, C. DNA nanotechnology-enabled interfacial engineering for biosensor development. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 11, p. 171-195, 2018.

YE, Y. et al. Electrochemical detection of Salmonella using an invA genosensor on polypyrrole-reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode and AuNPs-horseradish peroxidase-streptavidin as nanotag. **Analytica Chimica Acta**, v. 1074, p. 80-88, 2019.

YE, Y.; GUO, H.; SUN, X. Recent progress on cell-based biosensors for analysis of food safety and quality control. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, p. 389-404, 2019.

ZAFERANI, S. H. Introduction of polymer-based nanocomposites. In: Polymer-based nanocomposites for energy and environmental applications. **Woodhead Publishing**, p. 1-25, 2018.

ZHANG, H. et al. Fluorescent biosensors enabled by graphene and graphene oxide. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 96-106, 2017.

ZHANG, L. et al. An impedimetric biosensor for the diagnosis of renal cell carcinoma based on the interaction between 3-aminophenyl boronic acid and sialic acid. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 92, p. 434-441, 2017.

ZHANG, L. L.; ZHAO, X. S. Carbon-based materials as supercapacitor electrodes. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 9, p. 2520-2531, 2009.

ZHANG, Y.; CHEN, X. Nanotechnology and nanomaterial-based no-wash electrochemical biosensors: from design to application. **Nanoscale**, v. 11, n. 41, p. 19105-19118, 2019.

ZHOU, F. et al. Electrodeposition of gold nanoparticles on ZnO nanorods for improved performance of enzymatic glucose sensors. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 105, p. 1-10, 2020.

ZOUARI, M. et al. Femtomolar direct voltammetric determination of circulating miRNAs in sera of cancer patients using an enzymeless biosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 1104, p. 188-198, 2020.

9 APÊNDICES

9.1 APÊNDICE A – PRODUTO COMPLEMENTAR

Número do pedido de depósito de patente - INPI: BR 10 2020 026632 2

**Plataforma sensora baseada em filme fino polimérico associado a compósito
híbrido e seu uso em diagnóstico biomédico**



23/12/2020 870200161126
17:53



29409161918340870

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2020 026632 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959

Email: patentes_dine.propesq@ufpe.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 23/12/2020 às 17:53, Petição 870200161126

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PLATAFORMA SENSORA BASEADA EM FILME FINO POLIMÉRICO ASSOCIADO A COMPOSITO HÍBRIDO E SEU USO EM DIAGNÓSTICO BIOMÉDICO

Resumo: PLATAFORMA SENSORA BASEADA EM FILME FINO POLIMÉRICO ASSOCIADO A COMPOSITO HÍBRIDO E SEU USO EM DIAGNÓSTICO BIOMÉDICO obtida por metodologia simples para fabricação de um dispositivo eletroquímico utilizável na identificação do oncogene quimérico BCR/ABL. Objetivando-se aprimorar o desempenho analítico do sensor biológico, uma plataforma nanoestruturada foi construída sobre a área ativa de um eletrodo metálico e seu procedimento metodológico exposto. A plataforma nanoestruturada foi baseada no polímero polipirrol (PPy) e compósito híbrido formado por quitosana e nanopartículas de óxido de zinco (Chit-ZnONP). O PPy pode assumir um caráter intrinsecamente condutor, favorecendo a transferência de carga na interface eletrodo-solução e contribuindo significativamente para a melhoria da sensibilidade dos sistemas de biodetecção. O compósito híbrido Chit-ZnONP disponibiliza grupos químicos para a ancoragem de biomoléculas, além de apresentar elevada área de contato. O nanocompósito Chit-ZnONP proporciona um microambiente hidrofílico e biocompatível, necessário para a manutenção da conformação molecular de biomoléculas imobilizadas. A fim de tornar a plataforma nanoestruturada aplicável ao diagnóstico de oncogene quimérico BCR/ABL, sequências curtas de oligonucleotídeos (denominadas de sondas de DNA) foram imobilizadas quimicamente sobre os transdutores modificados. As técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foram utilizadas para a caracterização das etapas de modificação do eletrodo de trabalho e o monitoramento da hibridização molecular. O invento ressalta o biossensor de DNA como ferramenta para a análise e detecção de genes de interesse biomédico, apresentando, especificamente, elevada sensibilidade (limite de detecção de 1,2 fM), simplicidade de construção, elevada reprodutibilidade, e passível de miniaturização.

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 23/12/2020 às 17:53, Petição 870200161126

Dados do Inventor (72)**Inventor 1 de 6**

Nome: KAREN YASMIM PEREIRA DOS SANTOS AVELINO

Inventor 2 de 6

Nome: MARYANA ROGÉRIA DOS SANTOS

Inventor 3 de 6

Nome: NORMA LUCENA CAVALCANTI LICÍNIO DA SILVA

Inventor 4 de 6

Nome: RENAN GARCIA GOMES

Inventor 5 de 6

Nome: CÉSAR AUGUSTO SOUZA DE ANDRADE

Inventor 6 de 6

Nome: MARIA DANIELLY LIMA DE OLIVEIRA

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU e comprovante.pdf
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Desenho	Figuras.pdf
Resumo	Resumo.pdf

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 23/12/2020 às 17:53. Petição 870200161126

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 23/12/2020 às 17:53, Petição 870200161126

1/20

**PLATAFORMA SENSORA BASEADA EM FILME FINO POLIMÉRICO
ASSOCIADO A COMPÓSITO HÍBRIDO E SEU USO EM DIAGNÓSTICO
BIOMÉDICO**

Campo técnico

01. O oncogene quimérico BCR/ABL é uma anormalidade genética associada à patogênese da leucemia mieloide crônica (LMC) em adultos. Entretanto, também representa um fator significativo para o desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda (LLA) em crianças. A avaliação da presença do oncogene quimérico BCR/ABL possibilita um diagnóstico precoce e o monitoramento da regressão da doença viabiliza a detecção de células leucêmicas residuais, especialmente após o transplante de medula óssea. Atualmente, os métodos de diagnóstico clínico e de prognóstico utilizados para a identificação desta fusão gênica apresentam algumas limitações, como o processo de análise dispendioso e os altos custos para a aquisição de equipamentos. Logo, o desenvolvimento de um ensaio molecular efetivo para a detecção do oncogene quimérico BCR/ABL é de grande interesse para a promoção da saúde de pacientes com leucemia.

02. A presente invenção aplica-se ao campo das ciências biomédicas, especificamente ao setor de diagnósticos clínicos. O invento descrito é aplicável à área de diagnóstico biomédico para detecção de sequências gênicas através do uso de biossensores de DNA. Particularmente, a invenção refere-se a método alternativo para a identificação eletroquímica do oncogene quimérico BCR/ABL.

03. A descoberta relatada concerne a um biossensor baseado na imobilização de uma sequência curta de oligonucleotídeos (sonda de DNA) ligada quimicamente a um compósito de quitosana (Chit) e nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs). O compósito polimérico foi automontado sobre um filme de polipirrol (PPy) eletrossintetizado na superfície de um eletrodo metálico. A plataforma elaborada tem como função a detecção do oncogene quimérico BCR/ABL em amostras clínicas de baixas concentrações, através do uso de uma sonda específica de DNA. Desta forma, um biossensor nanoestruturado foi desenvolvido para o diagnóstico de pacientes com LMC através da identificação de um marcador genético para desordens oncológicas.

2/20

04. A associação entre polímeros, materiais nanométricos e biomoléculas são de interesse da biotecnologia e nanociências. Em especial, ressalta-se que a conjugação de materiais funcionais, tais como nanopartículas semicondutoras de óxido metálico e polímeros orgânicos melhoram o desempenho analítico de sensores biológicos. Portanto, esta estratégia de construção de sistemas biomoleculares, baseada no uso de elementos que proporcionam funções ou propriedades a biossensores eletroquímicos, vem ganhando notoriedade na área de diagnósticos clínicos.

05. Em geral, os polímeros orgânicos condutores exercem importante papel na elaboração de plataformas para biodeteção, garantindo sensibilidade e versatilidade ao produto. O PPy é um bom representante desse grupo, apresentando diversas características atrativas, como monômero de baixo custo, estabilidade à temperatura ambiente, baixa toxicidade, alta condutividade, elevada taxa de transferência de carga, possibilidade de polimerização por via eletroquímica com aplicação de baixos potenciais de oxidação, espessura do filme polimérico controlada experimentalmente e presença de grupos funcionais para a ancoragem estável de biomoléculas.

06. Em adição, as ZnONPs se destacam entre os óxidos metálicos por possuírem excelentes propriedades para a construção de sistemas biossensíveis. As ZnONPs apresentam características físicas de um material semicondutor que possibilitam um rápido transporte de elétrons do eletrodo para a biomolécula. Além disso, as ZnONPs apresentam elevada razão entre área superficial e volume, alta eficiência catalítica, estabilidade química, biocompatibilidade e ausência de toxicidade.

07. Fundamentalmente, as ZnONPs podem ser incorporadas em biopolímeros, tais como a Chit para a síntese de compósitos poliméricos. A Chit é um polímero natural obtido a partir da carapaça de crustáceos usado para diversos fins biotecnológicos e sustentáveis. O nanocompósito Chit-ZnONP dispõe de grupos químicos reativos (-OH e -NH₂) que possibilitam a ligação estável de sequências oligonucleotídicas através de reações covalentes específicas. Ademais, por suas propriedades hidrofílicas, o nanocompósito Chit-ZnONP oferece um microambiente adequado para a manutenção da conformação tridimensional das biomoléculas imobilizadas, fator essencial para assegurar sua função biológica e/ou bioatividade.

3/20

08. Portanto, o invento descrito provém da aplicação de técnicas eletroquímicas para a síntese do polímero condutor PPy sobre um eletrodo de metálico. Por meio de metodologias de automontagem, o nanocompósito híbrido Chit-ZnONP foi sobreposto ao filme de PPy para a obtenção da plataforma nanoestruturada PPy/Chit-ZnONP. Com a ancoragem de sondas de DNA sobre o substrato modificado, um biossensor com elevada sensibilidade e especificidade foi obtido para o monitoramento do oncogene quimérico BCR/ABL e diagnóstico de LMC.

09. O biodispositivo eletroquímico é um sistema analítico promissor, pois requer pouco tempo de análise, oferecendo um diagnóstico rápido e com baixo custo. Em particular, a engenhosidade do invento pode ser aplicada ao desenvolvimento de outros biossensores, diversificando-se a natureza da molécula de biorreconhecimento.

Estado da técnica

10. A LMC é uma neoplasia caracterizada pela proliferação descontrolada e anormal de células da linhagem mieloide. Estas células são originadas na medula óssea e apresentam a função de proteção contra ameaças externas ao organismo. Ressalta-se que a LMC corresponde a aproximadamente 15% de todas as leucemias e afeta principalmente adultos [1]. A ocorrência deste tipo de leucemia frequentemente está relacionada a uma mutação genética caracterizada pela translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22 t(9;22)(q34; q11). Como resultado, um rearranjo cromossômico específico é obtido, comumente chamado de cromossomo *Philadelphia*. Este cromossomo contém o gene híbrido BCR/ABL (oncogene) que pode expressar três diferentes isoformas da proteína tirosina quinase (p185, p210 e p230), as quais estão associadas à patogênese de diferentes tipos de leucemia [2, 3].

11. As técnicas atuais de diagnóstico clínico para LMC estão voltadas para a detecção do gene de fusão BCR/ABL, considerado um biomarcador oncogênico. Entre os métodos moleculares encontram-se a análise cromossômica, hibridação fluorescente *in situ* (FISH), citometria de fluxo e reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RQ-PCR). Estas ferramentas de análise, embora precisas e específicas, apresentam sensibilidade limitada e demandam

4/20

um alto custo experimental, elevada habilidade técnica e longo tempo de experimentação. Como consequências destas desvantagens, pode-se ocorrer um retardo no diagnóstico médico e na implementação de estratégias terapêuticas efetivas [4]. Desta forma, um avanço nas metodologias de pesquisa e detecção do oncogene quimérico BCR/ABL é de grande interesse para saúde dos pacientes com leucemia [5, 6].

12. Nos últimos anos, os avanços da nanociência e o desenvolvimento tecnológico possibilitaram a construção de biodispositivos nanoestruturados, como os biossensores eletroquímicos. Na investigação diagnóstica, estes surgem como ferramentas presuntivas para a detecção precisa e específica de analitos biológicos com alta sensibilidade e rápido tempo de resposta [7]. Em sua estrutura há uma camada biológica, que exerce a função de reconhecimento, ligada a um transdutor, que detecta a interação analito-biocamada, transformando-a em um sinal quantificável. Este sinal é então amplificado por um processador eletrônico e apresentado em forma de gráficos. Biossensor de DNA ou, simplesmente, genossensor, é um tipo de dispositivo que utiliza como material biológico um ácido nucleico de fita simples, como o ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA). O princípio de detecção está baseado no processo de hibridação entre o segmento oligonucleotídico e sua cadeia complementar, que gerará perturbações mensuráveis no sistema. É importante ressaltar que, este tipo de sensor se destaca por sua alta especificidade e estabilidade diante de condições ambientais adversas [8-10].

13. Para um bom desempenho analítico, a imobilização do ácido nucleico sobre o transdutor eletroquímico precisa ser efetiva e estável. Para tal, processos de modificação de superfícies sólidas são amplamente utilizados para a construção de sensores biológicos. Neste cenário, as plataformas nanoestruturadas são consideradas estratégias inovadoras para a modificação de transdutores através da associação racional e direcionada de materiais funcionais [11]. Dentre estes constituintes, pode-se destacar os polímeros orgânicos e as partículas nanométricas.

14. O PPY é um dos polímeros orgânicos mais utilizados em aplicações comerciais e tem possibilitado a construção de biossensores eletroquímicos com novos designs e características aprimoradas. Este material pode assumir um caráter intrinsecamente condutor, favorecendo a transferência de carga na

interface eletrodo-solução. Ademais, exibe biocompatibilidade, estabilidade ambiental, presença de grupos químicos funcionais e elevada cinética de transporte de elétrons, o que contribui significativamente para a melhoria da sensibilidade dos sistemas de biodetecção. Entre as metodologias de síntese, ressalta-se a eletropolimerização de PPy através da oxidação do monômero pirrol em potenciais relativamente baixos [12]. Por meio deste método, a espessura e a densidade de corrente do filme de PPy podem ser controladas experimentalmente através do número de ciclos de polimerização [13]. Ademais, a síntese eletroquímica de PPy proporciona novas oportunidades para a obtenção de sistemas moleculares reprodutíveis e com baixos limites de detecção e quantificação.

15. No campo dos nanomateriais, as ZnONPs têm sido exploradas como um elemento potencial para biossensibilidade, amplamente utilizadas na fabricação de biodispositivos [14-16]. Esta nanopartícula de óxido metálico apresenta características de um material semicondutor com elevada estabilidade química e forte capacidade de adsorção. As nanoestruturas de ZnO além de possuírem elevada área superficial, eficiência catalítica e baixa toxicidade, apresentam elevada rugosidade, o que coopera para a imobilização biomoléculas sobre sua superfície. Desta forma, a presença de poros nas ZnONPs aumenta significativamente a superfície ativa das nanopartículas e contribui para uma maior sensibilidade nos sistemas analíticos [11, 15].

16. A capacidade das ZnONPs se complexarem com biopolímeros, como a Chit, tem despertado o interesse para obtenção de compósitos poliméricos particulados. A Chit é um biopolímero natural constituído por unidades de glicosamina e N-acetilglicosamina obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina, frequentemente presente nas carapaças de crustáceos [17]. Este biomaterial é amplamente utilizado em aplicações tecnológicas devido suas propriedades diferenciadas [18]. Por exemplo, a Chit possui excelente capacidade de formação de filmes, alta permeabilidade, resistência mecânica, estabilidade térmica, ausência de imunogenicidade, biocompatibilidade, atóxica, biodegradabilidade, baixo custo e facilidade de obtenção. Além disso, a Chit possui grupos químicos funcionais que possibilitam a imobilização de biomoléculas e a incorporação de nanoestruturas através de interações específicas. Em adição, a Chit fornece um microambiente hidrofílico que

6/20

assegura a estabilidade das biomoléculas ancoradas [19, 20]. Particularmente, o nanocompósito Chit-ZnONP pode ser obtido a partir da dispersão de ZnONPs no interior do retículo polimérico. Estas nanopartículas são estabilizadas através de ligações de hidrogênio entre os grupos amino ($-NH_2$) e grupos hidroxila ($-OH$) da molécula de Chit [21]. É interessante notar que os materiais híbridos apresentam propriedades singulares e sinérgicas entre seus constituintes e exibem promissor uso na área dos biossensores [22].

17. Diversos pesquisadores têm se dedicado ao estudo de metodologias mais eficazes para a detecção de sequências gênicas. Neste intuito, a patente CN101046461A pormenoriza um sensor eletroquímico baseado em nanotubos de carbono de múltiplas paredes, funcionalizados com grupos carboxílicos. Estas nanoestruturas de carbono, imobilizadas sobre um eletrodo de carbono vítreo, foram utilizadas como substrato para a ancoragem de segmentos de oligonucleotídeos específicos para a detecção do gene de fusão BCR/ABL. Além disso, a substância curcumina foi utilizada como indicadora de hibridização. Neste invento, foram verificadas que a elevada área de superfície e a rápida cinética de transferência de elétrons dos nanotubos de carbono contribuem, respectivamente, para uma maior fixação de biomoléculas e aumento de sensibilidade do sistema analítico. Por fim, o sensor eletroquímico usado para a detecção do oncogene apresentou elevada seletividade e limite de detecção de 2×10^{-10} g/mL.

18. A invenção CN101928767A também especifica um biossensor eletroquímico de DNA para detecção do gene de fusão BCR/ABL, baseado em tecnologia de ligação química e hibridização molecular. As sondas de biorreconhecimento foram projetadas com grupos amino ou mercapto 5'-terminal, destinadas à ancoragem sobre eletrodos de diferentes materiais, tais como, ouro, carbono vítreo e eletrodo de pasta de carbono. Em adição, através do uso de substâncias indicativas de hibridização, as respostas de biorreconhecimento para o gene da LMC foram evidenciadas nas formas de sinais de corrente, tensão, condutância ou resistência.

19. A invenção CN105334253A descreve um método de detecção para o oncogene PML/RAR- α , um biomarcador de leucemia promielocítica aguda (LPA), para através de um biossensor eletroquímico baseado em compósito de óxido de grafeno (GO) e quantum dots de carbono (C-dots). As sondas de

7/20

captura foram automontadas, por meio de ligações covalentes, sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo modificado com o nanocompósito C dots@GO e o processo de hibridização foi evidenciado usando o azul de metileno. O material híbrido demonstrou boa condutividade elétrica e numerosos grupos carboxílicos para a imobilização efetiva de sondas oligonucleotídicas. Ademais, o sistema desenvolvido exibiu elevada seletividade e sensibilidade para a identificação do oncogene PML/RAR- α , contribuindo para o diagnóstico clínico de LPA.

