

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**GUSTAVO ALVES DO NASCIMENTO**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELETROQUÍMICOS PARA**  
**DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE VIROSE BOVINA A PARTIR DE TÉCNICAS**  
**MOLECULARES**

RECIFE, 2011

**GUSTAVO ALVES DO NASCIMENTO**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELETROQUÍMICOS PARA DIAGNÓSTICO  
RÁPIDO DE VIROSE BOVINA A PARTIR DE TÉCNICAS MOLECULARES**

Trabalho de Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal do Departamento de Morfofisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Doutor em Biociência Animal, Área de concentração – Biotecnologia.

Orientador:

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

RECIFE, 2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELETROQUÍMICOS PARA DIAGNÓSTICO  
RÁPIDO DE VIROSE BOVINA A PARTIR DE TÉCNICAS MOLECULARES  
BANCA EXAMINADORA**

**Tese de Doutorado elaborada por:**

**GUSTAVO ALVES DO NASCIMENTO**

**Aprovada em 28 de Novembro de 2011**

---

Dr. José Luiz de Lima Filho  
(Presidente)

---

Dra. Rosângela Ferreira Frade de Araújo  
Membro Titular

---

Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins  
Membro Titular

---

Dra. Maria do Carmo de Barros Pimentel  
Membro Titular

---

Dra. Maria de Mascena Diniz Maia  
Membro Titular

---

Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior  
Membro Suplente

---

Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza  
Membro Suplente

## AGRADECIMENTOS

Em especial, ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho pela orientação, amizade conquistada, paciência, determinação e competência nos ensinamentos passados durante esse processo de titulação;

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Danyelly Bruneka Gondim Martins pela amizade conquistada, orientação e dedicação a pesquisa, contribuindo para o desenvolvimento desse projeto;

Ao programa de pós-graduação do Departamento de Morfofisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco por possuir professores e funcionários dedicados, e capacitados na formação de Mestres e Doutores;

Ao LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami) por ter permitido toda infraestrutura para a realização dessa pesquisa na obtenção do título de Doutor;

Ao IPA (Instituto Agrônômico de Pernambuco) pelo suporte para a realização desse trabalho, aprovação do comitê de ética e apoio técnico na coleta de amostras biológicas;

Aos órgãos de fomento FACEPE, CNPq e CAPES pela aprovação da presente pesquisa e pelo suporte financeiro para efetivação das atividades;

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alexandra Amorim Salgueiro por ter me inserido primeiramente na pesquisa científica e por ter intermediado esse contato com o Prof. José Luiz de Lima Filho;

A todos os funcionários do LIKA, com destaque a Otaviano pela atenção e devotamento ao trabalho voltado a pesquisa científica;

Aos amigos do LIKA, alunos, professores e pesquisadores que contribuíram para esse resultado durante todo o desenvolvimento do projeto;

Aos amigos da graduação em Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco pelo companheirismo e apoio nesse processo de qualificação;

Aos meus pais Nivaldo do Nascimento e Eunice Francisca Alves do Nascimento por me apoiarem e incentivarem a conquistar meus objetivos profissionais;

A todos os meus familiares pela ajuda, direta e indireta, nesse processo de qualificação profissional;

Também em especial a minha esposa Danielle C. Nascimento, pela atenção, carinho, ajuda e incentivo, contribuindo para minha dedicação na conquista desse trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1</b> – A) Papilomas ou verrugas localizados na região do nariz do animal; B) Papilomas localizados no pescoço do animal; C) Estágios mais avançados da infecção pelo papilomavírus com aparecimento de tumores; D) Papiloma no trato digestivo do animal em particular o rúmen; E) Papiloma na teta e úbere do animal; F) Papiloma epitelial induzido pelo BPV-6.....	18
<b>Figura 2</b> – Árvore filogenética contendo as sequências de 118 tipos de papilomavírus com os 16 gêneros descritos.....	20
<b>Figura 3</b> – Esquema da organização do genoma dos papilomavírus tipo 1 e 4. Os genomas virais estão linearmente representados com os genes que codificam as proteínas E e L em retângulos.....	21
<b>Figura 4</b> – Fotomicrografia eletrônica do papilomavírus humano tipo 58.....	21
<b>Figura 5</b> – Árvore filogenética dos gêneros <i>Deltapapillomavirus</i> (BPV-1 e 2), <i>Epsilonpapillomavirus</i> (BPV-5 e 8) e <i>Xipapillomavirus</i> (BPV-3, 4, 6, 9 e 10).....	23
<b>Figura 6</b> – Esquema do fluxo de corrente num sistema eletroquímico com dois eletrodos e com três eletrodos. Eletrodo de trabalho (W), eletrodo de referência (R) e eletrodo auxiliar (C).....	28
<b>Figura 7</b> – Voltametria de varredura linear onde $i_p$ representa a corrente total medida no sistema eletroquímico.....	31
<b>Figura 8</b> – Gráfico da voltametria cíclica (corrente <i>versus</i> potencial). $E_{p,a}$ é o pico de potencial anódico (pico de oxidação) e $E_{p,c}$ é o pico de potencial catódico (pico de redução).....	32
<b>Figura 9</b> – A) Gráfico do potencial aplicado em função do tempo em que $S_1$ determina a corrente capacitiva e $S_2$ determina a corrente faradaica. B) Voltamograma de pulso diferencial (corrente <i>versus</i> potencial) em que o pico de corrente $i_p$ representa a corrente livre de ruído.....	32
<b>Figura 10</b> – Esquema do funcionamento de um biossensor de ácido nucléico eletroquímico. As sondas em azul ligadas ao transdutor são os elementos de reconhecimento e as fitas em vermelho são as moléculas a serem detectadas.....	34
<b>Figura 11</b> – Formas de ligações dos aptâmeros com seus respectivos alvos. A) Pequena molécula alvo envolvida pelo aptâmero; B) Formato de ligação com único sítio; C) Formato de ligação com duplo sítio (sanduíche); D) Formato de ligação sanduíche com um aptâmero e um anticorpo.....	35

<b>Figura 12</b> – Esquema da síntese de aptâmeros utilizando o sistema SELEX (Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial). Uma biblioteca de ácidos nucleicos aleatórios é incubada com moléculas alvo; em seguida as moléculas não-ligadas são separadas das moléculas ligadas. Os ácidos nucleicos ligados são eluídos, amplificados por PCR e submetidos a um novo ciclo. De 6 a 12 ciclos consecutivos são realizados e a biblioteca final enriquecida é clonada e sequenciada.....	36
<b>Figura 13</b> – Processo de imobilização de ácidos nucleicos a partir de uma monocamada de grupamento tiol.....	38
<b>Figura 14</b> – Modelo representativo da detecção indireta utilizando indicadores de hibridização. Após o evento da hibridização (sonda-alvo) o indicador (estruturas em vermelho) é acumulado na dupla hélice formada para detecção do sinal de corrente.....	39
<b>Figura 15</b> – Modelo representativo da detecção indireta utilizando indicadores de hibridização. A sonda imobilizada sobre o transdutor apresenta uma estrutura química reveladora acoplada que, ao se ligar com o alvo, promove uma liberação de sinal elétrico.....	40
<b>Figura 16</b> – Preparação de eletrodo eletroquímico modificado com grafeno e polianilina para detecção da hibridização. GCE: eletrodo de carbono vítreo; Camada de grafeno oxidado sobre o eletrodo; PANI <sub>w</sub> : camada de polianilina sobre o grafeno (camada por camada); DNA alvo hibridizado com a sonda imobilizada sobre o transdutor modificado.....	41
<b>Figura 17</b> – Modelo de detecção com sondas de capturas imobilizadas em nanoesferas.....	42

## CAPÍTULO II

<b>Fig. 1.</b> Multiple alignment of DNA sequences obtained from 10 BPV serotypes was performed by the CLC Combined Workbench software v 3.6.1. The sequence consensus 27-mer was the fragment chosen for the construction of the work sequence.....	59
<b>Fig. 2.</b> Effect of BPV probe concentration on guanine oxidation signal in immobilization process. Differential pulse voltammetry method was used to analyze the current peaks in the following conditions: initial potential 0.5 V and end potential 1.2 V; modulation amplitude 50 mV and scan rate 20 mV/s. All results were plotted with the means of experiments performed at different BPV probe concentrations. One-way ANOVA analysis indicates significant effects and Tukey's test was used for post hoc analysis ( $p < 0.05$ , 0.05 $\mu$ M compared to 0.01, 0.1, 0.5, 1 or 5 $\mu$ M; $p < 0.05$ , 0.1 $\mu$ M compared to 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 or 5 $\mu$ M). The letters in common on the columns represent statistical similarity ( $p > 0.05$ ).....	60

**Fig. 3.** Effect of the BPV target concentration on the current peak in hybridization without indicator. Differential pulse voltammetry method was used to analyze the current peaks in the following conditions: initial potential 0.5 V and end potential 1.2 V; modulation amplitude 50 mV and scan rate 20 mV/s. All results were plotted with the means of experiments performed at different concentrations of BPV target. Inset shows calibration graph at concentration range 5 – 50 nM..... 61

**Fig. 4.** Effect of MB concentration on reduction signal in the graphite electrode. Differential pulse voltammetry method was used to analyze the current peaks in the following conditions: initial potential -0.8 V and end potential 0.3 V; modulation amplitude 50 mV and scan rate 20 mV/s. All results were plotted with the means of experiments performed at different concentrations of MB. One-way ANOVA analysis indicates significant effects and Tukey's test was used for post hoc analysis ( $p < 0.05$ , 200  $\mu\text{M}$  compared to 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500, 750 or 1000  $\mu\text{M}$ ). The letters in common on the columns represent statistical similarity ( $p > 0.05$ )..... 62

**Fig. 5.** (A) Differential pulse voltammograms on the guanine oxidation signal in BPV sequences without indicator; BPV probe 0.1  $\mu\text{M}$  before hybridization (a); oxidation signal after hybridization of the BPV probe 0.1  $\mu\text{M}$  with DNA non-complementary 0.1  $\mu\text{M}$  (b); BPV probe 0.1  $\mu\text{M}$  after hybridization with BPV target 0.1  $\mu\text{M}$  (c); and graphite electrode activated before immobilization (d). (B) Differential pulse voltammograms on the guanine oxidation signal in BPV sequences with indicator MB 500  $\mu\text{M}$ ; BPV probe 0.1  $\mu\text{M}$  before hybridization (a); oxidation signal after hybridization of the BPV probe 0.1  $\mu\text{M}$  with DNA non-complementary 0.1  $\mu\text{M}$  (b); BPV probe 0.1  $\mu\text{M}$  after hybridization with BPV target 0.1  $\mu\text{M}$  (c); and graphite electrode activated before immobilization (d). Experimental conditions as described in Section 2.8..... 64

### CAPÍTULO III

**Fig. 1.** Graphical representation of the relation between independent variables polymer, probe concentration and immobilization time analyzed in  $2^3$  full factorial design..... 78

**Fig. 2.** Pareto bar chart of the standardized effect estimate (absolute value) of the independent variables polymer (1), probe concentration (2) and immobilization time on MB reduction signal for the  $2^3$  full factorial design..... 79

**Fig. 3.** Histogram of the BPV probe concentration effect on MB reduction signal in immobilization process. Differential pulse voltammetry method was used to analyze the current signals in the following conditions: initial potential -0.8 V and end potential 0 V; modulation amplitude 50 mV and scan rate 20  $\text{mV s}^{-1}$ . All results were plotted with the averages of experiments performed at different BPV probe concentrations..... 80

**Fig. 4.** Effect of the BPV target concentration on MB reduction signal in hybridization. Differential pulse voltammetry method was used to analyze the current signals in the following conditions: initial potential -0.8 V and end potential 0 V; modulation amplitude 50 mV and scan rate 20 mV s<sup>-1</sup>. All results were plotted with the averages of experiments performed at different concentrations of BPV target. Inset shows calibration graph at concentration range 5 – 100 nM.....

81

**Fig. 5.** Amplification of L1 gene (papillomavirus) with primer pair MY09/MY11 from viral DNA extracted of bovine blood samples. Lane L1Kb: ladder 1Kb plus; lane C+: positive control of the papillomavirus L1 gene; lane C-: negative control (ultrapure water); lane VDE1: viral DNA extracted 1 and lane VDE2: viral DNA extracted 2.....

82

**Fig. 6.** Differential pulse voltammograms on MB reduction signal of (a) PLL-gold electrode modified bare; (b) BPV probe immobilized 1 μM on PLL-gold electrode modified after hybridization with BPV target sequence 100 nM; (c) BPV probe immobilized 1 μM on PLL-gold electrode modified after hybridization with VDE1 46.90 μg/mL; (d) BPV probe immobilized 1 μM on PLL-gold electrode modified after hybridization with VDE2 62.15 μg/mL; (e) BPV probe immobilized 1 μM on PLL-gold electrode modified after hybridization with non-complementary sequence; (f) BPV probe immobilized 1 μM on PLL-gold electrode modified before hybridization.....

84



**LISTA DE TABELAS****Artigo Científico II**

<b>Table 1</b> – Independent variables and levels used in the $2^3$ full factorial design.....	76
--	----

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AC	–	Corrente Alternada
BPV	–	Papilomavírus Bovino
CV	–	Voltametria Cíclica
DPV	–	Voltametria de Pulso Diferencial
DNA	–	Ácido Desoxirribonucléico
EIS	–	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
GCE	–	Eletrodo de Carbono Vítreo
HE	–	Hematúria Enzoótica
IBGE	–	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICTV	–	International Committee on Taxonomy of Viruses
IPA	–	Instituto Agrônomo de Pernambuco
ISE	–	Eletrodo Íon-Seletivo
IUPAC	–	International Union of Pure and Applied Chemistry
MAPA	–	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MB	–	Methylene Blue
PAN/w	–	Camada de Polianilina
pA	–	Pico Ampere
PCR	–	Reação em Cadeia de Polimerase
PLL	–	Poly-L-lysine
PNA	–	Ácido Nucléico Peptídico
RNA	–	Ácido Ribonucléico
RSD	–	Relative Standard Deviation
SAM	–	Self-Assembled Monolayer
SELEX	–	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
SNP	–	Single-nucleotide polymorphism
ssDNA	–	Ácido Desoxirribonucléico de fita simples
VDE	–	Viral DNA Extracted

## RESUMO

Enfermidades virais bovina, com destaque para o papilomatose bovina, trazem prejuízos para os produtores, podendo acometer todo o rebanho. Métodos de diagnósticos para o papilomavírus bovino (BPV) vêm sendo indispensáveis para o setor, pois os métodos tradicionais de observação morfológica são pouco eficazes. O uso de dispositivos capazes de reconhecerem moléculas biológicas específicas, como os biossensores, pode auxiliar no tratamento e prevenção de doenças virais bovina. O presente trabalho visou o desenvolvimento de métodos diagnósticos para detecção molecular de enfermidades bovinas de origem viral através da construção de biossensores. Um dos biossensores foi construído a partir de lápis grafite tipo 4B e outro modelo de biossensor foi constituído por eletrodos impressos. Nos dois biossensores propostos, um sonda de DNA específica para o BPV foi imobilizada no eletrodo de trabalho por eletrodeposição ou por adsorção e em seguida uma sequência alvo foi hibridizada com a sonda imobilizada. Os sinais redox da hibridização foram analisados pela técnica de voltametria de pulso diferencial. Os resultados mostraram que os biossensores puderam diferenciar a hibridização da não-hibridização. A ocorrência da hibridização apresentou diminuição no sinal redox e representou a positividade para a infecção do BPV. Os dois biossensores propostos (lápis grafite e eletrodos impressos) apresentaram elevada sensibilidade cujos limites de detecção foram 3,84 nM e 4,35 nM, respectivamente. O biossensor detectou também DNA viral extraído a partir de sangue bovino utilizando os eletrodos impressos. Os dados obtidos com os biossensores mostraram viabilidade para o diagnóstico de vários tipos de papilomavírus bovino, permitindo com isso o desenvolvimento de um novo sistema de detecção portátil para os vírus.

Palavras-chave: Papilomatose bovina, Vírus, Biossensor

## ABSTRACT

The bovine papillomatosis is a disease caused by papillomavirus that can generate damage for producers and farmers. In extreme cases it can affect all the herd. Diagnostic methods for bovine papillomavirus are essential to the sector because traditional methods of morphological observations are not very effective. The use of devices technological to recognize specific biological molecules may help treatment and prevention of bovine viral diseases. The biosensor incorporates a biological recognition element through electrochemical reactions that generate electrical signals that can be quantified and interpreted. Thus, this work aimed to develop molecular diagnostic methods for detection of bovine viral diseases through the construction of biosensors. One of the biosensor was constructed from pencil graphite type 4B and the other model biosensor was composed to three screen-printed electrodes. In both biosensors proposed, a DNA probe specific for the BPV was immobilized on the working electrode by electrodeposition or by adsorption and then a target sequence was hybridized with the probe immobilized. The hybridization redox signals were analyzed using differential pulse voltammetry. The results showed that biosensors could differentiate hybridization of non-hybridization. The hybridization occurrence showed decrease on the redox signal and represented the positive diagnostic for BPV infection. The two biosensors (pencil graphite and screen-printed electrodes) showed high sensitivity which detection limits were 3.84 nM and 4.35 nM, respectively. The biosensor also detected viral DNA extracted from bovine blood using screen-printed electrodes. The data obtained with the biosensors showed viability for the diagnosis of various bovine papillomavirus types, thereby allowing the development of a new portable detection system for viruses.

Keywords: Bovine papillomatosis, Virus, Biosensor

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b>	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	ix
<b>RESUMO</b>	x
<b>ABSTRACT</b>	xi
<b>INTRODUÇÃO</b>	14
<b>OBJETIVOS</b>	15
1.1. Objetivo geral	15
1.2. Objetivos específicos	15
<b>CAPÍTULO I</b>	16
<b>1. REVISÃO DA LITERATURA</b>	16
<b>1.1. Bovinocultura Brasileira: Breve Histórico</b>	16
<b>1.2. Papilomatose Bovina</b>	17
<i>1.2.1. Papilomavírus</i>	19
<i>1.2.2. Agente etiológico: Papilomavírus bovino</i>	22
<b>1.3. Biossensores</b>	24
<i>1.3.1. Definição</i>	24
<i>1.3.2. Classificação dos biossensores</i>	25
<i>1.3.2.1 De acordo com o biorreceptor</i>	25
<i>1.3.2.2 De acordo com o transdutor</i>	26
<b>1.4. Biossensores Eletroquímicos</b>	27
<b>1.5. Principais Técnicas Voltamétricas</b>	31
<b>1.6. Biossensores Eletroquímicos de Ácidos Nucléicos</b>	33
<i>1.6.1. Biorreceptores</i>	34
<i>1.6.2. Métodos de imobilização</i>	37
<i>1.6.3. Métodos de detecção</i>	38
<i>1.6.4. Aplicações dos biossensores de ácidos nucleicos eletroquímicos</i>	40
<b>REFERÊNCIAS</b>	44

<b>CAPÍTULO II</b>	53
<b>Artigo Científico I</b>	53
Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymer film on screen-printed electrode	53
<b>CAPÍTULO III</b>	71
<b>Artigo Científico II</b>	71
Electrochemical DNA sensor for detection of bovine papillomavirus serotypes from a probe consensus to the different viral types	71
<b>CAPÍTULO IV</b>	88
<b>Patente</b>	88
Biossensor Eletroquímico para Detecção de Ácidos Nucléicos	88

## INTRODUÇÃO

A bovinocultura é uma prática histórica na sociedade brasileira e com o seu crescimento, a prioridade no controle e vigilância sanitária passou a ser rotina neste setor. O crescimento do país frente ao cenário internacional na produção de leite e carne eleva a necessidade de um controle maior em relação às doenças bovinas, para que a produtividade desses componentes alimentares básicos cresça com garantia de qualidade. Entretanto, doenças como a papilomatose bovina podem levar a perdas econômicas neste setor e indiretamente podem também prejudicar outros setores que utilizam subprodutos oriundos da bovinocultura. A papilomatose bovina é uma doença infecto-contagiosa provocada por um vírus pertencente à família *Papillomaviridae* e causa o aparecimento de tumores na pele e mucosa, sendo conhecida por papiloma ou popularmente por verruga. Muitas vezes estas lesões podem persistir, evoluir para tumores malignos e, quando associados a imunossupressores, como, por exemplo, a alimentação por samambaia da espécie *Pteridium aquilinum*, os animais ficam impossibilitados de combater a infecção.

Partindo-se do pressuposto de que a papilomatose bovina, na maioria das vezes, só é percebida quando o animal já apresenta as verrugas na pele, o interesse pelo diagnóstico na fase precoce da infecção tem sido prioridade para o tratamento desta enfermidade. Além da identificação visual do papiloma no animal, atualmente, o diagnóstico vem sendo realizado a partir de observações histológicas de biópsia ou raspado celular, o que torna lento o resultado final. Com isso, a busca por novas tecnologias capazes de detectar em tempo real e na fase precoce da infecção é de extrema importância para o melhoramento produtivo neste setor. Para atender esta demanda, os biossensores podem ser utilizados por possuírem os requisitos necessários para a detecção do papilomavírus bovino.

O biossensor é um dispositivo analítico composto de um elemento de reconhecimento biológico acoplado a um transdutor que converte resposta bioquímica em sinal elétrico. Por integrar uma interface quimicamente sensível e transdutor numa única plataforma física, o biossensor apresenta algumas das funcionalidades da instrumentação analítica, como respostas *on-line*, custos e tamanhos reduzidos. Esse elemento de reconhecimento biológico é fixado (imobilizado) na superfície sensora, permitindo repetidas análises. A resposta bioquímica da interação entre o elemento de reconhecimento biológico e o alvo de interesse é obtida por reações de óxido-redução. Com isso, o desenvolvimento de biossensores pode auxiliar no diagnóstico, no tratamento e até na prevenção mais eficaz dessa doença bovina.

## **OBJETIVOS**

### **Geral**

Desenvolver modelos de biossensores de ácidos nucleicos eletroquímicos para o diagnóstico rápido do papilomavírus bovino a partir de técnicas moleculares.

### **Específicos**

- Identificar regiões de interesse para o desenvolvimento de biossensor através de ferramentas de bioinformática;
- Extrair o DNA dos vírus bovinos presentes em amostras coletadas em fazendas de Pernambuco;
- Identificar a presença viral nas diferentes amostras coletadas, utilizando os primers degenerados;
- Construir biossensor de DNA por técnica de screenprinting e/ou outras que permitam miniaturização e aumento da sensibilidade;
- Desenvolver sistema de imobilização de sonda de DNA diretamente na superfície dos eletrodos ou em superfícies poliméricas;
- Realizar testes de hibridização entre as sondas e DNA alvo;
- Desenvolver sistema de revelação eletroquímica para as reações de hibridizações;
- Avaliar a estabilidade do biossensor frente aos principais parâmetros físico-químicos.



## CAPÍTULO I

### 1. REVISÃO DA LITERATURA

#### 1.1. Bovinocultura Brasileira: Breve Histórico

Mundialmente, o Brasil apresenta-se como um dos principais países produtores, consumidores e exportadores de carne bovina. Atualmente, em relação à carne bovina, o Brasil é o segundo maior produtor mundial com cerca de 200 milhões de cabeças. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, desde 2004 a participação brasileira nas exportações mundiais de carne bovina assumiu a liderança, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países (1).

O rebanho bovino brasileiro proporciona o desenvolvimento de dois principais segmentos lucrativos: As cadeias produtivas da carne e do leite. O valor bruto da produção desses dois segmentos, estimado em R\$ 67 bilhões, aliado à presença da atividade em todos os estados brasileiros, evidencia a importância econômica e social da bovinocultura em nosso país (1).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2), no ano de 2010, foi registrado o abate de 29,265 milhões de cabeças de bovinos, representando aumento de 4,3% em relação ao ano anterior. No acumulado do ano de 2010, o Centro-Oeste respondeu por 34,7% do abate de bovinos, o Sudeste por 22,3%, o Norte por 19,4%, o Sul por 13,4% e o Nordeste por 10,7%. Mato Grosso continua sendo o Estado líder no abate de bovinos, totalizando 14,0% do total, seguido por São Paulo (12,1%) e Mato Grosso do Sul (11,3%). Quanto ao nível de inspeção sanitária do matadouro/frigorífico federal, estadual ou municipal, as quantidades de bovinos abatidos representaram, respectivamente, 75,7; 17,4 e 6,9% do abate total (2). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, as projeções de carne bovina para o Brasil mostram que esse setor deve apresentar intenso crescimento nos próximos anos. A carne bovina apresentará uma taxa de crescimento da produção em torno de 2,2% ao ano no período 2010/2011 a 2020/2021 (1).

Quanto à produção de leite, de 1997 aos dias atuais, o Brasil vem aumentando sua produção, apresentando variação anual positiva em todos os anos de sua série histórica. No comparativo de 2010 com 2009, a aquisição de leite teve aumento de 7,0%. Em 2010, a

produção de leite no Brasil foi de aproximadamente 21 bilhões de litros. Do total de leite adquirido pelas indústrias brasileiras, 93,8% do volume veio de estabelecimentos sob inspeção federal, 5,5% sob inspeção estadual e 0,7% sob municipal. O volume de leite *in natura* exportado no ano de 2010 foi de 8,802 mil toneladas, aumento de 58,8% sobre aquele registrado em 2009. O faturamento, por sua vez, teve aumento de 95,8% na mesma comparação. O preço médio da tonelada do produto foi de US\$ 2.114 em 2010 contra US\$ 1.715 em 2009, valorização de 23,3% (2).

O couro bovino, outro segmento lucrativo da bovinocultura, é um produto de elevado valor agregado no mercado interno e externo. Dados do IBGE mostraram que em 2010 foram adquiridas e recebidas de terceiros 35,009 milhões de peças inteiras de bovinos (2).

Diante desse crescimento da pecuária, a necessidade por melhorias das práticas sanitárias é indispensável. O aumento da criação de gado exige prevenção e tratamento, principalmente de doenças que podem acometer o setor produtivo. Entre as enfermidades que podem prejudicar a produção destacam-se: febre aftosa, mastite, brucelose, vaca louca, botulismo, tuberculose, timpanismo, linfossarcoma e a lifossitose persistente, rinotraqueíte infecciosa, diarreia viral, leptospirose bovina, colibacilose de bezerros, enterotoxemia, dermatomicose, dermatofilose, acidose láctica, laminite, assim como a papilomatose bovina (3).

## **1.2. Papilomatose Bovina**

A papilomatose bovina é uma enfermidade infecto-contagiosa, pertencente a um grupo heterogêneo de vírus DNA, crônica, de natureza fibroepitelial, caracterizando-se por levar ao desenvolvimento de tumores localizados na pele e mucosa. É uma doença de caráter cosmopolita e também é popularmente conhecida como verruga ou figueira (Figura 1) (4). Os papilomas, verrugas, têm dimensões variadas, desde 1 milímetro a vários centímetros de diâmetro, podendo estar parcialmente aderidos à pele ou pendurados. Essas verrugas podem se espalhar por todo o animal e muitas vezes acometem o úbere e as tetas, reduzindo a produtividade da vaca afetada, levando a prejuízo do produtor (5).

