



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

RAIZA PEREIRA SANTOS DE LUCENA

**GENOSSENSORES ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM  
NANOESTRUTURAS DE GRAFENO E FILME DE POLITIOFENO PARA A  
DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PAPILOMA VÍRUS HUMANO**

Recife  
2021

RAIZA PEREIRA SANTOS DE LUCENA

**GENOSSENSORES ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM  
NANOESTRUTURAS DE GRAFENO E FILME DE POLITIOFENO PARA A  
DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PAPILOMA VÍRUS HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica.

**Área de concentração:** Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Danielly Lima de Oliveira.

**Coorientadores:** Prof<sup>o</sup>. Dr. César Augusto Souza de Andrade.

Prof<sup>o</sup>. Dr. Isaac Aarón Morales Frías.

Recife  
2021

Catalogação na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Lucena, Raiza Pereira Santos de

Genossensores eletroquímicos baseados em nanoestruturas de grafeno e filme de politiofeno para a detecção e identificação de papiloma vírus humano / Raiza Pereira Santos de Lucena. - 2021.

149 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade, Prof. Dr. Isaac Aron Morales Frías.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2021.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Papiloma vírus humano. 2. Diagnóstico. 3. Virologia. I Oliveira, Maria Danielly Lima de (orientadora). II. Andrade, César Augusto Souza de (coorientadora). III. Frías, Isaac Aron Morales (coorientador). IV. Título.

618.14

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-159

RAIZA PEREIRA SANTOS DE LUCENA

**GENOSSENSORES ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM NANOESTRUTURAS  
DE GRAFENO E FILME DE POLITIOFENO PARA A DETECÇÃO E  
IDENTIFICAÇÃO DE PAPILOMA VÍRUS HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Aprovado em: 28 / 01 / 2021.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

---

Profa. Dra. Giselle Soares dos Santos (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

---

Prof. Dr. Kleber Gonçalves Bezerra Alves (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

*Aos meus pais e a minha irmã, vocês foram essenciais para que eu conseguisse caminhar nessa trajetória com êxito. A eles dedico todo meu amor, respeito e gratidão.*

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente a Deus, por tudo que sempre fez e continua fazendo na minha vida. Graças a ti, venho me tornando uma pessoa melhor e isso me orgulha muito. A presença do senhor na minha vida me faz ter mais esperança e nunca desistir dos meus sonhos. Grata, por iluminar meus caminhos e me proteger, e durante essa trajetória consegui construir sabedorias para continuar e nunca desistir. Os obstáculos da vida servem para nos fortalecer e mostrar que nada é impossível quando se tem fé. No meu coração só existe Gratidão!*

*Aos meus pais, **Roberval e Ladjane**, minha base e meu alicerce. Com vocês é onde minha história começa, vocês contribuíram bastante para quem sou hoje e por isso lhes agradeço até o último dos meus dias. Agradeço-lhes portodo incentivo, todo ensinamento, todo investimento, todo amor, ensino moral e tudo que continuam fazendo na minha vida. Nenhuma palavra poderia resumir o que são pra mim, mas saibam que sempre serão tudo. Amo vocês! E tudo que sempre fizeram por mim será recíproco.*

*À minha irmã/filha, **Lauany Lucena**, você é um presente de Deus, nossa alegria diária, meu aprendizado contínuo. Amo você mais que tudo!*

*Ao meu noivo, **Rodrigo Ribeiro**. Obrigada pelo apoio, incentivo, companheirismo, amor, carinho e felicidade. Sou grata por ter você na minha vida e me proporcionar momentos incríveis. Amo-te!*

*Aos meus familiares, agradeço a todos por todo incentivo e apoio. Em especial, minha avó **Cleonice**, minha inspiração e maior exemplo de pessoa que quero seguir ao longo da vida.*

*Aos meus orientadores, **Profa. Dra. Maria Danielly** e ao **Prof. Dr. César Andrade**. Agradeço a estas pessoas incríveis, que admiro muito e que contribuíram bastante no meu crescimento profissional e pessoal. Desde a iniciação científica e hoje mestrado, onde me deram oportunidades, ensinamentos, confiança, paciência, compreensão e suas disponibilidades. Grata!*

*À **Profa. Dra. Norma Lucena** do Laboratório de Imunogenética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz pela colaboração e fornecimento das amostras de HPV.*

Aos colegas do grupo **Biodispositivos Nanoestruturados (BIONANO)**, **Estéfani**, **Giselle**, **Kalline**, Jéssica, Damiris, Leony, Malu, Danilo, Matheus, Brenda, Vanessa e demais, que colaboraram de alguma forma. E em especial **Isaac**, por ter me acompanhado e ensinado, e também por ter contribuído enriquecedoramente nessa pesquisa. Agradeço a **Karen** e **Alberto** por toda ajuda, disponibilidade e contribuição no meu aprendizado. Ah, e uma pessoa que rapidamente virou uma amiga em especial, **Beatriz**.

Às minhas irmãs de alma, **Luana**, **Nara** e **Brenda**, por essa amizade que me fortalece e que me faz muito bem. Obrigada pelo apoio, união, incentivo, pelas festinhas, e acima de tudo, por terem orgulho de mim! E não poderia faltar as amigas de sempre, **Mayara**, **Fernanda**, **Rosângela**, **Mylena**, **Elayne**, **Dandara** e **Carla**. Obrigada por fazer parte de vários momentos da minha vida e por torná-la mais feliz. Agradeço a todos!

Aos amigos de graduação, que compartilhei desde momentos bons aos ruins, e de uma reciprocidade incrível. Em especial, minhas amigas queridas **Sanmiris** e **Luzia** por essa união incrível, que compartilhamos vários desafios e conquistas juntas. Obrigada pelo apoio e por estarem sempre presentes.

Não menos importante, meu cachorro **Spaik** (*in memoriam*), pelos 15 anos de lealdade e pela companhia até de madrugada durante meus estudos. Fazia-me um bem enorme, hoje é minha maior saudade.

#### **A Capes pelo apoio financeiro.**

A todos os mestres, funcionários e alunos do Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica e do Departamento de Bioquímica.

Enfim, sou grata a todos que contribuíram de alguma forma no desenvolvimento deste trabalho e na minha vida profissional e pessoal. Agradeço de coração!

*“Não se deve ir atrás de objetivos fáceis, é preciso buscar o que só se pode ser alcançado por meio dos maiores esforços.”*

*-Albert Einstein*

## RESUMO

O Papilomavírus Humano (HPV) é um grande grupo de vírus que infectam a pele e a mucosa causando verrugas e tumores epiteliais conhecidos como papilomas. Embora o HPV possa ser contraído durante a relação sexual, incluindo vaginal, anal e sexo oral, contato pele a pele é suficiente para causar infecção. Pacientes assintomáticos podem ter o vírus e passá-lo sem saber. Devido à escassez de produtos rápidos e métodos baratos disponíveis para identificar genótipos de HPV, aqui relatamos dois genossensores eletroquímicos como alternativa aos atuais métodos de identificação de HPV, molecular e sorológico. Foram desenvolvidas duas plataformas eletroquímicas: (1) nanofitas de grafeno (GNR) foram usadas como transdutor para imobilizar a sonda de DNA MY11, uma sonda degenerada geralmente empregada em PCR amplificação de um amplo espectro de tipos de DNA de HPV (tipos 33, 51, 53, 62, 66, 11 e 16); (2) Filme de poli (ácido tiofeno-3-acético (PTAA) foram usados para imobilizar a sonda de proteína P53 para identificação HPV (tipos 16, 11, 6, 31, 33, 45 e 58) em espécimes cervicais (amostras de cDNA). Voltametria cíclica (CV), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e microscopia de força atômica (AFM) foram utilizados para caracterizar a construção da plataforma e processar a biodetectção. Na plataforma 1 (NFG-MY11), nossos resultados sugerem que os subtipos oncogênicos do papilomavírus humano são rapidamente detectados e identificados na faixa de picogramas. Respostas impedimétricas agrupadas por subtipos de HPV 51, 53 e 66 genotipicamente relacionados com lesões anogenitais. Além disso, esse genossensor foi capaz de detectar com sucesso os tipos de HPV 16 e 18 em amostras de plasmídeos nas concentrações de 1 aM, 100 aM, 100 fM, 50 pM e 100 pM com um limite de detecção (LOD) de 3,5 aM e 1,2 aM para HPV 16 e HPV 18, respectivamente. Na plataforma 2 (PTAA-P53), os resultados impedimétricos revelaram aumento nos diâmetros do semicírculo de acordo com o grau de gravidade das lesões que induzem o câncer. Para os HPV de baixo risco (6 e 11) obtemos um pequeno aumento do diâmetro do semicírculo, quando comparados aos HPVs de risco intermediário (31, 33 e 58) e os de alto risco (45 e 16). A proteína p53 foi utilizada para avaliar o grau de lesões em amostras cervicais de pacientes infectados. Portanto, as plataformas genossensoras propostas podem ser

consideradas como novas ferramentas para detecção e identificação genótipos de HPV. Desta forma, proporcionando aos pacientes melhor qualidades de vida e minimizando o custo no sistema de saúde, fornecendo um prognóstico.

Palavras-chave: Genossensor; Nanofitas de grafeno; PTAA; HPV; Eletroquímica.

## ABSTRACT

Human Papillomavirus (HPV) is a large group of viruses that infects the skin and mucosa causing warts and epithelial tumors known as papillomas. Although HPV can be contracted during sexual intercourse, including vaginal, anal and oral sex, skin-to-skin contact is sufficient to cause infection. Asymptomatic patients can have the virus and pass it on without knowing it. Due to the scarcity of fast products and inexpensive methods available to identify HPV genotypes, here we report two electrochemical genosensors as an alternative to current HPV identification methods, molecular and serological. Two electrochemical platforms have been developed: (1) graphene nanofibers (GNR) were used as a transducer to immobilize the MY11 DNA probe, a degenerate probe generally employed in PCR amplification of a wide spectrum of HPV DNA types (types 33, 51, 53, 62, 66, 11 and 16); (2) Poly(thiophene-3-acetic acid (PTAA) film was used to immobilize the P53 protein probe for HPV identification (types 16, 11, 6, 31, 33, 45 and 58) in cervical specimens (samples of cDNA). Cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and atomic force microscopy (AFM) were used to characterize the construction of the platform and process biodetection. On platform 1 (NFG- MY11), our results suggest that the oncogenic subtypes of human papillomavirus are quickly detected and identified in the picogram range. Impedimetric responses grouped by HPV subtypes 51, 53 and 66 genotypically related to anogenital lesions. In addition, this genosensor was able to successfully detect HPV types 16 and 18 in plasmid samples at concentrations of 1 aM, 100 aM, 100 fM, 50 pM and 100 pM with a detection limit (LOD) of 3, 5 aM and 1.2 aM for HPV 16 and HPV 18, respectively. In platform 2 (PTAA-P53), the impedimetric results revealed an increase in the diameters of the semicircle according to the degree of severity of the lesions that induce cancer. For low-risk HPVs (6 and 11), we obtained a small increase in the diameter of the semicircle, when compared to intermediate-risk HPVs (31, 33 and 58) and high-risk HPVs (45 and 16). The p53 protein was used to assess the degree of lesions in cervical samples from infected patients. Therefore, the proposed genosensory platforms can be considered as new tools for the detection and identification of HPV genotypes. In this way, providing patients with better quality of life and minimizing the cost in the health system, providing a prognosis.