20. O invento CN101705279A fornece um biossensor eletroquímico de DNA para a identificação rápida do gene de fusão PML/RAR- α . O biodispositivo foi projetado sobre um eletrodo de ouro modificado com nanopartículas de ouro, sobre o qual as sondas de biorreconhecimento funcionalizadas com grupos tiol (-SH) foram conjugadas quimicamente. O gene de fusão PML/RAR- α foi detectado através de imunoenensaio eletroquímico ligado a enzima. A cadeia alvo do gene PML/RAR- α foi marcada com biotina e, após a formação do DNA híbrido, houve a interação com a enzima peroxidase de rábano silvestre marcada com avidina. Como substrato enzimático, foi utilizada a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. O método molecular proposto foi capaz de melhorar significativamente a sensibilidade e especificidade do sistema analítico.

21. Por fim, verifica-se que, com o intuito de aumentar a eficiência no diagnóstico e prevenção de cânceres, muitas metodologias estão sendo elaboradas. Uma delas foi a patente BR 10 2016 003449 3 A2, que se refere à construção de um sensor eletroquímico de DNA baseado nas técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) para a detecção da mutação gênica c.68_69del. Esta alteração genética, localizada no cromossomo 17, está relacionada à predisposição de indivíduos ao desenvolvimento de cânceres de mama e ovário. O sensor compreende o DNA de captura (HS-ssDNA) depositado em superfície modificada com 2-mercaptoetanol para detecção do oligonucleotídeo tarDNA alvo (sequência alvo) ou ncsDNA (sequência não complementar).

22. O presente invento relata um processo metodológico para a construção de um biossensor eletroquímico livre de marcador utilizado na identificação do gene de fusão BCR/ABL. O sistema de biodetecção foi baseado no uso de eletrodo de ouro, sobre o qual foi estruturada uma nanoplataforma para

8/20

amplificação do sinal analítico. Inicialmente, um filme de PPy foi sintetizado eletroquimicamente sobre um substrato de ouro. Em seguida, através de um método de *drop-coating*, o nanocompósito Chit-ZnONP foi adicionado. Com a finalidade de tornar a plataforma PPy/Chit-ZnONP funcional, um segmento de DNA funcionalizado com grupo amino terminal foi imobilizado covalentemente sobre o eletrodo modificado. Assim, um biodispositivo constituído por PPy/Chit-ZnONP/Sonda_{DNA} foi desenvolvido para a detecção do oncogene quimérico BCR/ABL. Nota-se que esta nova ferramenta eletroquímica é um método promissor para o diagnóstico de LMC, com elevada sensibilidade, especificidade, baixo custo e rápida análise.

23. Embora os documentos supracitados apresentem semelhanças em relação a patente aqui descrita, as diferenças existentes podem ser observadas na Tabela I.

Tabela I - Comparação entre os componentes característicos de cada invento.

	Presente invento	CN10104646 1A	CN10192876 7A	CN10533425 3A	CN10170527 9A	BR 10 2016 003449 3 A2
Substrato de ouro	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim
Polímero polipirrol	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
Nanocompósito Chit-ZnONP	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
Imobilização covalente das sondas de DNA	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Uso de marcadores eletroquímicos	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Transdutor eletroquímico	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Deteção do oncogene BCR/ABL	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
Deteção do oncogene PML/RAR-α	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não

Problemas do estado da técnica

24. A principal dificuldade encontrada quanto ao desenvolvimento da ferramenta analítica é alcançar um ótimo limite de detecção do gene de fusão BCR/ABL, ou seja, uma maior eficiência e sensibilidade da sonda para detectar a sequência alvo. Tendo isso em vista, a fim de melhorar a detecção e aumentar a quantidade de DNA híbrido, foi utilizado o polímero condutor PPy e o nanocompósito Chit-ZnONP para modificação eletródica. Enquanto o PPy é responsável por facilitar a passagem de íons sobre a superfície eletroativa e, conseqüentemente, aumentar a condutividade elétrica, o compósito polimérico particulado disponibiliza grupos químicos para a ancoragem de biomoléculas, além de apresentar elevada área de contato. Outrossim, o nanocompósito Chit-ZnONP proporciona um microambiente hidrofílico e biocompatível, necessário para a manutenção da conformação molecular das sondas de DNA. Portanto, esta estratégia de associação de materiais funcionais possibilitou a estruturação de uma nanoplataforma com propriedades essenciais para o interfaceamento do sinal analítico.

Objetivos da invenção

25. O principal objetivo da presente invenção é descrever um biossensor de DNA baseado em plataforma nanoestruturada de polímero condutor e compósito híbrido para a detecção eletroquímica do oncogene quimérico BCR/ABL. Especificamente, esta patente visa estabelecer um processo experimental para a construção de uma nova plataforma de interfaceamento composta por PPy e nanocompósito Chit-ZnONP, tendo a finalidade de aprimorar a capacidade de transdução e a performance bioanalítica de sistemas sensores. Além disto, pretende-se delinear o método de imobilização de oligonucleotídeos sobre a plataforma nanoestruturada e analisar sua eficiência de biodetecção.

26. O invento retratado nesta patente também objetiva o desenvolvimento de novos biodispositivos reprodutíveis, sensíveis, específicos, seletivos e com baixo custo operacional. Em particular, ressalta-se que o biossensor de DNA não necessita da utilização de marcadores moleculares, visto que as técnicas eletroquímicas empregadas revelam alterações nas propriedades elétricas da

10/20

superfície do eletrodo, tal como resistência e capacitância, gerando uma resposta específica na presença da molécula alvo.

Solução do problema

27. A patente dispõe, como ato inventivo, o processo de obtenção de um biossensor de DNA construído a partir da polimerização eletroquímica de PPy sobre um transdutor de ouro, seguido da automontagem do nanocompósito Chit-ZnONP sobre o eletrodo modificado. A posteriori, sondas oligonucleotídicas foram imobilizadas quimicamente, tornando o biodispositivo funcional para a detecção do oncogene quimérico BCR/ABL. Tal feito, ressalta o biossensor de DNA como ferramenta inovadora para a análise e detecção de genes de interesse biomédico, apresentando, especificamente, diversas vantagens em relação aos métodos convencionais para o diagnóstico de LMC.

Vantagens da invenção

28. A invenção apresenta um processo metodológico para fabricação de um biossensor de DNA com composição singular e inovadora. Preliminarmente, o ensaio descrito possui uma simplicidade de construção, elevada reprodutibilidade, modelo economicamente viável e passível de miniaturização. Estas propriedades oportunizam a transferência de tecnologia para o desenvolvimento de dispositivos *point of care* e chips bioanalíticos, frequentemente utilizados para o diagnóstico rápido de distintas patologias.

29. Uma das vantagens ressaltadas na presente patente foi a modificação química do transdutor metálico através da construção de uma plataforma nanoestruturada baseada em polímero condutor e material híbrido. Em adição, por meio de ligações covalentes, sondas de DNA foram conjugadas sobre a superfície do eletrodo modificado. Considera-se que a imobilização química de moléculas biológicas sobre substratos sólidos é uma das técnicas predominantes para a obtenção de biossensores efetivos. Destaca-se que, esta forma de ancoragem proporciona uma maior solidez e durabilidade ao sistema sensor, através da redução do processo de lixiviamento da plataforma nanoestruturada e das biomoléculas de reconhecimento.

11/20

30. Em vista dos benefícios, os filmes de polímero condutor (PPy) foram depositados diretamente no substrato de trabalho através de polimerização eletroquímica. Esta técnica fundamenta-se na oxidação do monômero pirrol em baixos potenciais e formação de radicais cátions, responsáveis pela reação de polimerização. Logo, através desta estratégia, filmes poliméricos uniformes, com elevada taxa de transferência de elétrons e espessura controlada experimentalmente foram obtidos.

31. O nanocompósito Chit-ZnONP foi capaz de formar uma monocamada automontada sobre toda a superfície do filme polimérico, através de um processo termodinamicamente favorável. Este fato é devido aos grupos hidroxila (-OH) e amino (-NH₂) presentes na estrutura molecular da Chit que podem realizar ligações de hidrogênio com a amina secundária do polímero PPy. Estes mesmos grupamentos funcionais do nanocompósito híbrido possibilitam a ancoragem química de biomoléculas, como as sondas de DNA. Estes elementos foram imobilizados de maneira previsível sobre a plataforma nanoestruturada, com orientação específica, estabilidade e acessibilidade a sequência alvo. Além disso, a adsorção não-específica foi minimizada e a capacidade de biodetecção da molécula receptora mantida.

32. Nota-se que as sondas de DNA podem discriminar mutações nas sequências alvo na ordem de um único nucleotídeo. Portanto, seu uso como elemento de biorreconhecimento confere aos sistemas de detecção elevada especificidade e seletividade. Além do mais, protocolos metodológicos podem ser utilizados para promover a de-hibridização das sondas de DNA após um ensaio analítico, o que torna os biossensores de DNA reutilizáveis.

33. O biossensor de DNA eletroquímico relatado nesta invenção gera resultados satisfatórios frente a diferentes concentrações de DNA alvo (gene de fusão BCR/ABL), sendo reprodutível e de fácil manuseio. Ademais, as respostas analíticas foram obtidas rapidamente, em um intervalo de 15 minutos, sem marcadores adicionais e com elevada sensibilidade, especificidade e seletividade. Tais características são consideradas vantajosas, pois, pela simplicidade e eficiência, permite sua aplicação não apenas em laboratórios de ensino e pesquisa, mas também em laboratórios de análises clínicas.

A novidade e o efeito técnico alcançado

12/20

34. A novidade da presente invenção está relacionada ao processo experimental utilizado para a construção de um dispositivo nanoestruturado aplicável ao diagnóstico clínico do oncogene quimérico BCR/ABL. Através da inventividade, um sistema transdutor modificado com filme de PPy, composto híbrido e sequências de oligonucleotídeos foi desenvolvido com elevada robustez e performance de biossensoriamento. Outrossim, a estratégia inovadora de ancoragem molecular, mediante o uso da plataforma de interfaceamento PPy/Chit-ZnONP, permitiu a imobilização orientada das sondas de DNA e a manutenção de sua capacidade de detecção frente ao oncogene leucêmico. É importante frisar que esta metodologia não foi identificada através da busca de anterioridade.

Descrição detalhada

35. Sem o intuito de limitar o escopo da invenção, os exemplos a seguir são utilizados apenas para ilustrar uma entre as inúmeras formas de se realizar a preparação do biossensor eletroquímico ao qual a presente patente se refere.

Síntese do nanocompósito Chit-ZnONP

36. Para a síntese do composto polimérico particulado, 50 mg de quitosana foram dissolvidas em 10 mL de ácido acético a 1%. Separadamente, 10 mg de ZnONPs foram dispersas em 10 mL de ácido acético a 1%. Posteriormente, a dispersão de ZnONPs foi acrescentada na solução transparente de Chit em uma proporção de 1:1 (v:v). A mistura final foi mantida por 30 minutos sob agitação magnética a temperatura ambiente, seguida de sonicação com ondas de ultrassom por aproximadamente 1 hora [21].

Análises eletroquímicas

37. Em primeiro momento, consegue-se chegar à invenção através do uso das técnicas eletroquímicas de VC e EIE. As medidas eletroanalíticas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT 128N através

13/20

de um software de interfaceamento NOVA 1.11 (Metrohm Autolab, The Netherlands). Em associação, foi utilizada uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos imersos em 20 mL de solução de ferro-ferricianeto de potássio $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ (1:1) a 10mM em PBS (pH 7,4), atuando como sonda redox. O eletrodo de ouro foi utilizado como eletrodo de trabalho, o eletrodo de Ag/AgCl saturado com KCl a 3M e o eletrodo de platina foram usados, respectivamente, como eletrodo de referência e contra referência. Os voltamogramas cíclicos para caracterização interfacial foram obtidos em uma faixa de potencial de -0,2 a +0,7 V e velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Os espectros de impedância foram registrados em uma faixa de frequência de 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV. Todas as análises eletroquímicas foram realizadas em triplicatas, a temperatura ambiente e no interior de uma gaiola de Faraday.

Estruturação da plataforma biossensível

38. O procedimento subsequente de preparação da plataforma biossensível sobre o transdutor metálico e a análise de sua capacidade de biorreconhecimento são relatados a seguir. Inicialmente, o eletrodo de ouro ($\varnothing = 2$ mm) foi cuidadosamente polido em um disco de feltro com uma suspensão de alumina (Al_2O_3) com granulometria de 0,05 μm . Em seguida, enxaguado com água ultrapura, submetido a um banho de ultrassom durante 10 minutos para a remoção de partículas residuais e seco ao ar.

39. A primeira etapa de montagem da plataforma consiste na eletropolimerização de pirrol e obtenção do filme polimérico através da técnica de VC, realizando-se seis ciclos voltamétricos em uma faixa de potencial de -0,4 a +1,0 V e velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. O eletrodo de trabalho foi imerso em 20 ml de solução de HCl a 0,5 M contendo pirrol a 30 mM. A segunda etapa refere-se à adsorção do nanocompósito Chit-ZnONP sobre o filme de PPy. Nesta etapa, foram adicionados 2 μL da solução de Chit-ZnONP por 30 minutos. Após obter a plataforma nanoestruturada de PPy/Chit-ZnONP, foi realizada a terceira etapa que se reporta a imobilização química de sondas de DNA para a detecção do oncogene quimérico BCR/ABL. Primeiramente, 2 μL de glutaraldeído a 0,5% foram adicionados sobre a plataforma nanoestruturada por

14/20

15 minutos. Posteriormente, 2 μL de uma solução de oligonucleotídeos a 25 $\text{pmol } \mu\text{L}^{-1}$ foram acrescentados por 15 minutos para a construção do nanossistema de DNA. O glutaraldeído atuou como um agente reticulante biofuncional, possibilitando a formação de ligações químicas entre os grupos amino do biopolímero Chit e os grupos amino das sondas de DNA. Por fim, a quarta etapa compreende o bloqueio dos sítios inespecíficos do biossensor com moléculas de albumina do soro bovino (BSA). Nesta etapa, foram acrescentados 2 μL de uma solução de BSA a 1% (pH 7,4) sobre a superfície do eletrodo modificado por 30 segundos. Logo, através deste processo metodológico, o biossensor eletroquímico baseado em PPy/Chit-ZnONP/Sonda_{DNA}/BSA foi desenvolvido (Figura 1).

Estudo de bioatividade

40. A sensibilidade e especificidade do biossensor eletroquímico foram avaliadas através de estudos de hibridização com plasmídeos recombinantes contendo o oncogene quimérico BCR/ABL em variáveis concentrações. Em cada análise, o biossensor foi exposto a 2 μL da amostra a ser testada por 15 min para promover o processo de biorreconhecimento. Ressalta-se que, previamente, as amostras biológicas foram aquecidas a 94 °C para a desnaturação do DNA. Em adição, as diluições das amostras foram preparadas com solução salina de tampão fosfato (PBS; pH 7,4) e mantidas congeladas.

Caracterização eletroquímica do biossensor nanoestruturado

41. A Figura 2a apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos durante a polimerização eletroquímica do pirrol. Ao realizar 15 ciclos de varredura, foi constatado que a eletropolimerização atuou aumentando a condutividade da superfície do eletrodo de trabalho até o 6º ciclo (Figura 2a). A partir do 7º ciclo de eletropolimerização, as correntes de pico diminuíram, ocorrendo um decréscimo na resposta amperométrica do sistema. Presume-se que este fato esteja relacionado à superoxidação do filme polimérico e à diminuição da quantidade de monômeros de pirrol que foram consumidos durante a síntese [23]. Logo, ao realizar a análise voltamétrica, pode-se verificar que o 6º ciclo de

polimerização é um parâmetro ideal para a modificação da superfície de trabalho e obtenção do filme polimérico de PPy, devido sua elevada condutividade e reprodutibilidade.

42. As etapas de construção do biossensor de DNA são apresentadas nas Figuras 2b e 2c. Observa-se que o voltamograma cíclico (Figura 2b) e o espectro de impedância (Figura 2c) para o eletrodo de ouro após a eletropolimerização do monômero pirrol apresenta uma elevada densidade de corrente e diminuta resposta impedimétrica ($R_{CT} = 0,512 \pm 0,004 \text{ k}\Omega$). É importante evidenciar que a oxidação do pirrol na superfície eletroativa de ouro leva à formação de um filme polimérico com alta estabilidade química e elevada condutividade elétrica. Devido estas características, o PPy é capaz de aumentar a sensibilidade e seletividade de sistemas sensores [12, 23].

43. Prosseguindo nas etapas de montagem da plataforma nanoestruturada, o compósito híbrido Chit-ZnONP foi adicionado sobre o eletrodo de ouro previamente modificado com PPy. De acordo com as Figuras 2b e 2c, nota-se, respectivamente, um decréscimo nas correntes de pico anódica e catódica e um aumento na resistência interfacial ($R_{CT} = 8,483 \pm 0,111 \text{ k}\Omega$). Estes resultados indicam a ordenação do nanocompósito sobre o filme polimérico, impedindo, de forma moderada, as reações redox na dupla camada elétrica. Destaca-se que, a presença do nanomaterial híbrido é fundamental para aumentar a área superficial e possibilitar a imobilização de um maior número de sondas DNA, o que assegura um efetivo processo de biorreconhecimento.

44. Ao realizar a imobilização química das sondas de DNA sobre o compósito Chit-ZnONP, pode-se observar uma menor resposta condutimétrica com uma taxa reduzida de transferência de elétrons ($R_{CT} = 10,867 \pm 0,153 \text{ k}\Omega$). Este fenômeno está relacionado à uma penetrabilidade reduzida dos eletrólitos no sistema sensor. Isto ocorre devido à repulsão eletrostática entre os grupos fosfato das sondas de DNA e as cargas negativas dos íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ / $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, contribuindo assim, para o impedimento parcial das reações de oxido-redução em regiões próximas à superfície do eletrodo [24]. Como presumido, o uso de moléculas BSA para o bloqueio dos sítios inespecíficos do nanossistema de DNA ocasionou uma redução nas correntes voltamétricas e um aumento na resistividade ($R_{CT} = 12,567 \pm 0,451 \text{ k}\Omega$). Portanto, através destas

16/20

caracterizações eletroquímicas, foi possível assegurar a apropriada construção do sensor biológico sobre uma superfície metálica.