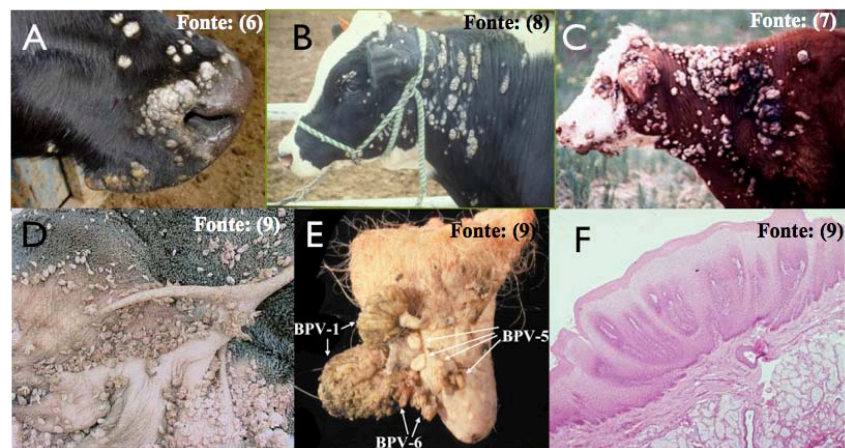


Figura 1. A) Papilomas ou verrugas localizados na região do nariz do animal; B) Papilomas localizados no pescoço do animal; C) Estágios mais avançados da infecção pelo papilomavírus com aparecimento de tumores; D) Papiloma no trato digestivo do animal em particular o rúmen; E) Papiloma na teta e úbere do animal; F) Papiloma epitelial induzido pelo BPV-6.

A infecção do papilomavírus pode ocorrer por contato direto de regiões do corpo do bovino que estão mais sujeitas a lesões ou irritações, por contato sexual ou ainda de forma indireta, por meio de instalações e equipamentos contaminados. Com isso, o animal, uma vez infectado, deve ser isolado dos demais animais sadios. A replicação viral ocorre nas células basais do epitélio, estimulando a divisão celular, hiperproliferação e também induzindo o crescimento excessivo dessas células, formando as verrugas ou papilomas (10, 11). O papilomavírus bovino também está presente em peles saudáveis como um comensal, infecções latentes ou infecções subclínicas (12). A duração da infecção é muito variável e a cura espontânea pode ocorrer em alguns animais. Entretanto, o tratamento é necessário na maioria dos casos, principalmente quando o número de papilomas é elevado e existe um grande número de animais com a doença dentro da propriedade (13, 14). Entre os tratamentos está a auto-hemoterapia, que promove um estímulo inespecífico; os produtos da degradação eritrocitária, que estimulam a eritropoiese e ativam o sistema imune, permitindo a manutenção da homeostasia; o cloro-butanol e o diacetato de diaminazina que têm apresentado resultados significativos em animais acometidos pela papilomatose cutânea (13, 14).

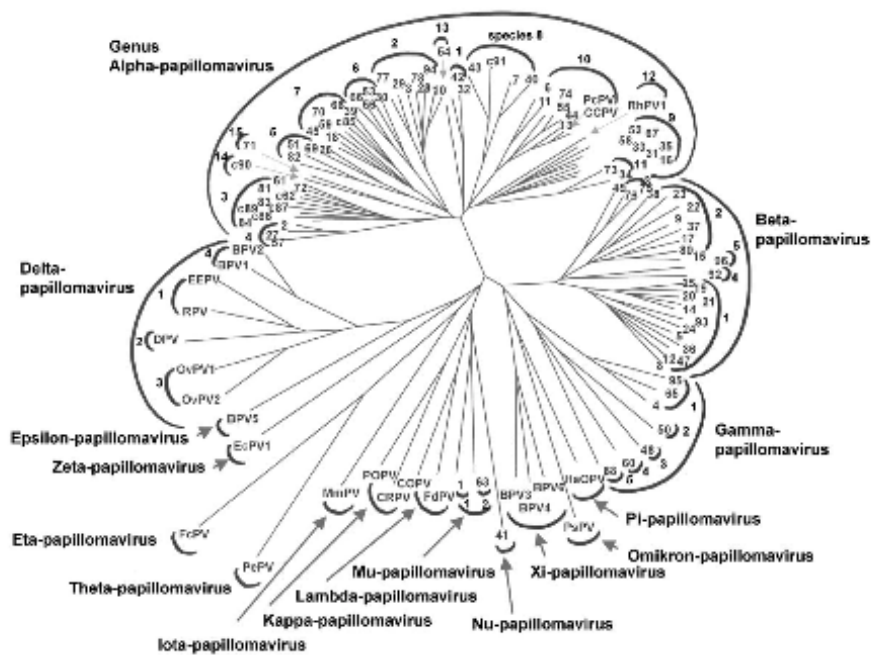
A papilomatose bovina também pode estar associada à hematúria enzoótica (HE), que é uma das formas clínicas da intoxicação crônica por samambaia da espécie *Pteridium aquilinum*, caracterizada por alterações neoplásicas da bexiga. O animal desenvolve

hematúria intermitente ou contínua e acaba morrendo, devido à anemia (15). O quadro clínico está diretamente relacionado à alimentação do rebanho, em que ocorre a presença da planta nas pastagens, sendo comum em rebanhos criados no sul do Brasil. Segundo a literatura, a infecção com o papilomavírus bovino tipo 2 e 4 vem sendo associada aos quadros clínicos da hematúria enzoótica, porém, apesar de já divulgado o envolvimento desses sorotipos na etiologia da HE, pouco se sabe sobre essas interações patológicas (16, 17).

Além da aparência desagradável do animal acometido pela papilomatose bovina, a enfermidade pode levar a prejuízos, principalmente no que diz respeito à diminuição da produtividade. Há ainda a desvalorização do couro do animal, desenvolvimento retardado, cegueira, depreciação do valor do bovino em função da dificuldade em comercializá-lo, problemas relacionados à fertilidade (10, 14).

### 1.2.1. Papilomavírus

Originalmente, os papilomavírus foram confundidos com os poliomavírus da família *Papovaviridae*, baseado na similaridade dos capsídeos não-envelopados e dos genomas circulares de DNA fita dupla. Mais tarde, reconheceu-se que os dois grupos de vírus tinham tamanhos diferentes do genoma. As organizações do genoma eram completamente diferentes e não apresentavam grandes semelhanças entre as sequências de nucleotídeos ou aminoácidos. O papilomavírus e poliomavírus agora são oficialmente reconhecidos pelo International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV) como duas famílias separadas, *Papillomaviridae* e *Polyomaviridae* (18). Neste relatório publicado, diversos pesquisadores propuseram uma nova classificação para os papilomavírus, estabelecendo-se que a família *Papillomaviridae* continha 92 papilomavírus humano e 24 papilomavírus animal (19). Conforme a Figura 2, a família *Papillomaviridae* é constituída por 16 gêneros, sendo nomeados com letras gregas e denominados por: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Deltapapillomavirus*, *Epsilonpapillomavirus*, *Zetapapillomavirus*, *Etapapillomavirus*, *Thetapapillomavirus*, *Iotapapillomavirus*, *Kappapapillomavirus*, *Lambdapapillomavirus*, *Mupapillomavirus*, *Nupapillomavirus*, *Xipapillomavirus*, *Omikronpapillomavirus* e *Pipapillomavirus* (20).



Fonte: (18)

Figura 2. Árvore filogenética contendo as sequências de 118 tipos de papilomavírus com os 16 gêneros descritos.

Em geral, os papilomavírus apresentam um genoma circular de DNA fita dupla de aproximadamente 8 kb, com três oncogenes (E5, E6, E7) que modulam o processo de transformação; duas proteínas reguladoras (E1 e E2) que modulam a transcrição e replicação, e duas proteínas estruturais (L1 e L2) que compõem o capsídeo viral (Figura 3). Em particular, as proteínas E1, E2, L1 e L2 são bem conservadas em todos os membros da família *Papillomaviridae*. Com isso, os táxons do papilomavírus geralmente são definidos com base na identidade da sequência nucleotídica da proteína L1 (18). O capsídeo viral tem uma estrutura icosaédrica não-envelopada de 55 nm de diâmetro e composto por 72 capsômeros pentaméricos (Figura 4) (21).

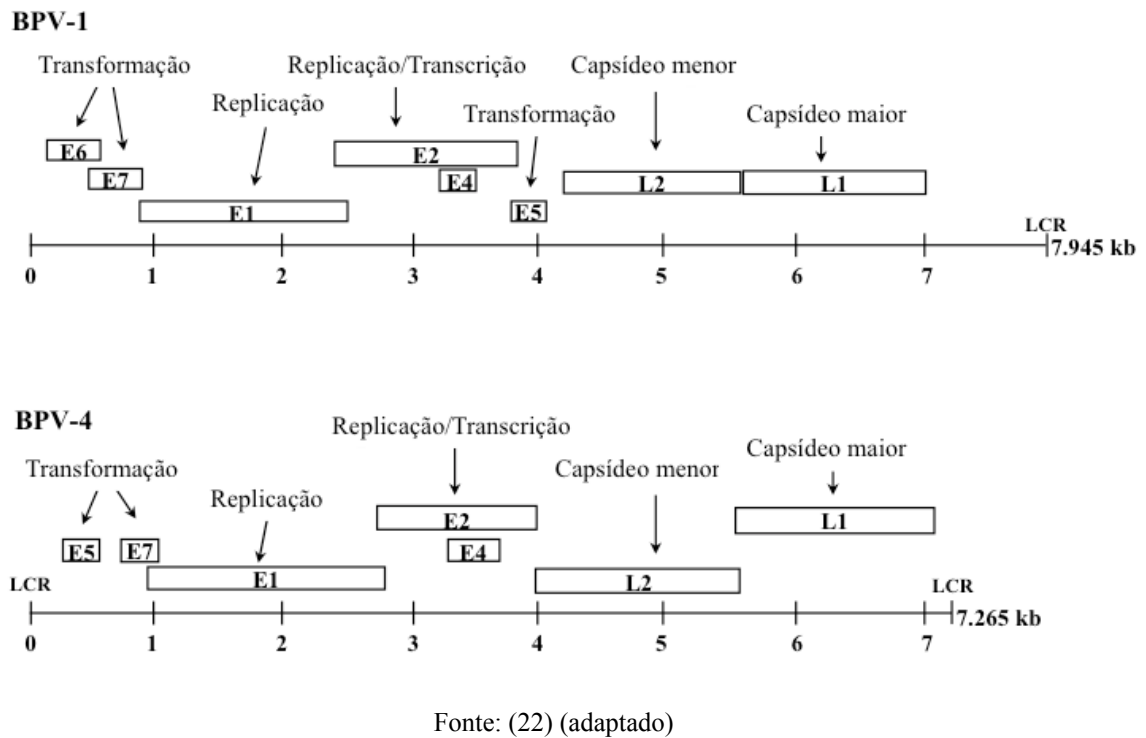
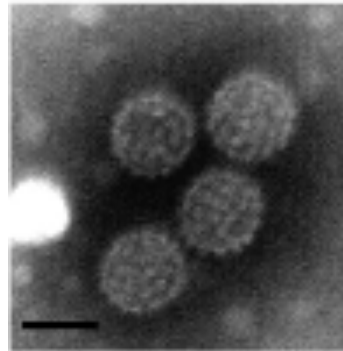


Figura 3. Esquema da organização do genoma dos papilomavírus tipo 1 e 4. Os genomas virais estão linearmente representados com os genes que codificam as proteínas E e L em retângulos.



Fonte: (23)

Figura 4. Fotomicrografia eletrônica do papilomavírus humano tipo 58.

As proteínas E estão envolvidas nos eventos iniciais do ciclo de vida do vírus. E1 é uma helicase necessária para a replicação do DNA viral; E2 é uma proteína reguladora de transcrição da expressão do gene viral e também auxilia no processo de replicação, ajudando no recrutamento de E1 para a origem da replicação do DNA (24). E4 é uma proteína

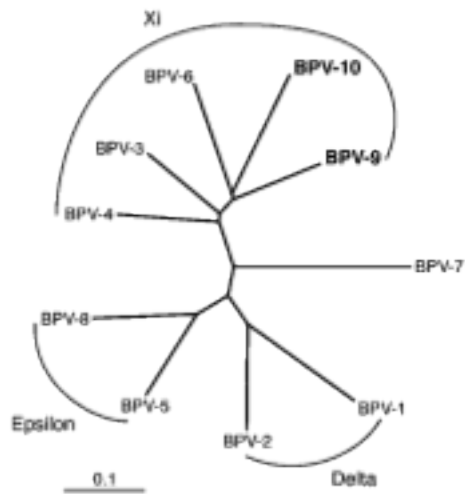
intermediária expressa durante a fase de replicação do DNA viral. E5, E6 e E7 são as proteínas de transformação, em maior ou menor grau, que induzem a replicação e proliferação do DNA na célula, ajudando assim na replicação do DNA viral propriamente dito (21).

O ciclo de vida dos papilomavírus é totalmente dependente da diferenciação dos queratinócitos. O vírus infecta as células basais e libera o genoma no núcleo. O genoma viral episomal começa expressando as proteínas E que mantêm os queratinócitos num estado proliferativo. Os queratinócitos continuam a se dividir, também se diferenciam, e o genoma viral tipicamente mantido em um baixo número de cópias passa por muitas rodadas de replicação, auxiliado por E4. As proteínas L são expressas na camada granular, onde começam a encapsular o genoma viral, e os vírus infecciosos maduros são liberados com a queratina (21, 25). Como muitos vírus, o papilomavírus pode estabelecer uma infecção latente. Neste caso, o genoma viral pode ser encontrado no epitélio normal, sem sinais clínicos de doença. No entanto, o genoma viral também pode residir nos linfócitos, tanto em bovinos como em humanos (9).

Atualmente, os papilomavírus formam um grupo com centenas de vírus diferentes. Estudos têm mostrado que os PVs infectam epitélio em humanos e animais, causando lesões benignas hiperproliferativas, comumente chamadas de verrugas ou papilomas, que podem ocasionalmente progredir para câncer de células escamosas ou menos comumente adenocarcinoma.

### 1.2.2. Agente etiológico: *Papilomavírus bovino*

O Papilomavírus bovino (BPV) também pertence à família *Papillomaviridae*. Até o momento foram caracterizados dez tipos (Figura 5). Esses tipos virais estão incluídos nos gêneros *Deltapapillomavirus* (BPV-1 e 2), *Epsilonpapillomavirus* (BPV-5 e 8) e *Xipapillomavirus* (BPV-3, 4, 6, 9 e 10) (26-28). Apenas o BPV-7 ainda não tem gênero descrito (29). Em se tratando do tropismo celular e as lesões ocasionadas, seis tipos de BPV podem ser classificados em dois subgrupos: o subgrupo A (BPV-1, 2 e 5) compreende os fibropapilomavírus, e o subgrupo B (BPV-3, 4 e 6) abrange os papilomavírus epiteliotrópicos (10). Com o uso de métodos moleculares, foram descritos 16 supostos novos tipos virais de BPV (30, 31).



Fonte: (27)

Figura 5. Árvore filogenética dos gêneros *Deltapapillomavirus* (BPV-1 e 2), *Epsilonpapillomavirus* (BPV-5 e 8) e *Xipapillomavirus* (BPV-3, 4, 6, 9 e 10).

O genoma dos BPVs também é constituído por uma fita dupla de DNA circular que contém 10 seqüências abertas de leitura (*open reading frames* – ORF), distribuídas em duas regiões principais (E e L), conforme a fase de transcrição (10). O segmento inicial (*early* - E) é constituído por oito ORFs e o segmento tardio (*late* – L) contém duas ORFs. Entre os segmentos E e L existe ainda um outro segmento denominado LCR (*long control region*). O segmento E codifica proteínas não-estruturais, o segmento L codifica as proteínas estruturais L1 e L2 e o LCR contém elementos promotores e reguladores da replicação viral. O capsídeo viral é formado pelas proteínas L1 e L2. A proteína gênero-específica L1, principal proteína do capsídeo, contém epítomos que induzem anticorpos neutralizantes e, mesmo na ausência do genoma e da outra proteína, pode formar partículas semelhantes a vírions (32). Os genes E codificam produtos que são necessários para a replicação do DNA viral e transcrição e podem subverter a proliferação celular, em última análise conduzindo à transformação celular. Assim, a proteína E1 tem como função a replicação do DNA viral (24), e o produto do gene E2 está envolvido no controle da transcrição e replicação do DNA viral.

Como os vírus da família *Papillomaviridae* não podem ser cultivados em sistemas de culturas celulares, o diagnóstico é baseado na identificação do DNA viral por meio das técnicas de *Southern blot*, *Dot blot* e amplificação do DNA por PCR (33). O diagnóstico pode



ser feito também pela observação visual associada ao aspecto epidemiológico e manejo ao qual o animal é submetido, sendo necessário realizar diagnóstico diferencial com granulomas infecciosos (tuberculose, actinomicose, dermatose nodular), lesões crostosas da febre aftosa e dermatofilose. Porém, a menor sensibilidade e, em algumas situações, a demora para a conclusão dos resultados estimularam o desenvolvimento dos métodos moleculares para o diagnóstico do BPV, sendo ainda de elevado custo para os produtores de gado (13, 14).

Estudos têm mostrado que a infecção pelo BPV-1 e -2 no gado pode estar relacionada ao surgimento de verrugas na pele; o aparecimento de papilomatose e câncer do trato gastrointestinal superior pode estar associado ao BPV-4; papilomatose nas tetas e úbere (BPV-1, -5 e -6), pênis (BPV-1) e câncer de bexiga (BPV-1 e -2). O câncer no trato gastrointestinal superior e bexiga urinária pode se desenvolver quando associado às interações entre o vírus, carcinógenos químicos e imunossupressores presentes na samambaia (9). O BPV-3 foi isolado na Austrália a partir de um papiloma epitelial da pele, mas muito pouco é conhecido sobre sua biologia (22). O BPV-7 e -8 estão associados a lesões na pele e tetas; e os BPV-9 e -10 estão associados a lesões nas tetas (34).

Os papilomavírus podem ser detectados e caracterizados por PCR com primers consensos concebidos a partir de genes que codificam as proteínas L1, L2, E6 e E7. Os dois conjuntos de primers FAP59/FAP64 e MY09/MY11 são amplamente utilizados para a identificação de papilomavírus humano, bovino e em outros animais (12). Ensaio de PCR a partir de primers degenerados que amplificam fragmentos parciais do gene L1, seguido de sequenciamento, têm demonstrado a presença de inúmeros tipos de BPV em rebanhos bovinos de diversas regiões geográficas (35).

### **1.3. Biossensores**

#### *1.3.1. Definição*

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), o biossensor é um dispositivo que contém um transdutor e receptor integrado que é capaz de fornecer informações analíticas quantitativas ou semi-quantitativas, usando um elemento de reconhecimento biológico (36). Essencialmente, o biossensor incorpora um elemento de reconhecimento biológico em estreita proximidade ou integrado a um transdutor de sinal, o

qual fornece um sistema de detecção específico para um analito alvo. O propósito de um biossensor é fornecer a informação rápida, em tempo real e confiável sobre a composição bioquímica do seu ambiente circundante. Idealmente, é um dispositivo que é capaz de responder de forma contínua (37). Um biossensor contém basicamente dois componentes conectados em série: um sistema de reconhecimento químico ou molecular denominado **biorreceptor** e um **transdutor** físico-químico (36). O elemento de reconhecimento biológico ou biorreceptor é um componente crucial e sua função é dar seletividade para que o sensor responda apenas a um analito particular ou biomoléculas de interesse, evitando assim a interferência de outras substâncias. O transdutor é o outro componente do biossensor que também desempenha um papel importante em termos de conversão do evento de reconhecimento em um sinal elétrico (36, 38).

### *1.3.2. Classificação dos biossensores*

Os biossensores basicamente podem ser classificados de duas formas: de acordo com o mecanismo biológico que confere especificidade (biorreceptor) e de acordo com o modo de transdução de sinal (transdutor). Alternativamente, uma combinação dos dois também tem sido descrita.

#### *1.3.2.1 De acordo com o biorreceptor*

Os biossensores são denominados com base nas biomoléculas que estão presentes na reação para detecção do analito de interesse. Com isso, os biossensores podem ser classificados em:

a) Enzimáticos: quando os dispositivos utilizam uma enzima como elemento de reconhecimento biológico, cujo princípio baseia-se numa reação catalisada pela enzima sobre analito de interesse. Dessa forma, um consumo contínuo de substrato é realizado através do biocatalisador imobilizado sobre o sensor (39).

b) Imunossensores: a operação do biossensor é baseada na interação do analito com macromoléculas. Um dos exemplos mais comuns são os biossensores que operam a partir de reações imunoquímicas, ou seja, ligação do antígeno a um anticorpo específico. A formação

de tais complexos antígeno-anticorpo pode ser detectada sob condições em que interações não específicas são minimizadas (40).

c) Microbiológicos: dispositivos que combinam uma célula microbiológica imobilizada. A vantagem do uso de células microbiológicas como biocatalisadores reside, principalmente, no fato de que as mesmas têm a capacidade de se adaptarem a condições adversas sem perderem a sensibilidade, ao contrário do que ocorre com as enzimas (41).

d) De DNA ou Genossensores: baseiam-se na detecção de ácidos nucleicos a partir do evento da hibridização. Nesses modelos, uma sonda imobilizada no biossensor deve ser capaz de reconhecer uma sequência complementar alvo de interesse (42).

#### *1.3.2.2 De acordo com o transdutor*

a) Piezoelétricos: a detecção piezoelétrica trabalha com o princípio de que as variações de frequência de um cristal de quartzo oscilante correspondem a alterações na massa, como resultado de um evento de reação ou bioreconhecimento bioquímicos. Os principais tipos de sensores piezoelétricos são o de microbalança de cristal de quartzo (QCM) e o de onda acústica de superfície (38).

b) Ópticos: envolvem a detecção direta do analito de interesse ou detecção indireta através de sondas opticamente marcadas. Em geral, há pelo menos quatro tipos de biossensores usando os princípios da tecnologia óptica: absorção / reflexão, quimioluminescência, fluorescência e fosforescência. A quantificação desses analitos de interesse pelo transdutor óptico é realizada por medidas do índice de refração, quantidade de luz absorvida ou propriedades fluorescentes das moléculas analisadas (43).

c) Magnéticos: a biomolécula de reconhecimento é imobilizada sobre uma superfície magnética, como, por exemplo, esferas magnéticas, e o sinal é detectado por magnetorresistência gigante. Esse efeito se manifesta quando ocorre um decréscimo significativo da resistência elétrica sob a aplicação de um campo magnético externo (44-46).

d) Eletroquímicos: implicam na transferência de carga de um eletrodo para outra fase que pode ser um sólido ou líquido e essa transferência de carga é gerada a partir de uma reação eletroquímica entre o biorreceptor e o analito alvo de interesse (47).

#### 1.4. Biossensores Eletroquímicos

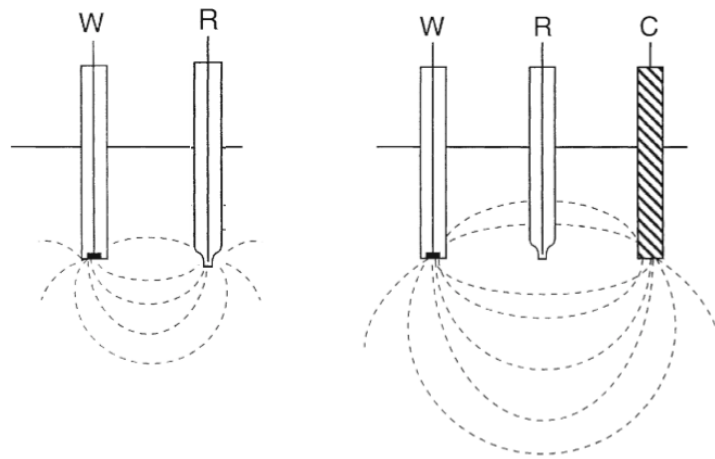
Dentre os transdutores classificados, os eletroquímicos vêm se destacando na comunidade científica devido a diversas vantagens: dentre elas, aplicação em diferentes áreas de interesse. Esses transdutores são desenvolvidos a partir de um conjunto de eletrodos cujo sistema pode ser constituído por dois ou três eletrodos (Figura 6). O eletrodo de trabalho é usualmente constituído por um metal condutor, como platina, carbono, ouro, paládio, entre outros. O eletrodo de referência é usualmente constituído por prata/cloreto de prata (Ag/AgCl). E um terceiro eletrodo auxiliar ou contra eletrodo, constituído por platina ou carbono, pode ser incluído no sistema (48).

O eletrodo de trabalho é um eletrodo do sistema eletroquímico que funciona como um transdutor e responde ao sinal de excitação, além da concentração de uma substância de interesse na solução que está sendo investigada, ou seja, é onde ocorre a reação de interesse; também permite o fluxo de corrente suficientemente grande para efeito de alterações significativas dentro de uma duração normal de medição (49).

O eletrodo de referência é utilizado para fechar o circuito, ou seja, a reação de interesse ocorre na superfície do eletrodo de trabalho, que pode ser uma reação de oxidação ou redução. Ao mesmo tempo, no eletrodo de referência, ocorre uma outra reação redox, separada da reação no eletrodo de trabalho. É necessário que a reação no eletrodo de referência não interfira na reação no eletrodo de trabalho. Para aplicações práticas, a reação que ocorre no eletrodo de referência deve ser altamente reversível, não contribuindo para a reação no eletrodo de trabalho (50). Quando utilizado um sistema com dois eletrodos, a corrente flui através do eletrodo de referência. Nessa condição, o potencial do eletrodo de referência pode não ser estável ao longo do tempo. E quanto menor o eletrodo de trabalho, menor é o risco de afetar o potencial do eletrodo de referência. No trabalho com microeletrodos (eletrodos com as dimensões de suas partes ativas na faixa de micrômetros ou menor), como eletrodos de trabalho, o uso do sistema com dois eletrodos é justificado. Se o

sistema de três eletrodos é usado, o eletrodo de referência é carregado apenas com uma corrente muito pequena; essa corrente está na faixa de picoampere (pA) (48).

O eletrodo auxiliar ou contra eletrodo é utilizado num sistema com três eletrodos. Nesse sistema, a corrente flui entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar. O contra eletrodo geralmente consiste de um fio de platina de grande área de superfície colocado diretamente na solução teste. Uma vez que a corrente flui através do eletrodo auxiliar, ele deve ter uma área de superfície suficientemente grande em relação ao eletrodo de trabalho para prevenir limitações da corrente que flui no circuito total (51).



Fonte: (48) (adaptado)

Figura 6. Esquema do fluxo de corrente num sistema eletroquímico com dois eletrodos e com três eletrodos. Eletrodo de trabalho (W), eletrodo de referência (R) e eletrodo auxiliar (C).

Os biossensores eletroquímicos abrangem um grupo de transdutores que podem ser utilizados conforme a aplicabilidade ou a necessidade do método. Os transdutores eletroquímicos compreendem os potenciométricos, condutimétricos, impedimétricos, amperométricos e voltamétricos.