Keywords: Genosensor; Graphene nanoribbons; PTAA; HPV; Electrochemistry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Modelo representativo do vírus do HPV	24
Figura 2	Representação do genoma HPV mostrando arranjo das proteínas precoces (E), os genes capsídeos (L1 e L2) e a região de longo controle (LCR)	25
Figura 3	Árvore filogenética do HPV	27
Figura 4	Estimativa de novos casos de câncer no Brasil, em 2020	29
Figura 5	Fluxograma do processo de diagnóstico do HPV	31
Figura 6	Esquema geral do funcionamento de um biossensor. A detecção do analito (A) é realizada através de um componente biológico (B) associado a um transdutor (C). A superfície transdutora é responsável pela conversão da resposta bioquímica em um sinal mensurável (D) que será amplificado e processado por um software de computador (E), posteriormente, os dados experimentais serão apresentados na forma de gráficos (F)	33
Figura 7	Classificação dos biossensores	34
Figura 8	Representação esquemática dos métodos de biossensibilidade com vários mecanismos de sinal biológico: (a) anticorpo/antígeno; (b) catalisador enzimático; (c) baseado em células; (d)nucleico ácido e (e) biomimético	43
Figura 9	Representação esquemática de um biossensor desenvolvidopara detectar o HPV e técnicas utilizadas na conversão de sinal através de SPR, EIE e QCM	44
Figura 10	Representação esquemática da formação de ligações de hidrogênio entre DNA e RNA nucleobases complementares (A) e estruturas das formas A e B do DNA	46
Figura 11	Estratégias de imobilização de biomoléculas, como por exemplo, segmentos de ácidos nucleicos, em superfícies transdutoras	48
Figura 12	Representação das principais formas alotrópicas do carbono: (a) grafeno, (b) fulereno, (c) nanotubo de carbono e (d) grafite	50

Figura 13	Esquema dos principais elementos de reconhecimento biológico que podem ser imobilizados em grafeno para aplicações de biosensor	51
Figura 14	Estrutura química do politiofeno	53
Figura 15	Tipos de derivados do politiofeno	53
Figura 16	Estrutura química do poli (ácido 3-tiofenoacético)	54
Figura 17	Aplicação do potencial para a voltametria cíclica: A) potencial com varredura linear e B) voltamograma obtido para um sistema reversível	55
Figura 18	Representação de um diagrama de Nyquist	59
Figura 19	Representação circuito equivalente de Randles	59
Figura 20	Representação esquemática demonstrando a releção do circuito equivalente com os processos que ocorrem na interface eletrodo/solução. Onde, (A) Camada de Helmholtz, (B) Camada difusa, (C) Seio da solução	60
Figura 21	Esquema ilustrativo do mecanismo de funcionamento básico do AFM	62
Figura 22	Efeito da distância entre a sonda e a amostra sobre o regime de forças do sistema	63
Figura 23	Modos de operação do AFM: modo de contato (A), modo de não contato (B) e modo de contato intermitente (C)	64
Figura 24	Representação esquemática dos equipamentos de análise dos biosensores, (a) potenciómetro/galvanômetro PGSTAT 128N, (b) Gaiola de Faraday, (c) célula eletroquímica composta por três eletrodos (eletrodo de trabalho, contra-eletrodo e eletrodo de referência), (d) sistema de amplificação e processamento	67
Figura 25	Analise MEV das nanofitas de grafeno empregadas como transdutor no desenvolvimento do genossensor para HPV	69
Figura 26	Representação esquemática do genossensor impedimétrico (NFG-sondaMY11) para detecção de diferentes amostras deDNA alvo de HPV. Adsorção de nanofitas de grafeno com grupos – COOH e -SH na superfície do outro (a), imobilização de sonda oligonucleotídica degenerada com grupos -NH <sub>2</sub> via EDC:NHS (b) e hibridização do HPV alvo	70

Figura 27	Representação esquemática do sistema sensor PTAA-sondaHPV (p53)	72
Figura 28	Imagens topográficas do AFM em 3D revestidas com NFG (A), NFG-MY11 (B), NFG-MY11-HPV16 (C) e NFG-MY11-controle negativo (D). Área de varredura 5 $\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$	73
Figura 29	Análises de VC e EIE do processo de modificação do sistema: Voltamograma cíclico (A) e diagrama de Nyquist (B) após a adsorção do grafeno sobre o eletrodo de ouro e voltamograma cíclico (C) e diagrama de Nyquist (D) do processo de immobilização do primer após ativação via EDC:NHS	75
Figura 30	Diagramas de Nyquist do sistema genossensor NFG-MY11 para a) HPV33, b) HPV 51, c) HPV53, d) HPV62, e) HPV66, e amostras negativas f) <i>Candida Albicans</i> e g) <i>Mycobacterium tuberculosis</i> na concentração (100pg. $\mu\text{L}^{-1}$ ) Circuito equivalente de Randle	77
Figura 31	Gráfico tridimensional para os valores Rct, Q e n, obtidos como resultado do ajuste dos resultados com o circuito equivalente	78
Figura 32	Biosensor desenvolvido sobre substrato flexível para identificação e diferenciação de subtipos oncogênicos de HPV	80
Figura 33	Biosensor desenvolvido sobre substrato flexível para identificação e diferenciação de subtipos oncogênicos de HPV	81
Figura 34	Diagrama de Nyquist do sistema genossensor exposto a diferentes concentrações de plasmídeo recombinantes contendo genomas de HPV 16 e HPV 18 [DNA alvo – 1aM, 100aM, 1E5 (100fM), 50E7 (50pM), 1E8 (100pM)]	82
Figura 35	$\Delta\text{Rct}$ para o sistema genossensor NFG_sondaMY11 após exposição com as diferentes concentrações de genomas de HPV 16 e HPV 18. Os dados usados para obtenção do $\Delta\text{Rct}$ foram demonstrados na tabela 2	84
Figura 36	Diagrama de Nyquist dos HPV 6, 11, 16, 18	86
Figura 37		87

Figura 38	Valores do $\Delta R_{ct}$ obtidos a partir dos ensaios com as amostras de plasmídeos contendo genomas dos HPV 6, HPV 11, HPV 16, HPV 18 [Concentração de $100\text{pg}.\mu\text{L}^{-1}$ ]	89
Figura 39	Gráfico voltamétrico do processo de polimerização do PTAA	90
Figura 40	Análises de VC e EIE do processo de imobilização da sonda p53 no PTAA após ativação via EDC:NHS	92
Figura 41	Resposta impedimétrica do genossensor (PTAA-sondaP53) para amostras de cDNA de pacientes infectados com diferentes tipos de HPV. Os gráficos a) HPV 6, b) HPV 31, c) HPV33, d) HPV45 e e) HPV 58 na concentração $100\text{ pg}.\mu\text{L}^{-1}$	93
Figura 42	Resposta impedimétrica do genossensor PTAA-sondaHPV(p53) para amostras de cDNA de pacientes infectados com HPV 16 e b) HPV 11 na concentração ( $75\text{ pg}.\mu\text{L}^{-1}$ )	94
Figura 43	Gráfico de barra a partir da extração de dados $\% \Delta R_{ct}$ de amostra de cDNA de diferentes genomas de HPV e circuito equivalente de Randles	96

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Parâmetros obtidos pelo ajuste das respostas impedimétricas com o circuito equivalente de amostras plasmidiais contendo HPV associados a lesões anogenitais	79
Tabela 2	Valores dos elementos de circuito equivalente dos resultados de impedância de genótipos de HPV de alto risco	85
Tabela 3	Valores dos elementos de circuito equivalentes dos resultados da impedância ajustada de genótipos de HPV de alto e baixo risco oncogênico	88
Tabela 4	Valores dos elementos de circuito equivalente dos resultados de impedância das amostras de cDNA contendo HPV de alto e baixo risco oncogênico	95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
cDNA	DNA complementar
CNTs	Nanotubo de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	1,4-ditiotreitol
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
GO	Óxido de grafeno
HCl	Ácido clorídrico
HPV	Papiloma Virus Humano
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MWCNTs	Nanotubos de carbono com múltiplas paredes
MWE	MWCNTs esfoliados
NFG	Nanofitas de grafeno
NFG-COOH	Nanofitas de grafeno carboxilada
NFGTh	Nanofitas de grafeno tiolada
NHS	N-hidroxissuccinimida
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia de Polimerase
PTAA	Poli (ácido tiofeno 3-acético)
P53	Proteína de tumor
QCM	Microbalança de cristal de quartzo
rGO	Óxido de grafeno reduzido
RMT	Resistência à transferência de massa
SPR	Ressonância de plasma de superfície
TAA	Ácido 3-tiofeno acético
V	Volt
VC	Voltametria Cíclica
2D	Nanomaterial bidimensional

## LISTA DE SÍMBOLO

$C_{dl}$	Capacitância de Dupla Camada Elétrica
$R_{ct}$	Resistência à transferência de carga
$I_{pa}$	Corrente de pico anódica
$I_{pc}$	Corrente de pico catódica
$Z_w$	Impedância de Warburg
$R_s$	Resistência da Solução
$E$	Potencial
$E_i$	Potencial inicial
$E_v$	Potencial de Vértice
$ne^-$	Número de elétrons
$O$	Forma Oxidada
$R$	Forma reduzida
$I$	Corrente
$Z$	Impedância
$Z_F$	Impedância Faradaica
$\Omega$	Ohm
$\phi$	Ângulo de Fase
$Z_{re} / Z'$	Eixo Real da Impedância
$Z_{im} / Z''$	Eixo Imaginário da Impedância
$ Z $	Módulo da Impedância
$\omega$	Frequência angular
$\Delta R_{ct}$	Variação Relativa do $R_{ct}$
$\theta$	Grau de Revestimento de Superfície
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
$\%$	Por cento
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\text{mM}$	Milimolar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
<b>2.</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>24</b>
2.1	PAPILOMA VÍRUS HUMANO	24
<b>2.1.1</b>	<b>Relação filogenética</b>	<b>26</b>
2.2	EPIDEMIOLOGIA	28
2.3	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICOS	30
2.4	BIOSSENSORES	32
<b>2.4.1</b>	<b>Classificação dos biossensores quanto ao elemento transdutor</b>	<b>34</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Classificação de acordo com a natureza do elemento receptor</b>	<b>38</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Genossensores</b>	<b>44</b>
<b>2.4.4</b>	<b>Estratégias de imobilização de DNA</b>	<b>46</b>
2.5	NANOESTRUTURAS	49
<b>2.5.1</b>	<b>Nanofitas de grafeno</b>	<b>49</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Poli (ácido tiofeno-3-acético)</b>	<b>52</b>
2.6	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA	54
<b>2.6.1</b>	<b>Voltametria cíclica</b>	<b>54</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Espectroscopia de impedância eletroquímica</b>	<b>56</b>
2.7	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	61
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>65</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	65
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	65
<b>4.</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>66</b>
4.1	MATERIAIS	66
4.2	INSTRUMENTAÇÃO	67
4.3	SINTESE DAS NANOFITAS DE GRAFENO	68
4.4	PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE ELETRODO E OBTENÇÃO DOS SISTEMAS SENSORES	69
<b>4.4.1</b>	<b>Ouro-NFG-sondaMY11</b>	<b>69</b>