Estudo de bioatividade

45. O estudo de detecção do oncogene quimérico BCR/ABL envolve o monitoramento de variações na passagem de corrente entre o eletrodo biomodificado e a camada adjacente de solução eletrolítica. A performance analítica do biossensor de DNA foi avaliada através de hibridização específica com o oncogene quimérico BCR/ABL presente em plasmídeos recombinantes. Como evidenciado na Figura 3a, após a exposição do sistema PPy/Chit-ZnONP/Sonda_{DNA}/BSA às amostras plasmidiais, uma redução do sinal amperométrico e uma diminuição das áreas voltamétricas foram constatadas. Verifica-se que, para as maiores concentrações do gene de fusão (de 13,88 pM a 138,80 aM) houve um decréscimo linear das correntes de pico anódicas, como apresentado na Tabela II e Figura 3b.

Tabela II - Variação da corrente amperométrica anódica do biossensor após sua exposição a amostras plasmidiais contendo o oncogene quimérico BCR/ABL. As análises foram realizadas em triplicatas e os valores são apresentados como a média $\pm$ o desvio padrão.

Modificação eletródica	Concentração do alvo biológico	Corrente amperométrica antes da hibridação (1/I _b μ A ⁻¹)	Corrente amperométrica depois da hibridação (1/I _a μ A ⁻¹)	ΔI (%)
PPy	-	34,771 $\pm$ 1,134	-	-
PPy/Chit-ZnONP	-	19,946 $\pm$ 1,145	-	-
PPy/Chit-ZnONP/Sonda _{DNA}	-	12,264 $\pm$ 1,209	-	-
PPy/Chit-ZnONP/Sonda _{DNA} /BSA	-	8,654 $\pm$ 0,365	-	-
Biossensor	-	8,654 $\pm$ 0,365	-	-
Biossensor/Oncogene _{BCR/ABL}	138,800 aM	-	7,498 $\pm$ 0,050	15,418 $\pm$ 0,771

17/20

Biossensor/Oncogene _{BCR/ABL}	1,388 fM	-	6,346 ± 0,309	36,593 ± 6,702
Biossensor/Oncogene _{BCR/ABL}	13,880 fM	-	4,506 ± 0,274	92,555 ± 11,703
Biossensor/Oncogene _{BCR/ABL}	138,800 fM	-	2,202 ± 0,282	297,561 ± 53,444
Biossensor/Oncogene _{BCR/ABL}	1,388 pM	-	1,260 ± 0,056	587,568 ± 30,831
Biossensor/Oncogene _{BCR/ABL}	13,880 pM	-	0,433 ± 0,001	1898,525 ± 3,166

46. Por meio do teste de calibração (Figura 3b), foi obtida uma equação de regressão linear [$y = 6,202 - 0,605 \ln(x)$] com coeficiente de correlação (R^2) de 0,99. Onde x corresponde a concentração do DNA alvo e y refere-se ao valor de corrente de pico anódica. Ressalta-se que a linearização do eixo x foi realizada em escala logarítmica da concentração. Os dados analíticos inferem a elevada sensibilidade do biodispositivo nanoestruturado, que apresentou um limite de detecção de 1,2 fM e um limite de quantificação de 3,6 fM. Estes parâmetros foram calculados através das equações descritas abaixo.

$$\text{Limite de detecção} = 3,3 \times \frac{SD}{m} \quad (1)$$

$$\text{Limite de quantificação} = 10 \times \frac{SD}{m} \quad (2)$$

47. Onde, SD é o desvio padrão do branco e m é a inclinação da curva analítica. A capacidade de biorreconhecimento também foi analisada em função da variação percentual da corrente de pico anódica (ΔI) [24], descrita a seguir.

$$\Delta I(\%) = \frac{I_b - I_a}{I_b} \times 100 \quad (3)$$

48. Onde I_b e I_a correspondem, respectivamente, a corrente de pico antes e após o processo de hibridização. Na Tabela II, os valores de ΔI foram demonstrados para o biossensor após sua exposição à diferentes concentrações do oncogene quimérico BCR/ABL. Pode-se constatar que, com o aumento das concentrações plasmidiais houve um aumento da variação de corrente (de

18/20

15,42% a 1898,52%). De acordo com relatos na literatura [25, 26], o fenômeno observado indica a formação de DNA híbrido sobre o biodispositivo, uma vez que as duplas fitas de DNA apresentam caráter dielétrico e dificulta o processo de oxido-redução da sonda redox.

49. Tendo em vista que as técnicas convencionais voltadas para a identificação da LMC apresentam desvantagens, como o diagnóstico tardio e sensibilidade limitada, a elaboração de uma nova ferramenta para a detecção do oncogene quimérico BCR/ABL e o monitoramento da doença residual mínima em LMC é de extrema importância para promoção da saúde do paciente portador da patologia. Todavia, o invento apresentando nesta patente pode ser considerado uma ferramenta promissora para diagnósticos biomédicos, como a detecção molecular do oncogene quimérico BCR/ABL. Através da associação de materiais funcionais e sinergia entre suas propriedades físicas e químicas, uma plataforma nanoestruturada baseada em polímero PPy e compósito híbrido Chit-ZnONP foi obtida, a qual possibilitou uma amplificação da área superficial com eficiente transferência de elétrons. O biossensor de DNA demonstrou ser um dispositivo analítico com elevada sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, baixos limites de detecção e quantificação, sendo assim, um método eletroquímico alternativo para a detecção do oncogene quimérico BCR/ABL e diagnóstico de LMC.

REFERÊNCIAS

- [1] R. Pallotta, D.F. Lima, F. Cal, M. Almeida, M. Conchon, Treatment of chronic myelogenous leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation with imatinib mesylate: report of three cases, *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 28(2006) 157-60.
- [2] S. Faderl, M. Talpaz, Z. Estrov, S. O'Brien, R. Kurzrock, H.M. Kantarjian, The biology of chronic myeloid leukemia, *New England Journal of Medicine*, 341(1999) 164-72.
- [3] A.S. Advani, A.M. Pendergast, Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects, *Leukemia Research*, 26(2002) 713-20.
- [4] A. Sharma, C.M. Pandey, G. Sumana, U. Soni, S. Sapra, A.K. Srivastava, et al., Chitosan encapsulated quantum dots platform for leukemia detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 38(2012) 107-13.
- [5] L. Wang, E. Hua, M. Liang, C. Ma, Z. Liu, S. Sheng, et al., Graphene sheets, polyaniline and AuNPs based DNA sensor for electrochemical determination of BCR/ABL fusion gene with functional hairpin probe, *Biosensors and Bioelectronics*, 51(2014) 201-7.
- [6] C.C.S. Yeung, D. Egan, J.P. Radich, Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia: present and future, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 16(2016) 1083-91.
- [7] K.Y. Avelino, R.R. Silva, A.G. da Silva Junior, M.D. Oliveira, C.A. Andrade, Smart applications of bionanosensors for BCR/ABL fusion gene detection in leukemia, *Journal of King Saud University-Science*, 29(2017) 413-23.
- [8] J. Yang, W. Zhang, Indicator-free impedimetric detection of BCR/ABL fusion gene based on ordered FePt nanoparticle-decorated electrochemically reduced graphene oxide, *Journal of Solid State Electrochemistry*, 18(2014) 2863-8.
- [9] A. Sassolas, B.D. Leca-Bouvier, L.J. Blum, DNA Biosensors and Microarrays, *Chemical Reviews*, 108(2008) 109-39.
- [10] T.G. Drummond, M.G. Hill, J.K. Barton, Electrochemical DNA sensors, *Nature biotechnology*, 21(2003) 1192.
- [11] K. Rovina, S. Siddiquee, Electrochemical sensor based rapid determination of melamine using ionic liquid/zinc oxide nanoparticles/chitosan/gold electrode, *Food Control*, 59(2016) 801-8.
- [12] M. Gerard, A. Chaubey, B. Malhotra, Application of conducting polymers to biosensors, *Biosensors and bioelectronics*, 17(2002) 345-59.
- [13] M. Ates, A review study of (bio) sensor systems based on conducting polymers, *Materials Science and Engineering: C*, 33(2013) 1853-9.
- [14] N.P. Shetti, S.D. Bukkitgar, R.R. Kakarla, C. Reddy, T.M. Aminabhavi, ZnO-based nanostructured electrodes for electrochemical sensors and biosensors in biomedical applications, *Biosensors and Bioelectronics*, (2019) 111417.
- [15] S. Kumar, W. Ahlawat, R. Kumar, N. Dilbaghi, Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare, *Biosensors and Bioelectronics*, 70(2015) 498-503.
- [16] K.Y.P. dos Santos Avelino, I.A.M. Frias, N. Lucena-Silva, C.A.S. de Andrade, M.D.L. de Oliveira, Impedimetric gene assay for BCR/ABL transcripts in plasmids of patients with chronic myeloid leukemia, *Microchimica Acta*, 185(2018) 415.
- [17] B.D. Malhotra, A. Kaushik, Metal oxide-chitosan based nanocomposite for cholesterol biosensor, *Thin Solid Films*, 518(2009) 614-20.

- [18] W. Suginta, P. Khunkaewla, A. Schulte, Electrochemical biosensor applications of polysaccharides chitin and chitosan, *Chemical reviews*, 113(2013) 5458-79.
- [19] M.K. Patel, M.A. Ali, M. Zafaryab, V.V. Agrawal, M.M.A. Rizvi, Z.A. Ansari, et al., Biocompatible nanostructured magnesium oxide-chitosan platform for genosensing application, *Biosensors and Bioelectronics*, 45(2013) 181-8.
- [20] X. Wang, S. Uchiyama, Polymers for biosensors construction, *State of the Art in Biosensors—General Aspects*, 3(2013) 67-84.
- [21] R. Khan, A. Kaushik, P.R. Solanki, A.A. Ansari, M.K. Pandey, B. Malhotra, Zinc oxide nanoparticles-chitosan composite film for cholesterol biosensor, *Analytica Chimica Acta*, 616(2008) 207-13.
- [22] S. Guo, S. Dong, Biomolecule-nanoparticle hybrids for electrochemical biosensors, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(2009) 96-109.
- [23] M. Mahmoudian, W. Basirun, Y. Alias, A.K. Zak, Electrochemical characteristics of coated steel with poly (N-methyl pyrrole) synthesized in presence of ZnO nanoparticles, *Thin Solid Films*, 520(2011) 258-65.
- [24] K.Y.P.S. Avelino, I.A.M. Frias, N. Lucena-Silva, R.G. Gomes, C.P. de Melo, M.D.L. Oliveira, et al., Attomolar electrochemical detection of the BCR/ABL fusion gene based on an amplifying self-signal metal nanoparticle-conducting polymer hybrid composite, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 148(2016) 576-84.
- [25] A. Benvidi, A. Dehghani Firouzabadi, M. Dehghan Tezerjani, S.M. Moshtaghiun, M. Mazloun-Ardakani, A. Ansarin, A highly sensitive and selective electrochemical DNA biosensor to diagnose breast cancer, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 750(2015) 57-64.
- [26] Y. Ye, J. Gao, H. Zhuang, H. Zheng, H. Sun, Y. Ye, et al., Electrochemical gene sensor based on a glassy carbon electrode modified with hemin-functionalized reduced graphene oxide and gold nanoparticle-immobilized probe DNA, *Microchimica Acta*, 184(2017) 245-52.

REIVINDICAÇÕES

01. PLATAFORMA SENSORA BASEADA EM FILME FINO POLIMÉRICO ASSOCIADO A COMPÓSITO HÍBRIDO E SEU USO EM DIAGNÓSTICO BIOMÉDICO caracterizada pela presença dos componentes a seguir: a) eletrodo de trabalho com superfície eletroativa de ouro; b) filme condutor de polipirrol (PPy); c) compósito híbrido de quitosana e nanopartículas de óxido de zinco (Chit-ZnONP); d) agente de acoplamento glutaraldeído; e) sondas de DNA; e f) moléculas de albumina do soro bovino (BSA).
02. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicação 1, caracterizada por eletrodos conectados a um potenciostato/galvanostato com gerador de frequência para mensuração voltamétrica e impedimétrica.
03. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1 e 2, caracterizada por aplicar a técnica de voltametria cíclica com potencial de varredura entre -0,2 e 0,7 V e velocidade de 50 mV s⁻¹.
04. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1 e 2, caracterizada por aplicar a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica com uma faixa de frequência de 100 mHz a 100 KHz e potencial de amplitude alternada de 10 mV.
05. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1 e 2, caracterizada por possuir um sistema de três eletrodos dispostos em uma gaiola de Faraday.
06. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1, 2 e 5, caracterizada por possuir eletrodo de trabalho, eletrodo de referência Ag/AgCl saturado com KCl 3M e contra-eletrodo.
07. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1, 2, 5 e 6, caracterizada por ter os eletrodos imersos em uma solução de 10 mM de [Fe(CN)₆]³⁻ / [Fe(CN)₆]⁴⁻ em tampão fosfato para a mensuração eletroquímica.

08. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1, 2, 5 e 6 caracterizada por ser sintetizada a partir da imersão do eletrodo de trabalho em solução de ácido clorídrico (HCl) contendo o monômero pirrol, seguido da aplicação de seis ciclos de polimerização voltamétrica em uma faixa de potencial de -0,2 a +0,7 V com uma velocidade de varredura de 10 a 100 mV s⁻¹.

09. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1, 2, 5, 6 e 8, caracterizada pela adição do compósito híbrido Chit-ZnONP sobre o eletrodo de trabalho modificado com o filme de PPy, com posterior lavagem em água ultrapura para remoção de moléculas não ligadas.

10. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1 e 9, caracterizada pelo uso do compósito híbrido Chit-ZnONP sintetizado a partir da dissolução de 50 mg de quitosana em 10 mL de ácido acético a 1% e dispersão de 10 mg de ZnONPs em ácido acético a 1%; posteriormente, a dispersão de ZnONPs foi acrescentada na solução transparente de Chit em uma proporção de 1:1 (v:v) e a mistura final foi mantida por 30 minutos sob agitação magnética a temperatura ambiente, seguida de sonicação com ondas de ultrassom por aproximadamente 1 hora.

11. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1, 2, 5, 6, 8 e 9, caracterizada pela adição de glutaraldeído sobre a plataforma nanoestruturada PPy/Chit-ZnONP, com posterior acréscimo de uma solução de oligonucleotídeos para a construção do nanossistema de DNA.

12. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1, 2, 5, 6, 8, 9 e 11, caracterizada pela adição de uma solução de BSA sobre a superfície do eletrodo modificado.

13. PLATAFORMA SENSORA, conforme reivindicações 1, 2, 5, 6, 8, 9, 11 e 12, caracterizada por compreender: (a) ensaio de bioatividade; (b) inserção do sistema de biodeteção em célula eletroquímica; (c) mensuração do

comportamento eletroquímico do sistema após sua exposição ao analito-alvo; (d) determinação de mudanças nos valores de correntes de pico anódicas e catódicas, bem como alterações nas áreas voltamétricas; e e) determinação da resistência a transferência de carga através de simulação teórica dos dados experimentais em circuito equivalente de Randles para indicar a presença ou ausência do analito-alvo na amostra teste.

14. USO DE PLATAFORMA SENSORA descrito na reivindicação 13, caracterizado por avaliar o analito-alvo que corresponde a sequência de nucleotídeos do oncogene quimérico BCR/ABL inserido em plasmídeo recombinante.

15. USO DE PLATAFORMA SENSORA descrito nas reivindicações 13 e 14, caracterizado por apresentar um limite de detecção de 1,2 fM.

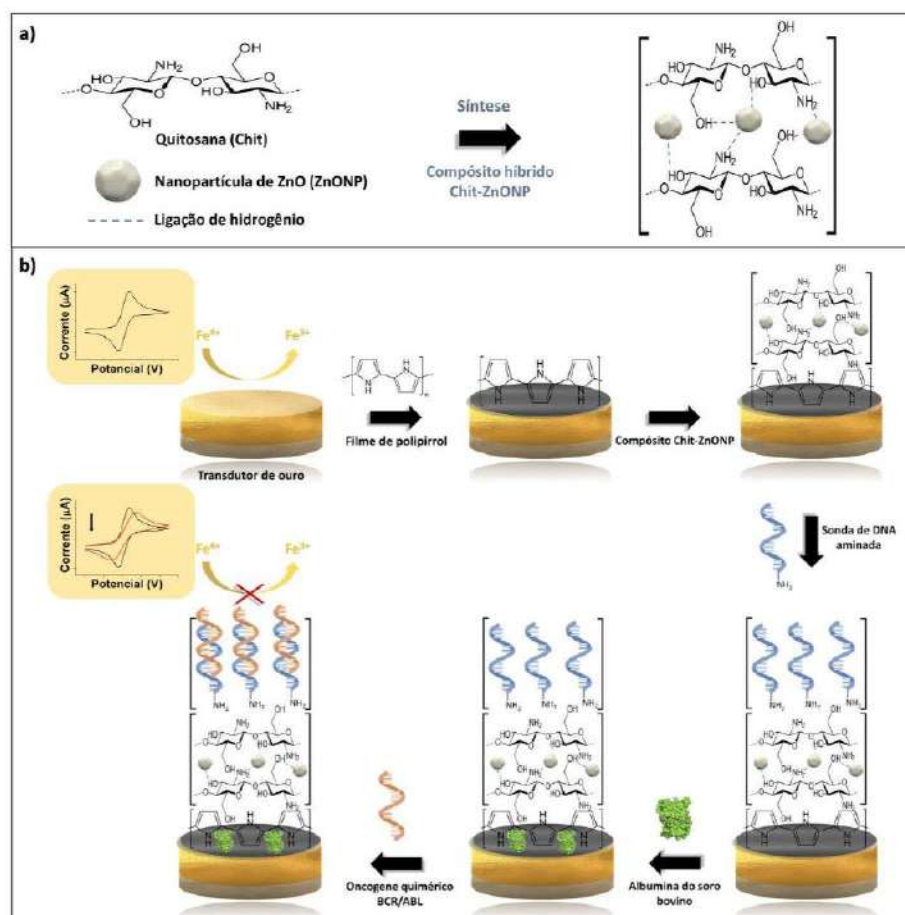
16. USO DE PLATAFORMA SENSORA descrito nas reivindicações 13, 14 e 15, caracterizado por apresentar um limite de quantificação de 3,6 fM.

17. USO DE PLATAFORMA SENSORA descrito nas reivindicações 1, 2, 5, 6, 8, 9, 11, 12 e 13, caracterizado pelo uso de diferentes tipos de substratos eletroativos para a construção da plataforma de biossensoriamento PPy/Chit-ZnONP/Sonda_{DNA}/BSA, tais como eletrodos convencionais de prata, carbono vítreo, óxido de índio dopado com estanho (ITO), eletrodos interdigitados e impressos.