Transdutores **potenciométricos** envolvem a determinação da diferença de potencial entre um indicador e um eletrodo de referência, ou dois eletrodos de referência separados por uma membrana seletiva, quando não há corrente significativa fluindo entre eles. O transdutor pode ser um eletrodo íon-seletivo (ISE), que é um sensor eletroquímico baseado em filmes finos ou membranas seletivas como elementos de reconhecimento (36). Os dispositivos

potenciométricos mais comuns são eletrodos de pH (52); vários outros eletrodos seletivos de íons ( $F^-$ ,  $I^-$ ,  $CN^-$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $NH_4^+$ ) ou gás ( $CO_2$ ,  $NH_3$ ) estão disponíveis. As diferenças de potencial entre esses indicadores e os eletrodos de referência são proporcionais ao logaritmo da atividade iônica ou da fugacidade do gás (ou concentração), como descrito pela equação de Nernst-Donnan. A equação de Nerst é definida pela diferença de potencial na interface para as atividades das espécies ( $i$ ) na fase amostral ( $s$ ) e na fase eletrodo (53):

$$E = E_0 + \frac{RT}{Z_i F} \ln \frac{a_i^s}{a_i^e} \quad \text{donde,}$$

$E_0$  é potencial padrão do eletrodo;  $a_i$  é a atividade do íon;  $R$  é a constante do gás universal;  $T$  é a temperatura absoluta;  $F$  é a constante de Faraday; e  $Z_i$  é a valência do íon (Wang *et al.*, 2008). Trabalhos têm sido realizados no desenvolvimento de biossensores potenciométricos para quantificar a concentração de uréia, a partir da enzima urease imobilizada sobre um eletrodo modificado quimicamente (54) e um outro sistema de detecção potenciométrica para quantificação de fosfato a partir das enzimas purina nucleosídeo fosforilase e xantina oxidase como biorreceptores (55).

Transdutores **condutimétricos** são baseados na medida da condutividade dos eletrólitos, que varia quando o sistema de reação é exposto a diferentes ambientes. Este efeito é baseado na mudança do número de cargas carregadas no eletrólito. A condutividade é uma função linear da concentração de íons (47). Trabalhos com esse tipo de transdutor têm sido publicados como, por exemplo, um biossensor condutimétrico para detecção do herbicida atrozina (56).

Transdutores **impedimétricos** ou espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) combinam a análise de ambas as propriedades resistivas e capacitivas de materiais, com base na perturbação de um sistema em equilíbrio por um pequeno sinal de excitação de amplitude sinusoidal. O potencial do EIS, que é a impedância do sistema, pode ser detectado através de uma ampla faixa de frequências de corrente alternada (AC) (57). Diversos estudos têm demonstrado a aplicação desses transdutores. Segundo a literatura, os biossensores impedimétricos podem ser utilizados a partir de eletrodos modificados com filmes poliméricos e imobilizados com citocromo C, como elemento de reconhecimento, para determinação da concentração de  $H_2O_2$  (58). Os biossensores impedimétricos também foram

usados para quantificar a concentração da albumina sérica em humanos para avaliar a função hepática (59).

Transdutores **amperométricos** baseiam-se na medição da corrente resultante da oxidação ou redução eletroquímica de espécies eletroativas, ou seja, reação eletroquímica fundamentada na relação corrente-potencial. A principal característica desses transdutores é a aplicação de um potencial constante num eletrodo de trabalho ou num arranjo de eletrodos em relação a um eletrodo de referência que também pode servir como eletrodo auxiliar, se as correntes forem baixas. A corrente resultante está diretamente relacionada com a concentração das espécies eletroativas ou sua taxa de produção ou consumo (47, 50, 52, 60). Como certas espécies químicas são oxidadas ou reduzidas num eletrodo inerte, os elétrons podem ser transferidos do analito para o eletrodo de trabalho ou vice-versa. A direção do fluxo de elétrons depende das propriedades do analito e pode ser controlada pelo potencial elétrico aplicado no eletrodo de trabalho (47, 50, 52).

Transdutores **voltamétricos** também se baseiam na relação corrente-potencial, porém, nesses biossensores voltamétricos, o potencial aplicado é na forma de varredura, numa velocidade constante em função do tempo, diferentemente dos transdutores amperométricos, que operam com um potencial fixo (Bronzino, 2000; Ronkainen *et al.*, 2010). Alguns autores consideram os sensores amperométricos como uma subdivisão dos voltamétricos (50). A partir dessa característica de varredura de potencial, esses transdutores voltamétricos podem operar em diferentes técnicas de medição; conseqüentemente, a respectiva resposta da relação corrente-potencial para cada técnica será diferente. Em geral, os biossensores voltamétricos examinam o efeito da concentração para detecção de analitos, sob a característica corrente-potencial envolvida na reação de redução ou oxidação. A taxa de transferência de massa para detecção de analitos sobre a superfície do eletrodo e a cinética de reação faradaica ou transferência de cargas na superfície do eletrodo afetam diretamente a relação corrente-potencial. Essa transferência de massa pode ser realizada através de uma migração iônica, como resultado de um gradiente de potencial elétrico; uma difusão sobre uma diferença de potencial químico ou gradiente de concentração; e transferência de massa (concentração analítica de uma substância que está presente em todo eletrodo ou solução sem fluxo algum de corrente), pela propagação natural ou forçada. A cinética de reação do eletrodo e os processos de transferência de massa contribuem para a taxa dos processos faradaicos em uma célula eletroquímica. Isso fornece a base para a operação do biossensor voltamétrico. Várias técnicas

para controlar tanto o potencial ou corrente são usadas para simplificar a análise da medida voltamétrica (50).

### 1.5. Principais Técnicas Voltamétricas

Os biossensores voltamétricos podem ser operados num modo de varredura linear, cíclica ou de pulso. **Voltametria de varredura linear** envolve um aumento linear no potencial aplicado, a uma velocidade constante entre um potencial inicial e final. O potencial aplicado ao eletrodo de trabalho varia linearmente com o tempo e essa técnica possibilita a aplicação de velocidades de varredura relativamente elevadas (até  $1000 \text{ mV s}^{-1}$ ). A corrente total lida, a partir dessa técnica, envolve as correntes faradaica e capacitiva. A corrente faradaica é uma corrente correspondente à redução ou à oxidação de alguma substância química e representa a soma algébrica de todas as correntes faradaicas que fluem através de um eletrodo de trabalho. A corrente capacitiva é uma corrente que flui num circuito elétrico, mas que não está relacionada com as reações de redução ou oxidação dos substratos. A curva corrente *versus* potencial usualmente mostra um pico de corrente num potencial em que ocorre a reação de oxidação ou redução. A altura do pico de corrente pode ser usada para a quantificação da concentração do analito de interesse (Figura 7) (50).

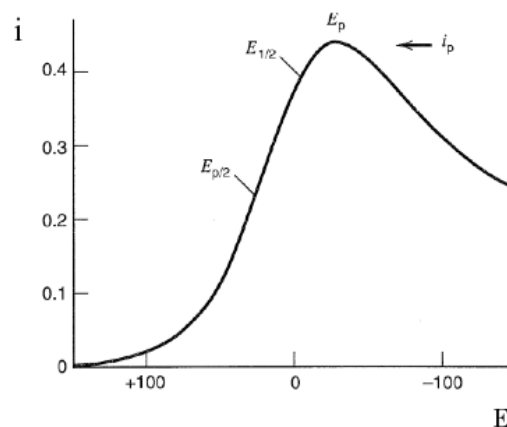
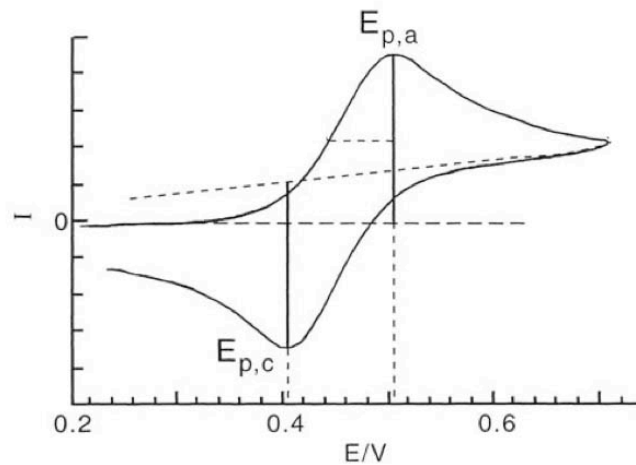


Figura 7. Voltametria de varredura linear onde  $i_p$  representa a corrente total medida no sistema eletroquímico.

A **voltametria cíclica** é similar à voltametria de varredura linear exceto que o potencial do eletrodo retorna para seu potencial inicial, aplicado numa velocidade constante. A varredura cíclica normalmente gera dois picos de corrente que correspondem às reações de



oxidação e redução (Figura 8). Nestas circunstâncias, o valor do pico de corrente pode relacionar a correspondente reação de oxidação e redução (50).



Fonte: (48)

Figura 8. Gráfico da voltametria cíclica (corrente *versus* potencial).  $E_{p,a}$  é o pico de potencial anódico (pico de oxidação) e  $E_{p,c}$  é o pico de potencial catódico (pico de redução).

**Voltametria de pulso diferencial** é outra técnica bastante empregada nas análises eletroquímicas. Trata-se da aplicação de pulsos de potencial crescente com amplitude fixa no eletrodo de trabalho. Nesse modelo, a corrente é lida duas vezes: uma antes da aplicação do pulso ( $S_1$ ) e outra ao final do pulso ( $S_2$ ). A corrente plotada no gráfico *versus* o potencial aplicado é a variação entre a corrente capacitiva ( $S_1$ ) e a corrente faradaica ( $S_2$ ), ou seja, instrumentalmente, a corrente faradaica (desejável) é subtraída da corrente capacitiva (ruído). O objetivo desse princípio é a obtenção de uma corrente final livre de ruído (Figura 9).

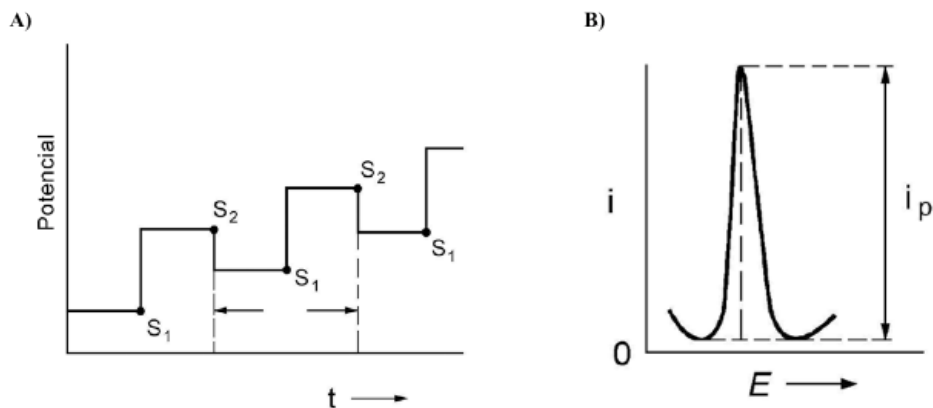


Figura 9. A) Gráfico do potencial aplicado em função do tempo em que  $S_1$  determina a corrente capacitiva e  $S_2$  determina a corrente faradaica. B) Voltamograma de pulso diferencial (corrente *versus* potencial) em que o pico de corrente  $i_p$  representa a corrente livre de ruído.

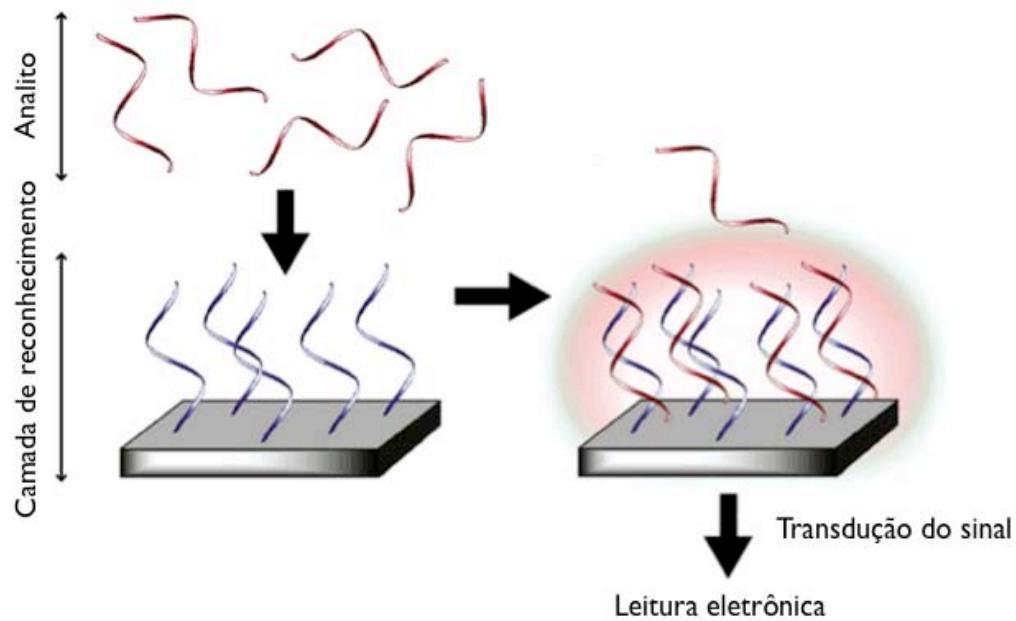
## 1.6. Biossensores Eletroquímicos de Ácidos Nucléicos

Os biossensores podem ser classificados pelo biorreceptor ou pelo transdutor empregado; ou a junção das duas classificações (ver seção 1.3.1.), como é o caso dos biossensores de DNA eletroquímicos ou genossensores eletroquímicos. Os biossensores de DNA eletroquímicos aliam a detecção de ácidos nucleicos com aos transdutores eletroquímicos.

Recentemente, um grande número de trabalhos publicados que envolve a detecção eletroquímica baseada em DNA tem surgido. Esses tipos de sensores combinam camadas de ácido nucleico com transdutores eletroquímicos para produzirem um biossensor que fornece uma plataforma simples, precisa e de baixo custo para o diagnóstico do paciente (42, 61-67).

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), um biossensor eletroquímico baseado em ácidos nucleicos é um dispositivo que integra ácido nucleico (natural ou biomimético oligo- e polinucleotídeo) como um elemento de reconhecimento biológico, e um eletrodo, como o transdutor eletroquímico. O fator determinante para que um biossensor seja classificado de ácido nucleico é a presença de uma sonda (fita de DNA, RNA ou PNA) ligada na superfície de um transdutor eletroquímico. Esses biossensores pertencem à família de sensores químicos, que transformam estímulos bioquímicos de um analito em relação ao ácido nucleico numa informação analiticamente útil. O produto de uma interação de algum ácido nucleico com um analito ou outro ácido nucleico pode ser detectado ou sua concentração determinada eletroquimicamente depois da acumulação sobre a superfície do eletrodo (68). Do ponto de vista da química eletroanalítica, o biossensor eletroquímico baseado em ácidos nucleicos representa um eletrodo modificado com ácido nucleico, que é usado principalmente em modelos de detecções voltamétricas, cronopotenciométricas (68) e impedimétricas (47).

O princípio básico de funcionamento de um biossensor de ácido nucleico eletroquímico é o reconhecimento de uma outra molécula alvo de ácido nucleico a partir do evento da hibridização. Uma fita simples ligada ao transdutor, quando colocada em contato com o alvo, promove a formação de um híbrido (Figura 10) que, a partir de técnicas eletroquímicas, é capaz de identificar ou quantificar esse evento (69, 70).



Fonte: Adaptado de (42)

Figura 10. Esquema do funcionamento de um biossensor de ácido nucléico eletroquímico. As sondas em azul ligadas ao transdutor são os elementos de reconhecimento e as fitas em vermelho são as moléculas a serem detectadas.

### 1.6.1. Biorreceptores

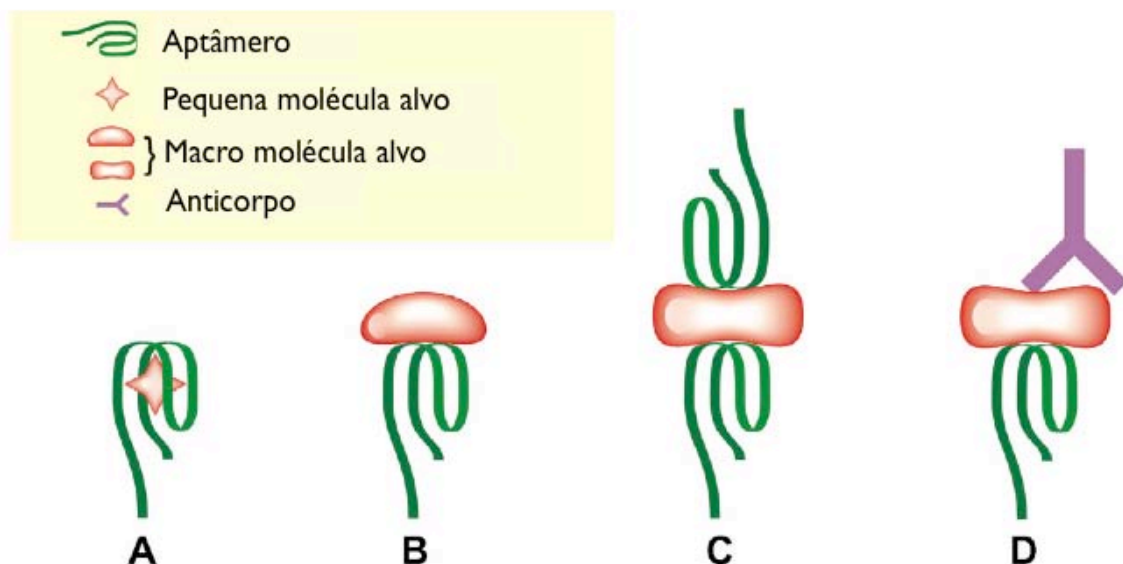
Têm sido utilizados dois modelos de biorreceptores para o desenvolvimento dos biossensores de ácidos nucléicos. Na maioria dos trabalhos publicados, pode-se encontrar sequências oligonucleotídicas (DNA ou PNA) e, recentemente, o uso de aptâmeros de ácidos nucléicos. Usualmente, esses biorreceptores são denominados de sondas nos trabalhos publicados na literatura (71). Vários tipos de ácidos nucléicos (DNA e RNA), naturais ou sintéticos, DNA cromossômico e genoma plasmidial podem ser detectados por genossensores a partir dessas sondas (52, 68, 72).

Os biorreceptores são moléculas previamente selecionadas, levando-se em conta sua elevada especificidade para o analito alvo, e comumente eles são imobilizados em um transdutor para formar um sensor funcional (72). As sondas de DNA fita simples (ssDNA) podem ser encontradas na maioria dos trabalhos, porém também são usadas fitas simples de PNA (ácido nucléico peptídico). O PNA é um DNA mimético sintético que contém ligações 2-aminoetilglicina, em vez dos ligantes fosfodiéstericos com cargas negativas presentes nos oligonucleotídeos. As sondas de PNA são particularmente convenientes para a detecção de

mal-pareamento de base única (mutações de ponto, SNPs), porque a estabilidade do híbrido DNA-PNA é fortemente influenciada por um mal-pareamento de base única (68, 71, 73, 74).

Aptâmeros de ácidos nucleicos são oligonucleotídeos de fita simples (principalmente DNA ou RNA), originários da seleção *in vitro* a partir de bibliotecas de sequências aleatórias, cujo objetivo é obter uma sonda com elevada afinidade de ligação para uma determinada biomolécula alvo. O termo “aptâmero” deriva do latim *aptus* que significa “caber” e enfatiza a relação entre aptâmero e seu alvo. Aptâmeros, mediante a ligação com o seu alvo, promovem uma associação com o alvo, de modo que se tornam uma parte intrínseca da estrutura do ácido nucleico (68).

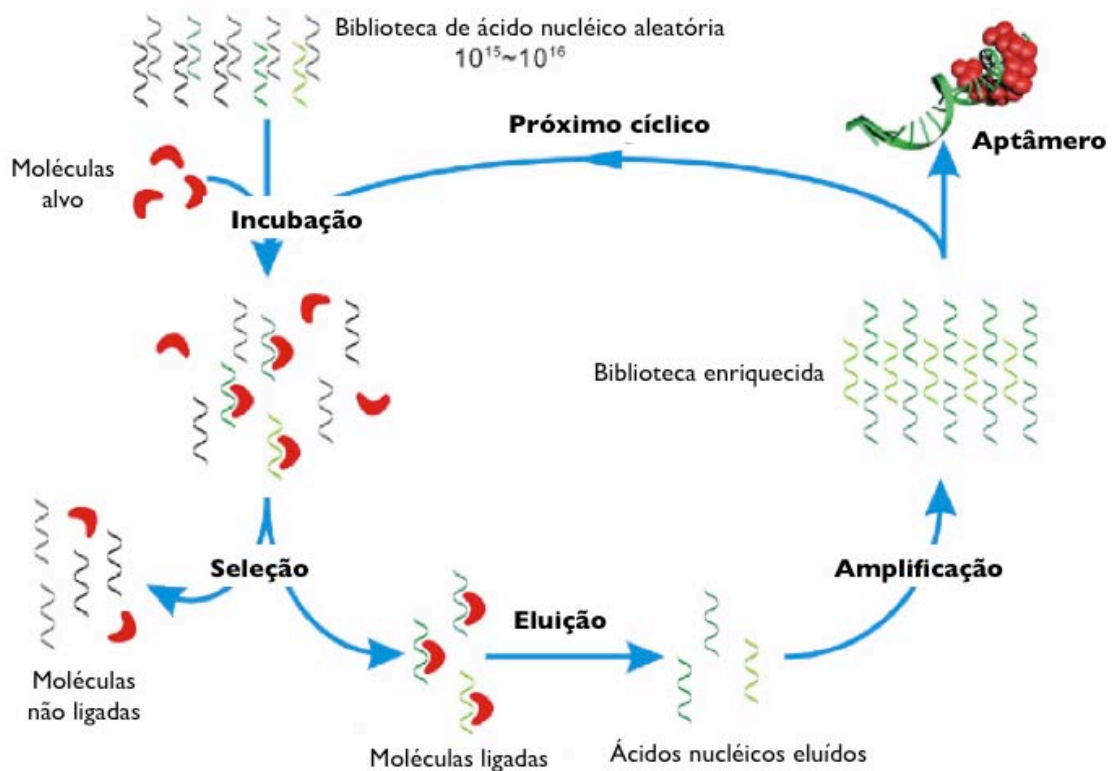
Os aptâmeros são rapidamente selecionados a partir de um processo chamado SELEX (evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial), cujo objetivo é se ligarem seletivamente a moléculas inorgânicas de baixo peso, orgânicas ou proteínas alvos (Figura 11). Em solução, as cadeias de nucleotídeos sintéticos formam interações intra-moleculares que dobram as moléculas de aptâmeros em uma forma tridimensional complexa. A única forma do aptâmero permite que ele se ligue firmemente e seletivamente com sua molécula-alvo. O processo de seleção para os aptâmeros tem sido realizado desde 1990 (75).



Fonte: Adaptado de (76)

Figura 11. Formas de ligações dos aptâmeros com seus respectivos alvos. A) Pequena molécula alvo envolvida pelo aptâmero; B) Formato de ligação com único sítio; C) Formato de ligação com duplo sítio (sanduíche); D) Formato de ligação sanduíche com um aptâmero e um anticorpo.

Um aptâmero para uma desejada molécula alvo é escolhido a partir de um conjunto de sequências aleatórias (DNA e RNA), geradas com métodos de síntese de oligonucleotídeo, automatizada por ciclos sucessivos de ligação com a molécula alvo immobilizada, seguido da remoção do material não ligado e, em seguida, replicam-se os ácidos nucleicos ligados por PCR, para outra rodada de SELEX (Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial) (Figura 12). Escolhido o aptâmero depois de vários ciclos de SELEX, pode-se também modificá-lo quimicamente para aumentar sua estabilidade e afinidade a uma molécula alvo (76-78).



Fonte: Adaptado de (76)

Figura 12. Esquema da síntese de aptâmeros utilizando o sistema SELEX (Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial). Uma biblioteca de ácidos nucleicos aleatórios é incubada com moléculas alvo; em seguida as moléculas não-ligadas são separadas das moléculas ligadas. Os ácidos nucleicos ligados são eluídos, amplificados por PCR e submetidos a um novo ciclo. De 6 a 12 ciclos consecutivos são realizados e a biblioteca final enriquecida é clonada e sequenciada.

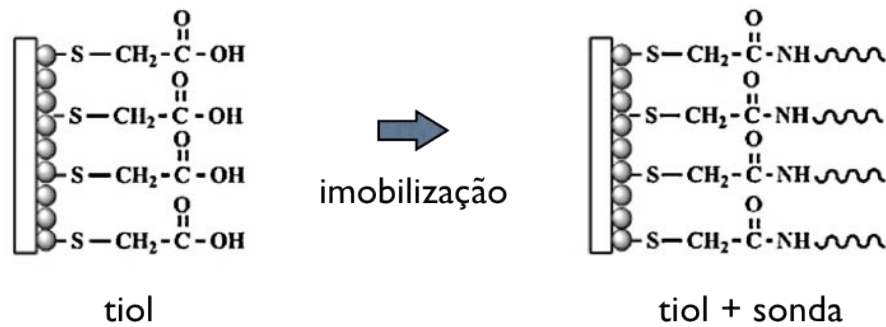
### 1.6.2. Métodos de imobilização

O processo de imobilização é um dos fatores de fundamental importância para a funcionalidade e integridade dos biossensores. Trata-se de um procedimento no qual a sonda é ligada ao transdutor. Nessa etapa, condições experimentais devem ser otimizadas para cada aplicação em especial. Uma grande quantidade de técnicas pode ser utilizada nos biossensores (72, 79).

A **ligação não-covalente** tem sido um método bastante utilizado para a imobilização da sonda. A adsorção de ácido nucléico sobre um transdutor imerso em solução diluída de ácido nucléico (para criar filmes finos de ácido nucléico), bem como uma evaporação de pequenos volumes de solução de ácido nucléico a seco (para criar camadas mais grossas de ácidos nucléicos) são normalmente utilizadas como formas da adsorção física de ácido nucléico. Essa ligação é mais forte nos eletrodos de mercúrio e de alguns carbonos e pode envolver, dependendo da estrutura do ácido nucléico e da carga na superfície do eletrodo, interações hidrofóbicas e/ou eletrostáticas das bases de ácidos nucléicos (68). A ligação não-covalente pode ser realizada a partir de uma adsorção direta sobre o transdutor, utilizando a aplicação de um potencial controlado numa solução, contendo a sonda e o eletrodo de trabalho imerso (80); ou a partir de uma fina camada polimérica formada sobre o eletrodo de trabalho (81, 82).

A **ligação por afinidade** é outra técnica bastante utilizada na imobilização. Um sistema avidina-biotina extremamente forte é também frequentemente usado para imobilizar ácido nucléico biotinizado no seu terminal 5', usando avidina conectada diretamente aos transdutores baseados em carbono. Esses esquemas têm inúmeras variações dependendo da forma de ligação da avidina. Por exemplo, ela pode ser fisicamente adsorvida; ligada através de uma outra molécula de biotina; incluída na pasta de carbono; ligada com glutaraldeído, incorporada em hidrogel, entre outras (68).

Outra técnica de imobilização é a **adsorção química**, que se baseia na formação de monocamadas (self-assembled monolayer - SAM). A SAM é uma camada organizada de moléculas anfífilas em que uma das extremidades dessas moléculas apresenta afinidade por um substrato (Figura 13). O tiol e outros derivados contendo enxofre podem ser utilizados para imobilizar os oligonucleotídeos ou PNA nos transdutores (68).



Fonte: Adaptado de (83)

Figura 13. Processo de imobilização de ácidos nucleicos a partir de uma monocamada de grupamento tiol.

A **ligação covalente** é uma técnica bastante utilizada no processo de imobilização.