<b>4.4.2 Ouro-PTAA-sondaP53</b>	<b>71</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>72</b>
<b>5.1 PLATAFORMA 1 (GENOSENSOR NFG-MY11)</b>	<b>72</b>
<b>5.1.1 Caracterização topográfica das etapas de modificação Do eletrodo de ouro</b>	<b>72</b>
<b>5.1.2 Estudos eletroquímicos dos processos de montagem Do biosensor</b>	<b>74</b>
<b>5.1.3 Caracterização por espectroscopias de impedância eletroquímica para detecção de subtipos de HPV</b>	<b>76</b>
<b>5.1.4 Identificação da relação filogenética entre diferentes genomas de HPV</b>	<b>80</b>
<b>5.1.5 Desenvolvimento de protótipo de diagnóstico portátil para identificação e diferenciação de subtipos oncogênicos de HPV</b>	<b>81</b>
<b>5.1.6 Ensaio de sensibilidade</b>	<b>83</b>
<b>5.1.7 Identificação impedimétrica de HPV de alto e baixo risco</b>	<b>87</b>
<b>5.2 PLATAFORMA 2 (GENOSENSOR PTAA-P53)</b>	<b>89</b>
<b>5.2.1 Síntese eletroquímica do filme de PTAA</b>	<b>89</b>
<b>5.2.2 Caracterização eletroquímica da detecção das amostras de cDNA pelo genossensor (PTAA-sondaP53)</b>	<b>90</b>
<b>5.2.3 Caracterização eletroquímica da plataforma do genossensor (PTAA-sondaP53)</b>	<b>92</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>97</b>
<b>7 PERSPECTIVAS</b>	<b>99</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>100</b>
<b>APÊNDICE A – IMPEDIMETRIC GENOSENSOR BASED ON GRAPHENE NANORIBBONS FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF ONCOGENIC TYPES OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS</b>	<b>122</b>
<b>ANEXO A – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO NA REVISTA JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY &amp; BIOTECHNOLOGY</b>	<b>146</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Papiloma Vírus Humano (HPV) são vírus capazes de infectar a pele e a mucosa. Existem mais de 200 tipos de HPVs, classificados de acordo com seu potencial oncogênico, em alto risco e baixo risco. Quando acometem as regiões genitais é considerada uma Infecção Sexualmente Transmissível (IST). A infecção por tipos de HPVs de alto risco estão relacionadas com o desenvolvimento de neoplasias de evoluções lentas, que pode ocasionar o câncer do colo uterino, vulva, pênis, canal anal e orofaringe. A incidência do HPV na população brasileira é uma questão preocupante na saúde, tendo alta prevalência na população, incluindo jovens (BRAY *et al.*, 2018; PEREIRA; DE CASTRO, 2020). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) em sua publicação de 18 de fevereiro de 2020, no Brasil são esperados 16.590 casos novos de câncer de colo de útero, com uma estimativa de 12,6 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2020). A Região Nordeste do Brasil é a segunda em números de ocorrências de câncer cervical.

Na maioria dos casos, os portadores do papiloma vírus humano não apresentam sinais e sintomas, pois o vírus pode ser combatido pelo sistema imunológico do hospedeiro e regredir naturalmente ou permanecer no organismo de forma latente, e o indivíduo infectado não chega a tomar ciência de que porta HPV (DE CARVALHO; COSTA, 2019). Porém, nos casos em que o patógeno persiste, costuma replicar seu material genético dentro do hospedeiro, causando danos celulares que comumente evoluem para processos patológicos mais graves como o câncer (ALBERTS *et al.*, 2010; BRAY *et al.*, 2018).

Os diferentes tipos de HPV podem ser agrupados de acordo com sua capacidade oncogênica: baixo risco e alto risco. Os HPVs mais comuns são HPV 16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 e as infecções com estes tipos estão associadas à maioria dos cancros anogenitais. Os tipos de baixo risco HPV 6 e 11 são comumente associados a verrugas benignas. Globalmente, o HPV 16 e 18 são os genótipos de HPV dominantes e são responsáveis por causar o câncer cervical em mulheres. No Brasil, nas regiões Norte, Sul e Sudeste o HPV 16 e 18, são mais comuns, enquanto nas regiões Nordeste e Central os tipos HPV 31 e 33 também são prevalentes (COSTA *et al.*, 2019)

Os métodos de diagnósticos do papilomavírus consistem em lesões subclínicas que podem ser avaliadas através de exames laboratoriais. Os testes moleculares baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Captura Híbrida (CH) são bastante sensíveis e precisos, e buscam diretamente a identificação do DNA viral. Entretanto, Estas tecnologias requerem de uma estrutura laboratorial robusta e laboriosa que na maioria das vezes é pouco acessível à maioria da população (SANTOS; FONSECA, 2008; DOS SANTOS *et al.*, 2016).

O desenvolvimento de métodos analíticos com potencial inovador que possibilitem o diagnóstico sensível e precoce, que minimize os custos com saúde pública e tratamento medicamentoso, torna-se necessário para o diagnóstico mais efetivo e melhorar a qualidade de vida do paciente. Como alternativa para esta problemática envolvendo o diagnóstico e identificação do subtipo de HPV infectante, diversos dispositivos eletrônicos conhecidos como biossensores vem sendo desenvolvidos. Um biosensor é um dispositivo composto por materiais de origem biológica, tais como proteínas, organelas, tecidos, microrganismos, antígenos ou anticorpos, ácidos nucleicos entre outros, que são imobilizados junto a um material transdutor adequado que reconhecerá o analito e amplificará o sinal de detecção (ZARE; SHEKARI, 2019) .

Os biossensores desenvolvidos são comparados em termos de precisão, reproduzibilidade, regeneração, estabilidade e especificidade. Métodos eletroanalíticos, tais como voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), fazem uso de propriedades elétricas mensuráveis (potencial, carga e corrente) e podem ser utilizadas para o estudo da interação entre biomoléculas e plataformas nanoestruturadas composta por nanomateriais, tais com nanofitas de grafeno quimicamente modificadas. (KUMAR, S. *et al.*, 2015).

Os nanomateriais vêm sendo aplicados no desenvolvimento de biossensores devido às suas vantagens como biocompatibilidade, versatilidade, estabilidade química, grande relação superfície-volume e alta condutividade elétrica. Dentre esses nanomateriais, nanofitas de grafeno (NFG) se destacam por apresentar característica de crescer em uma dimensão (comprimento), o que aumenta a relação área/borda e assim o número de sítios de funcionalização. As excelentes propriedades das NFG incluem rápida transferência de elétrons, dispersão em água, biocompatibilidade, aumento da área superficial, não-citotoxicidade com

biomoléculas, alta condutividade térmica (RASHEED; SANDHYARANI, 2017). Em adição, polímeros condutores como o poli (ácido tiofeno 3-acético) (PTAA) também apresentam aplicabilidade no desenvolvimento de biossensores, diante de suas propriedades, como estabilidade química e boa condutividade elétrica (NAIR; MISHRA; KUMAR, D., 2019). Estes polímeros apresentam características estruturais químicas que favorecem as modificações covalentes essenciais para o desenvolvimento de dispositivos sensores (WANG, S. *et al.*, 2017).

Assim, a associação da nanomateriais e técnicas eletroquímicas de análises são essenciais para o desenvolvimento de novos sistemas sensores. O desenvolvimento de um genossensor impedimétrico para detecção do HPV, conta com a capacidade de identificar o material genético do vírus de forma mais prática a partir de uma análise de impedância eletroquímica. Estes biossensores consistem em plataformas que servem de transdutor base para fixação da sonda genética, que irá interagir com o DNA complementar encontrado na amostra, possibilitando um rápido diagnóstico (YANG *et al.*, 2015)

Neste trabalho, foram preparadas duas plataformas a seguir: a primeira plataforma foi desenvolvida com nanofitas de grafeno funcionalizadas com grupos tiol, processo este essencial para permitir a ancoragem no eletrodo de trabalho e posterior imobilização covalente da sonda degenerada MY11 para detecção e identificação de genótipos de HPV de alto e baixo risco. E a segunda plataforma foi desenvolvida com filmes finos de poli (ácido tiofeno 3-acético) e sonda de HPV (p53) para avaliar a expressão do gene p53 em amostras de cDNA contendo o genoma viral. Desta forma, a presente dissertação apresentou como principal objetivo o desenvolvimento de dois genossensores impedimétricos como alternativa diagnóstica para detecção e identificação de genótipos de HPV.

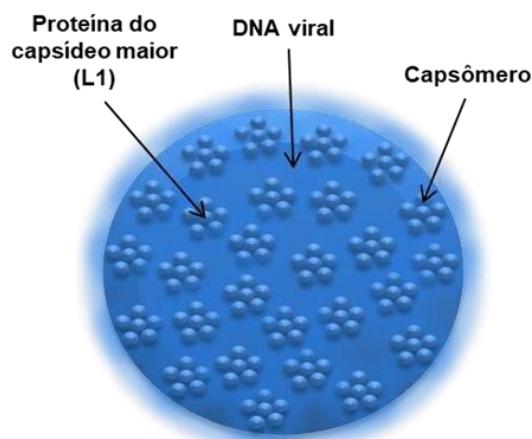
## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 PAPILOMA VÍRUS HUMANO

O HPV é um vírus que apresenta tropismo com células epiteliais ou mucosas (oral, genital ou anal), tanto de mulheres quanto de homens, causando diversos tipos de lesões desde verrugas comuns a verrugas genitais (região genital e no ânus), podendo causar neoplasias ou persistir de forma assintomática a depender do tipo de vírus (BERNARD *et al.*, 2010; PEREIRA; DE CASTRO, 2020).