18. USO DE PLATAFORMA SENSORA descrito nas reivindicações 1, 2, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13 e 14, caracterizado por ser capaz de reconhecer diferentes sequências oligonucleotídicas de acordo com a natureza da sonda de biorreconhecimento, tais como genótipo humano, viral, bacteriano e fúngico.

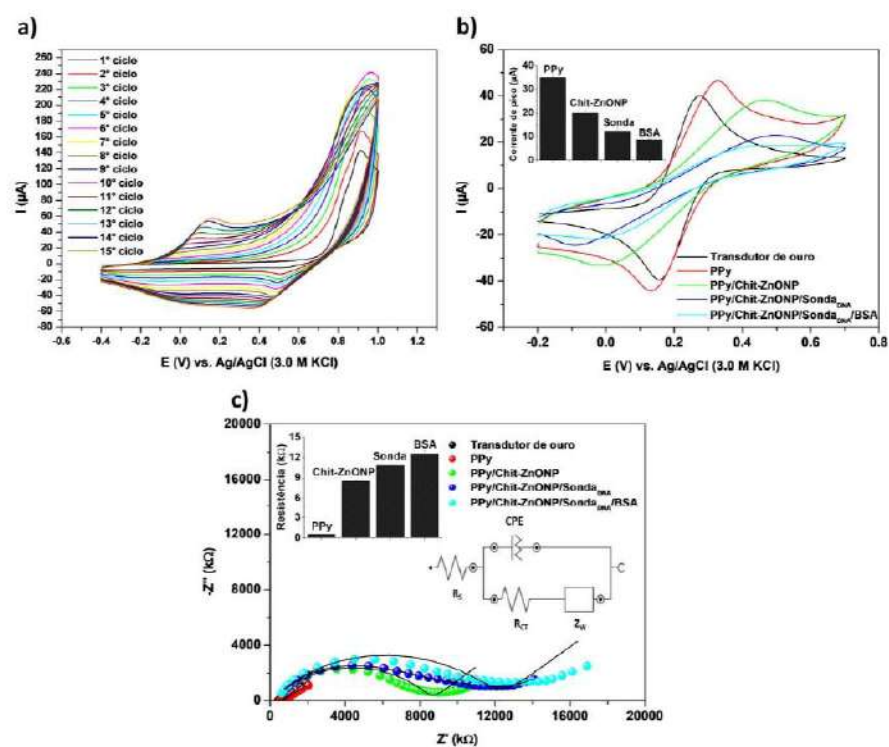
1/3

Figura 1



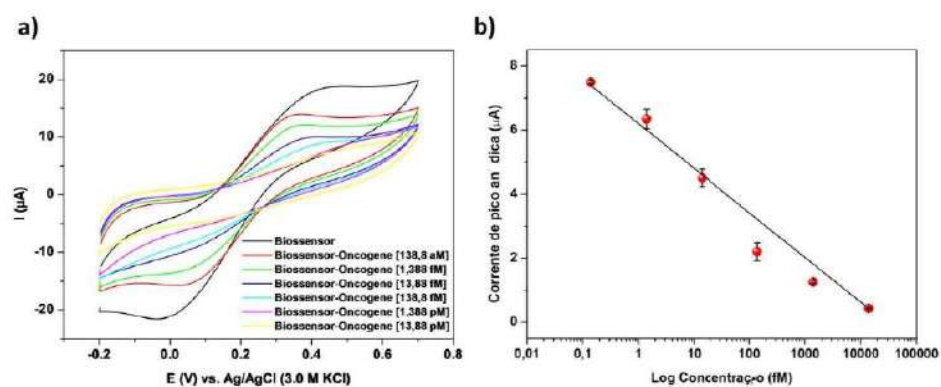
2/3

Figura 2



3/3

Figura 3



RESUMO

PLATAFORMA SENSORA BASEADA EM FILME FINO POLIMÉRICO ASSOCIADO A COMPÓSITO HÍBRIDO E SEU USO EM DIAGNÓSTICO BIOMÉDICO obtida por metodologia simples para fabricação de um dispositivo eletroquímico utilizável na identificação do oncogene quimérico BCR/ABL. Objetivando-se aprimorar o desempenho analítico do sensor biológico, uma plataforma nanoestruturada foi construída sobre a área ativa de um eletrodo metálico e seu procedimento metodológico exposto. A plataforma nanoestruturada foi baseada no polímero polipirrol (PPy) e compósito híbrido formado por quitosana e nanopartículas de óxido de zinco (Chit-ZnONP). O PPy pode assumir um caráter intrinsecamente condutor, favorecendo a transferência de carga na interface eletrodo-solução e contribuindo significativamente para a melhoria da sensibilidade dos sistemas de biodetecção. O compósito híbrido Chit-ZnONP disponibiliza grupos químicos para a ancoragem de biomoléculas, além de apresentar elevada área de contato. O nanocompósito Chit-ZnONP proporciona um microambiente hidrofílico e biocompatível, necessário para a manutenção da conformação molecular de biomoléculas imobilizadas. A fim de tornar a plataforma nanoestruturada aplicável ao diagnóstico de oncogene quimérico BCR/ABL, sequências curtas de oligonucleotídeos (denominadas de sondas de DNA) foram imobilizadas quimicamente sobre os transdutores modificados. As técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foram utilizadas para a caracterização das etapas de modificação do eletrodo de trabalho e o monitoramento da hibridização molecular. O invento ressalta o biossensor de DNA como ferramenta para a análise e detecção de genes de interesse biomédico, apresentando, especificamente, elevada sensibilidade (limite de detecção de 1,2 fM), simplicidade de construção, elevada reprodutibilidade, e passível de miniaturização.

9.2 APÊNDICE B – PRODUTO COMPLEMENTAR

Artigo submetido na revista *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*

(fator de impacto: 3.935)

Nanostructured sensor platform based on organic polymer conjugated to metallic nanoparticle for the impedimetric detection of SARS-CoV-2 at various stages of viral infection

Nanostructured sensor platform based on organic polymer conjugated to metallic nanoparticle for the impedimetric detection of SARS-CoV-2 at various stages of viral infection

Karen Y.P.S. Avelino^{a,b}, Giselle S. dos Santos^{a,b}, Isaac A.M. Frías^{a,b}, Alberto G. da Silva Júnior^{a,b}, Michelly C. Pereira^c, Maira G.R. Pitta^c, Breno C. de Araújo^c, Abdelhamid Errachid^d, Maria D.L. Oliveira^{a,b}, César A.S. Andrade^{a,b*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

^bLaboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

^cLaboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^dUniversité Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques (ISA), 5 rue de la Doua, 69100, Villeurbanne, Lyon, France

*To whom correspondence should be addressed.

César A.S. Andrade, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil

Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547

E-mail: cesar.sandrade@ufpe.br

ABSTRACT

The projection of new biosensing technologies for genetic identification of SARS-CoV-2 is essential in the face of a pandemic scenario. For this reason, the current research aims to develop a label-free flexible biodevice applicable to COVID-19. A nanostructured platform made of polypyrrole (PPy) and gold nanoparticles (GNP) was designed for interfacing the electrochemical signal in miniaturized electrodes of tin-doped indium oxide (ITO). Oligonucleotide primer was chemically immobilized on the flexible transducers for the biorecognition of the nucleocapsid protein (N) gene. Methodological protocols based on cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS), and atomic force microscopy (AFM) were used to characterize the nanotechnological apparatus. The biosensor's electrochemical performance was evaluated using the SARS-CoV-2 genome and biological samples of cDNA from patients infected with retrovirus at various disease stages. It is inferred that the analytical tool was able to distinguish the expression of SARS-CoV-2 in patients diagnosed with COVID-19 in the early, intermediate and late stages. The biosensor exhibited high selectivity by not recognizing the biological target in samples from patients not infected with SARS-CoV-2. The proposed sensor obtained a linear response range estimated from 800 to 4000 copies μL^{-1} with a regression coefficient of 0.99, and a detection limit of 258.01 copies μL^{-1} . Therefore, the electrochemical biosensor based on flexible electrode technology represents a promising trend for sensitive molecular analysis of etiologic agent with fast and simple operationalization. In addition to early genetic diagnosis, the biomolecular assay may help to monitor the progression of COVID-19 infection in a novel manner.

Keywords: Nanostructured biosensor; COVID-19; SARS-CoV-2; Polypyrrole; Gold nanoparticle; Impedance spectroscopy.

1. Introduction

At the end of 2019, Wuhan province (Hubei, China) reported atypical clinical cases showing similar viral pneumonia symptoms. In January 2020, genome sequencing identified a new coronavirus related to a respiratory disease named SARS-CoV-2, a single-stranded positive-sense RNA virus (+ ssRNA), enveloped and shaped like a crown, belonging to the β -coronaviruses genus [1]. An evolutionary analysis concerning 160 complete genomes of SARS-CoV-2 revealed grouping of three central variants characterized by amino acid changes. Its genome revealed three main conserved target sequences i) RNA-dependent RNA polymerase gene (RdRp gene), ii) envelope protein gene (E gene), and iii) nucleocapsid protein gene (N gene). Because of the error rate of its RNA-dependent RNA polymerase (RdRP), mutations and frequent recombination are common, thus accelerating the evolution and adaptation to the host processes [2].

The viral structure consists of 5 proteins, namely: the nucleocapsid protein (N), with the function of packaging the RNA genome; membrane proteins (M) that bind to nucleoproteins to form the nucleus structure; the viral envelope consisting of the union of protein M, an envelope protein (E) and spike protein (S), the latter being responsible for facilitating the entry into host cells through receptors such as the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) abundantly found in lung and small intestine epithelia [3]. According to Iqbal et al., the replication cycle of SARS-CoV-2 involves membrane fusion or endocytosis mechanism; release of viral genome; translation of viral polymerase protein; RNA replication; sub-genomic transcription; translation of viral structural protein; viral structural proteins combination with nucleocapsid; formation of mature virion; and release of mature virion via exocytosis mechanism. At this point, the mature virion is enabled to continue the infection of a new target [4].

Human-to-human transmissibility R_0 fluctuates but has always been estimated above 1 [5]. Current evidence suggests that its infective efficiency is favored by the inhalation of droplets produced during coughs, speaks, or sneezes and through contact with contaminated fomites. Measurements of infective viral titers have been detected during the asymptomatic incubation period (determined between 1 to 8 days), however after day 8 no isolates were obtained despite ongoing high viral loads. Nevertheless, titers vary according to the patient's medical history, and great caution is advised at all stages to minimize risks [6].

Few distinct stages have been observed in clinical samples from Germany and

China during the viral dynamics of SARS-CoV-2. For instance, during the initial stage from day 0 (641 copies mL⁻¹), viral titers increase rapidly, reaching a first peak (4-6 days after first symptoms) ranging around 10⁴ to 10⁸ copies mL⁻¹. At this point, lymphocyte response is activated, and a plateau phase can be observed. At the last stage, viral titers decline due to the adaptive immune response (after day 8). Nevertheless, some patients present late seroconversion, and therefore viral reinfection and viral persistence are expected [7, 8].

The quantitation of viral titers could help to monitor not only the disease's evolution but to evaluate the effect of therapeutic interventions design to tackle SARS-CoV-2 infection. In this context, numeric simulations have shown the effectiveness of combined anti-inflammatory treatments, antiviral drugs and interferon in reducing the duration of the infection's plateau phase and improving the time of recovery [9]. Despite its long response time and relatively complicated operation, real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) is the current protagonist method for detecting viral RNA. The minimum laboratory response time is foreseen between 2-4 hours and may extend up to 1 week if the samples need to be sent to public health laboratories designated by health authorities. Of note, the diagnostic evaluation via qRT-PCR needs to be carried out in certified laboratories with expensive equipment and highly trained technicians. Such limitations hinder the fast and simple diagnosis of suspected patients and monitor infected patients.

With the current information about the multiple biomarkers available to develop molecular and immunological tools to detect SARS-CoV-2 [10], a portable point-of-care test device to identify SARS-CoV-2 could be an excellent alternative to reach marginalized, rural and distant communities. Electrochemical biosensors are known for their sensitivity, specificity and accuracy, and their potential portability and affordability. The measured signal is defined as an increase or a decrease in electrochemical response of the electrode as a result of the target concentration, which is measured either through the electron transfer or the electron transfer resistance.

In this work, we developed a genetic biosensor for the evaluation and monitoring of human SARS-CoV-2 infection. The device can discriminate the early, intermediate, and late infection phases in amplified cDNA patient samples. Conserved SARS-CoV-2 sequences were covalently tethered to an electropolymerized pyrrole-gold nanoparticles (PPy-GNP) transducer, which was used as a working electrode in an electrochemical

set-up. In the case of SARS-CoV-2 positive samples, the target sequence will hybridize to the primer, thus inducing the transduction of the biorecognition event into a quantifiable change proportional to its concentration. This platform addresses a key element of traditional nucleic-acid detection assays while reducing the overall cost and achieving low detection limits comparable to qRT-PCR-based tests. Using flexible devices, we combine the portability with sensitivity and selectivity of the detection of SARS-CoV-2 at laboratory-level in biological samples.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and solutions

Tin-doped indium oxide (ITO), pyrrole monomer, tetrachloroauric acid trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), cysteamine (Cys), potassium ferricyanide ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), potassium ferrocyanide ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), bovine serum albumin (BSA), hydrochloric acid (HCl), glutaraldehyde and sodium phosphate buffer reagents were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Milli-Q plus water purification system (Millipore, Billerica, USA) was used to obtain deionized water.

2.2. Oligonucleotide primers and biological samples

The amino-modified primer was synthesized by Exxtend Biotecnologia Ltda. (Sao Paulo, Brazil). The oligonucleotide sequence ($100 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$) was diluted in a Tris-EDTA buffer solution (10 mM and 0.1 mM, respectively) (pH 8). As a positive control, cDNA plasmids with SARS-CoV-2 nucleocapsid gene were used, diluted in a concentration of $200.000 \text{ copies } \mu\text{L}^{-1}$. To assess the limit of quantification and limit of detection, we prepared a serial dilution of the plasmid control (800 to 4000 copies μL^{-1}) using Tris-EDTA buffer solution. All primers and probes used in the study were described in supplementary information (Table S1), where the binding regions to the SARS-CoV-2 N gene are specified.

The study's human samples were provided by the Central Laboratory of Public Health of Pernambuco, Brazil (LACEN/PE). These biological specimens were obtained from nasopharyngeal and oropharyngeal swabs from patients with suspected COVID-19. To obtain SARS-CoV-2 viral RNA, 200 μL of the collected sample were transferred to an Eppendorf (1.5 mL) with 200 μL of lysis buffer, homogenized and incubated

(15°C - 30°C, 10 min) and then another incubation (56°C, 10 min). Then, QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN®, Hilden, Germany) was used and followed the established procedure. Finally, we performed the RT-qPCR analysis after RNA extraction from real human samples.

2.3. PCR procedure for validation of clinical samples

As a reference to the electrochemical analyses, all samples were firstly assessed through RT-qPCR (Fig. S1). RT-qPCR tests for diagnosis of patients used in this study were carried out with commercial kit FDA EUA 2019-nCoV CDC, 500 rxn - IDT, USA (Catalog N° 10006606), following manufacturer's instructions. The commercial package FDA EUA 2019-nCoV CDC is a validated and licensed kit for diagnosis, with assured sensitivity and specificity for the identification of SARS COV2 genetic material. The following primers and probes, N1, N2, N3 and RNase P, were evaluated through CDC functional test, using the Diagnostic Panel Instruction (List-of-Acceptable-Commercial-Primers-Probes.pdf (cdc.gov)). The authors emphasize that frequently computer analysis is performed to verify whether mutations of new variants are detected in the sequence of the primers N1, N2 and N3 used. So far, no mutations have been found that invalidate the use of the kit for the diagnosis of patients positive for SARS-CoV- 2.

Briefly, following the manufacturer's instructions, 5 µL of the RNA samples were mixed with reagents, specific primers, and probes for SARS-CoV-2. The procedure was applied to four targets (N1, N2, N3, and RP). Cycling parameters were carried out as follows: reverse transcription (50°C, 15 min), followed by 95°C for 3 min for activation of the transcriptional reaction, and then 40 cycles (95°C, 15 seconds) and 55°C for 40 seconds corresponding to denaturation and annealing/extension, respectively. All tests were performed using a Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) and analyzed through the QuantStudio Design and Analysis Software. After certifying the samples' positivity for SARS-CoV-2 infection, they were subjected to electrochemical analyses with the developed flexible miniaturized biosensor. Samples from healthy donors were also evaluated and used in the experiments.

2.4. Fabrication and assembly of the flexible sensor platform

The manufacturing process of the ITO electrode was depicted in Fig. 1. A sheet of ITO-coated PET slide (surface resistivity $60 \Omega \text{ sq}^{-1}$) was used to obtain the working electrode. Firstly, after cutting the ITO into stripes (3 cm x 8 mm), they were washed and submitted to an ultrasound cleaning in acetone, ethanol, and deionized water. A polyvinyl chloride adhesive sheet composed of a circular hole ($\phi = 5 \text{ mm}$) was carefully applied to the ITO surface to achieve an identical and functional surface area to assemble the nanostructured sensor platform. The first step of the biosensor assembly consisted of the electrochemical polymerization of the PPy. The polymerization was carried out through 6 cycles of CV in the potential range of -0.4 to +1.0 V vs. Ag/AgCl (KCl 3M) and scan rate 100 mV s^{-1} , using the ITO strip as a working electrode immersed in an acidic solution containing 0.5 M HCl and 30 mM of pyrrole. Subsequently, the PPy surface was covered by GNP through electrochemical deposition, where PPy-ITO electrodes were immersed in a solution of 0.25 mM $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. After, 10 cycles were performed in a CV potential range of +0.2 to -1.0 V, and scan rate 50 mV s^{-1} [11]. The PPy-GNP electrode was then carefully rinsed with deionized water and dried in air. The third step relies on the chemisorption of Cys molecules onto GNP.

2 μL of an ethanolic solution of Cys (2.5 mM) was adsorbed onto the ITO electrode for 30 min, resulting in the PPy-GNP-Cys nanostructured platform. The immobilization of the COVID-19 DNA primer onto the ITO electrode was obtained by adsorbing 2 μL of 0.5% glutaraldehyde diluted in water for 10 min and then 2 μL of the specific oligonucleotide sequence (10 mM) for 15 min [12]. Finally, aiming to block non-specific binding sites, 1% BSA in phosphate buffer saline (PBS; pH 7.4; 10 mM) was dropped onto the ITO biosensor, resulting in the PPy-GNP-Cys-Primer-BSA sensor platform.