Esse procedimento envolve a imobilização através de uma extremidade da molécula de ácido nucleico sem danificar as bases, com o intuito de preservar a integridade do DNA para o reconhecimento específico e, portanto, eficiente hibridização. A imobilização de ácido nucleico pode ser bem controlada, e moléculas inespecíficas e fracamente ligadas à superfície do transdutor podem ser removidas (69).

### 1.6.3. Métodos de detecção

Após o reconhecimento da sonda imobilizada sobre a superfície do eletrodo de trabalho, a partir da hibridização ou outro modelo de reconhecimento, os biossensores eletroquímicos de ácidos nucleicos devem ser capazes de identificar ou quantificar estas ligações. Esse processo de detecção pode acontecer de forma direta ou indireta (47).

O modelo de **detecção direta** é baseado na atividade eletroquímica dos ácidos nucleicos, sejam naturais ou oligonucleotídeos sintéticos, que pode ser conferida pela eletroatividade de seus componentes, nucleobases e resíduos de açúcar, a partir de reações de redução ou oxidação. Essa detecção foi primeiramente elucidada sobre um eletrodo de mercúrio e, recentemente, tem sido demonstrada sobre eletrodos de ouro, carbono, eletrodos modificados com polímeros (47, 68). As bases presentes nos ácidos nucleicos (guanina, citosina, timina e adenina) possuem atividade eletroquímica, porém as mais eletroativas são as adeninas e as guaninas. Trabalhos têm mostrado o potencial de oxidação das adeninas e guaninas na faixa de potencial em torno de 1,2 e 0,9 V, respectivamente. Ou seja, ao aplicar-se

um potencial, fixo ou de varredura, essas bases apresentaram picos de corrente nos seus respectivos potenciais (65, 84, 85). A guanina é a base mais eletroativa entre os nucleotídeos presentes nos ácidos nucléicos. A partir de análise eletroquímica, a guanina apresenta uma oxidação  $2e^- - 2H^+$  na ligação N7=C8, formando o 8 oxoguanina. A identificação do dano oxidativo no DNA genômico, a partir das guaninas, é bastante utilizada para avaliar o nível de desnaturação de sequências nucleotídicas (86, 87).

Outro artifício utilizado para identificar o reconhecimento sonda-alvo é o uso de indicadores ou intercaladores de hibridização, sendo chamado de **deteccção indireta**. A vantagem desse método em relação à detecccção direta é o aumento do sinal de resposta, sem a necessidade do uso de amplificadores de sinais elétricos nos biossensores, o que aumenta os custos. Em geral, estruturas químicas, como azul de metileno (88), ferroceno (53), polianilina (89), rutênio (90), 2-nitroacridona (91), entre outras, possuem afinidade por algumas bases presentes na sequência ou apresentam potencial de intercalação na dupla hélice do DNA ou RNA (Figura 14). Muitos estudos têm sido realizados com o azul de metileno como indicador de hibridização por causa da afinidade com as moléculas de DNA. É amplamente conhecida essa afinidade do azul de metileno pelo DNA, e dois possíveis mecanismos de interação têm sido demonstrados na literatura. Essas ligações podem ocorrer pela interação eletrostática com as cargas negativas dos grupos fosfatos presentes nos ácidos nucléicos ou pela interação entre as bases de guanina, principalmente no DNA de fita simples (92, 93).

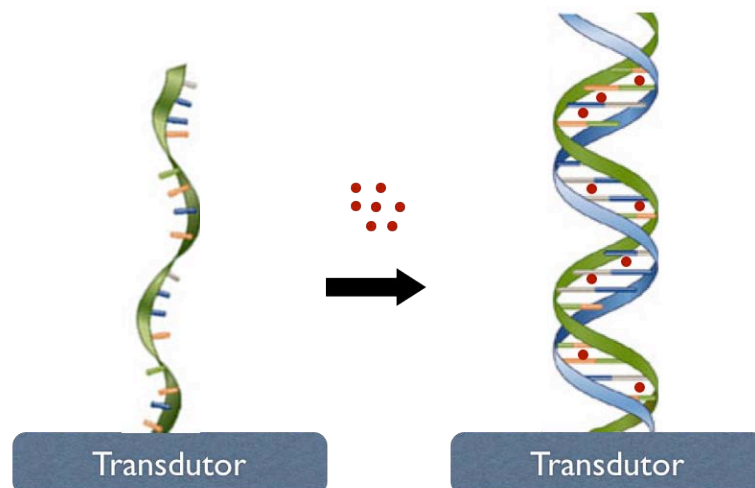


Figura 14. Modelo representativo da detecccção indireta utilizando indicadores de hibridização. Após o evento da hibridização (sonda-alvo) o indicador (estruturas em vermelho) é acumulado na dupla hélice formada para detecccção do sinal de corrente.



Outro modelo que vem sendo estudado na detecção indireta é a síntese de sequências nucleotídicas com uma substância reveladora acoplada em uma das extremidades da fita, isto é, o alvo, ao se ligar a esse modelo de sonda promove a revelação da hibridização (Figura 15). Outra forma é a síntese de sondas com um grupamento químico ligado em uma das extremidades da fita, porém, para que ocorra a revelação do sinal, é necessário que um outro indicador, depois de acumulado ao híbrido, se ligue a esse grupamento químico e revele o sinal (94).

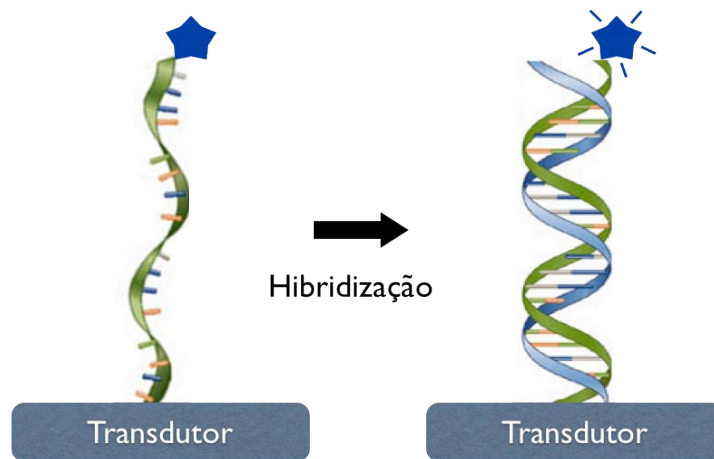


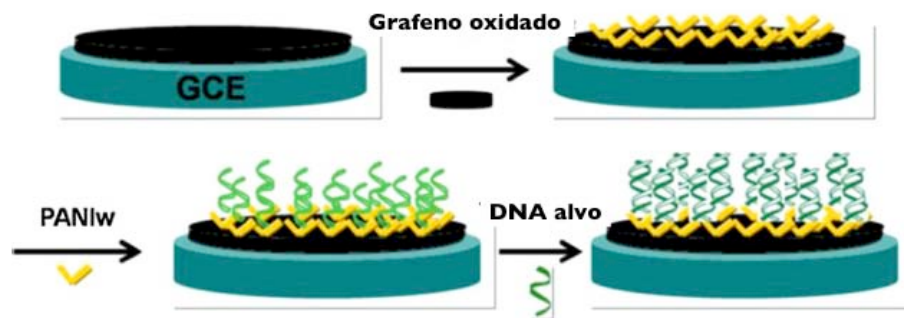
Figura 15. Modelo representativo da detecção indireta utilizando indicadores de hibridização. A sonda imobilizada sobre o transdutor apresenta uma estrutura química reveladora acoplada que, ao se ligar com o alvo, promove uma liberação de sinal elétrico.

#### 1.6.4. Aplicações dos biossensores eletroquímicos de ácidos nucleicos

Diversos avanços tecnológicos importantes têm sido criados, os quais nos permitem, com ferramentas necessárias, desenvolver novas tecnologias para monitorar eventos de reconhecimento e interações sobre dispositivos sólidos e em soluções (42). Segundo a literatura, mais da metade dos biossensores usados para detecção de patógenos e vírus são baseados em transdutores eletroquímicos. Além disso, um número de reportagens tem demonstrado a importância desses biossensores na análise clínica e ambiental (38). Outras vantagens importantes para a transdução eletroquímica são as seguintes: baixo custo; elevada sensibilidade; possibilidade de leitura em solução turva; facilmente miniaturizados, ou seja, adequados para a microfabricação; operam em baixa potência; e sua instrumentação é relativamente simples. Essas características fazem com que os biossensores de ácidos

nucléicos eletroquímicos sejam altamente atrativos para o monitoramento em campo de doenças infecciosas e até mesmo de agentes de guerras biológicas (38).

Modelos de transdutores eletroquímicos baseados em grafeno têm sido desenvolvidos para detecção de ácidos nucleicos. O grafeno, camada uniforme de carbono de alta condutividade, pode ser acoplado sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo junto com a polianilina como um método para imobilização de sonda e amplificação de sinal elétrico na detecção da hibridização (95).



Fonte: Adaptado de (95)

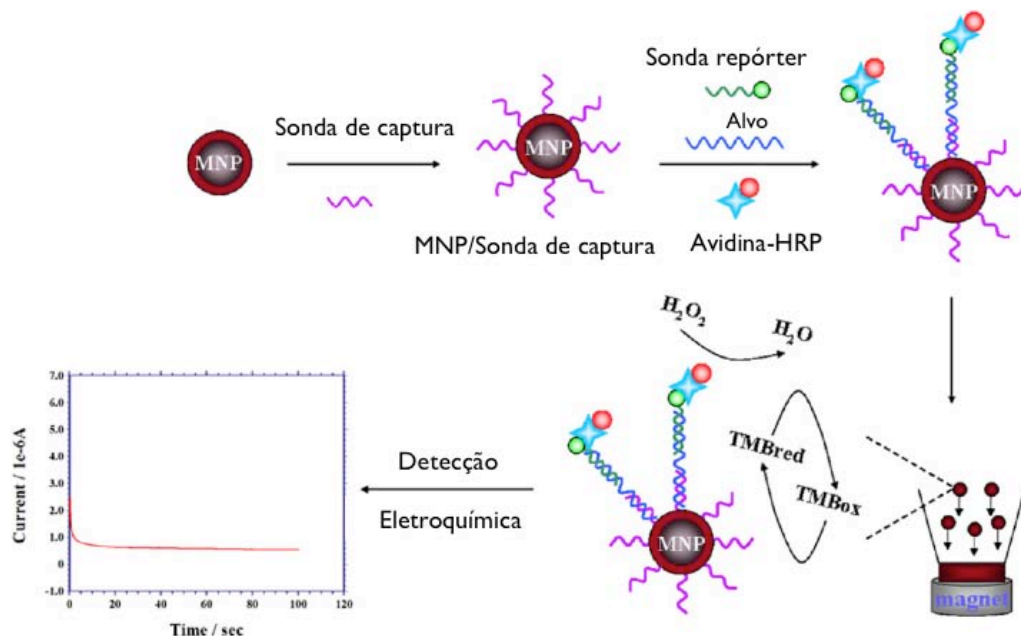
Figura 16. Preparação de eletrodo eletroquímico modificado com grafeno e polianilina para detecção da hibridização. GCE: eletrodo de carbono vítreo; Camada de grafeno oxidado sobre o eletrodo; PANIw: camada de polianilina sobre o grafeno (camada por camada); DNA alvo hibridizado com a sonda imobilizada sobre o transdutor modificado.

O uso de biossensores tem sido aplicado na detecção da dengue. Uma sonda específica do vírus da dengue tipo 1 foi imobilizada sobre eletrodos de carbono por adsorção direta a partir de um pulso fixo, e em seguida, com o evento da hibridização entre uma sequência complementar, foi possível identificar o híbrido (65). A partir de método de detecção indireta, com o uso do indicador azul de metileno, também foi possível identificar sequências de dengue (88). Outro biossensor para detecção da dengue foi desenvolvido, utilizando o ferroceno como intercalador da hibridização (53).

Outros trabalhos para detecção de vírus têm sido publicados. Um modelo de biossensor para o diagnóstico da influenza (tipo A) a partir de uma sonda específica biotinilada e imobilizada por intermédio do complexo biotina-avidina foi capaz de identificar sequências complementares para o vírus (96). Através de um sistema de multi-eletrodos foi possível a identificação dos vírus HIV-1 e HIV-2 simultaneamente, ou seja, sondas de DNA-

hairpin específicas para esses vírus foram imobilizadas sobre vários eletrodos de ouro; a partir da acumulação do azul de metileno, foram identificados, por voltametria e impedimetria, os alvos específicos (97). O vírus da hepatite também tem sido modelo de estudo para a construção de biossensores. Um biossensor eletroquímico utilizando o 2,9-dimetil-1,10-fenotrolina cobalto com indicador de hibridização foi desenvolvido para detecção do vírus da hepatite B (98). Uma pequena sequência de hepatite C 3a foi detectada através do biossensor, utilizando uma monocamada de sonda baseada em PNA sobre um transdutor de ouro (62).

Diversos biossensores de DNA eletroquímicos têm sido propostos para a detecção de micro-organismos. A partir de sondas tioladas e imobilizadas sobre eletrodos de ouro foram detectados, por voltametria, genes específicos relacionados a espécies de micro-organismos *Trichoderma harzianum* (99). Um outro biossensor utilizando sonda tiolada sobre eletrodo de ouro foi usado para detectar a *Neisseria gonorrhoeae*, micro-organismo causador de doenças sexualmente transmissíveis, a partir de amostras das regiões uretral e endogenital de pacientes (100). Para a detecção da *Escherichia coli*, um modelo foi proposto baseado na utilização de nanoesferas magnéticas compostas por  $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Au}$  cujo princípio foi a imobilização de sondas de captura sobre essas esferas e, por conseguinte, essas esferas modificadas eram postas em contato com outra sonda-reporte que continha a avidina e reagia quando hibridizava com a sequência alvo (Figura 17) (94).



Fonte: Adaptado de (94)

Figura 17. Modelo de detecção com sondas de capturas imobilizadas em nanoesferas.

Investigações de propriedades antioxidantes de extraído de plantas também têm sido objeto de estudo. Um biossensor com uma sonda dsDNA imobilizada, quando colocado em contato com extraídos de plantas, era capaz de identificar propriedades antioxidantes a partir dos sinais de oxidação das guaninas, concluindo que, quanto menores os sinais de oxidação, maiores eram as atividades antioxidantes das plantas (101). Biossensores, utilizando eletrodos de nanotubos de carbono modificados com poli-L-lisina para promover a imobilização de sondas, foram usados na identificação de fragmentos de genes presentes em plantas transgênicas (102).

## Referências

1. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Bovinos e Bubalinos; 2011. Available from: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>.
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção Pecuária; 2011. 33 p.
3. Brandini JC. Doenças de bovinos confinados. Campo Grande: Embrapa; 1996 [cited 2011 13 de outubro de 2011]; Available from: <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc65/index.html>.
4. Claus MP, Vivian D, Lunardi M, Alfieri AF, Alfieri AA. Análise filogenética de papilomavírus bovino associado com lesões cutâneas em rebanhos do Estado do Paraná. *Pesq Vet Bras.* 2007;27:314-8.
5. Rebhun WC. Doenças do gado leiteiro: Roca; 2000.
6. Colorado State University. Biosecurity for livestock shows and fairs: Warts; 2011. Available from: <http://coloradodisasterhelp.colostate.edu/prefair/disease/dz/Warts.html>.
7. General Veterinary Pathology. Disturbances of cell growth: carcinogenesis; 2005. Available from: <http://www.kosvi.com/courses/vpat5200/growth/etionoeslide03.htm>.
8. National Animal Disease Information Service NADIS. Warts (Bovine papillomatosis); 2005. Available from: <http://www.nadis.org.uk/DiseasesCattle/Warts/Warts%20in%20Cattle.htm>.
9. Campo MS. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res.* 2002;89(2): 249-61. Epub 2002/11/26.
10. Campo MS. Bovine papillomavirus and cancer. *Vet J.* 1997;154(3):175-88.
11. Silva LANF, Veríssimo AnCC, Filho PRLV, Fioravanti MCS, Eurides D, Linhares GCF, et al. Eficiência da repetição de diferentes protocolos de tratamentos para papilomatose bovina. *Revista da FZVA.* 2004;153-165(1):153-65.
12. Rai GK, Saxena M, Singh V, Somvanshi R, Sharma B. Identification of bovine papilloma virus 10 in teat warts of cattle by DNase-SISPA. *Vet Microbiol.* 2011;147(3-4): 416-9. Epub 2010/08/31.
13. Santin API, Brito LAB. Verrugas perigosas. Pelotas2004 [cited 2011 12 de outubro de 2011]; 33-5]. Available from: <http://www.grupocultivar.com.br/site/content/artigos/artigos.php?id=314>.

14. Santin API, Brito LAB. Estudo da papilomatose cutânea em bovinos leiteiros: comparação de diferentes tratamentos. *Ciência Animal Brasileira*. 2006;5(1).
15. Souto MdAM, Kommers GD, Barros CSLd, Rech RR, Piazer JVM. Neoplasmas da bexiga associados à hematúria enzoótica bovina. *Cienc Rural*. 2006;36:1647-50.
16. Borzacchiello G, Roperto F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Vet Res*. 2008;39(5):45. Epub 2008/05/16.
17. Wosiacki SR, Reis AnCF, Alfieri AF, Alfieri AA. Papilomavírus bovino tipo 2 na etiologia da hematúria enzoótica bovina. *Semina: Ciências Agrárias*. 2002;23(1):121-30.
18. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17-27. Epub 2004/06/09.
19. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010;401(1):70-9. Epub 2010/03/09.
20. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Virus taxonomy. The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. USA: Elsevier; 2005. 1162 p.
21. Campo MS, Roden RB. Papillomavirus prophylactic vaccines: established successes, new approaches. *J Virol*. 2010;84(3):1214-20. Epub 2009/11/13.
22. Campo MS. Bovine Papillomavirus: old system, new lessons? In: Campo MS, editor. *Papillomavirus Research: From Natural History To Vaccines and Beyond*. Wymondham: Caister Academic Press; 2006. p. 373-88.
23. Kim SY, Kim HJ, Kim H-J. Simple and convenient chromatography-based methods for purifying the pseudovirus of human papillomavirus type 58. *Protein Expr Purif*. 2011;76(1):103-8. Epub 2010/11/10.
24. Lambert PF. Papillomavirus DNA replication. *J Virol*. 1991;65(7):3417-20. Epub 1991/07/01.
25. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005;32 Suppl 1:S7-15. Epub 2005/03/09.
26. Claus MP, Lunardi M, Alfieri AA, Otonel RAA, Sartori D, Fungaro MHP, et al. Multiple bovine papillomavirus infections associated with cutaneous papillomatosis in Brazilian cattle herds. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2009;52:93-8.

27. Hatama S, Nobumoto K, Kanno T. Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. *J Gen Virol*. 2008;89(Pt 1):158-63. Epub 2007/12/20.
28. Tomita Y, Literak I, Ogawa T, Jin Z, Shirasawa H. Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. *Virus Genes*. 2007;35(2):243-9. Epub 2007/02/01.
29. Ogawa T, Tomita Y, Okada M, Shirasawa H. Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. *J Gen Virol*. 2007;88(Pt 7):1934-8. Epub 2007/06/08.
30. Antonsson A, Hansson BG. Healthy Skin of Many Animal Species Harbors Papillomaviruses Which Are Closely Related to Their Human Counterparts. *J Virol*. 2002;76(24):12537-42.
31. Ogawa T, Tomita Y, Okada M, Shinozaki K, Kubonoya H, Kaiho I, et al. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *J Gen Virol*. 2004;85(Pt 8):2191-7. Epub 2004/07/23.
32. Campo MS. Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination. *Trends in Microbiology*. 1995;3(3):92-7.
33. Wosiacki SR, Barreiro MA, Alfieri AF, Alfieri AA. Semi-nested PCR for detection and typing of bovine Papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. *J Virol Methods*. 2005;126(1-2):215-9. Epub 2005/04/26.
34. Nasir L, Campo MS. Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Veterinary Dermatology*. 2008;19(5):243-54.
35. Lunardi M, Claus MP, Alfieri AA, Fungaro MH, Alfieri AF. Phylogenetic position of an uncharacterized Brazilian strain of bovine papillomavirus in the genus Xipapillomavirus based on sequencing of the L1 open reading frame. *Genet Mol Biol*. 2010;33(4):745-9. Epub 2011/06/04.
36. Thevenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification - (Technical Report). *Pure Appl Chem*. 1999;71(12):2333-48.
37. Parkinson G, Pejcic B, editors. *Using Biosensors to Detect Emerging Infectious Diseases*. The Australian Biosecurity Cooperative Research Centre; 2005; Australia: Australian Biosecurity CRC.

38. Pejčić B, Marco RD, Parkinson G. The role of biosensors in the detection of emerging infectious diseases. *Analyst*. 2006;131(10):1079-90.
39. Mao C-J, Chen X-B, Niu H-L, Song J-M, Zhang S-Y, Cui R-J. A novel enzymatic hydrogen peroxide biosensor based on Ag/C Nanocables. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011(0).
40. Silva BV, Cavalcanti IT, Mattos AB, Moura P, Sotomayor Mdel P, Dutra RF. Disposable immunosensor for human cardiac troponin T based on streptavidin-microsphere modified screen-printed electrode. *Biosens Bioelectron*. 2010;26(3):1062-7. Epub 2010/09/25.
41. Lei Y, Chen W, Mulchandani A. Microbial biosensors. *Anal Chim Acta*. 2006;568(1-2):200-10. Epub 2007/09/01.
42. Drummond TG, Hill MG, Barton JK. Electrochemical DNA sensors. *Nat Biotechnol*. 2003;21(10):1192-9. Epub 2003/10/02.
43. Velasco-Garcia MN. Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2009;20(1):27-33.
44. Haun JB, Yoon TJ, Lee H, Weissleder R. Magnetic nanoparticle biosensors. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2010;2(3):291-304. Epub 2010/03/26.
45. Llandro J, Palfreyman JJ, Ionescu A, Barnes CH. Magnetic biosensor technologies for medical applications: a review. *Med Biol Eng Comput*. 2010;48(10):977-98. Epub 2010/06/25.
46. Meyer MHF, Krause H-J, Hartmann M, Miethe P, Oster Jr, Keusgen M. *Francisella tularensis* detection using magnetic labels and a magnetic biosensor based on frequency mixing. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2007;311(1):259-63.
47. Wang Y, Xu H, Zhang J, Li G. Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. *Sensors*. 2008;8(4):2043-81.
48. Scholz F. *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*: Springer; 2010.
49. Surhone LM, Tennoe MT, Henssonow SF. *Working Electrode*: VDM Verlag Dr. Mueller AG & Co. Kg; 2010.
50. Bronzino JD. *The biomedical engineering handbook*: CRC Press; 2000.



51. Bond AM. Broadening electrochemical horizons: principles and illustration of voltammetric and related techniques: Oxford University Press; 2002.
52. Ronkainen NJ, Halsall HB, Heineman WR. Electrochemical biosensors. *Chem Soc Rev.* 2010;39(5):1747-63. Epub 2010/04/27.
53. Teles FR, Prazeres DMF, Lima-Filho JL. Electrochemical Detection of a Dengue-related Oligonucleotide Sequence Using Ferrocenium as a Hybridization Indicator. *Sensors.* 2007;7(11):2510-8.
54. Lakard B, Herlem G, Lakard S, Antoniou A, Fahys B. Urea potentiometric biosensor based on modified electrodes with urease immobilized on polyethylenimine films. *Biosensors and Bioelectronics.* 2004;19(12):1641-7.
55. Adeloju SB, Lawal AT. Fabrication of a bilayer potentiometric phosphate biosensor by cross-link immobilization with bovine serum albumin and glutaraldehyde. *Analytica Chimica Acta.* 2011;691(1-2):89-94.
56. Valera E, Ramón-Azcón J, Sanchez FJ, Marco MP, Rodríguez Á. Conductimetric immunosensor for atrazine detection based on antibodies labelled with gold nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2008;134(1):95-103.
57. Guan JG, Miao YQ, Zhang QJ. Impedimetric biosensors. *J Biosci Bioeng.* 2004;97(4): 219-26. Epub 2005/10/20.
58. Shamsipur M, Kazemi SH, Mousavi MF. Impedance studies of a nano-structured conducting polymer and its application to the design of reliable scaffolds for impedimetric biosensors. *Biosens Bioelectron.* 2008;24(1):104-10. Epub 2008/05/07.
59. Chuang YH, Chang YT, Liu KL, Chang HY, Yew TR. Electrical impedimetric biosensors for liver function detection. *Biosens Bioelectron.* 2011;28(1):368-72. Epub 2011/08/16.
60. Belluzo Ma, Ribone Ma, Lagier C. Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics. *Sensors.* 2008;8(3):1366-99.
61. Chua A, Yean CY, Ravichandran M, Lim B, Lalitha P. A rapid DNA biosensor for the molecular diagnosis of infectious disease. *Biosens Bioelectron.* 2011. Epub 2011/04/05.
62. Hejazi MS, Pournaghi-Azar MH, Ahour F. Electrochemical detection of short sequences of hepatitis C 3a virus using a peptide nucleic acid-assembled gold electrode. *Analytical Biochemistry.* 2010;399(1):118-24.

63. Mandong G, Yanqing L, Hongxia G, Xiaoqin W, Lifang F. Electrochemical detection of short sequences related to the hepatitis B virus using MB on chitosan-modified CPE. *Bioelectrochemistry*. 2007;70(2):245-9.
64. Mascini M, Del Carlo M, Minunni M, Chen B, Compagnone D. Identification of mammalian species using genosensors. *Bioelectrochemistry*. 2005;67(2):163-9.
65. Souza E, Nascimento G, Santana N, Ferreira D, Lima M, Natividade E, et al. Label-Free Electrochemical Detection of the Specific Oligonucleotide Sequence of Dengue Virus Type 1 on Pencil Graphite Electrodes. *Sensors*. 2011;11(6):5616-29.
66. Teles FRR, Fonseca LP. Trends in DNA biosensors. *Talanta*. 2008;77(2):606-23.
67. Wang Q, Zhang B, Lin X, Weng W. Hybridization biosensor based on the covalent immobilization of probe DNA on chitosan, Äimutiwalled carbon nanotubes nanocomposite by using glutaraldehyde as an arm linker. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2011;156(2):599-605.
68. Labuda J, Brett AMO, Evtugyn G, Fojta M, Mascini M, Ozsoz M, et al. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem*. 2010;82(5):1161–87.
69. Palecek E, Jelen F. Electrochemistry of Nucleic Acids. In: Palecek E, Scheller F, Wang J, editors. *Perspectives in Bioanalysis*: Elsevier; 2005. p. 73-173.
70. Tosar JP, Branas G, Laiz J. Electrochemical DNA hybridization sensors applied to real and complex biological samples. *Biosens Bioelectron*. 2010;26(4):1205-17. Epub 2010/09/22.
71. Palecek E, Fojta M, Tomschik M, Wang J. Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage. *Biosens Bioelectron*. 1998;13(6):621-8. Epub 1998/11/26.
72. Caygill RL, Blair GE, Millner PA. A review on viral biosensors to detect human pathogens. *Anal Chim Acta*. 2010;681(1-2):8-15. Epub 2010/11/03.
73. Raoof JB, Ojani R, Golabi SM, Hamidi-Asl E, Hejazi MS. Preparation of an electrochemical PNA biosensor for detection of target DNA sequence and single nucleotide mutation on p53 tumor suppressor gene corresponding oligonucleotide. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2011;157(1):195-201.
74. Wang J. From DNA biosensors to gene chips. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(16):3011-6. Epub 2000/08/10.
75. Keefe AD, Pai S, Ellington A. Aptamers as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(7):537-50.