São pequenos vírus de DNA não envelopado, com capsídeo icosaédrico com diâmetro de 50 a 60 nm, e peso molecular de  $5,2 \times 10$  daltons. Possui um genoma constituído por dupla hélice de DNA circular com aproximadamente 8000 pares de base (8Kb) de DNA (Figura 1), apesar do tamanho pequeno, sua biologia molecular é bastante complexa (ARALDI *et al.*, 2018).

**Figura 1.** Modelo representativo do vírus do HPV.



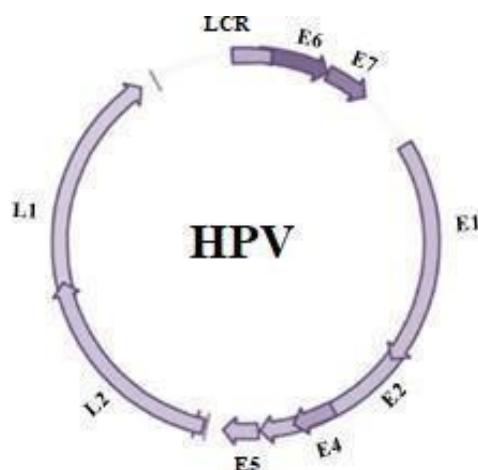
Fonte: Elaborada pelo autor.

O DNA viral está associado a proteínas similares a histonas, que são proteínas que participam na regulação de genes, possui 72 capsômeros constituídos por duas proteínas estruturais, L1 e L2 (KIM, 2016).

O genoma viral está organizado em três regiões: a região precoce (E) que tem como função codificar as proteínas envolvidas na replicação do DNA viral e na transformação das células que compõem E1, E2, E6 e E7. A região tardia (L) codifica as proteínas do capsídeo L1 e L2 que são responsáveis pelas etapas finais da replicação do vírus e secundária do capsídeo, e a região longa de controle (LCR)

possui a maioria dos elementos reguladores envolvidos no DNA viral domínio terminal. Os genes E6 e E7 estão associados a lesões malignas, que se associam as proteínas celulares p53 e pRb envolvidas no controle da proliferação celular e eliminam suas funções assumindo o controle (LETO *et al.*, 2011).

**Figura 2.** Representação do genoma HPV mostrando arranjo das proteínas precoces (E), os genes capsídeos (L1 e L2) e a região longa de controle (LCR).



Fonte: Adaptada MOHAMMED *et al.*, (2016).

Os genes supressores de tumor atuam no controle de crescimento e diferenciação celular (KOUSHIK *et al.*, 2005; KOSHIOL *et al.*, 2009). O TP53 é um gene supressor de tumor que age na regulação do desenvolvimento e do crescimento celular, responsável por codificar a proteína p53.

A Proteína p53 é responsável por um fator de transcrição capaz de inibir o crescimento de células tumorais, provocando a apoptose (WANG *et al.*, 2008; LU *et al.*, 2020). A p53 é considerada uma oncoproteína, pois apresenta um elevado nível de expressão em tumores. Desta forma, prevenindo que ocorra a proliferação de células com o DNA mutado levando ao desenvolvimento de câncer (LU *et al.*, 2020).

Quando ocorre a mutação dos genes supressores de tumores e a ativação dos oncogenes, temos a transformação de células normais em malignas, que resulta na tumorigênese. Consequentemente, a expressão da proteína do oncogene pode funcionar como um marcador tumoral.

A p53 é uma proteína bastante estudada como produto do gene do câncer e tem sido usada como biomarcador de câncer em diagnósticos clínicos (TERSE-THAKOOR; BADHULIKA; MULCHANDANI, 2017).

### **2.1.1 Relação filogenética**

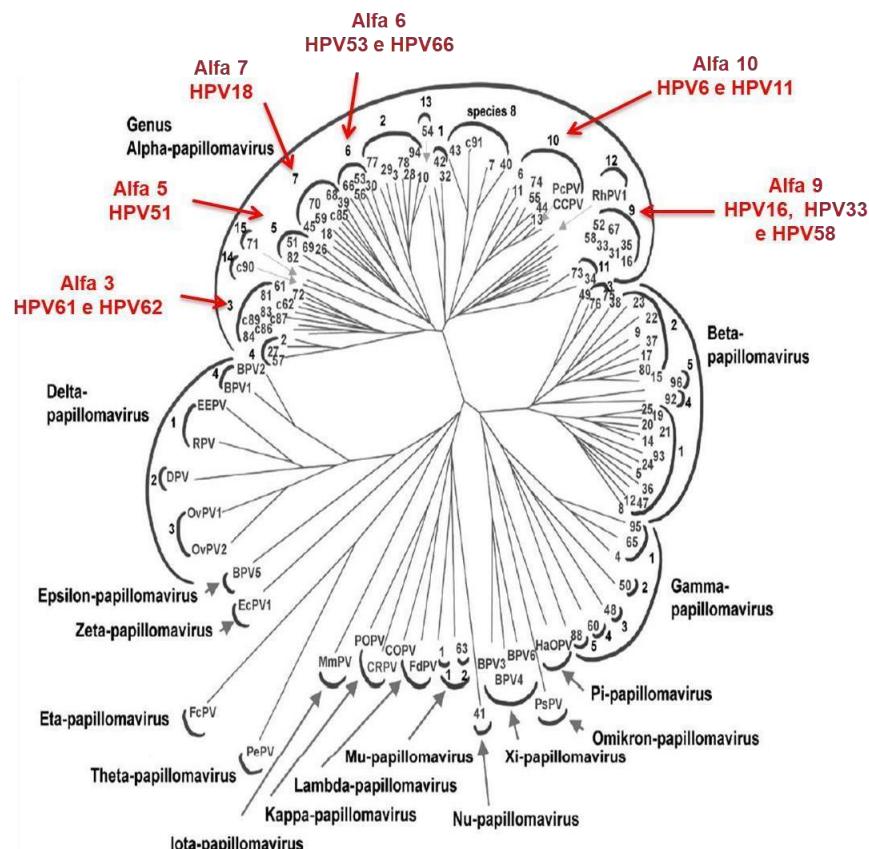
Os HPVs podem ser classificados taxonomicamente em tipos, subtipos e variantes de acordo com a base na sequência nucleotídica do gene L1. O termo tipos de HPV difere entre si pelo menos 10% na sequência nucleotídica do gene L1. O subtipo varia da diferença entre 2% e 10% de homologia dos tipos mais próximos, e são utilizados para identificar genomas de HPV com sequências de nucleotídeos de L1. As variantes de tipos diferem em menos de 2% na sequência de nucleotídeos de L1, e em 5% na LCR (CHEN; DE FREITAS; BURK, 2015; MCBRIDE, 2017).

Os HPVs são agrupados em cinco gêneros principais e baseados em diferenças em suas sequências de DNA: alfabapilomavírus, betabapilomavírus, gamabapilomavírus, mupapilomavírus e nupapilomavírus (BURK; HARARI; CHEN, 2013; BANSAL; SINGH; RAI, 2016). Os gêneros mais representativos são Alfa e o Beta, a maioria dos HPVs pertencem a estes dois gêneros. No gênero Beta, encontramos tipos associados com infecções cutâneas não aparentes em humanos, estes vírus podem estar associados ao desenvolvimento de câncer de pele (BERNARD *et al.*, 2010; COMBES, 2018).

Os HPVs quando classificados em genótipos são baseados na homologia do DNA, dentro deste grupo existem mais de 200 tipos que infectam humanos (SIQUEIRA, *et al.*, 2016; ARALDI *et al.*, 2018). A maioria das infecções são assintomáticas e transitórias, algumas possuem persistência por tipos oncogênicos representados pelos HPVs de alto risco que podem ocasionar no desenvolvimento do câncer. Os tipos mais comuns de HPV cuja infecção pode provocar o desenvolvimento de neoplasia celular são os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68 e 70, e os que não levam ao desenvolvimento de câncer são considerados de baixo risco, entre eles se encontram os subtipos 6, 11, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 72, 81, 84 e 86 (SERRANO, 2017).

A maioria dos tipos de HPVs pertence ao gênero Alfa, onde estão presentes a maioria de HPV genitais. Os demais tipos de HPVs pertencem aos gêneros, gamapapilomavírus, mupapilomavírus e nupapilomavírus, e geralmente responsáveis por causar papilomas cutâneos e verrugas que na maioria das vezes não progridem para câncer (MCBRIDE, 2017). Na Figura 3, a árvore filogenética apresentando a relação genética entre 118 tipos de HPV conhecidos. É possível observar a variabilidade filogenética que diferencia os diferentes subtipos de HPV. Desta maneira, subtipos de HPV encontrados num mesmo ramo são mais similares geneticamente entre eles, e ao mesmo tempo, altamente dissemelhantes aos subtipos catalogados dentro dos outros ramos (COMBES; FRANCESCHI, 2018). Destacamos em vermelho na árvore filogenética alguns subtipos de HPV que foram testados para o desenvolvimento deste trabalho.

**Figura 3.** Árvore filogenética do HPV.



Fonte: Adaptada DE VILLIERS et al., (2004).

Aproximadamente 60 dos tipos descritos tem relação ao gênero *Alphapapilomavírus*, e estão diretamente associadas no desenvolvimento de ambas às doenças, malignas ou benignas, tais como condiloma acuminado, papilomatose respiratória, e diversos tipos de câncer como os cervicais, anal, cabeça, pescoço, orofaringe e outros (BURK, Robert; HARARI; CHEN, 2013; COMBES; FRANCESCHI, 2018). Os *Alphapapilomavírus* são classificados nas seguintes espécies: Alpha-9 (HPV16, HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58, HPV67); Alpha-7 (HPV18, HPV, 39, HPV45, HPV59, HPV68, HPV70, HPV85, HPV97); Alpha- 5 (HPV26, HPV51, HPV69, HPV82); Alpha-6 (HPV30, HPV53, HPV56, HPV66); Alpha-11 (HPV34, HPV73); Alpha-10 (HPV6, HPV11); Alpha-13 (HPV54); Alpha-3 (HPV61). Os grupos alpha-5, alpha-6, alpha-7 e alpha-9 estão envolvidos na maioria dos carcinogêneses anogenitais (CHEN *et al.*, 2018).