2.5. Evaluation of the bioactivity and monitoring of SARS-CoV-2

The hybridization with complementary oligonucleotide sequences on the ITO sensor platform was performed using biological specimens of SARS-CoV-2 infected patients (cDNA samples). We used non-complementary oligonucleotide sequences and interfering molecules (glucose, glycine, ascorbic acid, citric acid, and cholesterol) to evaluate the biosensor's selectivity. All biological samples were diluted in PBS (pH 7.4; 10 mM) and frozen until use. The procedure occurred applying 2 μL of the samples on

the ITO electrode for 15 min and rinsed with deionized water to remove unbound molecules.

2.6. Electrochemical trials

Voltammetric and impedimetric analyzes were performed by a potentiostat/galvanostat Autolab PGSTAT 128N (Metrohm, The Netherlands) using NOVA 1.11 software. Electrochemical detection occurred in a three-electrode system immersed in a 10 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) solution prepared in PBS (pH 7.4; 10 mM). The ITO flexible substrate was used as a working electrode. As reference electrode, we used Ag/AgCl (saturated 3M KCl) and as counter electrode, we used platinum wire. CV was obtained at the potential range between -0.2 to +0.7 V (scan rate of 50 mV s^{-1}). Impedance data were recorded in a frequency range of 100 mHz to 100 kHz and amplitude of the applied sine potential of 10 mV.

2.7. Atomic force microscopy measurements

Topographic and morphological AFM images were obtained using an atomic force microscope SPM-9700 (Shimadzu, Japan) in a non-contact mode. All measurements were performed using cantilevers with silicon probe (Nanoworld, Japan). We used cantilevers with 42 N m^{-1} spring constant and 300 kHz resonant frequencies. The images were obtained at room temperature with a scan rate of 1 Hz line s^{-1} and scan area $5 \times 5 \text{ }\mu\text{m}$. Gwyddion software was used to evaluate the images.

2.8. ATR-FTIR measurements

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) measurements were performed from 650 cm^{-1} to 4000 cm^{-1} , and a 2 cm^{-1} resolution using an Agilent Cary 630 FTIR Spectrometer (Agilent Technologies, Rowville, Australia) with a diamond attenuated total reflectance (ATR) sampling accessory. The experiments were performed at 21°C , and 50% relative humidity.

3. Results and discussion

3.1. AFM and ATR-FTIR analyses

AFM was used to investigate the functionalization and hybridization efficiency of the electrode. Fig. 2 illustrates the flexible electrode surface before and after exposure to positive and negative COVID-19 clinical samples. The topographic image of the electrochemically polymerized PPy film on the ITO substrate is shown in Fig. 2a. The polymeric coating shows a homogeneous morphology with isolated regions with a maximum height of 0.29 μm . According to literature reports, the observed roughness is characteristic of thinner PPy films with a nodular surface [13]. It is important to emphasize that this morphological profile is desirable for electrochemical biosensors since rough electrodes have high electroactive areas that improve sensitivity and increasing the number of active sites capable of recognizing the target molecules [14].

A notable change in the system morphology was observed after assembling the PPy-GNP-Cys-Primer-BSA sensor platform (Fig. 2b). The roughness peaks did not increase significantly (maximum height of 0.31 μm). The topographic profile is influenced by the particles' arrangement on the polymeric matrix, determining the roughness and average height of the system [15]. The transducer surface became rougher, and the morphological heterogeneity increased to a maximum height of 1.14 μm after interaction with SARS-CoV-2 positive human samples (Fig. 2c). The AFM analysis shows a dense layer on the sensor surface associated with the formation of double-stranded DNA (dsDNA) [16]. Therefore, the ability to detect viral genetic material is assumed. Fig. 2d shows no significant alteration of the sensor platform's roughness and heterogeneity during selectivity testing with non-complementary DNA molecules (maximum height of 0.47 μm).

In supplementary information, the ATR-FTIR measurements and characteristic peaks for the pristine ITO support and after PPy polymerization (Fig. S2 and Table S2), construction of the biosensing platform (Fig. S3), and hybridization process with positive sample were displayed (Fig. S4 and Table S3).

3.2. Electrochemical characterization of the sensor platform

CV and EIS were effective techniques to specify changes in transducer behavior after each modification step. Cyclic voltammograms are graphical representations of a current curve (I) as a potential function (E). The anodic and cathodic peak currents, I_{pa} and I_{pc} respectively, and voltammetric areas were calculated for each constituent of the biosensor (Table S4). From another perspective, the EIS spectra include a semicircular

region at higher frequencies, characterizing the charge transfer resistance (R_{CT}) of the electrical double layer. Also, a linear part can be visualized at lower frequencies, indicating the diffusional process. In this work, the Randles equivalent circuit was used to adjust the impedance data. Randles equivalent circuit includes the resistance of the electrolytic solution (R_s), R_{CT} , constant phase element (CPE), and Warburg impedance (Z_w) [17]. The results obtained from the theoretical simulation with the Randles equivalent circuit were presented in Table S5.

Fig. S5 represents the potentiodynamic scans during the electropolymerization of PPy on flexible ITO substrate. Anodic oxidative polymerization was carried out in a potential range from -0.4 to +1.0 V in HCl solution at 0.5 M. The result revealed that the potential for initializing the electropolymerization of pyrrole was above 0.7 V versus Ag/AgCl. Consequently, a well-adhered homogeneous PPy black film was electrodeposited on the electrode surface, causing a significant increase in anode current. The absence of a cathodic peak suggests the occurrence of an irreversible reaction of PPy electropolymerization. Thus, this behavior is associated with the immobilization of bulk anions in the polymeric matrix during doping [18]. Of note, six polymeric cycles were performed to obtain the polymeric matrix. This phenomenon is related to the increase in the thickness of the PPy film, which causes a reduction in conductivity and a lower diffusion rate [19].

After the polymeric coating, the modifications of the working electrode were characterized by electrochemical measurements using the electrolytic solution containing 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ in PBS (pH 7.4; 10 mM) (Fig. 3). The PPy film exhibited a high current density ($I_{pa} = 307.37 \pm 1.73 \mu A$) and a low impedimetric response with an electron transfer resistance of $0.04 \pm 0.002 k\Omega$. This response is justified by forming the stable PPy film that features high conductivity, high electronic affinity, and a σ - π conjugate system that favors charge mobility throughout the molecule structure. Thus, these characteristics contribute significantly to improving the analytical performance and robustness of the biodetection systems [20].

Subsequently, the electroactive area for immobilization of biomolecules was improved by incorporating GNP into the polymer matrix. Also, the electron transport between the miniaturized electrode and the redox pair was enhanced [21]. A decrease in anodic and cathodic currents ($I_{pa} = 166.84 \pm 5.74 \mu A$) was obtained after GNP electrosynthesis. Besides, an increase in the interfacial resistivity ($R_{CT} = 0.15 \pm 0.001$

k Ω) was observed. According to Li and Shi [22], PPy films contribute to the deposition of nanoparticles with reduced nanometric dimensions in a state of non-aggregation due to the expressive number of nucleation sites in the polymeric network.

In sequence, Cys molecules were self-assembled over GNP through the Au-thiol chemistry. The chemisorption process allows the formation of monomolecular films with a high degree of structural organization. In addition to the thiol termination, Cys molecules have an amino-functional group that provides covalent and stable adhesion of DNA sequences to maintain their conformational structure. The amino group present in Cys can be protonated, showing a positive electrical charge that attracts negatively charged electrolytes, such as $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. This process favors the occurrence of oxidation-reduction reactions in regions adjacent to the electrode surface [23]. In this way, it was verified that the use of Cys as a spacer molecule increases current ($I_{pa} = 185.50 \pm 4.70 \mu\text{A}$) and a decrease in charge transfer ($R_{CT} = 0.13 \pm 0.002 \text{ k}\Omega$), reflecting the proper assembly of the PPy-GNP-Cys nanostructured platform.

The redox peaks showed a further decrease by immobilizing single-stranded DNA (ssDNA) segments modified with the 5' amino group ($I_{pa} = 101.53 \pm 5.58 \mu\text{A}$). As expected, an increase in the R_{CT} value was found ($R_{CT} = 0.29 \pm 0.002 \text{ k}\Omega$). The charge flow blockage is due to electrostatic repulsion between the electroactive anions in solution and the nucleotide structure's phosphate groups [24]. The nanostructured transducer's biofunctionalization was mediated by using the glutaraldehyde coupling agent. Thus, a Schiff bases' formation between two adjacent amino groups (H_2N -Cys and H_2N -primer) was obtained [25]. The sensor system was incubated in a BSA solution to block non-functional electrode areas, resulting in an additional reduction in the electron transfer rate ($I_{pa} = 70.94 \pm 0.55 \mu\text{A}$) and increased specific resistance ($R_{CT} = 0.99 \pm 0.013$).

3.3. Analytical features of the sensor platform

The analytical performance of the PPy-GNP-Cys-Primer-BSA nanostructured system was evaluated through a biodetection assay using recombinant plasmids containing the nucleocapsid protein gene of SARS-CoV-2. The genomic concentrations of the analyzed samples were 800, 1000, 1333.33, 2000, and 4000 copies μL^{-1} . The amperometric response decreases proportionally with the increase of the concentration of target DNA (Fig. 4a). The decrease in oxidation and reduction currents is related to

the capture of the viral gene on biodevice's surface. The double-stranded DNA molecules (dsDNA) formed on the sensor layer have a negative global charge. This property hinders the transit of electrons between the transducer and the electroactive species. Consequently, changes in voltammetric signals are evidenced and associated with the detection mechanism [26].

EIS spectra demonstrate the electrochemical resistance against various viral nucleocapsid gene concentrations (Fig. 4b). Impedimetric measurements were positively correlated to the increase in the gene copy number. The bioanalytical tool's resistive properties gradually became more significant as the molecular target concentration increased, denoting the formation of hybrid DNA at the sensing interface. As mentioned earlier, this fact is due to the electrostatic repulsion between the negatively charged DNA strands and the negative charges of the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Additionally, the biosensor's double layer impedance was represented by a constant phase element (CPE). From the CPE values presented in Table S5, it was observed that the measurements for the non-ideal capacitance progressively decreased after the exposure of the biosensor to samples with higher concentrations. This behavior may suggest less homogeneity of the sensing layer and reduced charge storage capacity due to the viral gene's interaction [27].

In Fig. 4c, we can see that the percentage variation of R_{CT} (ΔR_{CT}) is linear for the concentrations of the SARS-CoV-2 gene. The ΔR_{CT} is described as:

$$\Delta R_{CT} (\%) = \frac{R_{CT(\text{Biosensor-viral genome})} - R_{CT(\text{Biosensor})}}{R_{CT(\text{Biosensor})}} \times 100 \quad (1)$$

where $R_{CT(\text{Biosensor-viral genome})}$ is the value calculated after identification of the COVID virus genome and $R_{CT(\text{Biosensor})}$ corresponds to the preliminary response of the PPy-GNP-Cys-Primer-BSA biosensor (Table S5). The measurement of this variable enabled the characterization of the analytical performance of the biosensitive platform. The linear regression equation was determined from the calibration plot as $y = 2.60189 + 0.09949x$ with a correlation coefficient (R^2) of 0.99805. The y values correspond to ΔR_{CT} and the x values to the concentration ($\text{copies } \mu\text{L}^{-1}$) of the tested specimens.

The proposed nanostructured system showed a linear sensitivity range of 800 to 4000 $\text{copies } \mu\text{L}^{-1}$ with a standard deviation (SD) of 9.33 (S/N=3). The proposed sensor obtained a limit of detection of 258.01 $\text{copies } \mu\text{L}^{-1}$, limit of quantification of 781.84

copies μL^{-1} , and sensitivity of $0.51 \mu\text{A}/\text{copies } \mu\text{L}^{-1} \text{ cm}^2$. These parameters were calculated using the respective equations, $3.3\sigma/\text{slope}$, $10\sigma/\text{slope}$, and $\text{slope}/(\text{area of the electrode})$, where σ is the standard deviation of the blank measurement in three replicates [28]. Adequate reproducibility was obtained with a relative standard deviation value of 1.31% for the nanostructured sensor system. The reproducibility was determined from the standard deviation's percentage value for three independent sensor systems produced with the same methodological protocol and experimental conditions. The repeatability was confirmed considering the relative standard deviation of less than 1% for all assays with the SARS-CoV-2 gene employing variable concentrations. To evaluate the repeatability, the analytical response of each sensor was tested at least three times in a single day.

The selectivity of the nanostructured sensor was also assessed using the ΔR_{CT} intensity. Electrochemical experiments were performed with non-complementary oligonucleotide sequence and molecules commonly present in human plasma (glucose, glycine, cholesterol, ascorbic acid, and citric acid at a concentration of 0.5 ng mL^{-1}). Fig. 4d shows the resistance variation for the selectivity study. The values measured for interfering species were relatively low ($\Delta R_{\text{CT}} = 1.52 \pm 0.71$ to 18.69 ± 5.00) as compared to the impedimetric signals obtained for the SARS-CoV-2 N gene ($\Delta R_{\text{CT}} = 86.87 \pm 1.01$ to 405.56 ± 5.00). It is noteworthy that the slight variations observed in the interfacial resistance are due to non-specific adsorption. Hence, our result suggests that the PPy-GNP-Cys-Primer-BSA platform has good selectivity, allowing the application of the biosensor in clinical trials.

3.4. Measurement of SARS-CoV-2 in clinical samples

The nanostructured flexible device's feasibility for the clinical diagnosis of COVID-19 was evaluated using human samples obtained from a nasopharyngeal swab. Molecular tests were processed with SARS-CoV-2-negative samples and others from patients at various stages of viral infection, as follow: initial (1st to 7th day of symptom onset), intermediate (7th to 14th day of symptom onset), and late (after the 14th day of symptom onset) (Fig. 5a). Positive samples for COVID-19 caused a more significant impedance variation (ΔR_{CT} of 56.39 ± 3.83 to 699.46 ± 12.84) than the negative samples (ΔR_{CT} of -10.55 ± 0.71 to 9.20 ± 1.01).

The analytical efficiency of the biosensor was performed in comparison to the RT-PCR technique. The relative variation of R_{CT} was associated with the cycle threshold (CT) value of the RT-PCR analysis. The CT value can measure viral load in the clinical sample, directing the diagnostic interpretation and therapeutic decisions. An inversely proportional correlation between ΔR_{CT} values and CT values was found (Table S6). It is known that the lower the CT value, the greater the number of viral copies present in the clinical sample. In this sense, samples with higher viral expression (lower CT values) exhibited more significant impedimetric signals due to identifying a greater number of SARS-CoV-2 N gene sequences. Therefore, we demonstrated the ability of the electrochemical sensor to detect SARS-CoV-2 in cDNA samples.

The degree of surface coverage (θ) was used as a complementary parameter for diagnostic evaluation. θ values after exposure of the biomolecular system to clinical cDNA samples were calculated using the following equation:

$$\theta (\%) = 1 - \frac{R_{CT(Biosensor)}}{R_{CT(Biosensor-viral\ genome)}} \times 100 \quad (2)$$

$R_{CT(Biosensor)}$ is the R_{CT} value of the PPy-GNP-Cys-Primer-BSA system. $R_{CT(Biosensor-viral\ genome)}$ is the corresponding value for the biosensor against clinical samples. The surface coverage is related to the number of N gene sequences hybridized with a DNA primer on the sensor surface. The formation of hybrid DNA on the sensor layer increases the degree of surface coverage. Different θ values were calculated for samples of initial infection ($\theta = 84.90 \pm 0.42$ to 87.49 ± 0.20), intermediate infection ($\theta = 78.32 \pm 0.80$ to 83.24 ± 0.54), and late infection ($\theta = 36.03 \pm 1.55$ to 52.90 ± 0.39) (Fig. 5b). Lower θ values were found ($\theta = -11.80\% \pm 0.89$ to $8.42\% \pm 0.85$) for SARS-CoV-2-negative samples. These results denote the feasibility of the biosensor for target DNA assays in real samples. Of note, there are distinctive electrochemical responses for SARS-CoV-2-negative samples and patients in the early, intermediate, and late infection stages.

It is assumed that the electrochemical data are related to the circulating virus in the different periods of infectivity. In patients with COVID-19, a peak in viral load is commonly observed near the onset of symptoms (early infection stage) and gradually decreases. It is possible that asymptomatic COVID-19-positive individuals also exhibit high viral loads, contributing to the virus's spread [29]. The differentiation between the

disease stages is essential to monitor the infection's evolution, therapeutic interventions and identify asymptomatic cases.

Nowadays, social distance and rapid diagnosis represent strategies for slowing the virus transmission and understanding the COVID-19 epidemiology. In this conjecture, electrochemical DNA biosensors represent an alternative approach to detect viral nucleic acids, contributing to the development of point-of-care-testing methods. Genetic screening devices are considered an ideal strategy for the COVID-19 diagnosis, particularly in the first to second week after infection when anti-SARS-CoV-2 antibodies cannot be detected (immune window) [30]. Table 2 summarizes the main electrochemical DNA biosensors reported in the literature for the SARS-CoV-2 detection. We compare our nanostructured genetic platform with other DNA biosensors based on electrochemical transduction.

The proposed device can quickly and quantitatively detect the viral gene in a small sample volume (only two μL of a sample is required). The proposed sensor system exhibited interesting analytical performance parameters: comparable detection and quantification limits, high selectivity, specificity, and signal repeatability. Of note, most electrochemical tests depend on the analytical signal amplification using methylene blue [31], toluidine blue [32], acridine orange, and $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ [33]. Here, the proposed biosensor is free of markers aiming to reduce the consumption of chemical reagents, analysis time, and, consequently, overall costs of the process. Finally, the flexible electrode technology used in the PPy-GNP-Cys-Primer-BSA biosensor allows more significant functional and design versatility in developing new emergency care tests.