76. Song S, Wang L, Li J, Fan C, Zhao J. Aptamer-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2008;27(2):108-17.
77. Chiu T-C, Huang C-C. Aptamer-Functionalized Nano-Biosensors. *Sensors*. 2009;9(12):10356-88.
78. Strehlitz B, Nikolaus N, Stoltenburg R. Protein Detection with Aptamer Biosensors. *Sensors*. 2008;8(7):4296-307.
79. Wang J, Zhang S, Zhang Y. Fabrication of chronocoulometric DNA sensor based on gold nanoparticles / poly(L-lysine) modified glassy carbon electrode. *Anal Biochem*. 2010;396(2):304-9.
80. Pournaghi-Azar MH, Hejazi MS, Alipour E. Detection of Human Interleukine-2 Gene Using a Label-Free Electrochemical DNA Hybridization Biosensor on the Basis of a Non-Inosine Substituted Probe. *Electroanalysis*. 2007;19(4):466-72.
81. Cosnier S. Affinity Biosensors Based on Electropolymerized Films. *Electroanalysis*. 2005;17(19):1701-15.
82. Guimard NK, Gomez N, Schmidt CE. Conducting polymers in biomedical engineering. *Progress in Polymer Science*. 2007;32(8-9):876-921.
83. Gao H, Qi X, Chen Y, Sun W. Electrochemical deoxyribonucleic acid biosensor based on the self-assembly film with nanogold decorated on ionic liquid modified carbon paste electrode. *Analytica Chimica Acta*. 2011;704(1-2):133-8.
84. Honeychurch KC, O'Donovan MR, Hart JP. Voltammetric behaviour of DNA bases at a screen-printed carbon electrode and its application to a simple and rapid voltammetric method for the determination of oxidative damage in double stranded DNA. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007;22(9-10):2057-64.
85. Huang KJ, Niu DJ, Sun JY, Han CH, Wu ZW, Li YL, et al. Novel electrochemical sensor based on functionalized graphene for simultaneous determination of adenine and guanine in DNA. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011;82(2):543-9. Epub 2010/11/06.
86. Ferapontova EE. Electrochemistry of guanine and 8-oxoguanine at gold electrodes. *Electrochimica Acta*. 2004;49(11):1751-9.
87. Miroslav F. Detecting DNA Damage with Electrodes. In: Palecek E, Scheller F, Wang J, editors. *Perspectives in Bioanalysis*: Elsevier; 2005. p. 385-431.

88. Souza EM, Nascimento GA, Santana NA, Brunaska D, Lima Filho JL. Development of electrochemical biosensor for virus dengue diagnostic using graphite electrode. *New Biotechnology*. 2009;25, Supplement(0):S378.
89. Chang H, Yuan Y, Shi N, Guan Y. Electrochemical DNA Biosensor Based on Conducting Polyaniline Nanotube Array. *Analytical Chemistry*. 2007;79(13):5111-5.
90. Yan F, Erdem A, Meric B, Kerman K, Ozsoz M, Sadik OA. Electrochemical DNA biosensor for the detection of specific gene related to *Microcystis* species. *Electrochemistry Communications*. 2001;3(5):224-8.
91. Chen J, Zhang J, Wang K, Huang L, Lin X, Chen G. Electrochemical biosensor based on hairpin DNA probe using 2-nitroacridone as electrochemical indicator for detection of DNA species related to Chronic Myelogenous Leukemia. *Electrochemistry Communications*. 2008;10(10):1448-51.
92. Ortiz M, Fragoso A, Ortiz PJ, O'Sullivan CK. Elucidation of the mechanism of single-stranded DNA interaction with methylene blue: A spectroscopic approach. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2011;218(1):26-32.
93. Tran LD, Nguyen BH, Van Hieu N, Tran HV, Nguyen HL, Nguyen PX. Electrochemical detection of short HIV sequences on chitosan/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle based screen printed electrodes. *Materials Science and Engineering: C*. 2011;31(2):477-85.
94. Li K, Lai Y, Zhang W, Jin L. Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@Au core/shell nanoparticle-based electrochemical DNA biosensor for *Escherichia coli* detection. *Talanta*. 2011;84(3):607-13.
95. Bo Y, Yang H, Hu Y, Yao T, Huang S. A novel electrochemical DNA biosensor based on graphene and polyaniline nanowires. *Electrochimica Acta*. 2011;56(6):2676-81.
96. Chung D-J, Kim K-C, Choi S-H. Electrochemical DNA biosensor based on avidin-biotin conjugation for influenza virus (type A) detection. *Applied Surface Science*. 2011;257(22):9390-6.
97. Zhang D, Peng Y, Qi H, Gao Q, Zhang C. Label-free electrochemical DNA biosensor array for simultaneous detection of the HIV-1 and HIV-2 oligonucleotides incorporating different hairpin-DNA probes and redox indicator. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010;25(5):1088-94.
98. Ding C, Zhao F, Zhang M, Zhang S. Hybridization biosensor using 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline cobalt as electrochemical indicator for detection of hepatitis B virus DNA. *Bioelectrochemistry*. 2008;72(1):28-33.

99. Siddiquee S, Yusof NA, Salleh AB, Abu Bakar F, Heng LY. Electrochemical DNA biosensor for the detection of specific gene related to *Trichoderma harzianum* species. *Bioelectrochemistry*. 2010;79(1):31-6. Epub 2009/12/01.
100. Singh R, Sumana G, Verma R, Sood S, Pandey MK, Gupta RK, et al. DNA biosensor for detection of *Neisseria gonorrhoeae* causing sexually transmitted disease. *Journal of Biotechnology*. 2010;150(3):357-65.
101. Mello LD, Hernandez S, Marrazza G, Mascini M, Kubota LT. Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006;21(7):1374-82.
102. Jiang C, Yang T, Jiao K, Gao H. A DNA electrochemical sensor with poly-l-lysine/single-walled carbon nanotubes films and its application for the highly sensitive EIS detection of PAT gene fragment and PCR amplification of NOS gene. *Electrochimica Acta*. 2008;53(6):2917-24.

## CAPÍTULO II

## ARTIGO CIENTÍFICO I

Elsevier Editorial System(tm) for Diagnostic Microbiology and Infectious Disease Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Electrochemical DNA sensor for detection of bovine papillomavirus serotypes from a probe consensus to the different viral types

Article Type: Original Article

Keywords: DNA Biosensor; Electrochemical detection; Bioinformatics; Hybridization; Bovine papillomavirus.

Corresponding Author: Mr. Gustavo Nascimento,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Gustavo Nascimento

Order of Authors: Gustavo Nascimento; Elaine Souza; Danielly Campos-Ferreira; Danyelly Brunaska; José Lima-Filho

Abstract: The purpose of this work was to develop an electrochemical biosensor for bovine papillomavirus (BPV) detection, using a DNA sequence homologous to different BPV serotypes. Differential pulse voltammetry (DPV) was used to investigate the guanines oxidation signals on the surface graphite electrode without and with methylene blue (MB) as indicator. Results revealed that current peak increase in BPV probe and decrease in hybrid. Detection system with MB allowed amplification of the current peak in potential of guanine oxidation compared to detection system without indicator. It was also observed that DNA biosensor presented a loss detection limit of 3.84 nM combined the high sensitivity, stability and fast response compared the techniques currently used for the diagnosis of BPV. Electrochemical DNA biosensor proposed can be used to detect the serotypes BPV-3, 4, 5, 9 and 10, due to BPV probe show 100% homology with these serotypes.

## **Electrochemical DNA sensor for detection of bovine papillomavirus serotypes from a probe consensus to the different viral types**

Gustavo A. Nascimento<sup>a</sup>, Elaine V. M. Souza<sup>a</sup>, Danielly S. Campos-Ferreira<sup>a</sup>, Danyelly Brunaska<sup>a,b</sup>, José L. Lima-Filho<sup>a,b</sup>.

<sup>a</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego s/n, 50670-901 Recife, PE, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Professor Moraes Rego s/n, Campus Universitário, 50670-901 Recife, PE, Brasil

Corresponding author. Tel: +55 81 2126 8484 Fax: +55 81 2126.8485

E-mail address: [galvesn23@gmail.com](mailto:galvesn23@gmail.com) (Gustavo Nascimento)

### **Abstract**

The purpose of this work was to develop an electrochemical biosensor for bovine papillomavirus (BPV) detection, using a DNA sequence homologous to different BPV serotypes. Differential pulse voltammetry (DPV) was used to investigate the guanines oxidation signals on the surface graphite electrode without and with methylene blue (MB) as indicator. Results revealed that current peak increase in BPV probe and decrease in hybrid. Detection system with MB allowed amplification of the current peak in potential of guanine oxidation compared to detection system without indicator. It was also observed that DNA biosensor presented a loss detection limit of 3.84 nM combined the high sensitivity, stability and fast response compared the techniques currently used for the diagnosis of BPV. Electrochemical DNA biosensor proposed can be used to detect the serotypes BPV-3, 4, 5, 9 and 10, due to BPV probe shows 100% homology with these serotypes.

Keywords: DNA Biosensor, Electrochemical detection, Bioinformatics, Hybridization, Bovine papillomavirus, Methylene blue.

## 1. Introduction

Bovine papillomavirus (BPV) is double-stranded DNA virus that can infect cattle and cause lesions in the stratified squamous epithelium of the skin and mucous membranes, as well as fibroepithelial tumors (Antonsson and Hansson, 2002; Campo, 2002; Claus et al., 2008; Yuan et al., 2010). The BPV belongs to the *Papillomaviridae* family and includes ten serotypes BPV-1 to BPV-10 (Claus et al., 2009). These serotypes have been including in the genera *Deltapapillomavirus* (BPV-1 and 2), *Epsilonpapillomavirus* (BPV-5 and 8) and *Xipapillomavirus* (BPV-3, 4, 6, 9 and 10) (Claus et al., 2009; Hatama et al., 2008; Tomita et al., 2007). Only the BPV-7 has not yet described genus (Ogawa et al., 2007). Routinely, BPV diagnosis has been making based on histological findings of the lesions and alterations in cell morphology. While, molecular biology tools such as Southern blot, polymerase chain reaction (PCR) and *in situ* hybridization recently have allowed conclusive diagnosis of the viral DNA in tissue fragments (Claus et al., 2008; Munday and Knight, 2010; Wosiacki et al., 2005). However, these techniques are expensive and their clinical results are not quick. The BPV genome has three different regions: the long control region (LCR) containing the elements regulatory necessary for replication and transcription of the viral DNA and two regions containing open reading frames (ORF) corresponding to early and late gene. The early genes encode non-structural proteins and the region containing the late genes encodes the viral capsid proteins (Borzacchiello and Roperto, 2008; Campo, 2006).

Bioinformatics can be applied in solving various biological problems as genes recognition, identification and analysis of gene expression, protein structure determination and identification of possible differences in the sequences that can promote the development of diseases (Barnes, 2007). Information about the similarity between genomes of organisms is an important resource in the search for functional regions and conserved regions within the same taxonomic group (Chang, 2005; Hardison, 2003; Lee et al., 2010). The sequence analysis assumes a relevant role for the correlation between organisms at the molecular level (Hardison, 2003), highlighting the BPV in this work.

Research for the diagnosis of BPV has attracted considerable interest due to the problems caused in the infected animal and *in vitro* cell systems for isolation BPV have not been obtained to date (Lindsey et al., 2009; Wosiacki et al., 2005). Thus, the use of technological devices such as biosensor can assist in treatment and prevention of bovine papillomatosis. Electrochemical biosensor is an integrated receptor-transducer device, which



is capable of providing selective quantitative or semi-quantitative analytical information using a biological recognition element (Thevenot et al., 1999). The electrochemical detection has been an important tool for the DNA molecules recognition due to its high sensitivity, low cost, and development of portable device (Kwakye et al., 2006; Zhang et al., 2009). The homologous sequence recognition between the BPV types from bioinformatics and its use in developing an electrochemical detection system for the bovine papillomatosis diagnosis was the purpose of this study.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Reagents**

All reagents used were of high purity. Methylene blue (MB) was purchased from SIGMA (USA). Lead silver ink (ELECTRODAG - ACHESON, USA) was used in the production of electrode reference. UltraPure™ DNase/RNase-Free distilled water was purchased from invitrogen (USA). All Oligonucleotides ssDNA were synthesized by Integrated DNA Technologies (USA).

### **2.2. Apparatus**

A conventional two-electrode system was employed in this work. Pencil graphite type 4B (total length 3 cm and 2.5 mm diameter) was used as working electrode. Ag/AgCl was used as reference electrode which was produced for screen-printed using silver ink under gold wire and then dried at 60 °C. Electrochemical analysis was performed by potentiostat (AUTOLAB PGSTAT) and equipped with GPES (4.0.007) software. All hybridization experiments were carried out by a Thermomixer Comfort (Eppendorf).

### **2.3. Bioinformatics**

The complete genome of ten BPV types was collected from the database of the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) corresponding to GenBank accession numbers NC\_001522, NC\_004197, X05817, NC\_004195, AJ620208, NC\_007612, NC\_009752, NC\_010192 and NC\_010193. Subsequently, all BPV (1-10) genomes were aligned using the software CLC Combined Workbench v 3.6.1, to analyze the conserved regions between types searched.

#### 2.4. Bovine papillomavirus oligonucleotides

All oligonucleotides purchased in lyophilized powder were diluted with ultrapure water and stored as stock solution in freezer. Oligonucleotides were diluted from the stock solution in 0.2 M acetate buffer pH 5 for future experiments. Three different oligonucleotides sequences developed from bioinformatics tools were used in this study. The sequences presented the following bases:

BPV probe: 5' - TGG AAA TCT TTT TTT GAA AGG CTT TGG - 3'

BPV target: 5' - CCA AAG CCT TTC AAA AAA AGA TTT CCA - 3'

DNA non-complementary: 5' - CCC CGG ATC ACT GAG ACG - 3'

#### 2.5. Preparation of pencil graphite electrode

The pencil graphite was polished with emery impregnated disc to obtain a smooth surface (surface area of 28.50 mm<sup>2</sup>, approximately) and washed with ultrapure water to remove possible contaminants oligonucleotides. The graphite electrodes were activated electrochemically by applying 1.80 V for 5 min in 0.20 M acetate buffer solution (pH 5). After of the activation, working electrode was washed with ultrapure water.

#### 2.6. Immobilization of the probe DNA

The BPV probe was immobilized on the polished surface of the electrode activated by applying a potential of 0.50 V for 5 min in 0.20 M acetate buffer solution (pH 5) containing oligonucleotides with 300 rpm stirring speed. After working electrode was rinsed with ultrapure water to remove the unbound oligonucleotides.

#### 2.7. Hybridization of target DNA

In hybridization process, the working electrode immobilized with the BPV probe was immersed in a solution containing the DNA target in 0.2 M acetate buffer pH 5, and incubated at 55 °C for 10 min with 300 rpm stirred speed to link the complementary sequences. This temperature is the best for sequences annealing following the company descriptions. Then, the electrode was washed with ultrapure water for removing non-hybridized sequences. The same protocol was applied for the interaction of the BPV probe with non-complementary sequence.

## 2.8. Electrochemical Analysis

For electrochemical signals analysis, the working electrodes modified with the immobilized sequences were immersed in an electrochemical cell containing Tris-HCl buffer pH 7.0. Differential pulse voltammetry (DPV) method was proposed in this work as the measurement system of the current signals. For the oxidation of guanines, it was used the following conditions: potential sweep between 0.5 and 1.2 V, modulation amplitude 50 mV and scan rate 20 mV/s. For the reduction of MB, it was used the following conditions: potential sweep between -0.8 and 0.3 V, modulation amplitude 50 mV and scan rate 20 mV/s. The results were treated using GPES software moving average baseline correction, using a “peak width” of 0.01.

## 2.9. Statistics analysis

Experimental data were analyzed by the software Statistica 8 using parametric tests. To evaluate statistical significance, the one-way ANOVA and post hoc Tukey were used for the comparison of multi independent group data. A level of  $p < 0.05$  was assigned as significant.

# 3. Results

## 3.1. Bioinformatics Analysis

Genomic alignment of the 10 serotypes BPV showed several consensus regions. However, the largest fragment presented 27 nucleotides (5' - TGG AAA TCT TTT TTT GAA AGG CTT TGG - 3'), located in the gene E1 can detect all 10 serotypes. However, the location of this sequence is different in all 10 BPV serotypes. In BPV-1, for instance, the 27-mer sequence was aligned between 2538 and 2564 of its genome, while the BPV-2 was from 2535 to 2561, BPV-3 (2456 to 2482), BPV-4 (2706 to 2732), BPV-5 (2494 to 2520), BPV-6 (2652 to 2678), BPV-7 (2509 to 2535), BPV-8 (2499 to 2525), BPV-9 (2771 to 2797) and BPV-10 (2548 to 2574). The results showed that the sequence consensus of 27 nucleotides had high similarity with all types of BPV. Through BLAST program the similarity was also examined between other species genomes against the sequence found, displaying 100% similarity with serotypes BPV.

In Fig. 1, it was possible to observe that specific region of viral types BPV3, BPV-4,

BPV-5, BPV-9 and BPV-10 showed high conservation. While others (BPV-1, BPV-2, BPV-6, BPV-7 and BPV-8) showed some changes in the nucleotides types, probably some mutation in the viral cycle. DNA nucleotides with background black in Fig. 1 are possible mutations in serotypes sequences, furthermore, the highest variation in gene fragment was observed in BPV-7.

From the conserved sequence between all serotypes BPV, it was developed another complementary sequence (BPV target) that presented the following nucleotides: 5' - CCA AAG CCT TTC AAA AAA AGA TTT CCA - 3'.



**Fig. 1.** Multiple alignment of DNA sequences obtained from 10 BPV serotypes was performed by the CLC Combined Workbench software v 3.6.1. The sequence consensus 27-mer was the fragment chosen for the construction of the work sequence.

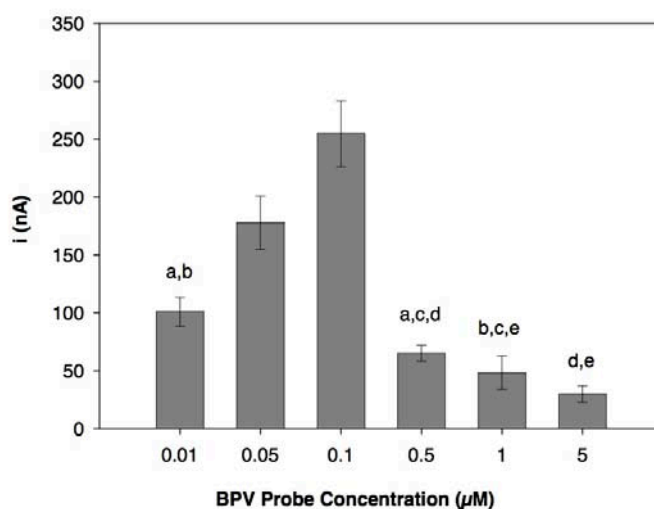
### 3.2. BPV probe concentration in immobilization analysis

BPV probe was immobilized on the graphite electrode for detection of viral serotypes contained more guanine than the complementary sequence. BPV probe contained 7 guanines, while the sequence chosen for the hybridization (BPV target) contained only 2 guanines. The difference in the number of guanines between complementary sequences was important because the current signals measured in the tests represented the guanines oxidation. The difference in the number of guanines was also used for comparison of currents peak generated only in the single strand and the hybrid.

In immobilization process, different BPV probe concentrations (0.01, 0.05, 0.1, 1, 5, 10  $\mu$ M) were used to optimize this process. The purpose of this step was to obtain the lowest concentration of ssDNA together with a better measurable signal without indicator. As shown in Fig. 2, the working electrode immobilized with the BPV probe at a concentration of 0.1  $\mu$ M had the highest current peak ( $255.00 \pm 28.51$  nA). In parametric analysis ANOVA  $p < 0.05$

and post hoc Tukey, concentration of 0.05  $\mu\text{M}$  showed statistical difference compared with the other concentrations. It was also observed that the concentration of 0.1  $\mu\text{M}$  presented statistical difference between the other concentrations, but the peak current was higher than at 0.05  $\mu\text{M}$ .

The concentrations of 0.01  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  and 5  $\mu\text{M}$  showed current peaks  $108.87 \pm 12.4$  nA,  $65.05 \pm 6.86$  nA,  $48.25 \pm 14.31$  nA and  $29.72 \pm 6.97$  nA, respectively. In ANOVA analysis, it was also observed that concentration 0.01  $\mu\text{M}$  presented  $p > 0.05$  compared to 0.5 or 1  $\mu\text{M}$ ; 0.5  $\mu\text{M}$  presented  $p > 0.05$  compared to 1 or 5  $\mu\text{M}$ ; and 1  $\mu\text{M}$  presented  $p > 0.05$  compared to 5  $\mu\text{M}$ . Thus, the concentration of 0.1  $\mu\text{M}$  showed the better response in the process of immobilization due to its good reproducibility and higher guanine oxidation signal combined with low concentration.



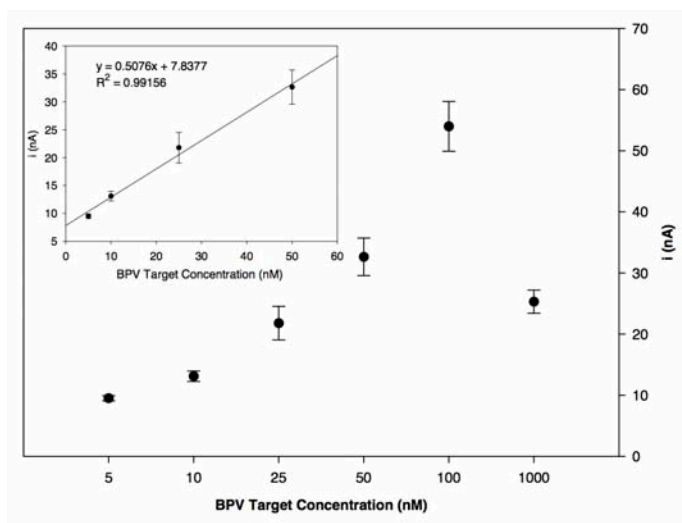
**Fig. 2.** Effect of BPV probe concentration on guanine oxidation signal in immobilization process. Differential pulse voltammetry method was used to analyze the current peaks in the following conditions: initial potential 0.5 V and end potential 1.2 V; modulation amplitude 50 mV and scan rate 20 mV/s. All results were plotted with the means of experiments performed at different BPV probe concentrations. One-way ANOVA analysis indicates significant effects and Tukey's test was used for post hoc analysis ( $p < 0.05$ , 0.05  $\mu\text{M}$  compared to 0.01, 0.1, 0.5, 1 or 5  $\mu\text{M}$ ;  $p < 0.05$ , 0.1  $\mu\text{M}$  compared to 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 or 5  $\mu\text{M}$ ). The letters in common on the columns represent statistical similarity ( $p > 0.05$ ).

### 3.3. BPV target concentration in hybridization analysis

Hybridization step was carried from the annealing temperature of the complementary sequences with agitation. Annealing temperature (55  $^{\circ}\text{C}$ ) used in hybridization allowed the

matching between the different BPV target concentrations and BPV probe (0.1  $\mu\text{M}$ ) immobilized on graphite electrodes. This fact could be verified because the current peak decreased when compared with the probe. The highest peak current observed in the BPV probe was  $255 \pm 28.51$  nA (Fig. 2) while the highest signal observed in the hybrid was  $54 \pm 4.06$  nA (Fig. 3). The concentration 5 nM presented the lowest peak current ( $9.51 \pm 0.30$  nA) among the other concentration of BPV target plotted in Fig. 3. The concentrations of 10, 25, 50, 100 and 1000 nM showed current peaks  $13.11 \pm 0.86$ ,  $21.80 \pm 3.36$ ,  $32.60 \pm 3.07$ ,  $53.99 \pm 4.06$  and  $25.30 \pm 1.90$  nA respectively (Fig. 3).

The calibration curve obtained from oxidation signal regarding to different concentrations of BPV target are shown in Fig. 3. The calibration plotter ( $y = 0.5076x + 7.8377$ ) is linear between 5 nM up to 50 nM with a correlation coefficient of 0.9915 ( $p < 0.00423$ ,  $n = 4$ ). The detection limit of 3.84 nM could be estimated by using  $3\sigma/a$ , where  $\sigma$  was the standard deviation of the blank solution and  $a$  was the slope of the line. The relative standard deviation (RSD) over three independently probe-modified electrodes measured at 5 nM BPV target was 3.1%, indicating a remarkable reproducibility of the detection method.

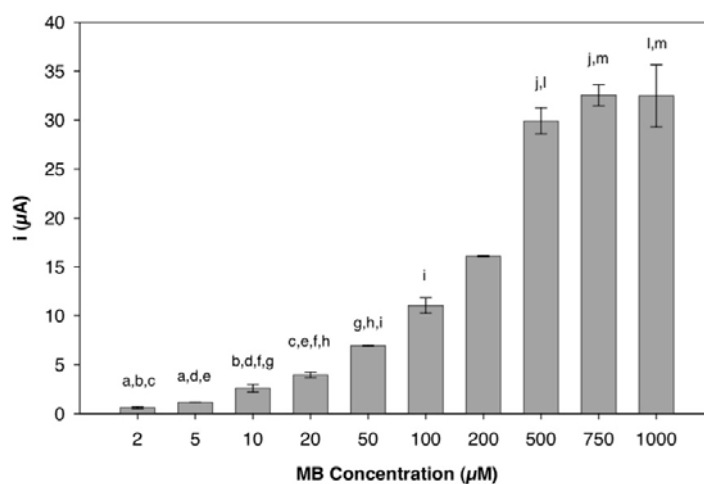


**Fig. 3.** Effect of the BPV target concentration on the current peak in hybridization without indicator. Differential pulse voltammetry method was used to analyze the current peaks in the following conditions: initial potential 0.5 V and end potential 1.2 V; modulation amplitude 50 mV and scan rate 20 mV/s. All results were plotted with the means of experiments performed at different concentrations of BPV target. Inset shows calibration graph at concentration range 5 – 50 nM.

### 3.4. Effect of MB concentration on pencil graphite electrode

For optimization this step, MB reduction on the graphite electrode surface was evaluated using different concentrations this indicator. In all results, MB reduction signal occurred approximately in the potential range -0.22 V.

The concentrations of 500  $\mu\text{M}$ , 750  $\mu\text{M}$  and 1000  $\mu\text{M}$  had the highest current peaks ( $29.90 \pm 1.22 \mu\text{A}$ ,  $32.50 \pm 1.08 \mu\text{A}$  and  $32.50 \pm 4.50 \mu\text{A}$ , respectively) among the other concentration tested (Fig. 4). However, from the parametric analysis (ANOVA - significance level  $p < 0.05$ ), it was not observed statistical difference between the concentrations of 500  $\mu\text{M}$ , 750  $\mu\text{M}$  and 1000  $\mu\text{M}$ . The post hoc Tukey test showed a  $p = 0.5426$  between 500  $\mu\text{M}$  and 750  $\mu\text{M}$ ,  $p = 0.5794$  between 500  $\mu\text{M}$  and 1000  $\mu\text{M}$ , and  $p = 1$  between 750  $\mu\text{M}$  and 1000  $\mu\text{M}$ . Thus, the redox signal saturation occurred at the concentration of 500  $\mu\text{M}$  because it showed the higher reduction signal than the concentrations of 2  $\mu\text{M}$  to 200  $\mu\text{M}$  and its result was statistically similar when compared to concentrations of 750  $\mu\text{M}$  and 1000  $\mu\text{M}$ . Moreover, the concentration of 500  $\mu\text{M}$  showed reproducibility in reduction signals. Therefore, the concentration of 500  $\mu\text{M}$  showed the best response among the requirements for detection of electrochemical signals.