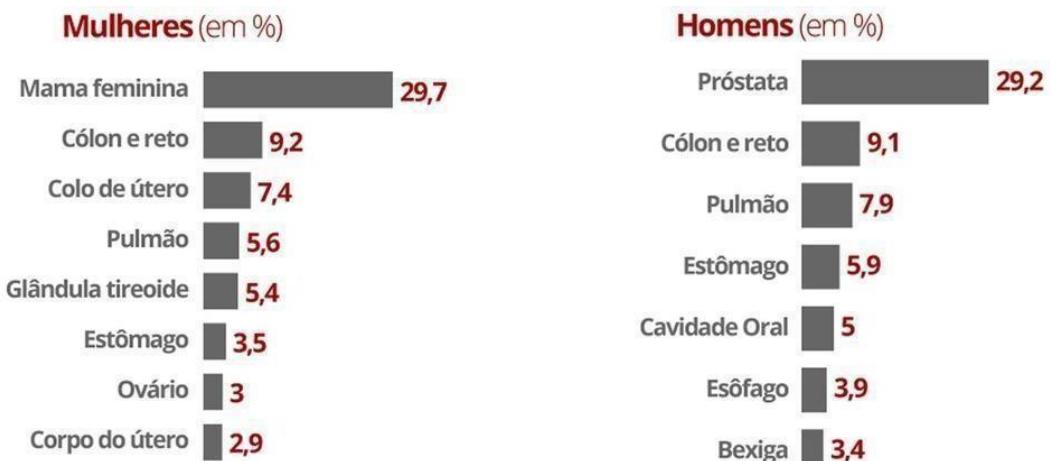
## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

Infecção pelo HPV é uma infecção sexualmente transmissível (IST) com maior prevalência no mundo. Globalmente, o HPV 16 e HPV 18 estão presentes em 70% das biópsias feitas em pacientes com câncer cervical, e causalmente envolvidos na patogênese do câncer anogenital (ânus, vulva, vagina e pênis). Os HPVs de alto risco também são responsáveis por 63% dos cânceres de pênis e 89% dos cânceres anais (WENDLAND *et al.*, 2018). Apesar de serem os tipos de HPVs mais frequentes detectados em carcinomas de células escamosas. Deve-se considerar que embora os níveis de infecção sejam elevados, relativamente em poucos casos há progressão maligna, já que 95% dos casos o próprio organismo, provavelmente pela ação do sistema imunológico, consegue eliminar o vírus (WENDLAND *et al.*, 2018).

O HPV 16 se destaca como o tipo oncogênico mais frequente em exames citológico normal, seguido pelo HPV 18, HPV 52, HPV 31 e HPV 58 em ordem específica (WENDLAND *et al.*, 2018). Quando afeta os órgãos genitais é uma infecção considerada de transmissão sexual, contudo, a transmissão de mãe para filho no momento do parto é possível devido ao trato genital materno estar infectado. Entretanto, somente um pequeno número de crianças desenvolvem sequelas congênitas como a papilomatose respiratória juvenil (BRUNI *et al.*, 2015; SERRANO *et al.*, 2018).

A prevalência por HPV ainda é uma problemática para o sistema de saúde, no Brasil o câncer cervical se apresenta como o terceiro tipo de câncer mais comum nas mulheres, ficando atrás apenas do câncer de mama e do câncer de colo-retal, sendo, a quarta causa mais comum de morte de mulheres por câncer (ABREU *et al.*, 2018). A Figura 4 apresenta a estimativa de 2020 demonstrando novos casos de câncer por ano (INCA, 2020). Segundo o Inca, cerca de 7,6 milhões de pessoas em todo o mundo podem morrer por causa do câncer a cada ano. E a previsão é que 6 milhões de pessoas morram prematuramente por ano até 2025, caso medidas de prevenção não sejam adotadas.

**Figura 4.** Estimativa de novos casos de câncer no Brasil, em 2020.



Fonte: Adapatada, INCA (2020).

O câncer do colo do útero é o segundo mais incidente nas regiões Norte (26,24/100 mil), Nordeste (16,10/100 mil) e Centro-Oeste (12,35/100 mil). Já na região Sul (12,60/100 mil), ocupa a quarta posição e, na região Sudeste (8,61/100 mil), a quinta posição. Nas regiões Nordeste com taxa de mortalidade de 6,49/100 mil, foi a terceira causa e Centro-Oeste, a quarta causa, com taxa de 5,33/100 mil. As regiões Sul e Sudeste tiveram as menores taxas (4,82/100 mil e 3,64/100 mil) representando a quinta e sexta posições, respectivamente, entre os óbitos por câncer em mulheres (INCA, 2020).

A maioria dos indivíduos sexualmente ativos será infectada pelo HPV em algum momento de suas vidas. A prevalência de infecção genital por HPV nos homens é maior que nas mulheres, onde a prevalência do HPV em homens é mais alto no pênis e mais baixo na uretra. Entre as mulheres, a prevalência do HPV é mais alta no colo uterino e vagina e inferior no epitélio vulvar (MARTEL *et al.*, 2017).

A infecção por HPV não significa no acarretamento de tumores, alguns fatores de risco relacionados ao hospedeiro contribuem para progressão da lesão, como alimentação, tabagismo, consumo de álcool, uso de contraceptivo hormonal, a idade e entre outros (WENDLAND *et al.*, 2018).

### 2.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICOS

Os testes atualmente empregados para diagnóstico do HPV são realizados por meio de exames clínicos e laboratoriais, dependendo do tipo de lesão, se clínica ou subclínica. Inicialmente o diagnóstico é baseado em anamnese, em seguida se necessário é realizado exame físico e exames complementares com a pesquisa direta do vírus ou indiretamente através das alterações provocadas pela infecção nas células e no tecido (MOURA *et al.*, 2014; PANIS *et al.*, 2018).

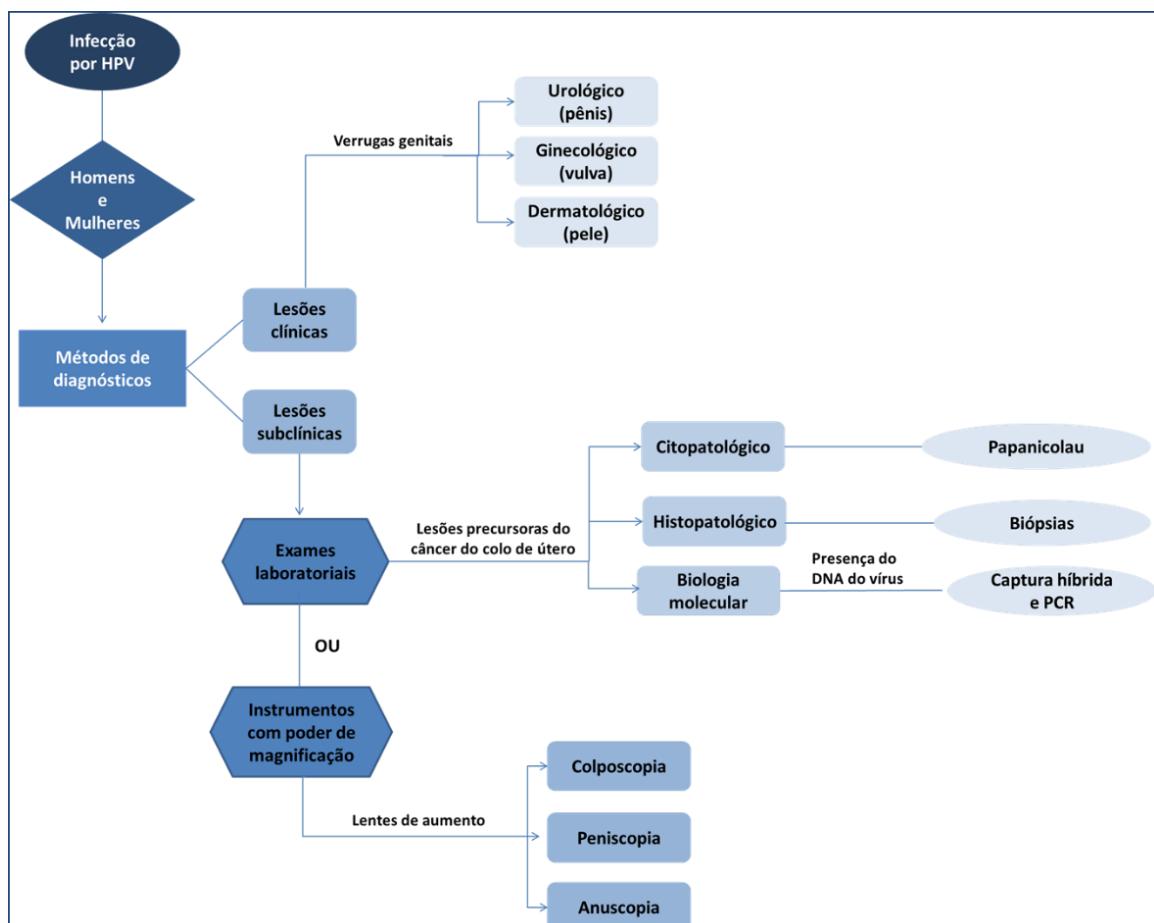
As lesões clínicas apresentam verrugas genitais encontradas no ânus, no pênis, na vulva, ou em qualquer área de pele, podem ser diagnosticadas por meio de exames clínicos, como, urológico (pênis), ginecológico (vulva) e dermatológico (pele). Esses exames podem ser realizados em homens e mulheres.

As lesões subclínicas são precursoras do câncer de colo de útero, produzidos pelos papilomavírus, o diagnóstico pode ser realizado pelo exame citopatológico (exame preventivo Papanicolau). No exame Papanicolau são avaliadas alterações celulares apresentando neoplasia intraepitelial cervical (GURGEL *et al.*, 2019). A confirmação da infecção pelo HPV pode ser realizada por exames laboratoriais de diagnóstico molecular, como os testes de captura hibrida (CH) e reação em cadeia da polimerase (PCR).

O diagnóstico de HPV é realizado por exames de biologia molecular, que mostram a presença do DNA do vírus. Porém, o diagnóstico molecular só deve ser realizado quando existir a presença de algum tipo de lesão clínica ou subclínica (COSER *et al.*, 2011).

A detecção de lesões subclínicas é realizada por meio de exames laboratoriais (citopatológico, histopatológico e de biologia molecular). Outros métodos de detecção são colposcopia, peniscopia e anuscopia, são exames realizados por um instrumento com o poder de magnificação (lentes de aumento), que aumenta o poder de visão do médico após aplicação de reagentes químicos para contraste, permitindo identificar as lesões na vulva, vagina, colo do útero e pênis. E, para distinguir a lesão benigna da maligna, são realizadas biópsias e confirmação histopatológica (PANIS *et al.*, 2018). Na Figura 5 podemos observar um fluxograma do processo de detecção da infecção pelo HPV.