4. Conclusions

Conclusively, we have demonstrated the construction and characterization of a miniaturized flexible device based on conductive polymer and metallic nanoparticles for rapid and effective detection of nucleocapsid protein gene of SARS-CoV-2. The nanostructured platform shows a high reproducibility (variation of 1.31%), a large surface area, and signal transduction capability. The biomolecular recognition was achieved through surface chemistry, allowing for the stable and oriented immobilization of the DNA primer. The bioactivity assays were carried out with synthetic oligonucleotide samples and clinical cDNA samples, requiring reduced volume and

without labeling agents. Our electrochemical biosensor showed significant specificity, selectivity, and sensitivity for SARS-CoV-2 with a limit of detection of 258.01 copies μL^{-1} and a limit of quantification of 781.84 copies μL^{-1} . Different electrochemical profiles were obtained for the initial, intermediate, and late stages of the viral infection, showing the innovative performance of the PPy-GNP-Cys-Primer-BSA system. Where, the resistance variation values were significantly correlated with the CT values of the RT-PCR analyses. As a result of this finding, the electrochemical technique can be a viable alternative for SARS-CoV-2 differential diagnosis. Biosensors are alternative technologies for detecting new COVID-19 cases, contact tracing, and implementing treatments. Although the proposed biodetection system has not yet been tested in real nasal swab specimens without any purification and pre-treatment strategy, the results achieved were promising for the progressive development of an emergency care biosensor with scalability, ease of operation, compactness, and low cost.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development/CNPq (grant numbers 314894/2018-7 and 314756/2018-3); Pernambuco State Foundation for Research Support, FACEPE-INOVA-IAM (grant number 0384-2.01/19); PROPESQ/UFPE; KardiaTool, H2020 (grant number 768686); and POC Allergies through the ERA PerMed program.

References

- [1] Y. Ji, Z. Ma, M.P. Peppelenbosch, Q. Pan, Potential association between COVID-19 mortality and health-care resource availability, *The Lancet Global Health* 8(4) (2020) e480.
- [2] P. Forster, L. Forster, C. Renfrew, M. Forster, Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117(17) (2020) 9241-9243.
- [3] R.P. Rajkumar, COVID-19 and mental health: A review of the existing literature, *Asian journal of psychiatry* 52 (2020) 102066.
- [4] H. Iqbal, K.D. Romero-Castillo, M. Bilal, R. Parra-Saldivar, The emergence of novel-coronavirus and its replication cycle-an overview, *J Pure Appl Microbiol* 14(1) (2020) 13-16.
- [5] L. Temime, M.-P. Gustin, A. Duval, N. Buetti, P. Crepey, D. Guillemot, R. Thiébaud, P. Vanhems, J.-R. Zahar, D.R. Smith, A Conceptual Discussion About the Basic Reproduction

Number of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Healthcare Settings, *Clinical Infectious Diseases* 72(1) (2021) 141-143.

[6] F. Masotti, S. Cattaneo, M. Stuknytė, V. Pica, I. De Noni, Transmission routes, preventive measures and control strategies of SARS-CoV-2 in the food factory, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (2021) 1-12.

[7] Y. Pan, D. Zhang, P. Yang, L.L. Poon, Q. Wang, Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples, *The Lancet infectious diseases* 20(4) (2020) 411-412.

[8] R. Wölfel, V.M. Corman, W. Guggemos, M. Seilmaier, S. Zange, M.A. Müller, D. Niemeyer, T.C. Jones, P. Vollmar, C. Rothe, Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019, *Nature* 581(7809) (2020) 465-469.

[9] S. Wang, Y. Pan, Q. Wang, H. Miao, A.N. Brown, L. Rong, Modeling the viral dynamics of SARS-CoV-2 infection, *Mathematical biosciences* 328 (2020) 108438.

[10] E. Morales-Narváez, C. Dincer, The impact of biosensing in a pandemic outbreak: COVID-19, *Biosensors and Bioelectronics* 163 (2020) 112274.

[11] N. Wang, M. Lin, H. Dai, H. Ma, Functionalized gold nanoparticles/reduced graphene oxide nanocomposites for ultrasensitive electrochemical sensing of mercury ions based on thymine–mercury–thymine structure, *Biosensors and Bioelectronics* 79 (2016) 320-326.

[12] K.Y. Avelino, L.S. Oliveira, N. Lucena-Silva, C.A. Andrade, M.D. Oliveira, Flexible sensor based on conducting polymer and gold nanoparticles for electrochemical screening of HPV families in cervical specimens, *Talanta* (2021) 122118.

[13] S. Carquigny, O. Segut, B. Lakard, F. Lallemand, P. Fievet, Effect of electrolyte solvent on the morphology of polypyrrole films: Application to the use of polypyrrole in pH sensors, *Synthetic Metals* 158(11) (2008) 453-461.

[14] Q. Zhu, B.o. Liang, Y. Liang, L. Ji, C. Y.u., K.e. Wu, T. Tu, H. Ren, B. Huang, J. Wei, L.u. Fang, X. Liang, X. Ye, 3D bimetallic Au/Pt nanoflowers decorated needletype microelectrode for direct in situ monitoring of ATP secreted from living cells, *Biosens. Bioelectron* 153 (2020) 112019.

[15] M. Fani, M. Rezayi, H.R. Pourianfar, Z. Meshkat, M. Makvandi, M. Gholami, S.A. Rezaee, Rapid and label-free electrochemical DNA biosensor based on a facile one-step electrochemical synthesis of rGO–PPy–(I-Cys)–AuNPs nanocomposite for the HTLV-1 oligonucleotide detection, *Biotechnology and Applied Biochemistry* (2020).

[16] M. Sajfutdinow, K. Uhlig, A. Prager, C. Schneider, B. Abel, D. Smith, Nanoscale patterning of self-assembled monolayer (SAM)-functionalised substrates with single molecule contact printing, *Nanoscale* 9(39) (2017) 15098-15106.

[17] K.Y. Avelino, R.R. Silva, A.G. da Silva Junior, M.D. Oliveira, C.A. Andrade, Smart applications of bionanosensors for BCR/ABL fusion gene detection in leukemia, *Journal of King Saud University-Science* 29(4) (2017) 413-423.

[18] A.S. Liu, M.C. Bezerra, L.Y. Chao, Electrodeposition of Polypyrrole Films on Aluminum Surfaces from a p-toluene Sulfonic Acid Medium, *Materials Research*, 12 (2009) 503-507.

[19] S. Sayyah, S. Abd El-Rehim, M. El-Deeb, Electropolymerization of pyrrole and characterization of the obtained polymer films, *Journal of applied polymer science* 90(7) (2003) 1783-1792.

[20] D.G. Prajapati, B. Kandasubramanian, Progress in the development of intrinsically conducting polymer composites as biosensors, *Macromolecular chemistry and physics* 220(10) (2019) 1800561.

[21] Y. Ye, J. Ji, F. Pi, H. Yang, J. Liu, Y. Zhang, S. Xia, J. Wang, D. Xu, X. Sun, A novel electrochemical biosensor for antioxidant evaluation of phloretin based on cell-alginate/L-cysteine/gold nanoparticle-modified glassy carbon electrode, *Biosens Bioelectron* 119 (2018) 119-125.

- [22] Y. LI, G. SHI, Electrochemical growth of two-dimensional gold nanostructures on a thin polypyrrole film modified ITO electrode, *The Journal of Physical Chemistry B* 109 (2005) 23787-23793.
- [23] N. Wang, M. Lin, H. Dai, H. Ma, Functionalized gold nanoparticles/reduced graphene oxide nanocomposites for ultrasensitive electrochemical sensing of mercury ions based on thymine-mercury-thymine structure, *Biosens Bioelectron* 79 (2016) 320-6.
- [24] H.-B. Xu, R.-F. Ye, S.-Y. Yang, R. Li, X. Yang, Electrochemical DNA nano-biosensor for the detection of genotoxins in water samples, *Chinese Chemical Letters* 25(1) (2014) 29-34.
- [25] J. Kang, X. Li, G. Wu, Z. Wang, X. Lu, A new scheme of hybridization based on the Au(nano)-DNA modified glassy carbon electrode, *Analytical biochemistry* 364(2) (2007) 165-70.
- [26] C. Srisomwat, P. Teengam, N. Chuaypen, P. Tangkijvanich, T. Vilaivan, O. Chailapakul, Pop-up paper electrochemical device for label-free hepatitis B virus DNA detection, *Sensors and Actuators B: Chemical* 316 (2020) 128077.
- [27] A.M. Nowicka, M. Fau, T. Rapecki, M. Donten, Polypyrrole-Au nanoparticles composite as suitable platform for DNA biosensor with electrochemical impedance spectroscopy detection, *Electrochimica Acta* 140 (2014) 65-71.
- [28] P. Supraja, S. Tripathy, S.R.K. Vanjari, V. Singh, S.G. Singh, Electrospun tin (IV) oxide nanofiber based electrochemical sensor for ultra-sensitive and selective detection of atrazine in water at trace levels, *Biosensors and Bioelectronics* 141 (2019) 111441.
- [29] Y. Hirotsu, M. Maejima, M. Shibusawa, Y. Nagakubo, K. Hosaka, K. Amemiya, H. Sueki, M. Hayakawa, H. Mochizuki, T. Tsutsui, Pooling RT-qPCR testing for SARS-CoV-2 in 1000 individuals of healthy and infection-suspected patients, *Scientific reports* 10(1) (2020) 1-8.
- [30] J. Kudr, P. Michalek, L. Ilieva, V. Adam, O. Zitka, COVID-19: a challenge for electrochemical biosensors, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2021) 116192.
- [31] T. Chaibun, J. Puenpa, T. Ngamdee, N. Boonapatcharoen, P. Athamanolap, A.P. O'Mullane, S. Vongpunawad, Y. Poovorawan, S.Y. Lee, B. Lertanantawong, Rapid electrochemical detection of coronavirus SARS-CoV-2, *Nature Communications* 12(1) (2021) 1-10.
- [32] H. Zhao, F. Liu, W. Xie, T.-C. Zhou, J. OuYang, L. Jin, H. Li, C.-Y. Zhao, L. Zhang, J. Wei, Ultrasensitive supersandwich-type electrochemical sensor for SARS-CoV-2 from the infected COVID-19 patients using a smartphone, *Sensors and Actuators B: Chemical* 327 (2021) 128899.
- [33] Z. Fan, B. Yao, Y. Ding, J. Zhao, M. Xie, K. Zhang, Entropy-driven amplified electrochemiluminescence biosensor for RdRp gene of SARS-CoV-2 detection with self-assembled DNA tetrahedron scaffolds, *Biosensors and Bioelectronics* (2021) 113015.
- [34] M. Alafeef, K. Dighe, P. Moitra, D. Pan, Rapid, ultrasensitive, and quantitative detection of SARS-CoV-2 using antisense oligonucleotides directed electrochemical biosensor chip, *ACS nano* (2020).
- [35] A. González-López, M.T.F. Abedul, Genosensor on gold films with enzymatic electrochemical detection of a SARS virus sequence, *Laboratory Methods in Dynamic Electroanalysis*, Elsevier 2020, pp. 213-220.

Table Captions

Table 1. Analytical comparison between the biosensor presented in this work and the other electrochemical biosensors reported in the literature for the COVID-19 diagnosis.

Sensing strategy	SARS-CoV-2 target	Analytical technique	Hybridization marker	Detection time	Detection range	Limit of detection	Limit of quantification	Sensitivity	Reference
ITO surface / PPy / GNP / Cys / Primer / BSA	N gene	CV and EIS	Label-free	15 min	800 copies μL^{-1} to 4000 copies μL^{-1}	258.01 copies μL^{-1}	781.84 copies μL^{-1}	51 $\mu\text{A}/\text{copies}$ $\mu\text{L}^{-1} \text{ cm}^2$	This work
Gold electrode / Graphene nanoplatelets / thiol-modified ssDNA-capped gold nanoparticles	N gene	Was applied a simple signal conditioning circuit	Label-free	5 min	585.4 copies μL^{-1} to 5.854×10^7 copies μL^{-1}	6.9 copies μL^{-1}	--	231 (copies $\mu\text{L}^{-1})^{-1}$	[34]
*Four different antisense oligonucleotides were used.									
Polyimide substrate / sputtered gold film / thiolated probe / biotinylated target / alkaline phosphatase-labeled streptavidin	N gene	*SWV	Alkaline phosphatase	2 hours	0.1 nM to 10 nM	--	--	--	[35]
Biosensor based on isothermal rolling circle amplification	N and S genes	*DPV	Methylene blue and acridine orange	Less than 2 hours	1 copies mL^{-1} to 1×10^{10} copies mL^{-1}	1 copy mL^{-1}	--	--	[31]

Gold electrode / DNA tetrahedron	RdRp gene	EIS and *ECL	Ru(bpy) ₃ ²⁺	1 hour 15 min	1 fM to 100 pM	2.67 fM	--	--	[33]
Screen printing carbon electrode / nanocomposite of Au@Fe ₃ O ₄ and thiolated capture probe / nanocomposite of graphene oxide functionalized with Au@calixarene and toluidine blue	ORF1ab gene	EIS and *DPV	Toluidine blue	3 hours	1 pM to 10 aM	200 copies mL ⁻¹	--	--	[32]
*Supersandwich-type recognition strategy based on label probe and auxiliary probe. *SWV: Square wave voltammetry *DPV: Differential pulse voltammetry *ECL: entropy-driven amplified electrochemiluminescence									

Figure Captions

Fig. 1. Schematic representation of the assembly principle of the COVID-19 electrochemical sensing platform.

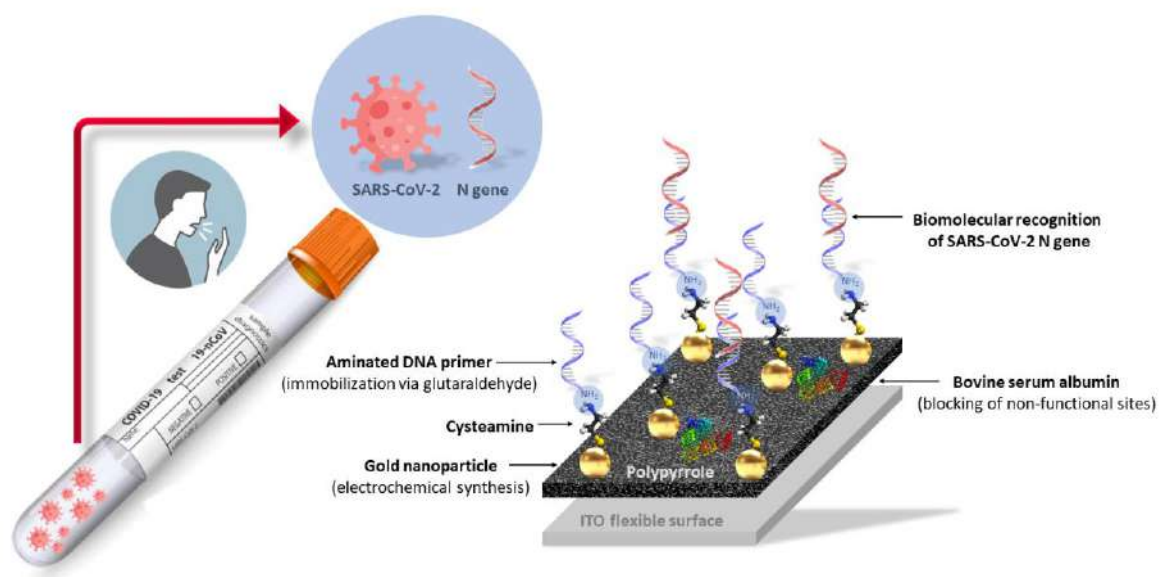


Fig. 2. AFM images of the PPy film (a), PPy-GNP-Cys-Primer-BSA film (b), PPy-GNP-Cys-Primer-BSA- SARS-CoV-2 sample film (c), and PPy-GNP-Cys-Primer-BSA-uninfected sample film (d).

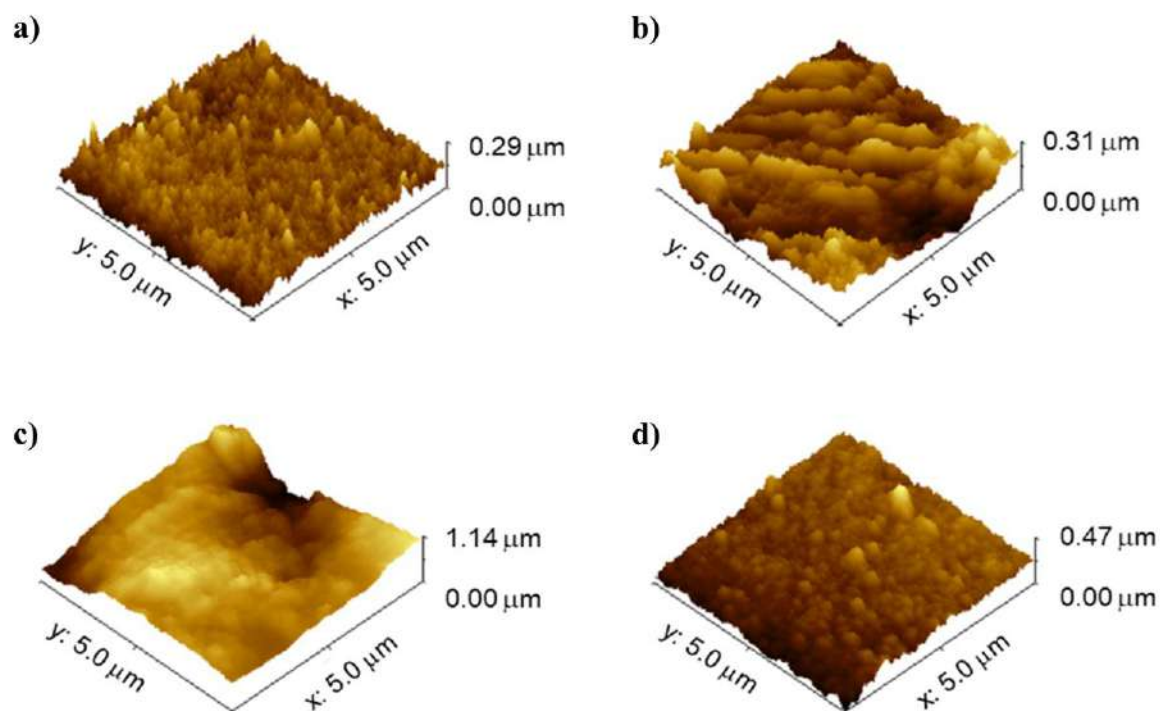


Fig. 3. Voltammetric (a) and impedimetric (b) characterization of each stage of construction of the flexible sensor platform. Inset: anodic peak currents obtained during the biosensor construction (a) and Randle's equivalent circuit used in the theoretical simulation of the impedance measurements (b). Three repetitions were performed for each methodological protocol, where the experimental data are presented as the mean values $\pm$ their standard deviation.