**Fig. 4.** Effect of MB concentration on reduction signal in the graphite electrode. Differential pulse voltammetry method was used to analyze the current peaks in the following conditions: initial potential -0.8 V and end potential 0.3 V; modulation amplitude 50 mV and scan rate 20 mV/s. All results were plotted with the means of experiments performed at different concentrations of MB. One-way ANOVA analysis indicates significant effects and Tukey's test was used for post hoc analysis ( $p < 0.05$ , 200  $\mu\text{M}$  compared to 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500, 750 or 1000  $\mu\text{M}$ ). The letters in common on the columns represent statistical similarity ( $p > 0.05$ ).

### 3.5. Viral detection systems analysis

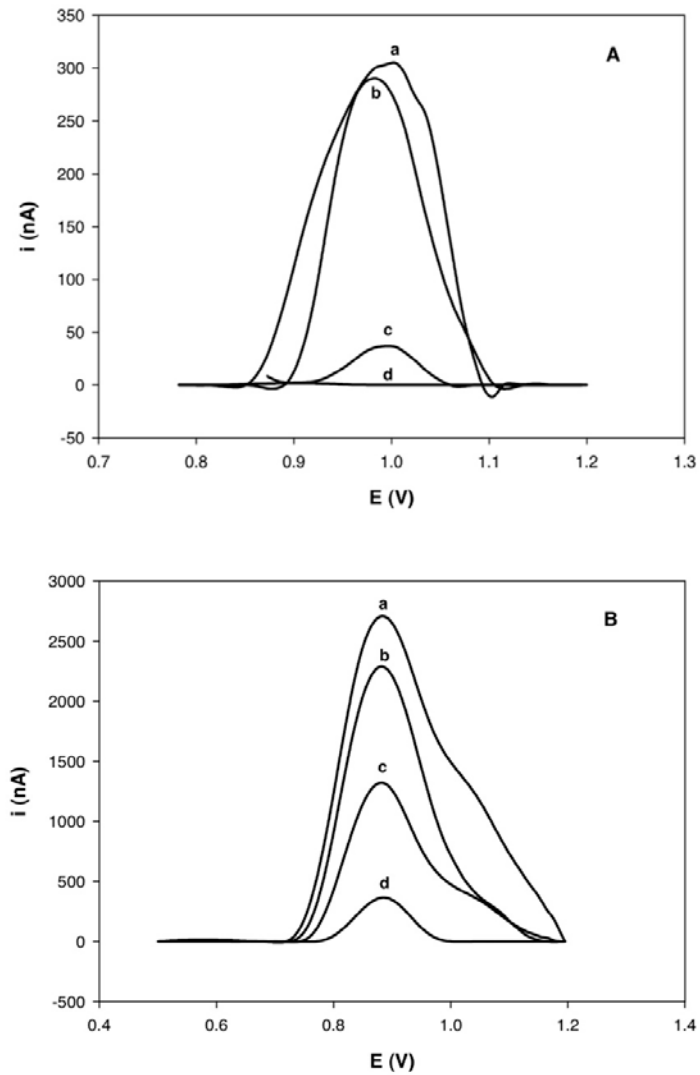
In this work, hybridization detection between BPV probe and BPV target was accompanied by guanines oxidation signals. Two detection systems for the hybridization of BPV sequences were used: guanine oxidation without indicator and guanine oxidation with MB as indicator.

Fig. 5A shows the differential pulse voltammogram of the guanine oxidation using the detection system without indicator. It was observed that the current peak of guanine at the electrode with the hybrid (probe-target) was approximately 88% lower than the signal of the BPV probe immobilized.

Still in Fig. 5A, it was possible to evaluate the selectivity of the detection system using a non-complementary sequence. The differential pulse voltammogram showed the similarity between the current peaks measured at the BPV probe-modified electrode and at the BPV probe-modified electrode after hybridization with non-complementary sequence. This similarity in the results was due to mismatch between the BPV probe and the non-complementary sequence. The mismatching of bases present in the BPV probe allowed the guanines free and contributed to the increase of current peak.

Fig. 5B displayed the differential pulse voltammogram of the BPV probe before hybridization, BPV probe after hybridization with the BPV target and BPV probe after hybridization with DNA non-complementary. The voltammogram showed that all oxidation current peaks of guanine were amplified when accumulated with MB in BPV sequences compared with the detection system without indicator. This occurred due to strong affinity of the MB by guanines. Fig. 5B also showed changes in the position of the oxidation potential of guanine. In addition, the highest current peak was observed in the BPV probe due to the presence of guanines free. While hybrid showed a significant decrease in current peak compared to BPV probe. In the Fig. 5B, BPV probe after hybridization with DNA non-complementary showed a voltammetric oxidation peak a little lower than the BPV probe alone.





**Fig. 5.** (A) Differential pulse voltammograms on the guanine oxidation signal in BPV sequences without indicator; BPV probe  $0.1 \mu\text{M}$  before hybridization (a); oxidation signal after hybridization of the BPV probe  $0.1 \mu\text{M}$  with DNA non-complementary  $0.1 \mu\text{M}$  (b); BPV probe  $0.1 \mu\text{M}$  after hybridization with BPV target  $0.1 \mu\text{M}$  (c); and graphite electrode activated before immobilization (d). (B) Differential pulse voltammograms on the guanine oxidation signal in BPV sequences with indicator MB  $500 \mu\text{M}$ ; BPV probe  $0.1 \mu\text{M}$  before hybridization (a); oxidation signal after hybridization of the BPV probe  $0.1 \mu\text{M}$  with DNA non-complementary  $0.1 \mu\text{M}$  (b); BPV probe  $0.1 \mu\text{M}$  after hybridization with BPV target  $0.1 \mu\text{M}$  (c); and graphite electrode activated before immobilization (d). Experimental conditions as described in Section 2.8.

#### 4. Discussion

Bioinformatics analysis could show different conserved regions in gene E1 from multiple alignment of 10 BPV serotypes sequences. This high conservation in gene E1 can be explained by overlap occurs between the gene E2 in all BPV types (McCauley et al., 2007).

On the other hand, some mutations have been observed in the BPV viral cycle (Campo, 1997). In BPV-1, for example, there are a large number of mutations in specific gene functions that are available for genetic analysis of the complete viral life cycle (McBride et al., 2000).

Among BPVs described in the literature, BPV-7 present high variation in its genome compared to other serotypes, probably because BPV-7 has not phylogeny described. BPV-7 has a distant relationship to other *Papillomavirus* in the phylogenetic tree, suggesting that BPV-7 should be classified in a novel genus of the family *Papillomaviridae* (Ogawa et al., 2007).

From *in silico* analysis of the BPV genome is possible to develop models for diagnostic of viral infection and also detection of mutations in the viral cycle. Mutations points, which include guanine bases in the DNA sequences, can rapidly be detected by using specific interaction of MB with unbound guanine bases (Meric et al., 2002).

Several DNA probes have been used for recognition of target sequences in electrochemical biosensors. Mainly, probes containing guanine. Guanine has been used in many works because it is electroactive and thus generate oxidation signal (Huang et al., 2011). Common pathway for guanine oxidation involves the conversion of guanine to 8-oxo-guanine (Ferapontova, 2004). Some advantages can be found in the use of probes with guanines, such as direct detection of guanine oxidation without a redox mediator (Wang and Zhou, 2002). Another important factor to consider in electrochemical measurement is the number of guanines in the DNA probe. Amount of guanine present in the probe is proportional to the current peak generated during oxidation of the guanine (Pournaghi-Azar et al., 2007). In our study, BPV probe containing 7 guanines showed a high current peak compared to other works (Jin et al., 2007; Mandong et al., 2007).

For hybridization of complementary sequences, many studies have used temperature to form the hybrid (Palecek and Jelen, 2005). We used the melting temperature and agitation parameters for annealing of sequences with base on PCR and microarray techniques that also use theses procedures for hybridization (Baeumner et al., 2003; Koltai and Weingarten-Baror, 2008; Ku et al., 2004; Li and Wang, 2011; Park et al., 2011). In our study, the melting temperature and agitation allowed hybridization between the BPV probe and BPV complementary. This fact could be observed due to the difference of current peak between the probe before hybridization and after hybridization. The hybrid showed a current peak lower

than the probe before hybridization. This decrease had occurred due to matching of the guanines (Souza et al., 2011), blocking their links sites free. According to literature, the decrease in current signal of the sequence hybridized could also be evidenced in the work of Kerman et al., (2002) where current peak was about five times lower than the probe immobilized on gold electrodes. According to Erdem et al., (2002) the hybrid also exhibited decrease current peak by using ribosomal DNA sequence of *Microcystis* spp.

From the preliminary results of the immobilization and hybridization, we performed experiments to amplify guanines oxidation signals. The purpose of this amplification system was to avoid the PCR in biological samples, which can increase the diagnostic cost. A comparative analysis of detection systems with indicator and without indicator could reveal an amplification on guanine oxidation signal, using MB as indicator hybridization. According to literature, the MB has been using as an indicator of hybridization for the affinity with guanines (Jin et al., 2007; Ozkan et al., 2002). In the detection system with indicator, hybrid showed a significant decrease in current peak compared to BPV probe before hybridization. This difference was due to weak interaction between dsDNA and MB compared to ssDNA and MB, resulting in decreased intercalation of MB between the dsDNA (de Souza et al., 2009; Lin et al., 2007).

The selectivity of the sensor was analyzed by a non-complementary sequence. In both detection systems, it was observed mismatch between probe BPV and non-complementary sequence. This mismatch contributed to the increase of peak current (Cheng et al., 2005) and thus, this result was similar to BPV probe before hybridization in both detection systems. However, in detection systems with indicator, the BPV probe after hybridization with DNA non-complementary showed a voltammetric oxidation peak a little lower than the BPV probe alone, due to nonspecific links between non-complementary sequence (Pournaghi-Azar et al., 2007).

In all experiments the position of the guanine oxidation signal varied approximately from 0.80 to 1.00 V. This shift in the guanine peak potential might be related to the different mechanisms of the interaction between electroactive indicators with nucleic acid chains (Hejazi et al., 2010). The change in position of the oxidation guanine potential was also observed in other works (Karadeniz et al., 2003).

According to data analyzed, the reduction or absence of the current peak represented the positive diagnosis for bovine papillomavirus infection in both detection systems.

## 5. Conclusions

In this paper, an efficient DNA electrochemical sensor was developed and further applied to the detection of the bovine papillomavirus. The assay employed one probe consensus of 27-mer found in the multiple alignment of DNA sequences from 10 BPV serotypes. The surface of the modified electrodes is characterized by differential pulse voltammetry. The results presented in this paper allow to differentiate the hybridization of the non-hybridization, with good selectivity, sensitivity and reproducibility. The hybridization shows a decrease in oxidation signal compared to ssDNA whose detection limit observed is 3.84 nM. In the detection system with indicator, MB allows the amplification of the current peak in potential of guanine oxidation. Electrochemical DNA biosensor proposed can be used to detect the serotypes BPV-3, 4, 5, 9 and 10, due to BPV probe shows 100% homology with these serotypes.

## Acknowledgements

The authors are grateful to the financial support received from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA).

## References

- Antonsson, A, Hansson, BG (2002) Healthy skin of many animal species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *J Virol*, 76, 12537-12542.
- Baeumner, AJ, Cohen, RN, Miksic, V, Min, JH (2003) RNA biosensor for the rapid detection of viable Escherichia coli in drinking water. *Biosensors & Bioelectronics*, 18, 405-413.
- Barnes, MR (2007) *Bioinformatics for Geneticists* (2nd ed.). Harlow: John Wiley & Sons, Ltd.
- Borzacchiello, G, Roperto, F (2008) Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Vet Res*, 39, 45.
- Campo, MS (1997) Bovine papillomavirus and cancer. *Vet J*, 154, 175-188.
- Campo, MS (2002) Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res*, 89, 249-261.
- Campo, MS (2006) Bovine Papillomavirus: old system, new lessons? In M. S. Campo Ed, *Papillomavirus Research: From Natural History To Vaccines and Beyond* (pp. 373-388). Wymondham: Caister Academic Press.
- Chang, PL (2005) Clinical bioinformatics. *Chang Gung Med J*, 28, 201-211.

- Cheng, GF, Zhao, J, Tu, YH, He, PA, Fang, YH (2005) A sensitive DNA electrochemical biosensor based on magnetite with a glassy carbon electrode modified by multi-walled carbon nanotubes in polypyrrole. *Anal Chim Acta*, 533, 11-16.
- Claus, MP, Lunardi, M, Alfieri, AA, Otonel, RAA, Sartori, D, Fungaro, MHP, Alfieri, AF (2009) Multiple Bovine Papillomavirus Infections Associated with Cutaneous Papillomatosis in Brazilian Cattle Herds. *Braz Arch Biol Techn*, 52, 93-98.
- Claus, MP, Lunardi, M, Alfieri, AF, Ferracin, LM, Fungaro, MH, Alfieri, AA (2008) Identification of unreported putative new bovine papillomavirus types in Brazilian cattle herds. *Vet Microbiol*, 132, 396-401.
- de Souza, EM, Nascimento, GA, Santana, NA, Brunaska, D, Filho, JLL (2009) Development of electrochemical biosensor for virus dengue diagnostic using graphite electrode. *New Biotechnol*, 25, S378-S378.
- Erdem, A, Kerman, K, Meric, B, Ozkan, D, Kara, P, Ozsoz, M (2002) DNA biosensor for *Microcystis* spp. sequence detection by using methylene blue and ruthenium complex as electrochemical hybridization labels. *Turk J Chem*, 26, 851-862.
- Ferapontova, EE (2004) Electrochemistry of guanine and 8-oxoguanine at gold electrodes. *Electrochim Acta*, 49, 1751-1759.
- Hardison, RC (2003) Comparative genomics. *PLoS Biol*, 1, E58.
- Hatama, S, Nobumoto, K, Kanno, T (2008) Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. *J Gen Virol*, 89, 158-163.
- Hejazi, MS, Pournaghi-Azar, MH, Ahour, F (2010) Electrochemical detection of short sequences of hepatitis C 3a virus using a peptide nucleic acid-assembled gold electrode. *Anal Biochem*, 399, 118-124.
- Huang, KJ, Niu, DJ, Sun, JY, Han, CH, Wu, ZW, Li, YL, Xiong, XQ (2011) Novel electrochemical sensor based on functionalized graphene for simultaneous determination of adenine and guanine in DNA. *Colloid Surface B*, 82, 543-549.
- Jin, Y, Yao, X, Liu, Q, Li, J (2007) Hairpin DNA probe based electrochemical biosensor using methylene blue as hybridization indicator. *Biosens Bioelectron*, 22, 1126-1130.
- Karadeniz, H, Gulmez, B, Sahinci, F, Erdem, A, Kaya, GI, Unver, N, Kivcak, B, Ozsoz, M (2003) Disposable electrochemical biosensor for the detection of the interaction between DNA and lycorine based on guanine and adenine signals. *J Pharm Biomed Anal*, 33, 295-302.
- Kerman, K, Ozkan, D, Kara, P, Meric, B, Gooding, JJ, Ozsoz, M (2002) Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes. *Anal Chim Acta*, 462, 39-47.
- Koltai, H, Weingarten-Baror, C (2008) Specificity of DNA microarray hybridization: characterization, effectors and approaches for data correction. *Nucleic Acids Res*, 36, 2395-2405.
- Ku, WC, Lau, WK, Tseng, YT, Tzeng, CM, Chiu, SK (2004) Dextran sulfate provides a quantitative and quick microarray hybridization reaction. *Biochem Bioph Res Co*, 315, 30-37.
- Kwakye, S, Goral, VN, Baeumner, AJ (2006) Electrochemical microfluidic biosensor for nucleic acid detection with integrated minipotentiostat. *Biosens Bioelectron*, 21, 2217-2223.
- Lee, SH, Vigliotti, VS, Pappu, S (2010) Signature sequence validation of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in clinical specimens. *J Clin Pathol*, 63, 235-239.

- Li, PCH, Wang, L (2011) Microfluidic DNA microarray analysis: A review. *Anal Chim Acta*, 687, 12-27.
- Lin, XH, Wu, P, Chen, W, Zhang, YF, Xia, XH (2007) Electrochemical DNA biosensor for the detection of short DNA species of Chronic Myelogenous Leukemia by using methylene blue. *Talanta*, 72, 468-471.
- Lindsey, CL, Almeida, ME, Vicari, CF, Carvalho, C, Yagui, A, Freitas, AC, Becak, W, Stocco, RC (2009) Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. *Genet Mol Res*, 8, 310-318.
- Mandong, G, Yanqing, L, Hongxia, G, Xiaoqin, W, Lifang, F (2007) Electrochemical detection of short sequences related to the hepatitis B virus using MB on chitosan-modified CPE. *Bioelectrochemistry*, 70, 245-249.
- McBride, AA, Dlugosz, A, Baker, CC (2000) Production of infectious bovine papillomavirus from cloned viral DNA by using an organotypic raft/xenograft technique. *P Natl Acad Sci USA*, 97, 5534-5539.
- McCauley, S, de Groot, S, Mailund, T, Hein, J (2007) Annotation of selection strengths in viral genomes. *Bioinformatics*, 23, 2978-2986.
- Meric, B, Kerman, K, Ozkan, D, Kara, P, Erensoy, S, Akarca, US, Mascini, M, Ozsoz, M (2002) Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue. *Talanta*, 56, 837-846.
- Munday, JS, Knight, CG (2010) Amplification of feline sarcoid-associated papillomavirus DNA sequences from bovine skin. *Vet Dermatol*.
- Ogawa, T, Tomita, Y, Okada, M, Shirasawa, H (2007) Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. *J Gen Virol*, 88, 1934-1938.
- Ozkan, D, Erdem, A, Kara, P, Kerman, K, Gooding, JJ, Nielsen, PE, Ozsoz, M (2002) Electrochemical detection of hybridization using peptide nucleic acids and methylene blue on self-assembled alkanethiol monolayer modified gold electrodes. *Electrochem Commun*, 4, 796-802.
- Palecek, E, Jelen, F (2005) Electrochemistry of Nucleic Acids. In F. S. Emil Palecek & J. Wang (Eds, *Perspectives in Bioanalysis* (Vol. Volume 1, pp. 73-173): Elsevier.
- Park, S, Zhang, Y, Lin, S, Wang, TH, Yang, S (2011) Advances in microfluidic PCR for point-of-care infectious disease diagnostics. *Biotechnol Adv*.
- Pournaghi-Azar, MH, Hejazi, MS, Alipour, E (2007) Detection of human interleukine-2 gene using a label-free electrochemical DNA hybridization biosensor on the basis of a non-inosine substituted probe. *Electroanal*, 19, 466-472.
- Souza, E, Nascimento, G, Santana, N, Ferreira, D, Lima, M, Natividade, E, Martins, D, Lima, J (2011) Label-Free Electrochemical Detection of the Specific Oligonucleotide Sequence of Dengue Virus Type 1 on Pencil Graphite Electrodes. *Sensors-Basel*, 11, 5616-5629.
- Thevenot, DR, Toth, K, Durst, RA, Wilson, GS (1999) Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification - (Technical Report). *Pure Appl Chem*, 71, 2333-2348.
- Tomita, Y, Literak, I, Ogawa, T, Jin, Z, Shirasawa, H (2007) Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. *Virus Genes*, 35, 243-249.

- Wang, J, Zhou, FM (2002) Scanning electrochemical microscopic imaging of surface-confined DNA probes and their hybridization via guanine oxidation. *J Electroanal Chem*, 537, 95-102.
- Wosiacki, SR, Barreiro, MA, Alfieri, AF, Alfieri, AA (2005) Semi-nested PCR for detection and typing of bovine Papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. *J Virol Methods*, 126, 215-219.
- Yuan, ZQ, Bennett, L, Campo, MS, Nasir, L (2010) Bovine papillomavirus type 1 E2 and E7 proteins down-regulate Toll Like Receptor 4 (TLR4) expression in equine fibroblasts. *Virus Res*, 149, 124-127.
- Zhang, S, Wu, Z, Shen, G, Yu, R (2009) A label-free strategy for SNP detection with high fidelity and sensitivity based on ligation-rolling circle amplification and intercalating of methylene blue. *Biosens Bioelectron*, 24, 3201-3207.

**ARTIGO CIENTÍFICO II**

Elsevier Editorial System(tm) for Biosensors and Bioelectronics  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus  
detection using polymer film on screen-printed electrode

Article Type: Full Length Article

Section/Category: The others

Keywords: Bovine papillomavirus; Electrochemical DNA biosensor;  
Electrode screen-printed Corresponding Author: Mr. Gustavo  
Nascimento,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Gustavo Nascimento

Order of Authors: Gustavo Nascimento; Elaine Souza; Danielly Campos-  
Ferreira; Mariana Arruda; Carlos Castelletti; Marcela Wanderley;  
Marek Ekert; Danyelly Bruneska; José Lima-Filho



## **Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymer film on screen-printed electrode**

Gustavo A. Nascimento<sup>a</sup>, Elaine V. M. Souza<sup>a</sup>, Danielly S. Campos-Ferreira<sup>a</sup>, Mariana S. Arruda<sup>a</sup>, Carlos H. M. Castelletti<sup>a</sup>, Marcela S. O. Wanderley<sup>a</sup>, Marek H. F. Ekert<sup>a</sup>, Danyelly Brunaska<sup>a,b</sup>, José L. Lima-Filho<sup>a,b</sup>.

<sup>a</sup> Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Campus Universitário 50670-901 Recife, PE, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Campus Universitário, 50670-901 Recife, PE, Brasil

Corresponding author. Tel: +55 81 2126 8484 Fax: +55 81 2126.8485

E-mail: [galvesn23@gmail.com](mailto:galvesn23@gmail.com) (Gustavo Nascimento)

### **Abstract**

In present work, it was reported a new electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus (BPV) based on screen-printed electrodes. Polymers films were used to link BPV probe on gold electrode. From factorial design, polymer poly-L-lysine (PLL), probe concentration 1  $\mu$ M and immobilization time 60 min showed the best condition for BPV probe immobilization. Methylene blue (MB) reduction signal decreased when occurred the hybridization. DNA extracted from papilloma samples also showed decrease on MB reduction signal, suggesting that this decrease of electrochemical signal corresponded to positive diagnostic for bovine papillomavirus infection. Thus, technological devices development such as biosensor can assist in treatment and prevention of bovine papillomatosis.

*Keywords:* Bovine papillomavirus, Electrochemical DNA biosensor, Electrode screen-printed

## 1. Introduction

Bovine papillomatosis is an infectious disease caused by double-stranded DNA virus called bovine papillomavirus (BPV) (Campo 2006; Claus et al. 2008). This virus can induce lesions in the stratified squamous epithelium of the skin and mucous membranes as well as fibroepithelial tumors (Antonsson and Hansson 2002; Campo 2002; Yuan et al. 2010). The BPV belong to Papillomaviridae family and ten types (BPV-1 to BPV-10) have been characterized by study of their biology and genome homology (Claus et al. 2009; Nasir and Campo 2008). In general, two primer pairs FAP59/FAP64 and MY09/MY11 are widely used for papillomavirus identification in human, bovine and other animals (Rai et al. 2011). Research for the BPV diagnostic has attracted considerable interest due to the troubles caused in the infected animal like dermatitis and cancer in different body sites (Borzacchiello and Roperto 2008; Brandt et al. 2011; Campo 2002). Consequently, these problems can contribute to economic losses in the agricultural industry. Currently, the BPV diagnostic has been made through histological observations of skin and tissues. These models often do not lead to conclusive results, as well as the diagnostics are slow.

Electrochemical DNA biosensor technologies have been developing because their several advantages like specificity, selectivity, low cost, rapid diagnostic and possibility of miniaturization (Siddiquee et al. 2010). DNA biosensor or genosensor is based on the skill of single-strand DNA (probe) to recognize a complementary sequence (target) (Souza et al. 2011). In DNA hybridization sensor, a probe with a defined nucleotide sequence was immobilized on a conducting surface, using immobilization methods as adsorption, cross-linking, encapsulation, avidin-biotin complexation and covalent attachment (Wang et al. 2008). The key for fabrication of DNA biosensor is the oligonucleotides immobilization on different kinds of transducer surfaces (Wang et al. 2010). Many polymers have been used in the development of DNA biosensor (Ghanbari et al. 2008; Jiang et al. 2008; Li et al. 2005). The polymers have ability to form thin layers on electrodes surfaces and their principal characteristics are presence of functional groups that allow link nucleic acids. Poly-L-lysine (PLL) and chitosan, for instance, are polymers widely used in the construction of DNA biosensors. The PLL can be electrodeposited or adsorbed on several kinds of electrodes and it has functional group that can link with DNA (Stobiecka and Hepel 2011; Wang et al. 2010). Chitosan is a polysaccharide biopolymer widely used in several industry, biomedicine and biosensors (Wang et al. 2011) that also has ability to bind with DNA molecules (Mandong et

al. 2007). Thus, the purpose of this present study was to develop a new electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymers films on electrodes screen-printed.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and material

All reagents used were of high purity. Methylene blue (MB), L-lysine and Chitosan were purchased from Sigma-Aldrich. UltraPure™ DNase/RNase-Free distilled water was purchased from Invitrogen. All Oligonucleotides ssDNA were synthesized by Integrated DNA Technologies. Screen-printed electrodes were purchased from The Gwent Group (UK) for electrochemical detection.

### 2.2. Apparatus

A conventional three-electrode system was employed in this work. Gold was used as working electrode (surface area of 3 mm<sup>2</sup>, approximately). Silver/silver chloride (Ag/AgCl) was used as reference electrode and carbon was used as counter electrode. Electrochemical analysis was performed by potentiostat (Autolab PGSTAT) and equipped with GPES (4.0.007) software. All hybridization experiments were carried out by a Hybridization Oven/Shaker (Amersham Pharmacia Biotech).

### 2.3. Bovine papillomavirus oligonucleotides

All oligonucleotides purchased in lyophilized powder were diluted with ultrapure water and stored as stock solution in freezer. Oligonucleotides were diluted from the stock solution in 0.5 M acetate buffer pH 5 for future experiments. Three different oligonucleotides sequences developed from bioinformatics tools were used in this study. The sequences presented the following bases:

BPV probe: 5'- TGG AAA TCT TTT TTT GAA AGG CTT TGG - 3'

BPV target: 5'- CCA AAG CCT TTC AAA AAA AGA TTT CCA - 3'

DNA non-complementary: 5' - CCC CGG ATC ACT GAG ACG - 3'

## 2.4 Papilloma samples

Fifteen blood samples were collected from cattle with cutaneous papillomatosis on the farm of the Instituto Agronômico de Pernambuco located in the Itambé city, Pernambuco, Brazil. Blood samples were kept in vacutainer tubes EDTA and stored at 0 °C until viral DNA extraction.