**Figura 5.** Fluxograma do processo de diagnóstico do HPV.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A infecção pelo HPV pode ser detectada pelos testes disponíveis no mercado por um período de até um ano, podendo ser diagnosticada usando evidências clínicas (verrugas) e moleculares da infecção. A evidência imunológica da infecção pelo HPV é difícil devido ao ciclo de vida inato do HPV, em que as proteínas tardias (capsídeos)

são expressas apenas em infecções produtivas e as proteínas precoces são expressas em baixas quantidades nos tecidos infectados e falta de resposta robusta de anticorpos à infecção viral. Em adição, o HPV não pode ser cultivado em cultura de tecidos e os métodos de diagnóstico sorológico apresentam precisão limitada. Desta forma, seu diagnóstico depende da detecção de ácidos nucleicos virais (DNA ou RNA) usando técnicas moleculares como a tecnologia de DNA recombinante (INSINGA *et al.*, 2010).

A principal técnica de diagnóstico molecular usada nos dias atuais para detecção do HPV é a reação em cadeia da polimerase (PCR) considerada ainda como o método mais sensível e mais amplamente utilizado para detecção viral em situações em que a quantidade de DNA disponível é reduzida (COSER *et al.*, 2011). É um teste de alta sensibilidade que consiste em amplificação do DNA viral e posterior hibridização. Após a amplificação do DNA viral pela PCR, o material precisa ser submetido a uma técnica que permita a identificação do tipo de HPV.

Cabe salientar que, embora altamente específico e confiável, realizar o diagnóstico molecular pela técnica de PCR requer pessoal devidamente treinado, assim como instrumentos, equipamentos e instalações especiais que distam bastante da realidade em que muitos centros de saúde operam (LUU *et al.*, 2013). Logo, se faz necessário ter um dispositivo analítico confiável e portátil, capazes de executar rapidamente análises precisas, tais como os biossensores.

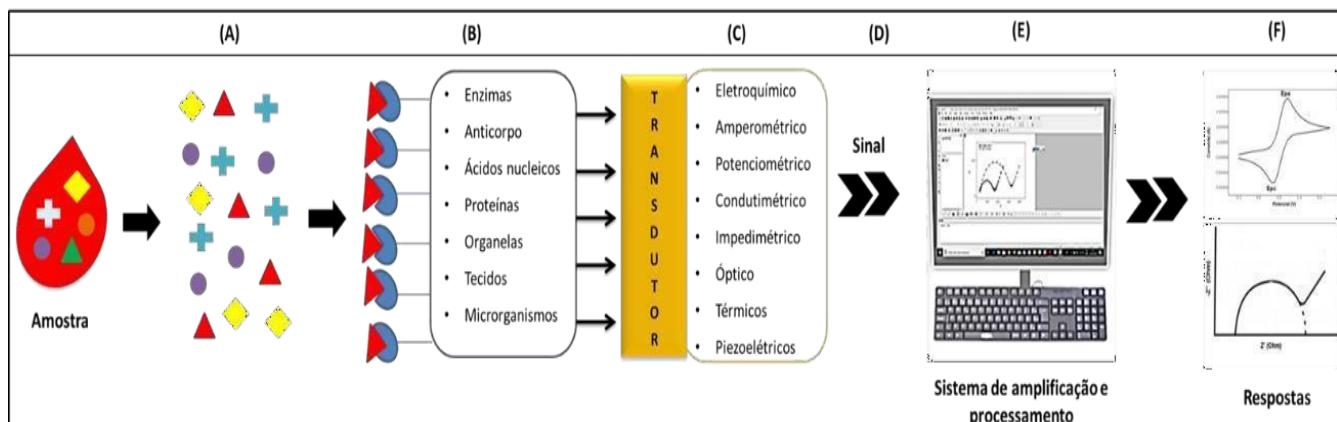
Desta forma, para um diagnóstico precoce da infecção pelo papilomavírus, o presente trabalho se propôs a desenvolver genossensores capazes de detectar e identificar tipos de HPV, de forma simples e rápida.

## 2.4 BIOSSENSORES

O biosensor é um dispositivo analítico conveniente e portátil, constituído por pelo menos uma molécula biológica, tais como proteínas, organelas, tecidos, microrganismos,抗ígenos ou anticorpos, ácidos nucleicos entre outros, são imobilizados como alvos junto a um material transdutor adequado que reconhecerá e amplificará o sinal de detecção, geralmente elétrico, detectável e mensurável (D'ORAZIO, 2011; TERSE-THAKOOR; BADHULIK; MULCHANDANI, 2017). Esses dispositivos introduziram novas oportunidades para procedimentos rápidos, simples, econômicos, sensíveis e específicos, principalmente para o diagnóstico precoce de

doenças infecciosas (LU *et al.*, 2020). Os biossensores são formados por três componentes: elementos de reconhecimento biológico, transdutor e um sistema de processamento (MALHOTRA *et al.*, 2017) (Figura 6).

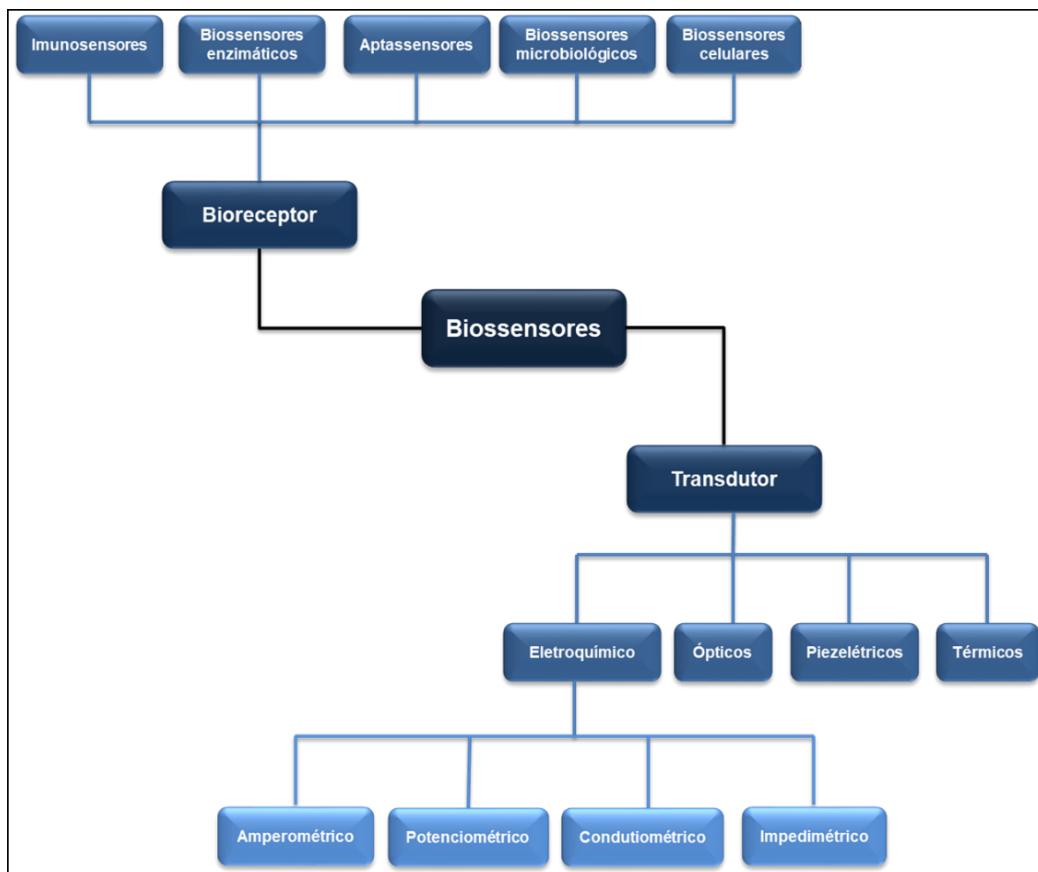
**Figura 6.** Esquema geral do funcionamento de um biossensor. A detecção do analito (A) é realizada através de um componente biológico (B) associado a um transdutor (C). A superfície transdutora é responsável pela conversão da resposta bioquímica em um sinal mensurável (D) que será amplificado e processado por um software de computador (E), posteriormente, os dados experimentais serão apresentados na forma de gráficos (F).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Quando o receptor se liga à molécula de interesse, analito alvo, ocorre uma reação que é convertida pelo transdutor num sinal mensurável, uma vez que surge uma perturbação bioquímica através da reação ocorrida tal como transferência de calor, alterações de distribuição de cargas elétricas, movimentos de elétrons e emissão de luz (JUSTINO *et al.*, 2013; MALHOTRA *et al.*, 2017). Os biossensores podem ser classificados (Figura 7) de acordo com sua natureza de reconhecimento, por exemplo, pelo tipo de mecanismo de sinalização ou pelo tipo de transdução de sinal (JACOBS *et al.*, 2014).

**Figura 7.** Classificação dos biossensores.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A tecnologia de biossensores fornece uma ferramenta com sensibilidade, seletividade e detecção rápida (ponto de atendimento) para o diagnóstico e monitoramento de doença.

#### 2.4.1 Classificação dos biossensores quanto ao elemento transdutor

- Biossensores eletroquímico: são dispositivos que apresentam reações químicas entre a biomolécula e o analito alvo, onde produzem ou consomem íons ou elétrons, que fornecem informações elétricas mensuráveis da solução, como o potencial (ZHANG; JU; WANG, 2011). O sinal eletroquímico produzido é usado para relacionar quantitativamente à quantidade de analito presente na amostra (AHMED *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2020). Os biossensores eletroquímicos representam a classe dos biossensores desenvolvidos atualmente comercializados com sucesso por apresentarem alta sensibilidade dos

transdutores eletroquímicos, compatibilidade para miniaturização e baixo custo, como por exemplo, os biossensores de glicose (YOO; LEE, 2010; PERUMAL; HASHIM, 2014; SRINIVASAN; TUNG, 2015). De acordo com os parâmetros elétricos que medem, os biossensores eletroquímicos podem ser subclassificados em:

- (A) Biossensores amperométrico: são dispositivos que medem a mudança na corrente elétrica devido ao processo de oxidação/redução de uma espécie eletroativa. Geralmente, os eletrodos de trabalho são de metal nobre ou de uma camada impressa em tela coberta por um elemento de bioreconhecimento (RICCI; ADORNETTO; PALLESCHEI, 2012; ENSAFI, 2019). A corrente produzida pelo processo de oxidação ou redução de um analito eletroativo de espécies na superfície do eletrodo são monitoradas sob condições potenciais controladas. A magnitude da corrente é então relacionada à quantidade de analito presente. Se uma corrente é medida durante variações controladas do potencial, isso é referido voltametria (AHMED *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2020). Os biossensores amperométricos têm sido preferidos pela fácil manipulação e pelo fato de a concentração do analito ser proporcional à alteração na corrente elétrica (ENSAFI, 2019).
- (B) Biossensores potenciométrico: são dispositivos que utilizam íons-seletivos efeito de campo sensível a íons para medir a mudança no potencial elétrico devido ao acúmulo de íons resultantes de uma reação enzimática (GRUHL; RAPP; LANGE, 2011). Os biossensores potenciométricos medem a diferença de potencial gerada através de uma membrana seletiva de íons que separa duas soluções com fluxo de corrente praticamente zero (POHANKA; SKLADAL, 2008; DING; QIN, 2013). Atualmente, os limites de detecção mais baixos para dispositivos potenciométricos são frequentemente alcançada com eletrodos íons seletivos. São adequados para medir baixas concentrações em pequenos volumes de amostra, idealmente, eles oferecem o benefício de não influenciar quimicamente uma amostra (AHMED *et al.*, 2016; ENSAFI, 2019).