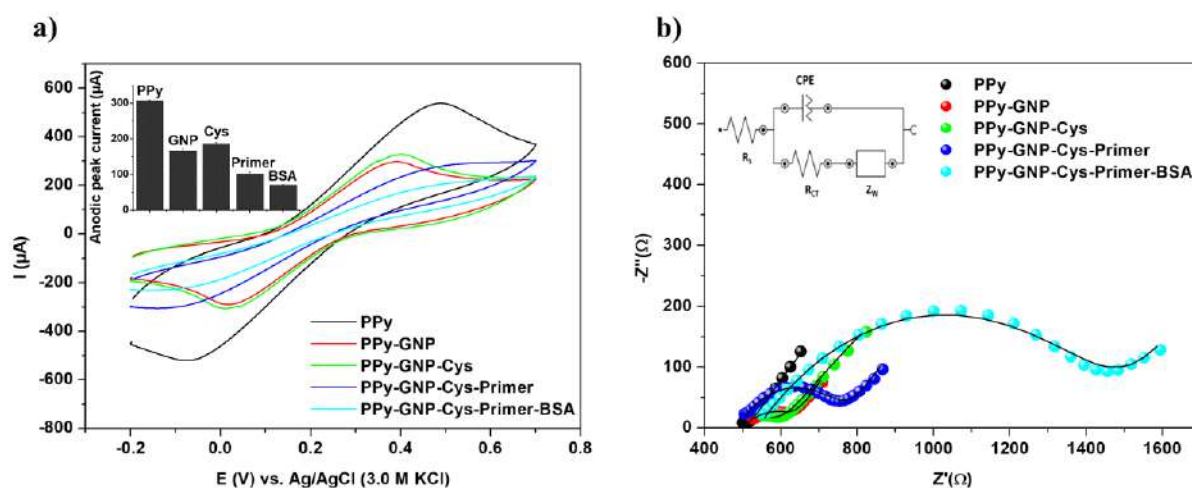


Fig. 4. Voltammetric records (a) and impedance spectra (b) for the flexible sensor platform exposed to different concentrations of the SARS-CoV-2 N gene in recombinant plasmids (DNA target: 800, 1000, 1333.33, 2000 and 4000 copies μL^{-1}). Calibration plot of the biosensor (c). Resistance variation for the selectivity study with non-complementary oligonucleotide sequence, glucose, glycine, cholesterol, ascorbic acid, and citric acid. Three repetitions were performed for each methodological protocol, where the experimental data are presented as the mean values $\pm$ their standard deviation.

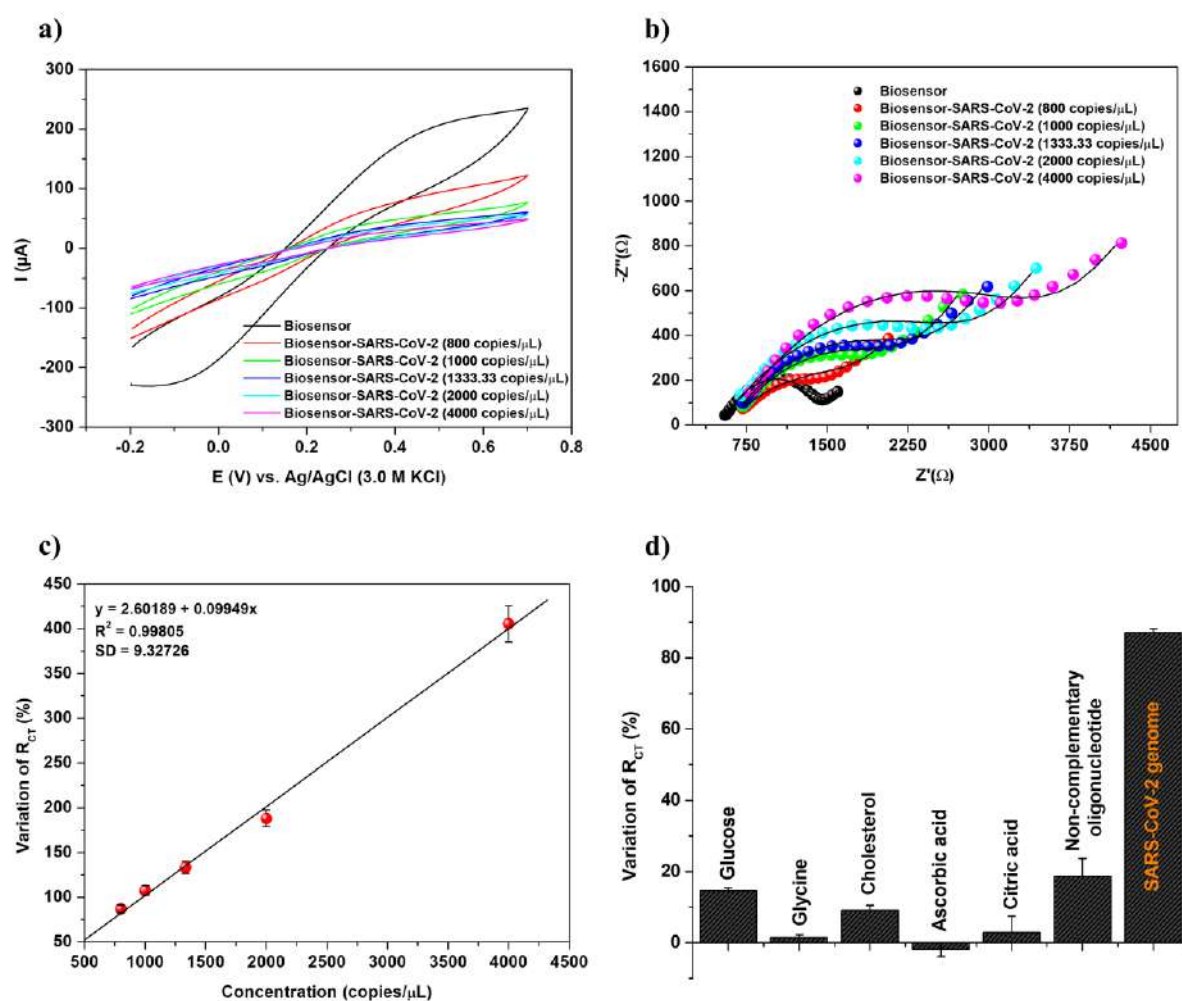
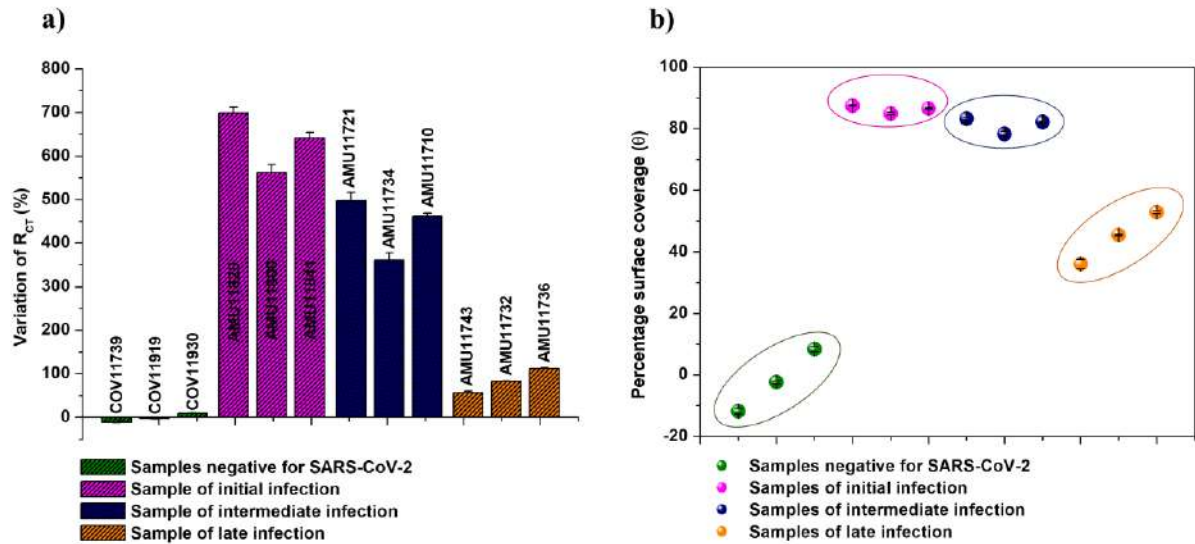


Fig. 5. Percentage variation of R_{CT} (a) and degree of surface coverage (Θ) (b) for the flexible sensor platform exposed to samples from patients not infected with SARS-CoV-2 and samples from patients in early, intermediate and late stages of viral infection. Three repetitions were performed for each methodological protocol, where the experimental data are presented as the mean values $\pm$ their standard deviation.



Electronic Supporting Material

Nanostructured sensor platform based on organic polymer conjugated to metallic nanoparticle for the impedimetric detection of SARS-CoV-2 at various stages of viral infection

Karen Y.P.S. Avelino^{a,b}, Giselle S. dos Santos^{a,b}, Isaac A.M. Frías^{a,b}, Alberto G. da Silva Júnior^{a,b}, Michelly C. Pereira^c, Maira G.R. Pitta^c, Breno C. de Araújo^c, Abdelhamid Errachid^d, Maria D.L. Oliveira^{a,b}, César A.S. Andrade^{a,b*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

^bLaboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

^cLaboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^dUniversité Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques (ISA), 5 rue de la Doua, 69100, Villeurbanne, Lyon, France

*To whom correspondence should be addressed.

César A.S. Andrade, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil

Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547

E-mail: cesar.sandrade@ufpe.br

Figure S1. Amplification Plot of samples evaluated by the presence of N1 and N2 SARS-CoV-2 virus.



Figure S2. ATR-FTIR of ITO before polymerization (a) and after pyrrole polymerization.

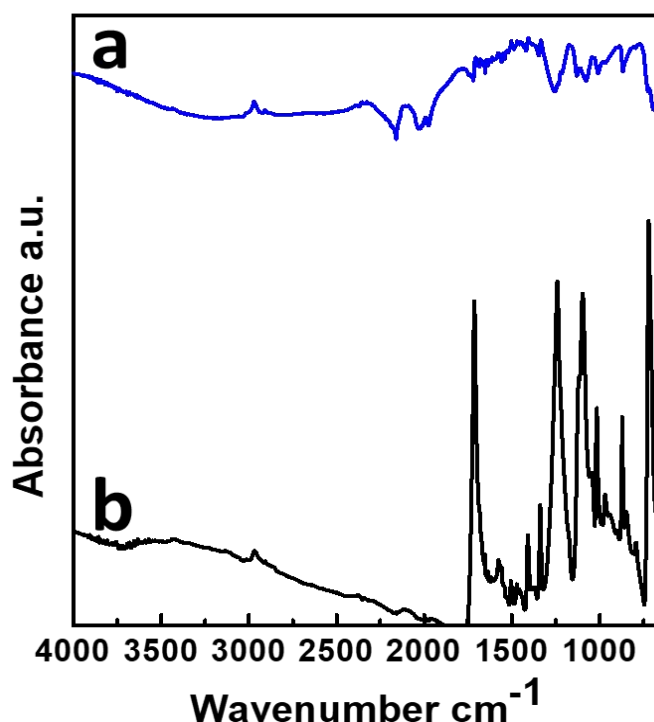
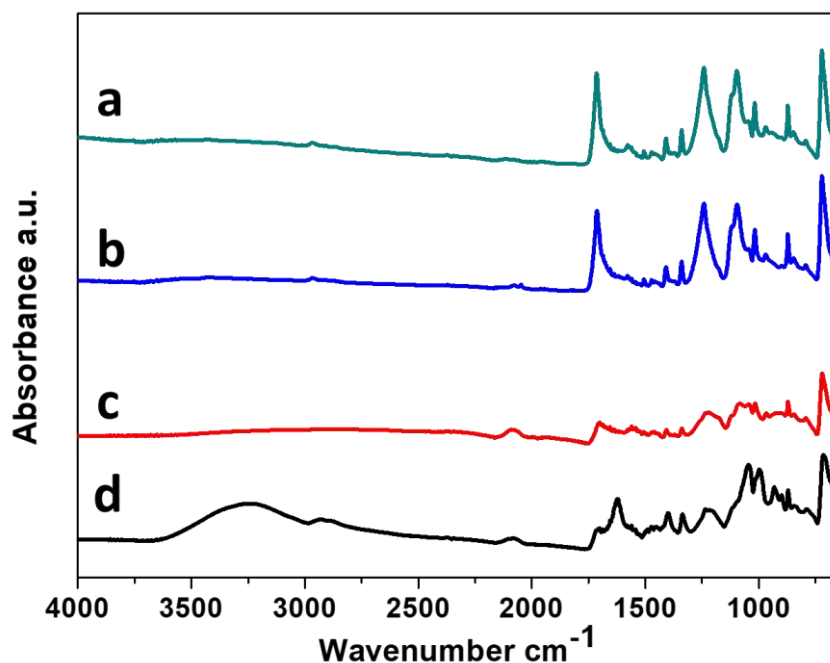


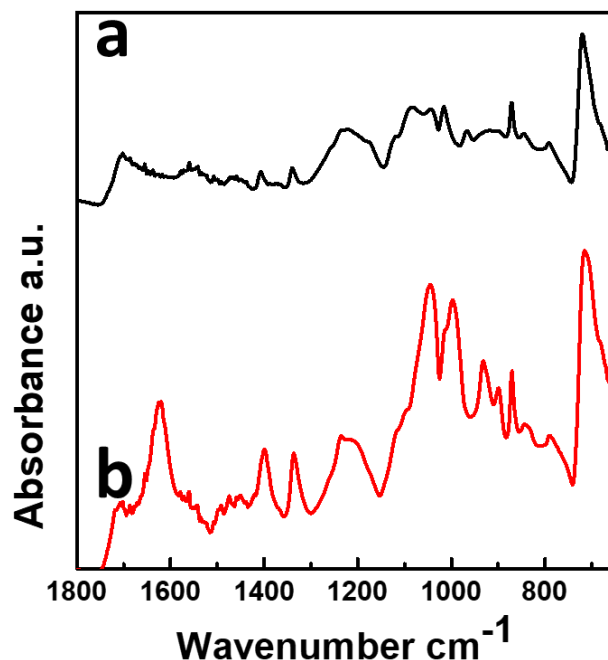
Fig. S2a shows ATR-FTIR spectra of pristine ITO support. After polymerization (Fig. S2b), typical PPy absorption bands were found. For instance, at 3400 cm^{-1} we observed a strong broad N–H stretching vibration absorption band probably due to hydrogen bonding with the water molecules that absorbed along opened rings. The band found at 1712 cm^{-1} is assigned to the formation of a carbonyl group by the nucleophilic attack of water molecules on pyrrole. As a result, oxidation of polymeric chains might promote ring-opening or H add in the pyrrole ring [1]. The bands at 1574 cm^{-1} are related to C=C intra-ring and C–C inter-ring stretch peaks of the aromatic ring stretching modes [2]. An intense straight band at 1241 cm^{-1} is assigned to the C–H and C–N in-plane deformation modes. This band's high intensity in the spectra is probably due to free in-plane deformation occurring within the polymeric chains. The peak at 1093 cm^{-1} corresponds to the pyrrole ring's breathing vibration. The peaks from 1017 cm^{-1} to 723 cm^{-1} are assigned to the C–H in and out of plane deformation vibration. Briefly, Table S2 has presented the FTIR characteristic peaks of PPy spectrum.

Figure S3. ATR-FTIR monitoring of the fabrication of the platform. PPy deposition (a); gold nanoparticle electrosynthesis (b); primer immobilization (c); and positive sample hybridization (d).



Platform construction was also monitored by ATR-FTIR (Fig. S3). After immobilization of the DNA primer sequence, DNA vibration absorbances prevailed over the PPy transducer's signals except for bands near 1400 cm^{-1} and 1336 cm^{-1} .

Figure S4. ATR-FTIR of PPy-GNP-Cys-Primer-BSA platform before hybridization to positive sample (a), and after hybridization (b).



In Fig. S4, we present the biosensing platform's spectra before and after exposure to a positive sample. Hybridization was confirmed by increased intensity and the apparition of new bands assigned to double-stranded DNA formation. For instance, the band's intensity found near 1703 cm^{-1} associated with Guanine C=O stretching is lower for PPy-GNP-Cys-Primer-BSA platform. After hybridization, the intensity of this band increases. Another of the main bands associated with double-strand DNA formation is the band near 1600 cm^{-1} found only after exposure to the positive sample. According to a previous study [3], this band is associated with thymine C2=O stretching and Adenine C7=N stretching.

Additionally, in Mello et al.'s research, this band experienced red shifting to lower frequencies when a double-stranded DNA is formed. Another difference in intensity is found for bands near 1230 cm^{-1} , which is assigned to phosphate antisymmetric stretching from phosphodiester groups. As expected, the intensity is also higher in the hybridized sample. From 1080 cm^{-1} to 1000 cm^{-1} , bands are assigned to phosphate antisymmetric and symmetric stretching. These intensities were also higher as a result of DNA mass increase after hybridization. Intensity increase was also found for 970 cm^{-1} band, which is assigned to an O-P-O bending C-C-C deoxyribose stretching; however, after hybridization, this band is red-shifted to 931 cm^{-1} . This kind of peak shift behavior was also observed by Mello et al. in

several frequencies and is most likely to gain molecular weight after hybridization [4]. Finally, from 922 cm^{-1} to 788 cm^{-1} we found bands associated with deoxyribose ring and sugar-phosphate vibrations, which were also higher for the platform after exposure to a positive sample. The FTIR peaks for the nanostructured platform before and after the hybridization process were summarized in Table S3.

Figure S5. Cyclic voltamograms obtained during electrochemical PPy polymerization in HCL solution at 0.5 M.

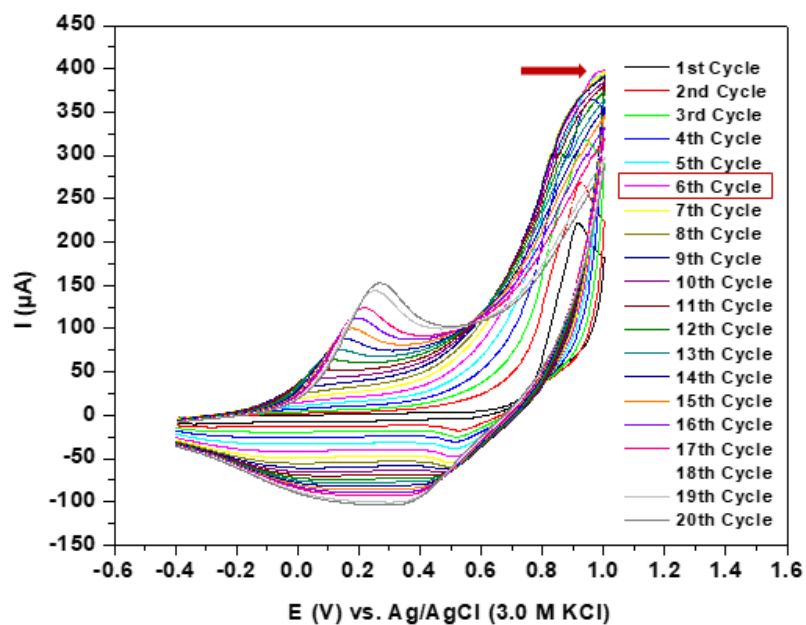


Table S1. Oligonucleotides sequences involved in the experiments.