## 2.5 Viral DNA extraction and PCR assay

Viral DNA was extracted of the blood samples from automated Maxwell<sup>®</sup> 16 Clinical Instrument System (Promega). The Maxwell<sup>®</sup> 16 Blood DNA Purification Kit was used to DNA purification according to protocol specifications. After purification, DNA extracted was amplified with primer pair MY09 (forward: 5'- CGT CCM ARR GGA ACT GAT C - 3') and MY11 (reverse: 5' - GCM CAG GGC ATA AYA ATG G - 3') that amplify a fragment of 450 bp from L1 gene of all papillomavirus types. PCR was performed using GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix kit with the following condition: 1 µL of the DNA extracted, 6.25 µL of GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix, 1 µL of each primer and 3.25 µL ultrapure water. Amplification conditions were performed in following condition: (i) 94 °C for 3 min, (ii) 34 cycles of denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min and extension at 72 °C for 1 min, (iii) final extension at 72 °C for 10 min. Then, PCR product was visualized by electrophoresis in 2% agarose gel and TBE buffer pH 8.4 under UV light.

## 2.6 Preparation of polymer-modified screen-printed electrode

The polymers chitosan and poly-L-lysine (PLL) were used in experiments to allow DNA probe immobilization on the working electrode. Chitosan solution (1%) was prepared in acid acetic solution (1%). L-lysine solution (0.001 M) was prepared in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4. For the preparation of chitosan, film was added 3 µL of chitosan solution on working electrode and then incubated to dry at 30 °C for 20 min. For the preparation of PLL film, L-lysine solution was electropolymerized on working electrode by cyclic potential scanning from -1.8 to 2.0 V for 10 cycles with a scan rate of 100 mVs<sup>-1</sup>.

## 2.7 Experimental design

The influence of the independent variables of polymer, probe concentration (BPV probe) and immobilization time on the dependent variable of MB reduction signal was

evaluated from the results obtained by  $2^3$  full factorial design (Table 1). In this design, it was performed a set of 24 experiments in triplicates to allow the estimation of pure experimental error. The results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) at a significance level of  $p < 0.05$ . All statistical and graphical analyses were carried out with the Statistica 8.0 program (StatSoft Inc., 2008, Tulsa, OK, USA).

Table 1. Independent variables and levels used in the  $2^3$  full factorial design.

Independent variables	Levels	
	Lower (-1)	Higher (+1)
Polymer	PLL	Chitosan
Probe concentration ( $\mu\text{M}$ )	1	8
Immobilization time	30	60

## 2.8 Probe DNA immobilization and target DNA hybridization

The BPV probe in 0.50 M acetate buffer solution (pH 5) was immobilized for adsorption on gold electrode surface modified with polymer layer and immobilization time was obtained in factorial design. After working electrode was washed with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 to remove the unbound oligonucleotides.

In hybridization process, a solution containing the BPV target in 0.5 M acetate buffer pH 5 was added on the working electrode immobilized with the BPV probe and incubated at 55 °C for 10 min with 300 rpm stirred speed to link the complementary sequences. This temperature is the best for sequences annealing following the company descriptions. Then, the electrode was washed with Tris-HCl buffer (20 mM and pH 7.0) to remove non-hybridized sequences. The same protocol was applied for the interaction of the BPV probe with non-complementary sequence. For hybridization of the papilloma samples with BPV probe on working electrode modified, viral DNA extracted was first heated to 94 °C during 4 min to allow denaturation of the double helix and then added on the working electrode surface immobilized with the probe BPV. The formation of hybrid between viral DNA extracted and BPV probe was also performed at 55 °C for 10 min with 300 rpm stirred speed and then washed with Tris-HCl buffer (20 mM and pH 7.0) to remove non-hybridized sequences.

## 2.9. Electrochemical Analysis

For electrochemical signals analysis, differential pulse voltammetry (DPV) method was proposed as the measurement system of the current signals. After immobilization and hybridization process, MB solution 500  $\mu\text{M}$  in Tris-HCl buffer (20 mM and pH 7.0) was accumulated on the working electrode modified for 5 min and then it was washed with Tris-HCl buffer. The measurement of DPV was performed in Tris-HCl buffer under following conditions for the MB reduction: potential sweep between -0.8 and 0 V, modulation amplitude 50 mV and scan rate 20  $\text{mV s}^{-1}$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1 Preliminary Investigations

In this work, polymers were used to allow immobilization of the probe on gold working electrode surface. Polymers PLL and chitosan were chosen to be electropositive compounds and thus allow the link with DNA molecules that are electronegative. With these polymers, it is possible to produce thin films on different supports such as gold electrodes.

The binding of DNA on PLL or chitosan has occurred in a similar way. The immobilization of DNA on a PLL Au surface has occurred primarily on account of electrostatic attraction of negatively charged phosphate groups of DNA to positively charged PLL. It is likely that hydrogen bonding between  $\text{NH}^{+3}$  groups of PLL and oxygens of phosphate groups in DNA may contribute to strengthen the attachment of DNA to PLL (Stobiecka and Hepel 2011). Chitosan also can form a stable complex with the polyanionic phosphodiester backbones of DNA (Singh et al. 2010). It is susceptible to chemical modifications due to the presence of reactive amino and hydroxyl functional groups and provides hydrophilic environment for the immobilization of desired biomolecules (Mandong et al. 2007). From this similarity of the interaction between DNA and polymers investigated, it was performed a factorial design to evaluate the efficiency of the polymer layer on electrodes screen-printed in the immobilization process.

The performance of the biosensor was investigated by differential pulse voltammetry with redox indicator methylene blue (MB). It is widely known that the MB has affinity by DNA and two possible mechanisms of interaction have been demonstrated by many authors.

These links can occur by electrostatic interaction with negatively charged phosphate groups or by interaction between guanine bases, mainly in ssDNA (Ortiz et al. 2011; Tran et al. 2011). In this work, the binding of MB occurred by interaction between guanine bases in ssDNA (probe) because the phosphate groups were linked to polymer layer on the gold surface.

### 3.2 Factorial design analysis in probe immobilization

To evaluate the efficiency of probe immobilization, it was carried out a  $2^3$  full factorial design, whose independent variables polymers types (PLL and chitosan), probe concentration (BPV probe) and immobilization time were investigated. From the 24 experiments carried out under the conditions of the Table 1, it was observed that the best result for BPV probe immobilization process on MB reduction signal was obtained with polymer PLL, probe concentration of 1  $\mu\text{M}$  and immobilization time of 60 min (Fig. 1). Probably, the chitosan had no significant results on MB reduction signal compared to PLL due to its poor electrical conductivity that often results in a low sensitivity for the determination of the analytes (Wang et al. 2011).

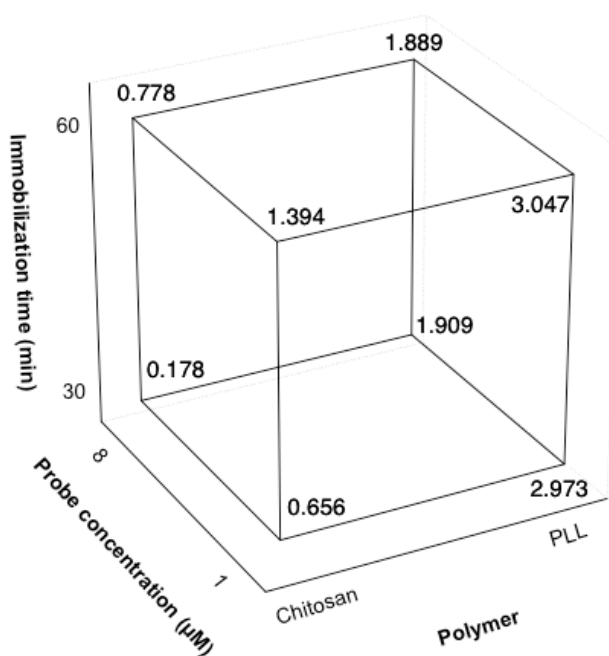


Fig. 1. Graphical representation of the relation between independent variables polymer, probe concentration and immobilization time analyzed in  $2^3$  full factorial design.

Statistic analysis showed that independent variables polymer and immobilization time had a significant positive effect on MB reduction signal. While, independent variable probe concentration and interactions polymer-immobilization time and polymer-probe concentration had significant negative effects on MB current peak. However, the independent variable polymer was the most significant effect, suggesting that PLL can improve immobilization process, and consequently electrochemical signal. The interactions probe concentration-immobilization time and polymer-probe concentration-immobilization time had no significant effect (Fig. 2).

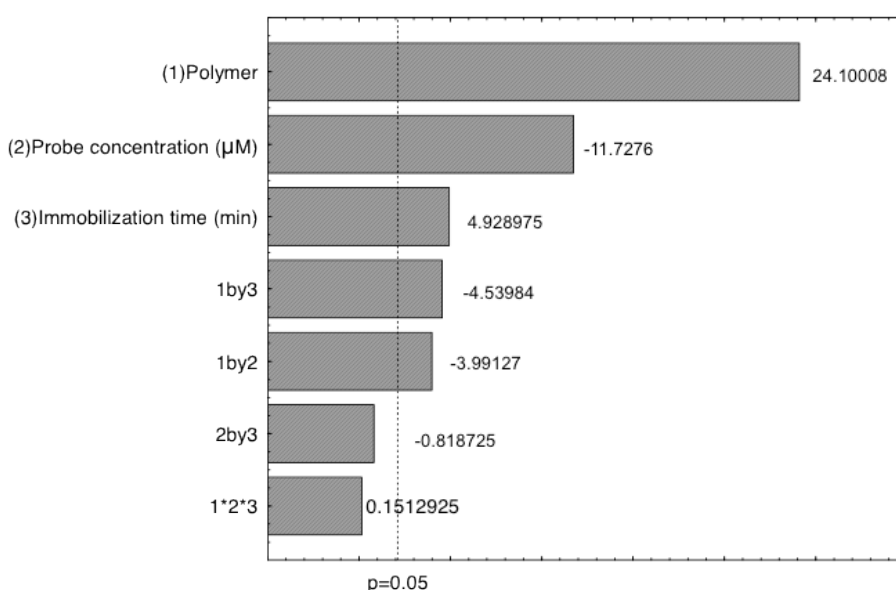


Fig. 2. Pareto bar chart of the standardized effect estimate (absolute value) of the independent variables polymer (1), probe concentration (2) and immobilization time (3) on MB reduction signal for the  $2^3$  full factorial design.

From the best condition observed in the full factorial design for the BPV probe immobilization, a concentration curve was carried out varying the probe concentration on values lower and higher than  $1 \mu\text{M}$ , and fixing the independent variables polymer PLL and immobilization time of 60 min. This experiment was carried out because Pareto bar chart (Fig. 2) shows that the decrease of the probe concentration may improve the current signal. Thus, the goal of this experiment was to observe the probe concentration effect on the immobilization process from MB reduction signal. In Fig. 3, it was observed that concentrations  $1 \mu\text{M}$  and  $1.5 \mu\text{M}$  had the highest current peaks, however, the concentration of  $1 \mu\text{M}$  had better reproducibility compared to  $1.5 \mu\text{M}$ . The other concentration ( $0.01 \mu\text{M}$ ,  $0.1$



$\mu\text{M}$ ,  $0.25 \mu\text{M}$  and  $0.5 \mu\text{M}$ ) showed lower current signals due to low probe immobilized amount on the working electrode surface. Thus, it was chose concentration of  $1 \mu\text{M}$  for probe immobilization.

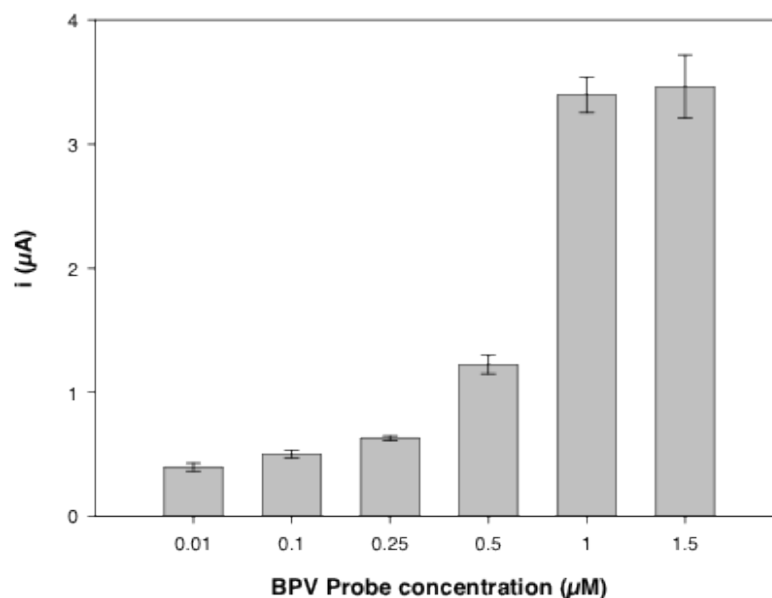


Fig. 3. Histogram of the BPV probe concentration effect on MB reduction signal in immobilization process. Differential pulse voltammetry method was used to analyze the current signals in the following conditions: initial potential  $-0.8 \text{ V}$  and end potential  $0 \text{ V}$ ; modulation amplitude  $50 \text{ mV}$  and scan rate  $20 \text{ mV s}^{-1}$ . All results were plotted with the averages of experiments performed at different BPV probe concentrations.

### 3.3 Optimization of hybridization process

The biosensor recognition array was applied in experiments on hybridization reaction between the BPV probe and the BPV target DNA fragment. In this study, the hybridization was carried out to differential potential voltammetry on reduction MB signal. The goal this experimental was to determine optimal hybridization condition ensuring specific binding of the target nucleic acid fragments with the ssDNA probe on PLL-gold electrode modified and minimizing non-specific interaction. In this regard, hybridization was performed with different concentrations of complementary target sequence. In Fig. 4, it was observed that the current signal increased with increasing concentration of the target until the current to stabilize in concentrations  $100 \text{ nM}$  and  $250 \text{ nM}$ . In these concentrations, it was observed the highest current signal that was  $0.9 \mu\text{A}$ . However, this current signal in hybridization decreased when compared to current signal in BPV probe immobilized on gold electrode. MB

had strong affinity by guanines free in ssDNA. Thus, this difference occurred due to weak interaction between dsDNA and MB compared with ssDNA and MB, resulting in decreased intercalation of MB between the dsDNA (Lin et al. 2007; Souza et al. 2009).

The linear regression obtained from reduction signal regarding to different concentrations of BPV target are shown in Fig. 4. The calibration curve ( $y = 5.3283x + 0.3504$ ) is linear between 5 nM up to 100 nM with a correlation coefficient of 0.99763 ( $p < 0.00048$ ,  $n = 5$ ). The detection limit of 4.35 nM could be estimated by equation  $3\sigma/a$ , where  $\sigma$  was the standard deviation of the intercept and  $a$  was the slope of the linear regression (Gumustas and Ozkan 2011). The relative standard deviation (RSD) over three independently probe-modified electrodes measured at 100 nM BPV target was 0.056%, indicating a remarkable reproducibility of the detection method.

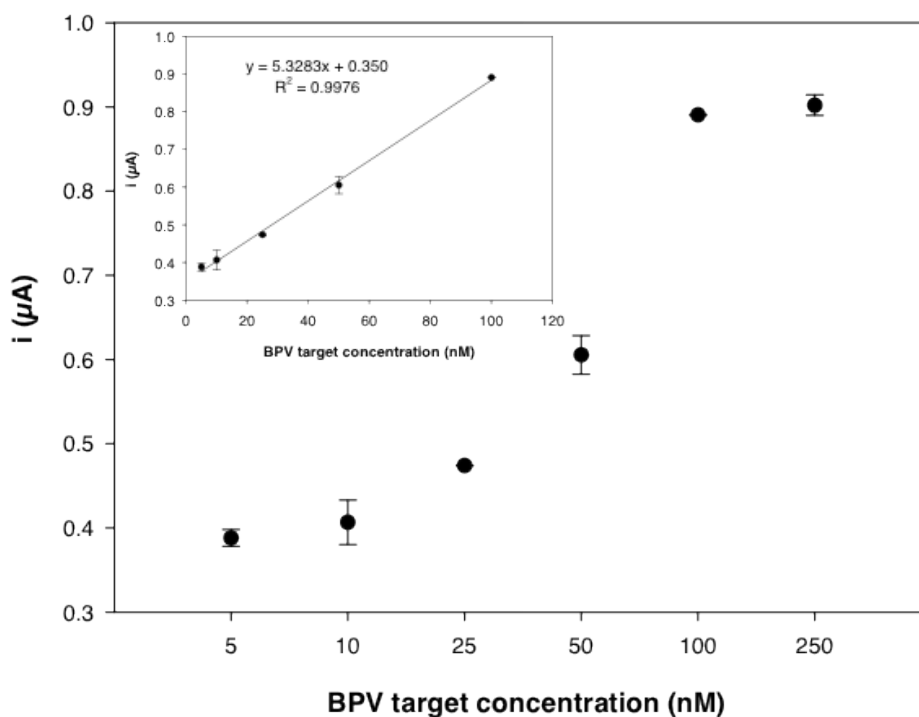


Fig. 4. Effect of the BPV target concentration on MB reduction signal in hybridization. Differential pulse voltammetry method was used to analyze the current signals in the following conditions: initial potential -0.8 V and end potential 0 V; modulation amplitude 50 mV and scan rate 20 mV s<sup>-1</sup>. All results were plotted with the averages of experiments performed at different concentrations of BPV target. Inset shows calibration graph at concentration range 5 – 100 nM.

### 3.4 Papilloma samples analysis

The viral DNA extraction from blood samples was proposed in this paper to reduce the steps in the processing of biological samples when compared to skin samples (Munday and Knight 2010). Consequently, the elimination of these steps allowed the rapid detection of BPV. Two of the fifteen samples were amplified by primer pair MY09/MY11. This amplification number compared to samples number occurred due to low concentration of viral DNA in blood. According to literature, identification of BPV also was possible in blood samples collected from cows with papillomatosis (Wosiacki et al. 2005). In Fig. 5, it was possible to observe two amplification products of 450 bp in electrophoresis gel that correspond to papillomavirus L1 gene. Primer MY is widely used for amplification and identification of the human papillomavirus L1 gene (Rai et al. 2011). However, Many authors have demonstrated the amplification of BPV L1 gene from primer MY (Ogawa et al. 2004; Silva et al. 2010). Positive and negative controls of papillomavirus were used to compare with PCR products of bovine samples. The goal of this experiment was to identify papillomavirus in blood samples and after to detect BPV in biosensor system proposed from viral DNA extracted.

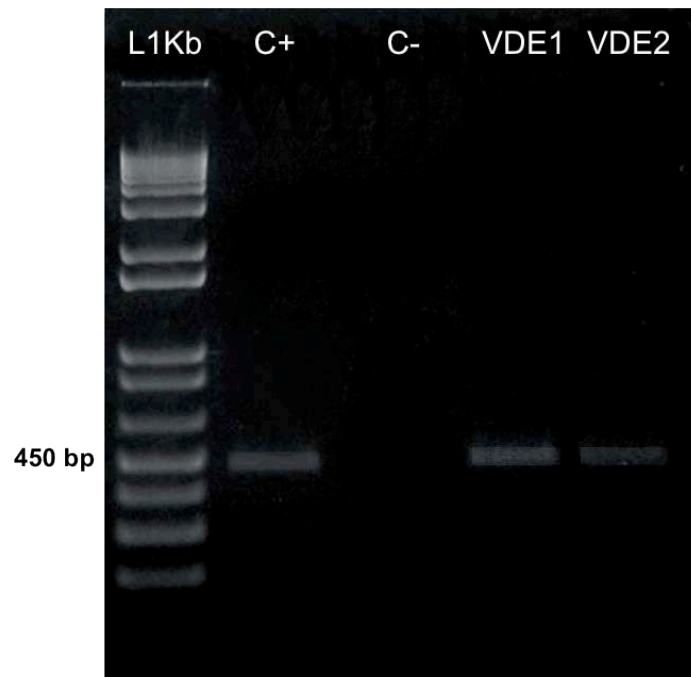


Fig. 5. Amplification of L1 gene (papillomavirus) with primer pair MY09/MY11 from viral DNA extracted of bovine blood samples. Lane L1Kb: ladder 1Kb plus (invitrogen); lane C+: positive control of the papillomavirus L1 gene in pBR322.HPV16 plasmid; lane C-: negative control (ultrapure water); lane VDE1: viral DNA extracted 1 and lane VDE2: viral DNA extracted 2.

### 3.5 Detection of Bovine Papillomavirus

The performance of electrochemical DNA biosensor was investigated by checking BPV probe immobilized on PLL-gold electrode modified hybridization with BPV target sequence, non-complementary sequence and viral DNA extracted from papilloma samples. Fig. 6 shows a voltammogram with profile of current peak generated in different experiments. It was possible to observe that BPV probe showed the highest current peak when compared to other curves due to strong affinity between MB and 7 guanines free present in BPV probe. After hybridization of the BPV probe with BPV target complementary, viral DNA extracted 1 (VDE1) and viral DNA extracted 2 (VDE2) current peaks decreased. These current peaks decrease confirmed the hybridization occurrence in our detection system. The current peak change could be explained by the steric inhibition of MB packing between the duplex (Tran et al. 2011). The specificity of biosensor was studied by incubating the non-complementary sequence on probe electrode. Fig. 6 showed that the electrochemical signal after hybridization of the BPV probe with non-complementary sequence increased when compared to hybrids formed. The significant increase in the current signal between BPV probe and non-complementary sequence showed that the biosensor was highly specific for the BPV. However, the experiments with non-complementary sequence showed a current peak little lower than the BPV probe immobilized on PLL-gold electrode modified, probably due to nonspecific links between non-complementary sequences (Pournaghi-Azar et al. 2007). The curve (a) plotted in Fig. 6 corresponded to the PLL-gold electrode bare whose electrochemical signal presented a baseline, indicating guanine absence on electrode modified. According to data analyzed, the decrease of the current peak represented the positive diagnostic for bovine papillomavirus infection.

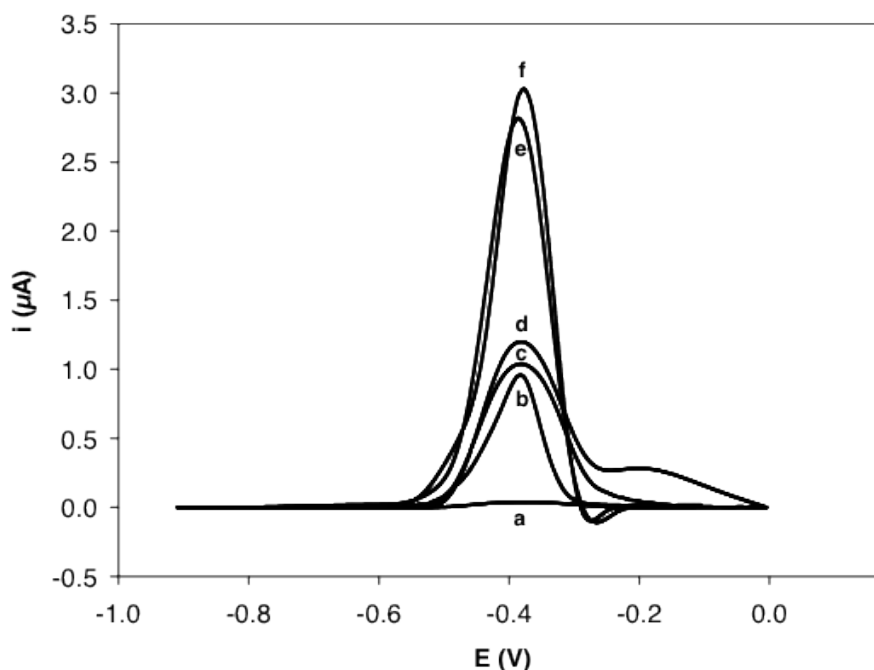


Fig. 6. Differential pulse voltammograms on MB reduction signal of (a) PLL-gold electrode modified bare; (b) BPV probe immobilized 1  $\mu\text{M}$  on PLL-gold electrode modified after hybridization with BPV target sequence 100 nM; (c) BPV probe immobilized 1  $\mu\text{M}$  on PLL-gold electrode modified after hybridization with VDE1 46.90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; (d) BPV probe immobilized 1  $\mu\text{M}$  on PLL-gold electrode modified after hybridization with VDE2 62.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; (e) BPV probe immobilized 1  $\mu\text{M}$  on PLL-gold electrode modified after hybridization with non-complementary sequence; (f) BPV probe immobilized 1  $\mu\text{M}$  on PLL-gold electrode modified before hybridization.

#### 4. Conclusions

In this present work, it is demonstrated a new electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection from oligonucleotides synthesized and viral DNA extracted with high specificity and sensitivity. The surface of the gold electrode modified can be characterized by differential pulse voltammetry. PLL shows better performance than the chitosan in immobilization process. In detection system proposed, the DNA biosensor can differentiate hybridization of the non-hybridization and thus it is possible to identify positive samples for bovine papillomavirus. Hybridization presents a decreased on MB reduction signal when compared to probe before hybridization, suggesting that this decrease is related to the presence of the BPV in cattle. The data obtained with the biosensor showed viability for the bovine papillomavirus diagnostic, thereby allowing the development of a new portable detection system for viruses.

## Acknowledgements

The authors are grateful to the financial support received from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA).

## References

- Antonsson, A., Hansson, B.G., 2002. Healthy skin of many animal species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *J Virol* 76(24), 12537-12542.
- Borzacchiello, G., Roperto, F., 2008. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Vet Res* 39(5), 45.
- Brandt, S., Apprich, V., Hackl, V., Tober, R., Danzer, M., Kainzbauer, C., Gabriel, C., Stanek, C., Kofler, J., 2011. Prevalence of bovine papillomavirus and *Treponema* DNA in bovine digital dermatitis lesions. *Vet Microbiol* 148(2-4), 161-167.
- Campo, M.S., 2002. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res* 89(2), 249-261.
- Campo, M.S., 2006. Bovine Papillomavirus: old system, new lessons? In: Campo, M.S. (Ed.), *Papillomavirus Research: From Natural History To Vaccines and Beyond*, pp. 373-388. Caister Academic Press, Wymondham.
- Claus, M.P., Lunardi, M., Alfieri, A.A., Otonel, R.A.A., Sartori, D., Fungaro, M.H.P., Alfieri, A.F., 2009. Multiple Bovine Papillomavirus Infections Associated with Cutaneous Papillomatosis in Brazilian Cattle Herds. *Braz Arch Biol Techn* 52, 93-98.
- Claus, M.P., Lunardi, M., Alfieri, A.F., Ferracin, L.M., Fungaro, M.H., Alfieri, A.A., 2008. Identification of unreported putative new bovine papillomavirus types in Brazilian cattle herds. *Vet Microbiol* 132(3-4), 396-401.
- Ghanbari, K., Bathaie, S.Z., Mousavi, M.F., 2008. Electrochemically fabricated polypyrrole nanofiber-modified electrode as a new electrochemical DNA biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 23(12), 1825-1831.
- Gumustas, M., Ozkan, S.A., 2011. The Role of and the Place of Method Validation in Drug Analysis Using Electroanalytical Techniques. *The Open Analytical Chemistry Journal* 5, 1-21.