(C) Biossensores condutimétrico: são dispositivos que monitoram alterações na condutividade elétrica da solução da amostra no processo de reação química (POHANKA; SKLADAL, 2008; BHATTARAI; HAMEED, 2020). Os biossensores condutométricos, geralmente incluem enzimas, cujos produtos carregados resultam em alterações da força iônica e, por tanto, resultam em maior condutividade (GRUHL; RAPP; LANGE, 2011). A condutometria tem sido usada como modo de detecção em biossensores para monitoramento ambiental e análises clínicas (AHMED *et al.*, 2016; ENSAFI, 2019; LU *et al.*, 2020).

(D) Biosensor impedimétrico: são dispositivos que medem a impedância por meio de uma perturbação da corrente senoidal de pequena amplitude de sinal, a partir de um potencial aplicado na superfície do eletrodo de trabalho, apresentam propriedades resistivas e capacitivas (RONKAINEN; HALSALL; HEINEMA, 2010; AHMED *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2020). O espectro de impedância é obtido a partir da variação de uma frequência em uma determinada faixa. Os métodos de impedância são considerados excelentes ferramentas capazes de mostrar a transferência de elétrons em alta frequência e de transferência de massa em baixa frequência. A detecção impedimétrica é bastante utilizada para biossensores de afinidade, onde a superfície do eletrodo varia ao detectar o analito alvo (BHATTARAI; HAMEED, 2020). Esta detecção deve ser bastante cautelosa, onde possa minimizar a ligação não específica do analito (PERUMAL; HASHIM, 2014). Nanomateriais vem sendo bastante utilizados no desenvolvimento de biossensores de impedância eletroquímica, como grafeno, nanotubo de carbono, nanopartícula de ouro e entre outros (SALOUT; DERAKHSHAN, 2020). Este nanomateriais apresentam excelentes vantagens no sistema sensor, como aumento da área superficial do eletrodo, melhor condutividade elétrica de interface de detecção, acessibilidade química ao analito e eletrocatalise (CHAMORRO-GARCIA; MERKOÇI, 2016; SALOUT; DERAKHSHAN, 2020).

- Biossensores óptico: são dispositivos que medem diferentes propriedades ópticas, como energia, polarização e amplitude. A amplitude é a mais utilizada com finalidade de monitorar a concentração do analito de interesse (TOUHAMI,

2014). Os biossensores ópticos podem ser usados na medida de luminescência, espectroscopia de fluorescência e fosforescência, elipsometria, Raman, etc (ASKIM; MAHMOUDI; SUSLICK, 2013). Entre as vantagens destes biossensores, em aplicações *in vivo*, detecção de múltiplos analitos detectados usando diferentes comprimentos (ZHANG *et al.*, 2017). As fibras ópticas presentes, permitem transferir sinais que relatam mudanças no comprimento de onda, propagação, tempo, intensidade, distribuição de espectro ou polaridade da luz (GRUHL; RAPP; LANGE, 2011; LU *et al.*, 2020). Normalmente, a aquisição do sinal destes dispositivos é realizada através de cabos flexíveis que podem transmitir luz ao componente biológico. Uma grande variedade de métodos ópticos tem sido usada em biossensores que incluem biossensores de ressonância plasmática de superfície (SPR), biossensores de adsorção e reflexão, biossensores de luminescência, biossensores de fluorescência e biossensores de fibra óptica. Os biossensores SPR e fluorescência são os biossensores ópticos que vem ganhando mais destaque (HOMOLA, 2003; AHMED *et al.*, 2016; ENSAFI, 2019).

- Biossensores térmicos: são dispositivos que medem a energia térmica liberada ou absorvida durante o processo de reação bioquímica. Baseados nos princípios da calorimetria, estes biossensores usam métodos de transdução a partir da mudança de temperatura (LEE *et al.*, 2013; BAI *et al.*, 2017). A calorimetria é definida como a ciência da medição de calor, nos últimos anos vem passando por vários avanços e desenvolvendo vários tipos de calorímetros para diversas aplicações (LEE; LEE; KOH, 2012). Os calorímetros de chip representam os biossensores sem etiqueta e com muitas vantagens, devido seu pequeno volume de amostras, capacidade de alto rendimento e são bastante utilizados para monitorar ecossistemas ou biorreatores. A miniaturização dos biossensores térmicos vem sendo bastante discutida por apresentarem vantagens, como estabilidade, aumento da sensibilidade e facilidade de manuseio (JAIN; GOODSON, 2011; MASKOW *et al.*, 2012). Entretanto, os biossensores térmicos convencionais são geralmente complicados na construção e requerem grandes volumes de amostras (por exemplo, mililitros). Estes biossensores usam resistores dependentes da temperatura, como unidade de detecção (MASKOW *et al.*, 2011). A transdução térmica oferece a possibilidade de detecção livre de marcadores (DE LA ESCOSURA-MUÑIZ *et al.*, 2016). Porém, os biossensores térmicos são poucos

utilizados para medições, devido à dificuldade de lidar com as variações inespecíficas de temperatura (YAKOVLEVA; BHAND; DANIELSSON, 2013).

- Biossensores piezoelétricos: são dispositivos que consistem em cristais anisotrópicos baseados na detecção de uma alteração na massa (relaciona a oscilação da frequência de vibração de cristais piezelétricos com variação da massa, microbalança de cristal de quartzo-QCM) (POHANKA, 2017). Os transdutores piezoelétricos apresentam uma frequência de ressonância natural que permite a conversão de um evento de ligação em um sinal mensurável, como alterações de frequências ressonantes (AHMED *et al.*, 2016). A microbalança de cristal de quartzo (QCM) é o exemplo mais popular de transdutor piezoelétrico (ZHOU *et al.*, 2016). QCM é uma técnica que fornece um sinal de resposta direta para caracterizar o evento de ligação entre uma camada sensível no transdutor de superfície e um analito a ser detectado (GUPTA; AKIN; BASHIR, 2004; ENSAFI, 2019). Biossensores piezoelétricos vêm sendo bastante utilizada para detecção de DNA, bactérias, células de mamíferos, capsídeos de vírus e interações proteínas-ligante (DO NASCIMENTO *et al.*, 2017).

#### **2.4.2 Classificação de acordo com a natureza do elemento receptor**

- Imunossensores: são dispositivos composto por anticorpos/antígenos como bioreceptor para o imunodiagnóstico (PERUMAL; HASHIM, 2014). O imunossensor à base de antígeno como bioreceptor utiliza a capacidade do anticorpo de se ligar ao antígeno correspondente, onde apresenta alta especificidade, versatibilidade e estabilidade (DONAHUE; ALBITAR, 2010; D'ORAZIO, 2011). Um anticorpo é uma imunoglobina, representada em forma de (Ig) composto por duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L). Cada cadeia tem uma parte constante e variável, a parte variável é específica para um antígeno correspondente que é altamente específico e seletivo (CONROY, 2009; HOLFORD; DAVIS; HIGSON, 2012). Atualmente, existem dois métodos de detecção usados no imunossensor, os ópicos e eletroquímicos. Imunossensores eletroquímicos e ópicos vem desempenhando um papel importante na melhoria da saúde pública, permitindo uma detecção rápida, simples e econômica (FOWLER *et al.*, 2008; SHANKARAN; GOBI; MIURA, 2010). Os imunissensores têm diversas aplicações na detecção de bactérias e patógenos, câncer/tumores, vírus, drogas, hormônios, pesticidas e poluentes

ambientais (USHAA; MADHAVILATHA; RAO, 2011; SIMÃO *et al.*, 2016). O desenvolvimento de imunossensores é baseado em alguns métodos de immobilizar os reagentes imunológicos, como por exemplo, adsorção física, ligação covalente, automontagem, incorporação e reticulação (LI; LI; YANG, 2012). Imunossensores eletroquímicos vem se destacando e atraindo atenção por preparação simples, rápida detecção, alta sensibilidade, portabilidade e baixo custo (RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010; PERUMAL; HASHIM, 2014).

- Biossensores enzimáticos: são dispositivos que se baseiam no uso de enzimas específicas das biomoléculas associados com biocatalizadores contendo uma camada de detecção com um transdutor capaz de quantificar o produto gerado (DU *et al.*, 2011; YOU; PAK, 2014). A maioria das enzimas usadas nos biossensores são oxidases que reagem com o oxigênio dissolvido para produzir peróxido de hidrogênio (CORCOLES; BOUTELLE, 2013). Os primeiros biossensores desenvolvidos foram baseados em enzimas introduzidos por Clark e Lyons em 1962, que desenvolveram um biossensor amperométrico com eletrodo enzimático para detecção de glicose (CHEN *et al.*, 2013; DOS SANTOS SILVA, 2018). Estes eletrodos enzimáticos são sondas eletroquímicas com uma fina camada de enzima immobilizada na superfície do trabalho, que fornece a seletividade para o sensor e catalisa formação do produto eletroativo para detecção (SILVESTRE *et al.*, 2011). Desde o primeiro biossensor, os biossensores baseados em enzimas vêm sofrendo modificações para várias aplicações até o presente. As enzimas apresentam propriedades únicas que as tornam mais eficientes e uma excelente ferramenta para desenvolver dispositivos analíticos (DOS SANTOS SILVA, 2018). As enzimas são biocatalizadores, e têm a capacidade de reconhecer especificamente seus substratos e transformá-los em produto. Os biossensores baseados em enzimas utilizam as enzimas como bioreceptor que detecta o analito alvo a partir de uma matriz de amostras (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012). Estes biossensores usam o modelo chave e fechadura que se baseia no mecanismo da enzima com ação altamente específica. As reações catalíticas específicas fornecidas pelas enzimas oferecem a capacidade de detectar limites muitos mais baixos do que com outras técnicas de ligação.