US CDC, USA				
Gene	Primer/sonda	Sequence 5'-3'	Lengh	Nº
N (N1)	2019-nCoV_N1-Forward	GACCCCAAAATCAGCGAAAT	20	1
	2019-nCoV_N1-Probe	ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC	24	2
	2019-nCoV_N1-Reverse	TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG	24	3
N (N2)	2019-nCoV_N2-Forward	TTACAAACATTGGCCGCAAA	20	4
	2019-nCoV_N2-Probe	ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG	23	5
	2019-nCoV_N2-Reverse	GCGCGACATTCCGAAGAA	18	6
N (N3)	2019-nCoV_N3-Forward	GGGAGCCTTGAATACACCAAAA	22	7
	2019-nCoV_N3-Probe	ATCACATTGGCACCCGCAATCCTG	24	8
	2019-nCoV_N3- Reverse	TGTAGCACGATTGCAGCATTG	21	9
RPP30 gene	RP-F_RNAseP_Forward	AGATTGACCTGCGAGCG	19	--
	RP-P_RNAseP_Probe	TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG	23	--
	RP-R_RNAseP_Reverse	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	20	--
Sensing primer		Amine-TTACAAACATTGGCCGCAAA	20	4

Gene N

ATGTCTGATAATG**GACCCCAAAATCAGCGAAAT**¹GC**ACCCCGCATTACGTTTGGTGGAC**
C²CT**CAGATTCAACTGGCAGTAACCAGA**³ATGGAGAACGCAGTGGGGCGCGATCAAAACAACG
TCGGCCCCCAAGGTTTACCCAATAATACTGCGTCTTGTTTACCGCTCTCACTCAACATGGCA
AGGAAGACCTTAAATTCCTCGAGGACAAGGCGTTCCAATTAACACCAATAGCAGTCCAGAT
GACCAAATTGGCTACTACCGAAGAGCTACCAGACGAATTCGTGGTGGTGACGGTAAATGAA
AGATCTCAGTCCAAGATGGTATTTCTACTACCTAGGAAGTGGGCCAGAAGCTGGACTTCCCT
ATGGTGCTAACAAAGACGGCATCATATGGGTTGCAACTGA**GGGAGCCTTGAATACACCAAAA**⁷
GATCACATTGGCACCCGCAATCCTG⁸CTAA**CAATGCTGCAATCGTGCTACA**⁹ACTTCCTCAAG
GAACAACATTGCCAAAAGGCTTCTACGCAGAAGGGAGCAGAGGCGGCAGTCAAGCCTCTTCT
CGTTCCCTCATCACGTAGTCGCAACAGTTCAAGAAATTCAACTCCAGGCAGCAGTAGGGGAAC
TTCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTTGACA
GATTGAACCAGCTTGAGAGCAAAATGTCTGGTAAAGGCCAACAACAAGGCCAAACTGTC
ACTAAGAAATCTGCTGCTGAGGCTTCTAAGAAGCCTCGGCAAAAACGTACTGCCACTAAAGC
ATACAATGTAACACAAGCTTTCGGCAGACGTGGTCCAGAACAACCCAAAGGAAATTTTGGGG
ACCAGGAATAATCAGACAAGGAAGTGA**TTACAAACATTGGCCGCAA**⁴TTGC**ACAATTTGCC**
CCCAGCGCTTCAG⁵CG**TTCTTCGGAATGTCGCGC**⁶ATTGGCATGGAAGTCACACCTTCGGGAA
CGTGGTTGACCTACACAGGTGCCATCAAATTGGATGACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAA
GTCATTTTGCTGAATAAGCATATTGACGCATACAAAACATTTCCACCAACAGAGCCTAAAAA
GGACAAAAAGAAGAAGGCTGATGAAACTCAAGCCTTACCGCAGAGACAGAAGAAACAGCAAA
CTGTGACTCTTCTTCTGCTGCAGATTTGGATGATTTCTCCAAACAATTGCAACAATCCATG
AGCAGTGCTGACTCAACTCAGGCCTAA

Table S2. FTIR characteristic peaks of PPy spectrum.

Wavenumber cm^{-1}	Assignment	Reference
3400	N–H stretching	[5, 6]
1712	C=O	[7, 8]
1574	Ring stretching: C–C; C=C	[6, 8]
1241	In-plane deformation modes C–H and C–N	[6, 8]
1093	Ring breathing	[9]
1017-723	C–H in and out of plane deformation vibration	[9]

Table S3. FTIR characteristic peaks of platform during biosensing stage.

Wavenumber cm^{-1}	Assignment	Reference
PPy-GNP-Cys-Primer-BSA platform		
1701	Guanine C=O stretching	[10, 11]
1230	Phosphate antisymmetric stretching From phosphodiester groups	[10, 12]
1080	Phosphate antisymmetric stretching	[12]
1041-1013	Phosphate symmetric stretching	[12]
969	O-P-O bending C-C C-) deoxyribose stretching	[10]
922 shoulder 900	Deoxyribose ring vibration	[10]
844	Deoxyribose-phosphate	[10]
792	Sugar-Phosphate vibration	[10]
Positive sample hybridization		
1703	Guanine C=O stretching	[10, 11]
1619	C=O, C=N, C=C stretching and exocyclic -NH ₂ bending vibrations in double stranded DNA bases	[3, 12, 13]
1233 shoulder 1203	Phosphate antisymmetric stretching From phosphodiester groups	[10, 12]
1045-997	Phosphate symmetric stretching	[12]
931	O-P-O bending C-C C-) deoxyribose stretching	[10]
898	Deoxyribose ring vibration	[10]
842	Deoxyribose-phosphate	[10]
788	Sugar-Phosphate vibration	[10]

Table S4. Amperometric anodic shift for the construction steps of the flexible sensor platform. Three repetitions were performed for each methodological protocol, where the experimental data are presented as the mean values $\pm$ their half-deviation.

Modified electrode	Anodic peak height (μA)	Anodic peak area (μA)	Cathodic peak height (μA)	Cathodic peak area (μA)
PPy	307.37 ± 1.73	93.61 ± 0.53	-209.95 ± 3.91	57.47 ± 1.64
PPy-GNP	166.84 ± 5.74	36.93 ± 2.49	-168.79 ± 4.99	34.12 ± 2.53
PPy-GNP-Cys	185.50 ± 4.70	42.69 ± 3.35	-186.50 ± 9.36	41.26 ± 4.50
PPy-GNP-Cys-Primer	101.53 ± 5.58	34.96 ± 1.92	-84.19 ± 0.75	22.71 ± 0.31
PPy-GNP-Cys-Primer-BSA	70.94 ± 0.55	25.27 ± 0.33	-56.65 ± 8.20	14.56 ± 2.95

Table S5. Values of the equivalent circuit elements obtained from the fitting of the impedance results for each step of assembly of the flexible sensor platform. Three repetitions were performed for each methodological protocol, where the experimental data are presented as the mean values $\pm$ their half-deviation.

Modified electrode	CPE (μS)	n	R_{CT} ($k\Omega$)	ΔR_{CT} (%)	Θ (%)
PPy	1735 $\pm$ 247.49	0.31 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.002	--	--
PPy-GNP	539.33 $\pm$ 29.14	0.41 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.001	--	--
PPy-GNP-Cys	369 $\pm$ 10.61	0.32 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.002	--	--
PPy-GNP-Cys-Primer	109.43 $\pm$ 12.86	0.54 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.002	--	--
PPy-GNP-Cys-Primer-BSA	54.23 $\pm$ 1.65	0.52 $\pm$ 0.003	0.99 $\pm$ 0.013	--	--
Sensitivity assay					
SARS-CoV-2 N gene (800 copies μL^{-1})	174.67 $\pm$ 1.15	0.29 $\pm$ 0.001	1.85 $\pm$ 0.01	86.87 $\pm$ 1.01	46.49 $\pm$ 0.29
SARS-CoV-2 N gene (1000 copies μL^{-1})	68.13 $\pm$ 3.21	0.37 $\pm$ 0.004	2.06 $\pm$ 0.01	107.74 $\pm$ 1.17	51.86 $\pm$ 0.27
SARS-CoV-2 N gene (1333.33 copies μL^{-1})	56.67 $\pm$ 2.35	0.38 $\pm$ 0.004	2.31 $\pm$ 0.01	133.33 $\pm$ 1.01	57.14 $\pm$ 0.19
SARS-CoV-2 N gene (2000 copies μL^{-1})	43.37 $\pm$ 1.36	0.38 $\pm$ 0.003	2.85 $\pm$ 0.02	188.22 $\pm$ 2.10	65.30 $\pm$ 0.25
SARS-CoV-2 N gene (4000 copies μL^{-1})	18.05 $\pm$ 3.32	0.38 $\pm$ 0.005	5.01 $\pm$ 0.05	405.56 $\pm$ 5.00	80.22 $\pm$ 0.20
Selectivity assay					
Glucose	252.50 $\pm$ 7.78	0.22 $\pm$ 0.001	1.14 $\pm$ 0.01	14.65 $\pm$ 0.71	12.77 $\pm$ 0.54
Glycine	190.50 $\pm$ 3.54	0.25 $\pm$ 0.01	1.01 $\pm$ 0.01	1.52 $\pm$ 0.71	1.49 $\pm$ 0.69
Cholesterol	86.15 $\pm$ 3.04	0.37 $\pm$ 0.005	1.08 $\pm$ 0.01	9.09 $\pm$ 1.43	8.33 $\pm$ 1.20
Ascorbic acid	182.00 $\pm$ 2.83	0.30 $\pm$ 0.005	0.97 $\pm$ 0.02	-1.97 $\pm$ 1.93	-2.03 $\pm$ 2.01
Citric acid	197.33 $\pm$ 15.53	0.27 $\pm$ 0.01	1.02 $\pm$ 0.05	2.86 $\pm$ 4.58	2.66 $\pm$ 4.24
Non-complementary oligonucleotide	203.50 $\pm$ 4.95	0.23 $\pm$ 0.004	1.18 $\pm$ 0.05	18.69 $\pm$ 5.00	15.67 $\pm$ 3.55
Samples negative for SARS-CoV-2					
Biosensor-COV11739	72.73 $\pm$ 1.30	0.54 $\pm$ 0.002	0.88 $\pm$ 0.007	-10.55 $\pm$ 0.71	-11.80 $\pm$ 0.89
Biosensor-COV11919	69.20 $\pm$ 0.17	0.55 $\pm$ 0.01	0.97 $\pm$ 0.004	-2.29 $\pm$ 0.47	-2.35 $\pm$ 0.49
Biosensor-COV11930	61.17 $\pm$ 0.49	0.56 $\pm$ 0.003	1.08 $\pm$ 0.01	9.20 $\pm$ 1.01	8.42 $\pm$ 0.85
Samples of initial infection					
Biosensor-AMU11820	5.79 $\pm$ 0.05	0.64 $\pm$ 0.001	7.91 $\pm$ 0.13	699.46 $\pm$ 12.84	87.49 $\pm$ 0.20
Biosensor-AMU11800	5.73 $\pm$ 0.22	0.65 $\pm$ 0.01	6.55 $\pm$ 0.18	562.62 $\pm$ 18.43	84.90 $\pm$ 0.42
Biosensor-AMU11841	5.39 $\pm$ 0.24	0.66 $\pm$ 0.01	7.34 $\pm$ 0.13	642.16 $\pm$ 12.91	86.52 $\pm$ 0.23
Samples of intermediate infection					
Biosensor- AMU11734	6.19 $\pm$ 0.45	0.63 $\pm$ 0.003	4.57 $\pm$ 0.17	361.75 $\pm$ 16.81	78.32 $\pm$ 0.80
Biosensor- AMU11710	4.98 $\pm$ 0.25	0.56 $\pm$ 0.005	5.55 $\pm$ 0.08	461.17 $\pm$ 8.03	82.18 $\pm$ 0.26
Biosensor- AMU11721	5.70 $\pm$ 0.32	0.64 $\pm$ 0.01	5.91 $\pm$ 0.19	497.24 $\pm$ 19.35	83.24 $\pm$ 0.54
Samples of late infection					
Biosensor- AMU11743	27.07 $\pm$ 0.76	0.55 $\pm$ 0.01	1.55 $\pm$ 0.04	56.39 $\pm$ 3.83	36.03 $\pm$ 1.55
Biosensor- AMU11732	25.93 $\pm$ 1.47	0.56 $\pm$ 0.01	1.81 $\pm$ 0.01	83.35 $\pm$ 0.58	45.46 $\pm$ 0.17
Biosensor- AMU11736	28.70 $\pm$ 0.87	0.54 $\pm$ 0.01	2.10 $\pm$ 0.02	112.34 $\pm$ 1.75	52.90 $\pm$ 0.39

Table S6. R_{CT} variation and CT values of N1 and N2 genes of SARS-CoV-2 detected in samples used in this study.

	N1 target (CT value)	N2 target (CT value)	ΔR_{CT} (%)	Result
Samples negative for SARS-CoV-2				
COV11930	-	-	9.20 ± 1.01	Negative
COV11919	-	-	-2.29 ± 0.47	Negative
AMU11739	-	-	-10.55 ± 0.71	Negative
Samples of initial infection				
COV11820	19.25	23.06	699.46 ± 12.84	Positive
AMU11800	18.80	19.18	562.62 ± 18.43	Positive
AMU11841	18.32	20.29	642.16 ± 12.91	Positive
Samples of intermediate infection				
AMU11734	22.85	24.197	361.75 ± 16.81	Positive
AMU11710	26.40	28.20	461.17 ± 8.03	Positive
AMU11721	23.01	26.80	497.24 ± 19.35	Positive
Samples of late infection				
AMU11743	33.513	38.144	56.39 ± 3.83	Positive
AMU11732	33.922	37.416	83.35 ± 0.58	Positive
AMU11736	29.095	31.701	112.34 ± 1.75	Positive

*CT value less than 40 was interpreted as positive for SARS-CoV-2 RNA. N1, N2 are primer-probe sets to nucleocapsid (N) genes. All samples included in the study were tested following the CDC-designed FDA EUA 2019-nCoV CDC kit (IDT, USA) and GoTaqR Probe qPCR Master Mix.

REFERENCES

- [1] F. Ajjan, M. Jafari, T. Rębiś, T. Ederth, O. Inganäs, Spectroelectrochemical investigation of redox states in a polypyrrole/lignin composite electrode material, *Journal of Materials Chemistry A* 3(24) (2015) 12927-12937.
- [2] M.B.G. Costa, J.M. Juárez, M.L. Martínez, A.R. Beltramone, J. Cussa, O.A. Anunziata, Synthesis and characterization of conducting polypyrrole/SBA-3 and polypyrrole/Na-ALSBA-3 composites, *Materials Research Bulletin* 48(2) (2013) 661-667.
- [3] M. Banyay, M. Sarkar, A. Gräslund, A library of IR bands of nucleic acids in solution, *Biophysical chemistry* 104(2) (2003) 477-488.
- [4] S. Yang, Z. Liu, Y. Liu, Y. Jiao, Effect of molecular weight on conformational changes of PEO: an infrared spectroscopic analysis, *Journal of materials science* 50(4) (2015) 1544-1552.
- [5] L. Jiwei, Q. Jingxia, Y. Miao, J. Chen, Preparation and characterization of Pt-polypyrrole nanocomposite for electrochemical reduction of oxygen, *Journal of materials science* 43(18) (2008) 6285-6288.
- [6] Y.-s. Qiao, L.-z. Shen, T. Dou, M. Hu, Polymerization and characterization of high conductivity and good adhesion polypyrrole films for electromagnetic interference shielding, *Chinese Journal of Polymer Science* 28(6) (2010) 923-930.
- [7] F. López-García, G. Canché-Escamilla, A. Ocampo-Flores, P. Roquero-Tejeda, L. Ordóñez, Controlled size nano-polypyrrole synthesized in micro-emulsions as PT support for the ethanol electro-oxidation reaction, *International Journal of Electrochemical Science* 8(3) (2013) 3794-3813.
- [8] S.V. Kasisomayajula, X. Qi, C. Vetter, K. Croes, D. Pavlacky, V.J. Gelling, A structural and morphological comparative study between chemically synthesized and photopolymerized poly(pyrrole), *Journal of Coatings Technology and Research* 7(2) (2010) 145-158.
- [9] S. Jing, S. Xing, C. Zhao, Direct synthesis of PbS/polypyrrole core-shell nanocomposites based on octahedral PbS nanocrystals colloid, *Materials Letters* 62(1) (2008) 41-43.
- [10] M.L.S. Mello, B. Vidal, Changes in the infrared microspectroscopic characteristics of DNA caused by cationic elements, different base richness and single-stranded form, *PLoS One* 7(8) (2012) e43169.
- [11] D.R. Whelan, K.R. Bambery, P. Heraud, M.J. Tobin, M. Diem, D. McNaughton, B.R. Wood, Monitoring the reversible B to A-like transition of DNA in eukaryotic cells using Fourier transform infrared spectroscopy, *Nucleic acids research* 39(13) (2011) 5439-5448.
- [12] M.K. Patel, P.R. Solanki, S. Khandelwal, V.V. Agrawal, S. Ansari, B. Malhotra, Self-assembled monolayer based electrochemical nucleic acid sensor for *Vibrio cholerae* detection, *Journal of Physics: Conference Series*, IOP Publishing, 2012, p. 012009.
- [13] S. Alex, P. Dupuis, FT-IR and Raman investigation of cadmium binding by DNA, *Inorganica Chimica Acta* 157(2) (1989) 271-281.

10 ANEXOS

10.1 ANEXO A – COMPROVAÇÃO DE APRECIÇÃO ÉTICA

PLATBR - Comunicado de Início de Projeto

De: **Equipe Plataforma Brasil** (plataformabrasil@saude.gov.br)
Enviada: quinta-feira, 2 de julho de 2015 06:59:46
Para: Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva (norma.lucena@hotmail.com)

Sr. (a) Pesquisador (a),

O projeto Biossensor para diagnóstico de infecção cervical por HPV: ferramenta para rastreamento e seguimento de mulheres sob risco de desenvolver câncer de colo, com número CAAE 23698513.0.0000.5190, tem data de início prevista para 07/07/2014.

Atenciosamente,

Plataforma Brasil

www.saude.gov.br/plataformabrasil

plataformabrasil@saude.gov.br