- Jiang, C., Yang, T., Jiao, K., Gao, H., 2008. A DNA electrochemical sensor with poly-l-lysine/single-walled carbon nanotubes films and its application for the highly sensitive EIS detection of PAT gene fragment and PCR amplification of NOS gene. *Electrochimica Acta* 53(6), 2917-2924.
- Li, J., Liu, Q., Liu, Y., Liu, S., Yao, S., 2005. DNA biosensor based on chitosan film doped with carbon nanotubes. *Anal Biochem* 346(1), 107-114.
- Lin, X.-H., Wu, P., Chen, W., Zhang, Y.-F., Xia, X.-H., 2007. Electrochemical DNA biosensor for the detection of short DNA species of Chronic Myelogenous Leukemia by using methylene blue. *Talanta* 72(2), 468-471.
- Mandong, G., Yanqing, L., Hongxia, G., Xiaoqin, W., Lifang, F., 2007. Electrochemical detection of short sequences related to the hepatitis B virus using MB on chitosan-modified CPE. *Bioelectrochemistry* 70(2), 245-249.
- Munday, J.S., Knight, C.G., 2010. Amplification of feline sarcoid-associated papillomavirus DNA sequences from bovine skin. *Veterinary Dermatology* 21(4), 341-344.
- Nasir, L., Campo, M.S., 2008. Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Veterinary Dermatology* 19(5), 243-254.
- Ogawa, T., Tomita, Y., Okada, M., Shinozaki, K., Kubonoya, H., Kaiho, I., Shirasawa, H., 2004. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *J Gen Virol* 85(Pt 8), 2191-2197.
- Ortiz, M., Fragoso, A., Ortiz, P.J., O'Sullivan, C.K., 2011. Elucidation of the mechanism of single-stranded DNA interaction with methylene blue: A spectroscopic approach. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 218(1), 26-32.
- Pournaghi-Azar, M.H., Hejazi, M.S., Alipour, E., 2007. Detection of Human Interleukine-2 Gene Using a Label-Free Electrochemical DNA Hybridization Biosensor on the Basis of a Non-Inosine Substituted Probe. *Electroanalysis* 19(4), 466-472.
- Rai, G.K., Saxena, M., Singh, V., Somvanshi, R., Sharma, B., 2011. Identification of bovine papilloma virus 10 in teat warts of cattle by DNase-SISPA. *Vet Microbiol* 147(3-4), 416-419.
- Siddiquee, S., Yusof, N.A., Salleh, A.B., Abu Bakar, F., Heng, L.Y., 2010. Electrochemical DNA biosensor for the detection of specific gene related to *Trichoderma harzianum* species. *Bioelectrochemistry* 79(1), 31-36.
- Silva, M.S., Weiss, M., Brum, M.C., Dos Anjos, B.L., Torres, F.D., Weiblen, R., Flores, E.F., 2010. Molecular identification of bovine papillomaviruses associated with cutaneous warts in southern Brazil. *J Vet Diagn Invest* 22(4), 603-606.

Singh, R., Sumana, G., Verma, R., Sood, S., Sood, K.N., Gupta, R.K., Malhotra, B.D., 2010. Fabrication of *Neisseria gonorrhoeae* biosensor based on chitosan, MWCNT platform. *Thin Solid Films* 519(3), 1135-1140.

Souza, E., Nascimento, G., Santana, N., Ferreira, D., Lima, M., Natividade, E., Martins, D., Lima, J., 2011. Label-Free Electrochemical Detection of the Specific Oligonucleotide Sequence of Dengue Virus Type 1 on Pencil Graphite Electrodes. *Sensors* 11(6), 5616-5629.

Souza, E.M., Nascimento, G.A., Santana, N.A., Brunaska, D., Lima Filho, J.L., 2009. Development of electrochemical biosensor for virus dengue diagnostic using graphite electrode. *New Biotechnology* 25, Supplement(0), S378.

Stobiecka, M., Hepel, M., 2011. Double-shell gold nanoparticle-based DNA-carriers with poly-L-lysine binding surface. *Biomaterials* 32(12), 3312-3321.

Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S., 1999. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification - (Technical Report). *Pure Appl Chem* 71(12), 2333-2348.

Tran, L.D., Nguyen, B.H., Van Hieu, N., Tran, H.V., Nguyen, H.L., Nguyen, P.X., 2011. Electrochemical detection of short HIV sequences on chitosan/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle based screen printed electrodes. *Materials Science and Engineering: C* 31(2), 477-485.

Wang, J., Zhang, S., Zhang, Y., 2010. Fabrication of chronocoulometric DNA sensor based on gold nanoparticles/poly(L-lysine) modified glassy carbon electrode. *Anal Biochem* 396(2), 304-309.

Wang, Q., Zhang, B., Lin, X., Weng, W., 2011. Hybridization biosensor based on the covalent immobilization of probe DNA on chitosan-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite by using glutaraldehyde as an arm linker. *Sensors and Actuators B: Chemical* 156(2), 599-605.

Wang, Y., Xu, H., Zhang, J., Li, G., 2008. Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. *Sensors* 8(4), 2043-2081.

Wosiacki, S.R., Barreiro, M.A.n.B., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., 2005. Semi-nested PCR for detection and typing of bovine Papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. *Journal of Virological Methods* 126(1-2), 215-219.

Yuan, Z.Q., Bennett, L., Campo, M.S., Nasir, L., 2010. Bovine papillomavirus type 1 E2 and E7 proteins down-regulate Toll Like Receptor 4 (TLR4) expression in equine fibroblasts. *Virus Res* 149(1), 124-127.



## CAPÍTULO IV

## PATENTE

 <b>INPI</b> INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL MARQUELA 2004 03/06/2011 019110000125 16 16 REPE  0000221105672810 Espaço reservado ao protocolo	< Uso exclusivo do INPI >     Espaço para etiqueta
--	---

---

**DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO**

**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**  
 O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas.

**1. Depositante (71):**

1.1 Nome: José Luiz de Lima Filho  
 1.2 Qualificação Médico  
 1.3 CNPJ/CPF: 216382414-49  
 1.4 Endereço Completo: Av. Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitária,  
 1.5 CEP: 50761-901 1.6 Telefone 08121268484 1.7 Fax: 08121268485  
 1.8 E-mail: joseluiz60@mac.com

continua em folha anexa

---

**2. Natureza:**  Invenção  Modelo de Utilidade  Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: INVENÇÃO

---

**3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):**  
 BIOSSENSOR ELETRÓQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

continua em folha anexa

---

**4. Pedido de Divisão:** do pedido N° \_\_\_\_\_ Data de Depósito: \_\_\_\_\_

---

**5. Prioridade:**  interna  unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

---

**6. Inventor (72):**

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: José Luiz de Lima Filho  
 6.2 Qualificação Médico 6.3 CPF: 21638241449  
 6.4 Endereço completo Av. Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitária,  
 6.5 CEP: 50761-901 6.6 Telefone: 08121268484 6.7 Fax: 08121268485  
 6.8 E-Mail: joseluiz60@mac.com

continua em folha anexa

**INPI** Formulário 1.01 - Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição (folha 1/2)

**7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:**

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

em anexo

**8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial:** (Período de Graça):  
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

**9. Procurador (74)**

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 APROAB:

9.4 Endereço completo

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

**10. Listagem de seqüências Biológicas** (documentos anexados) (se houver):

- Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: nº de CDs ou DVDs (original e cópia).
- Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
- Listagem de seqüências em formato impresso: fls.
- Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

**11. Documentos anexados** (assinale e indique também o número de folhas):  
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	1	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	6	fls.
<input type="checkbox"/>	11.2 Procuração		fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	2	fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade		fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	5	fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho		fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	1	fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) Lista de Inventores					1	fls.

**12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11):** 16 fls.

**13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.**

Prof. 02 Junho 2011  
Local e Data

[Assinatura]  
Assinatura e Carimbo

**Inventores (72):**

6.1 Nome: Gustavo Alves do Nascimento

6.2 Qualificação: Biólogo 6.3 CPF: 030.061.254-01

6.4 Endereço completo: Rua Guedes Pereira n 100 Ap 502 Casa Amarela Recife-PE

6.5 CEP: 52060-150 6.6 Telefone: (+55) (81) 32657583 / (81) 89685801

6.7 E-Mail: galvesn23@gmail.com

6.1 Nome: Mariana Souza de Arruda

6.2 Qualificação: Bióloga 6.3 CPF: 053.804.204-43

6.4 Endereço completo: Avenida Inácio Monteiro, nº 1012, Cordeiro, Recife-PE

6.5 CEP: 50721-320 6.6 Telefone: (81) 32279321/ (81) 99549724

6.7 E-Mail: mariana.s.arruda@gmail.com

6.1 Nome: Danielly Santos Campos Ferreira

6.2 Qualificação: Biomédica 6.3 CPF: 036.776.764-36

6.4 Endereço completo: Rua Setúbal, 984, apt 102, Boa Viagem, Recife-PE

6.5 CEP: 51030-010 6.6 Telefone: (+55) (81) 3341-5393 / 8883-1888

6.7 E-Mail: daniellysantos@hotmail.com

6.1 Nome: Elaine Virginia Martins de Souza

6.2 Qualificação: Biomédica 6.3 CPF: 041.392.544-75

6.4 Endereço completo: Rua Francisco Leopoldino nº 405 Apt 101 A

6.5 CEP: 50980-060 6.6 Telefone: 81 88743625

6.7 E-Mail: elainevms@yahoo.com.br

6.1 Nome: Danyelly Bruneka Gondin Martins

6.2 Qualificação: Bióloga 6.3 CPF:

6.4 Endereço completo:

6.5 CEP: 6.6 Telefone:

6.7 E-Mail: bruneka@gmail.com

# BIOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

## RELATÓRIO DESCRITIVO

### Campo da Invenção

A presente invenção descreve um biossensor eletroquímico para detecção de ácidos nucleicos a partir de amostras biológicas, como por exemplo, fluidos biológicos, células e tecidos biológicos. De forma mais específica, esta invenção descreve biossensores para detecção de ácidos nucleicos, mediante o uso de eletrodos impressos capazes de qualificar e quantificar a presença de substâncias (analito) acima citadas através de resposta elétrica.

### Antecedentes da Invenção

A detecção de seqüências específicas de ácidos nucleicos é necessária para diversas áreas, como testes de diagnósticos para mutações e detecção precoce de câncer, análise de seqüências gênicas, investigação forense, avaliação do tratamento médico e agentes biológicos.

Atualmente, há um enorme interesse no desenvolvimento de sistemas bioanalíticos que sejam portáteis, fáceis de usar e de baixo custo para o diagnóstico rápido de doenças genéticas e infecciosas. Biossensores através da hibridização dos ácidos nucleicos se tornaram uma das grandes ferramentas de diagnóstico, principalmente, quando a transdução do sinal do evento da hibridização é proveniente de método eletroquímico.

Os tratamentos de saúdes demandam, por vezes, um resposta rápida para o diagnóstico e prevenção de enfermidades e problemas relacionados à saúde. As formas de detecção no estado da técnica atual nem sempre conseguem dar uma resposta em tempo hábil para estes tratamentos. Isso gera naturalmente uma demanda pelo desenvolvimento de novas técnicas, como é o caso da presente invenção.

O método óptico, amplamente utilizado, é baseado na medida de mudanças no espectro. A quantificação desses analitos é realizada por medidas do índice de refração,

quantidade de luz absorvida ou propriedades fluorescentes das moléculas analisadas. Uma limitação importante dos métodos ópticos é na medição de amostras com alta turbidez, o qual dificulta a passagem dos feixes de luz pelo analito.

Baseada no método ótico, a patente GB20070002681 intitulada “DNA-based biosensor” de 12 de fevereiro de 2007, descreve um biosensor de detecção por método de luminescência. Essa invenção, no entanto, além de não servir para detecção de RNA exige uma condição ambiental controlada e muitas etapas no processo de detecção o que demanda um longo tempo para os resultados e gera um aumento dos custos de diagnóstico, limites importantes do estado da técnica.

A patente 11/427,544 intitulada “DNA biosensor and methods for making and using the same” de 29 de junho de 2006, descreve um sistema para quantificação de ácidos nucleicos e anticorpos, porém a detecção demanda uma amplificação dos ácidos nucleicos o que implica em maior tempo e custos para o processo de diagnóstico. O tipo de técnica demanda ainda o uso de pessoal qualificado onerando o processo de detecção e dificultando sua realização em lugares que não disponham de ambiente controlado e pessoal especializado.

Uma alternativa para o método ótico seria o método eletroquímico, pois este se caracteriza por ser de baixo custo, de simples utilização, rápida detecção, alta sensibilidade e de fácil miniaturização. A patente 12/540,669 intitulada “ Method for detecting biomolecules and use thereof ” de 13 de Agosto de 2009, descreve um sistema para detecção de biomoléculas alvo, através de método eletroquímico. No entanto, esta patente que utiliza uma molécula que deve ser constituída de metais, componentes metálicos, nanopartículas de prata ou anticorpos e que se ligam a biomolécula alvo (target), não tem como comprovar que esta biomolécula se ligou ao target ou a sonda, podendo levar a resultados falso positivos em um diagnóstico. A utilização destas moléculas constituída de metais, componentes metálicos, nanopartículas de prata ou de anticorpos aumenta também os custos do processo.

A patente 11/619,232 intitulada “Electrochemical detection of nucleic acids sequences” de 3 de Janeiro de 2007, descreve um biossensor para detecção de ácidos nucleicos, porém utiliza o método de PCR para amplificar o número de cópias de ácidos nucleicos e utiliza métodos para amplificação do sinal de hibridização, como: enzimas,

anticorpos-conjugados com fluoróforos, podendo utilizar ainda mediadores eletroativos. Isso tudo aumenta o número de etapas, e, por conseguinte as chances de erro, e de tempo no processo de diagnóstico, assim como também aumenta o seu custo. Este tipo de técnica demanda ainda o uso de pessoal qualificado que nem sempre é possível, sobretudo quando o diagnóstico deve ser realizado em regiões desprovidas de estrutura laboratorial adequada.

A patente 10/008,233 intitulada “Electrochemical detection of nucleic acid hybridization” de 6 de Novembro de 2001, descreve um método para detecção de hibridização de ácidos nucleicos em geral. No entanto, esta invenção não considera aspectos importantes na detecção de RNA, em particular aspectos devidos à rápida degradação destes em meio aquoso, células ou tecidos. Outro aspecto a considerar, é o fato de que, nesta invenção após a hibridização, ocorre uma reação ao final da sonda entre uma base pré-selecionada e um metal de transição, levando a uma reação de óxido-redução que gerará um sinal capaz de identificar se houve ou não a hibridização. Essa quantidade de etapas implica, por vezes, em longo tempo para a realização do processo de detecção, incrementando também o seu custo de mercado.

O biossensor proposto na presente invenção pode ser utilizado sem a necessidade de um laboratório bem equipado e sem instrumentos complexos, numa abordagem que reduz o sinal de fundo indesejado, permitindo a identificação rápida das biomoléculas capturadas com alta sensibilidade, especificidade e requerendo o processamento de pequena quantidade de amostra, superando assim os limites atuais do estado da técnica.

#### Descrição da Invenção

A presente invenção descreve um processo composto por uma fase de imobilização, uma fase de hibridização e uma fase de detecção de ácidos nucleicos. Inicialmente, fase de imobilização, o fluido é colocado no eletrodo de trabalho descrito abaixo onde a sonda é imobilizada por um processo de adsorção (outros processos de imobilização, como ligação covalente, também podem ser usados). Outros eletrodos são deixados sem sonda a fim de obter informação comparativa. Em seguida, fase de

hibridização, é realizado um processo de hibridização para detecção de um DNA alvo. Acontecendo a hibridização, essa será detectada, fase de detecção, através de um sinal eletroquímico mensurável que indicará a presença do DNA referente à doença pesquisada. O sinal de detecção pode ser amplificado através do uso de um indicador ou intercalador ou outro processo de amplificação conhecido.

A presente invenção descreve ainda um produto na forma de uma fita teste composta por um ou mais eletrodos de trabalho que recebem uma sonda específica para cada tipo de doença a ser testada, um ou mais eletrodos de referência e um ou mais eletrodos auxiliares. A fita teste é desenvolvida pela impressão de uma tinta e/ou pasta condutora em um suporte constituído de PVC (polyvinyl chloride), podendo também ser PVA (polyvinyl acetate), suporte cerâmico, vítreo ou outro material inerte não condutor. O eletrodo de trabalho é construído com pasta de carbono, mas pode também ser constituído de ouro, nanotubos de carbono, grafeno, entre outros compostos capazes de conduzir corrente elétrica. O eletrodo de referência é impresso com uma tinta composta de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl), mas pode também ser composto por paládio, platina ou outro material condutor. O eletrodo auxiliar pode ser composto de platina ou outro material condutor.

Do ponto de vista de função, o eletrodo de trabalho é responsável pela geração de um sinal elétrico correspondente à realização do processo de hibridização. O eletrodo de referência é responsável pela geração de um sinal elétrico correspondente a uma simples aplicação de uma diferença de potencial. O eletrodo auxiliar tem como função reduzir os ruídos das medidas de corrente geradas a partir dos eletrodos de trabalho e de referência. Em funcionamento, uma diferença de potencial é aplicada na fita teste gerando uma corrente que passa pelos eletrodos de referência, trabalho e auxiliar. A passagem dessa corrente determinará a geração de sinais que em função de sua magnitude, identificarão a ocorrência ou não de hibridização no eletrodo de trabalho. A hibridização corresponde à identificação positiva para a doença pesquisada, ou seja, o ácido nucléico da doença investigada é complementar a sonda imobilizada no eletrodo de trabalho.

Em conjunto o processo e produto acima descrito asseguram que no caso positivo para hibridização, sinais diferentes poderão ser lidos nos eletrodos de trabalho e

de referência, determinando um processo rápido e simples para detecção de ácidos nucléicos.

A figura 1 descreve uma fita teste (a) tendo um eletrodo de trabalho (b), um eletrodo de referência (c), duas áreas de contato (d) e (e), uma superfície isolante (f) e uma área de reação (g). Numa primeira modalidade preferida, a fita teste será constituída de um ou mais eletrodos de trabalho em carbono, e um eletrodo de referência em prata/cloreto de prata (Ag/AgCl).

Numa segunda modalidade preferida (Figura 2), a fita teste conterá uma área de reação (a) e três eletrodos: um eletrodo de trabalho (b), um eletrodo de referência (c) e um eletrodo auxiliar (d). Os eletrodos de trabalho e de referência são tais como descritos acima, enquanto que o eletrodo auxiliar é feito em platina e tem a função de reduzir ruídos elétricos gerados na reação eletroquímica, permitindo que o eletrodo de referência mantenha um potencial constante.

Numa terceira modalidade preferida (Figura 3), a fita teste é composta por uma área de reação (a), de dois ou mais eletrodos de trabalho (b), um eletrodo de referência (c) e um eletrodo auxiliar (d). Essa modalidade visa a detecção simultânea de dois ou mais ácidos nucléicos diferentes, a partir do mesmo processo descrito acima.

A Figura 4 mostra a diferença de potencial, normalmente na faixa de 0,5 V a 1,2 V, mas não restrito apenas a esta faixa, sendo aplicada nos eletrodos de trabalho (b) e referência (c) e o fluxo da corrente entre os eletrodos e a área de reação.

A Figura 5 mostra um gráfico dos sinais emitidos pela fita teste onde a curva (a) representa o sinal referente a sonda imobilizada (sem hibridização) e a curva (b) representa o sinal referente a hibridização no eletrodo de trabalho.



## REIVINDICAÇÕES

1. Processo na forma de biossensor para detecção de ácidos nucleicos caracterizado por imobilizar uma fita simples e específica para cada ácido nucleico alvo de DNA ou PNA e detectar sua hibridização com o DNA ou RNA alvo em um eletrodo de trabalho incorporado a uma fita teste.
2. Processo na forma de biossensor tal como descrito na reivindicação 1 caracterizado por conter e utilizar um eletrodo auxiliar como forma de reduzir o ruído do sinal gerado a partir do eletrodo de trabalho.
3. Um produto na forma de fita teste caracterizado por compreender um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência, um eletrodo auxiliar e uma área de reação.
4. Produto tal qual descrito na reivindicação 3 caracterizado por conter uma fita teste com um fragmento genético 5'- TGG AAA TCT TTT TTT GAA AGG CTT TGG - 3' obtido através de alinhamento genômico para detecção do papilomavírus bovino.
5. Produto tal qual descrito na reivindicação 3 caracterizado por conter uma fita teste com um fragmento genético 5'- CCA AAG CCT TTC AAA AAA AGA TTT CCA - 3' obtido através de alinhamento genômico para detecção do papilomavírus bovino.
6. Produto tal qual descrito na reivindicação 3 caracterizado por conter uma fita teste com um fragmento genético 5' – CCG CAC ACG GCG TTC ACC CAA CGC AGG TA – 3' obtido através de alinhamento genômico para detecção da febre aftosa.
7. Produto tal qual descrito na reivindicação 3 caracterizado por conter uma fita teste com um fragmento genético 5' - AGGGGAGATTTGTGTGGCTGCAGCCGAGGGAGACCAGGAAGATCTGC ATGG -3' obtido através de alinhamento genômico para detecção do câncer de próstata.

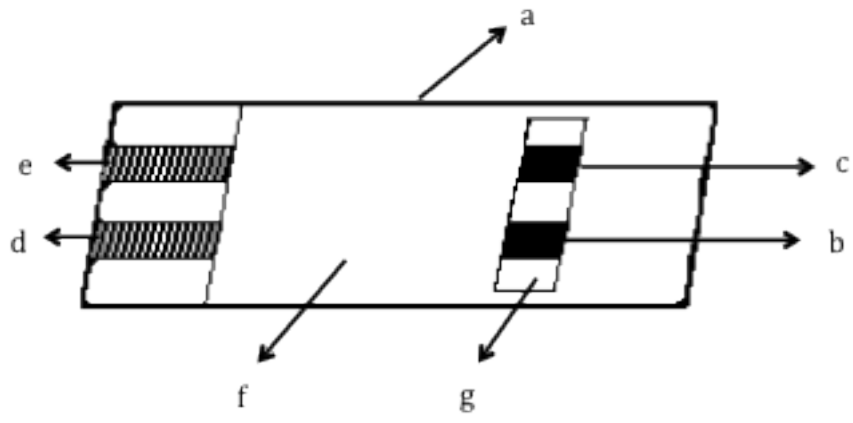
8. Produto tal qual descrito na reivindicação 3 caracterizado por conter uma fita teste com um fragmento genético 5'- CCC CGA TCC CGC CGA CCC TGT C -3' obtido através de alinhamento genômico para detecção do *Leishmania infantum*.
9. Produto tal qual descrito na reivindicação 3 caracterizado por conter uma fita teste com um fragmento genético 5'- GTT CCG GCC CCA CGG CAT CAC C -3' obtido através de alinhamento genômico para detecção do *Leishmania* sp.
10. Produto tal qual descrito na reivindicação 3 caracterizado por conter uma fita teste com um fragmento genético 5'- ICT TCT CIT TTC ICT TTI AA -3' obtido através de alinhamento genômico para detecção do *Leishmania brasiliensis*.
11. Produto tal qual descrito na reivindicação 3 caracterizado por conter uma fita teste com um fragmento genético 5'- GTT CCG GCC CCA CGG CAT CAC C -3' obtido através de alinhamento genômico para detecção do *Leishmania brasiliensis*.

## BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

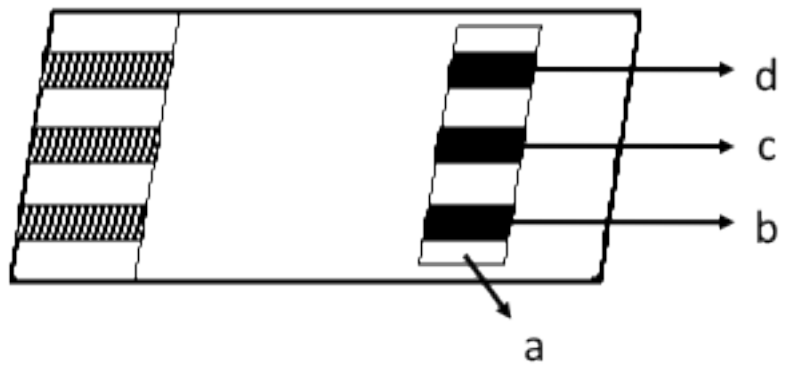
### RESUMO

A presente invenção refere-se a um processo eletroquímico para detecção de ácidos nucleicos e um produto na forma de fita teste, incorporados em um biossensor para detecção de DNA e RNA e por conseguinte das doenças correspondentes.

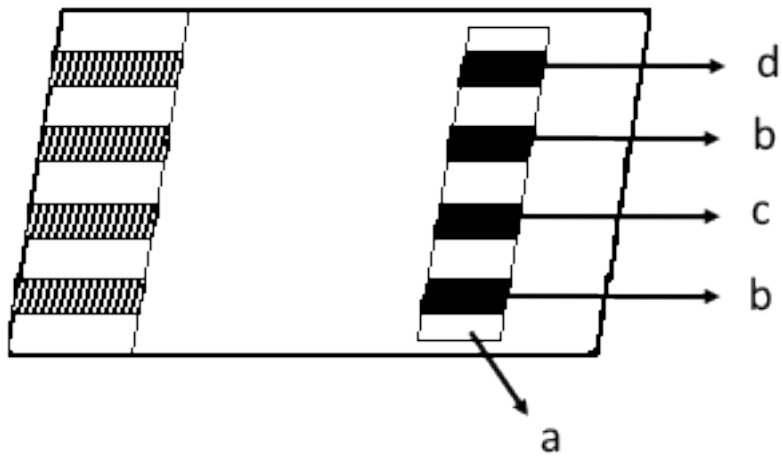
**Figura 1**

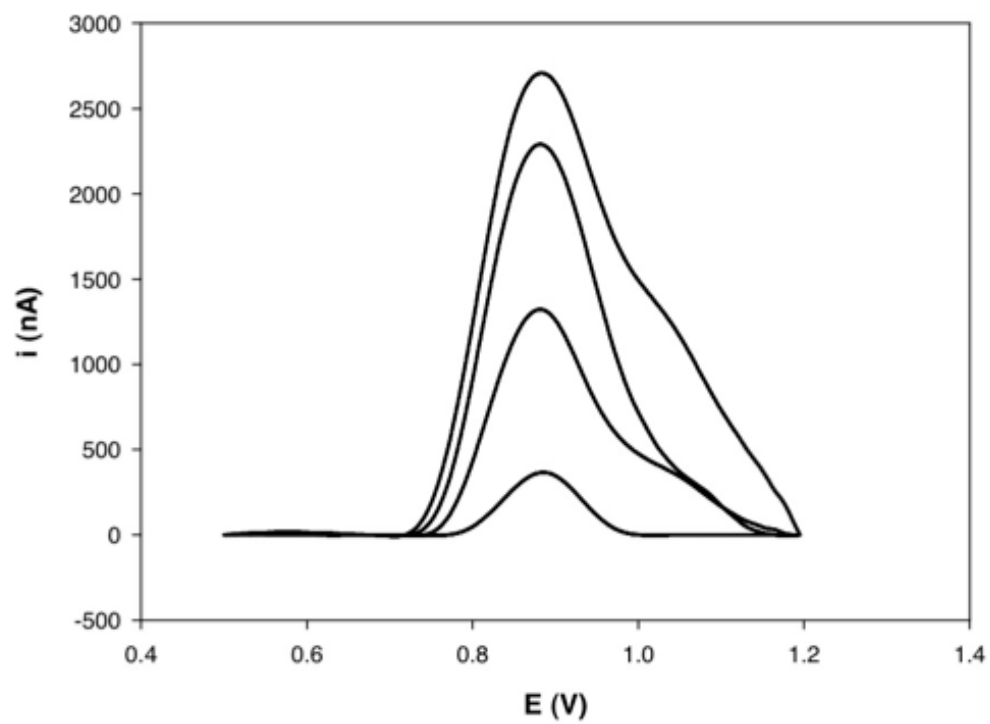


**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4**

**Figura 5**