A ligação enzima-substrato fornece ao biossensor uma alta especificidade (LECA-BOUVIER; BLUM, 2010). As enzimas glicose oxidase e a peroxidase de rabano silvestre são mais amplamente utilizadas no desenvolvimento de biossensores enzimáticos (LU *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2014). Diante alguns estudos presentes na literatura, biossensores baseados em enzimas podem ser usados para detectar colesterol, segurança alimentar, monitoramento ambiental, pesticidas e metais (NOMNGONGO *et al.*, 2012; DZYADEVYCH; JAFFREZIC-RENAULT, 2014; BUCUR *et al.*, 2018) Os biossensores enzimáticos apresentam vantagens como simplicidade, baratos, fácil construção, análises rápidas, fácil regeneração e reutilização (KAUR *et al.*, 2018). Também apresentam desvantagens, como perda gradualmente sua atividade, onde a camada enzimática deve ser substituída por um período de tempo (LOGUERCIO, 2019).

- Biossensores fluorescentes: são dispositivos que monitoram as mudanças de frequência de emissão de radiação eletromagnética estimulada pela absorção prévia de radiação e subsequente geração de um estado excitado (ROSSI *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2015). A fluorescência se define como fonte de energia fornecida por radiação eletromagnética, onde requer uma fonte de luz externa para iniciar as transições eletrônicas um átomo ou molécula que produz luminescência (TAN *et al.*, 2015). A fluorescência é um método óptico amplamente utilizado para biossensibilidade devido à sua seletividade e sensibilidade (ZHOU *et al.*, 2019). Os biossensores baseados em fluorescência incorporam moléculas de fluorocromo que são usados para produzir luz durante o evento de bioreconhecimento (HAMMOND *et al.*, 2016). Em uma medição típica de fluorescência, o fluoróforo é excitado por um comprimento de onda específico da luz e emite luz com um comprimento de onda diferente. Estes dispositivos usam etiquetas fluorescentes para geração de sinal, e a intensidade do sinal fluorescente é usada para determinar a quantidade de antígeno sendo detectado (ZHU *et al.*, 2014; WHANG *et al.*, 2015). Como a maioria dos sensores biológicos elemento e amaioria dos analitos não possuem propriedades espectrais intrínsecas, o evento de bioreconhecimento é transduzido para um sinal acoplando afluorescência em opticamente responsivo reagente aos elementos sensores. Temos como exemplo, a utilização de ácido nucleico ou anticorpos para marcar fluorocromo e converter a interação de hibridação entre dois DNA

complementares fica em um sinal óptico (BERDAT *et al.*, 2006; KAWASAKI *et al.*, 2011; TAN *et al.*, 2015). Biossensores baseado em fluorescência são aplicados no monitoramento ambiental e na detecção imunoquímica na área médica. Esta técnica apresenta algumas desvantagens, como complexidade, inadequada para monitoramento em tempo real e nos domínios das frequências (ZHU *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2019).

- Biossensores baseados em células: são dispositivos baseados em células inteiras viáveis que atuam como elemento sensor para detectar a presença de um analito específico, e produzir uma resposta por meio da interação entre o estímulo e a célula (XIAO *et al.*, 2010; PERUMAL; HASHIM, 2014; GUPTA *et al.*, 2019). Alguns microrganismos como bactérias, leveduras e fungos podem ser usados como biossensores para detectar moléculas específicas de ambiente circundante (ACHA *et al.*, 2010; BRENNAN *et al.*, 2016). Os biossensores baseados em células respondem às toxinas de maneira fisiologicamente relevante para fornecer informações adicionais sobre o mecanismo de ação e o resultado toxicológico das exposições, diferentemente dos biossensores baseados em ácido nucleico ou em anticorpos (STRUSS; PASINI; DAUNERT, 2010; MELAMED; ELAD; BELKIN, 2012). Biossensores que apresentem instrumentação confiável, facilidade de uso e robustez favorecem o sucesso dos sistemas baseados em biossensores no ponto de atendimento sem apoio de laboratórios (BELKIN; GU, 2010; BADHULIKA *et al.*, 2015). Biossensores que utilizam células comotransdutor apresentem vantagens e desvantagens. Os biossensores decélulas apresentam vantagens como flexibilidade na estratégia de detecção,são mais baratos que enzimas e anticorpos purificados, e simplicidade na fabricação (SILVA, 2016). Apesar dos avanços, estes biossensores apresentam algumas limitações como regeneração, estabilidade vida útil, biocompatibilidade, esterilização, armazenamento e alto custo (BOHRNet *et al.*,2012; SILVA, 2016; GUPTA *et al.*, 2019).
- Genossensores: são dispositivos que detectam moléculas de DNA como analito,e são chamados genossensores ou biossensores de DNA (WANG, 2002; CHEN *et al.*, 2017). Os biossensores de DNA têm como elemento de bioreconhecimento sondas de ssDNA, que são imobilizadas na superfície do transdutor que transforma o evento de hibridação do DNA em um sinal elétrico mensurável. A ligação de afinidade é altamente específica entre reação de duas cadeias de DNA de fita simples (ssDNA) para o DNA de fita dupla

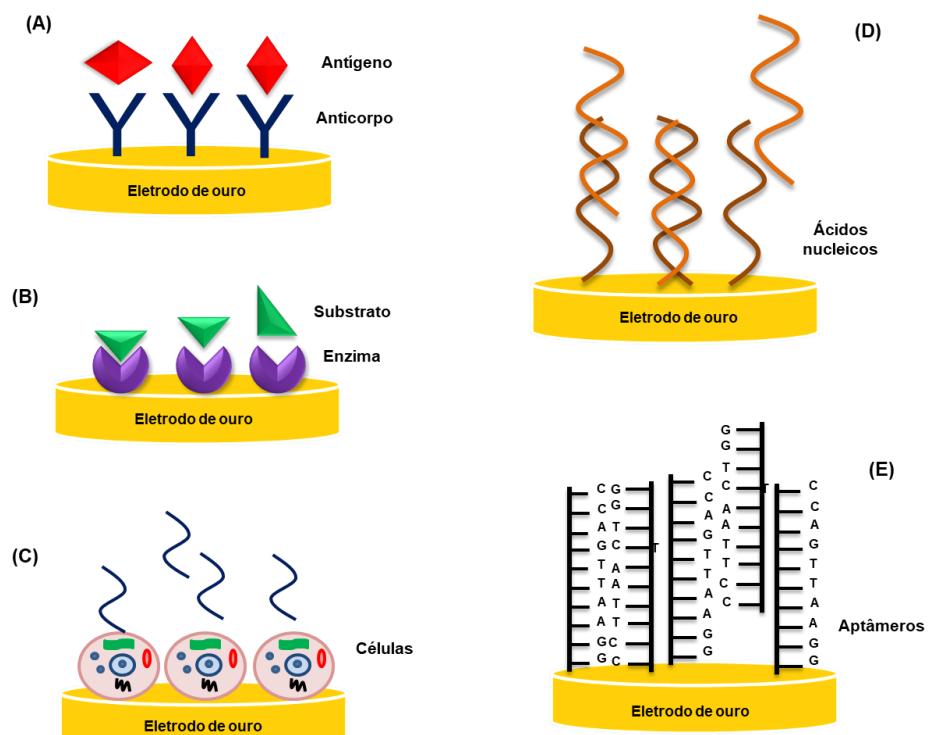
(dsDNA (KERMAN; KOBAYASHI; TAMIYA, 2003; LABUDA *et al.*, 2010; MEHROTRA, 2016). Estes biossensores tem como base uma sonda complementar em um bioreceptor que vai se ligar ao alvo de interesse resultando em uma reação bioquímica que permite o transdutor amplificar o sinal químico em sinal elétrico (CHEN *et al.*, 2016). É um método de baixo custo, análise rápida, operação simples e a possibilidade de miniaturização que são consideradas as vantagens dos biossensores de DNA que fazem desta tecnologia em rápido desenvolvimento uma valiosa alternativa à genética convencional ensaios (LABUDA *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2017). Ultimamente, vem sendo desenvolvido vários tipos de biossensores de DNA para o diagnóstico de mutações pontuais. Os biossensores à base de ácido nucleico integram uma forma natural e biomimética de oligonucleotídeos, confiando na forte afinidade do par de bases entre as seções complementares das cadeias de nucleotídeos por sua alta sensibilidade e seletividade (JUSTINO *et al.*, 2015). Biossensores eletroquímicos de DNA, nos quais o evento de reconhecimento de pares de bases é convertido em um sinal elétrico mensurável, estão sendo usados para o diagnóstico de doenças genéticas, patógenos, biomoléculas de interesse clínico e assim pordiante.

- Aptassensores: são definidos como biossensores biomiméticos que apresentam sensores artificiais ou sintéticos que imitam a função de um biosensor natural (FENG *et al.*, 2011; PERMURAL., 2014). Estes podem incluir aptassensores, onde os aptasensores usam aptâmeros como biocomponente. Aptâmeros são fios sintéticos de ácido nucleico que podem ser projetados para reconhecer aminoácidos, oligossacarídeos, peptídeos e proteínas (YI-XIAN *et al.*, 2012). Biossensores baseados em aptâmeros apresentam vantagens como alta eficiência de ligação (SONG *et al.*, 2008; LING *et al.*, 2011). Quando comparado com anticorpos apresenta vantagens como elemento de reconhecimento, com alta afinidade pelo alvo conseguindo distinguir entre alvos mesmos que sejam da mesma família (LEE *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2017). No entanto por ser altamente específico, versatilidade de imobilização, regenerabilidade, tamanho pequeno e possui alta afinidade por alvo, podem ser usados como agentes terapêuticos, como capacidade de detectar uma gama de alvos (KIM *et al.*, 2010; WENG; HUANG; LEE, 2012; KE *et al.*, 2014). Os aptâmeros não se limitam de alvos, que variam de moléculas pequenas, proteínas e antibióticos, apresentam alta estabilidade e

prazo de validade ilimitado (YI-XIAN *et al.*, 2012). O principal desafio no desenvolvimento de biosensores baseados em aptâmeros é que eles possuem propriedades de ácidos nucléicos, que reduzem a eficiência do ensaio e aumenta seu custo de produção (SCHNEIDER; STRONGIN, 2010; WANG *et al.*, 2017).

Conforme o tipo de interação que ocorre entre a substância a ser determinada e o alvo biológico, o biosensor é classificado como catalítico ou de afinidade (MAHMOODI *et al.*, 2019). Como foi visto nos tópicos acima, geralmente os biosensores podem ser classificados pelo tipo de mecanismo de sinalização biológica que eles utilizam. A sinalização biológica usada pelos biosensores pode ser dividida em cinco mecanismos principais (Figura 8).

**Figura 8.** Representação esquemática dos métodos de biosensibilidade com vários mecanismos de sinal biológico: (a) anticorpo / antígeno; (b) catalisador enzimático; (c) baseado em células; (d) nucleico ácido e (e) biomimético.



Fonte: Elaborada pelo autor.

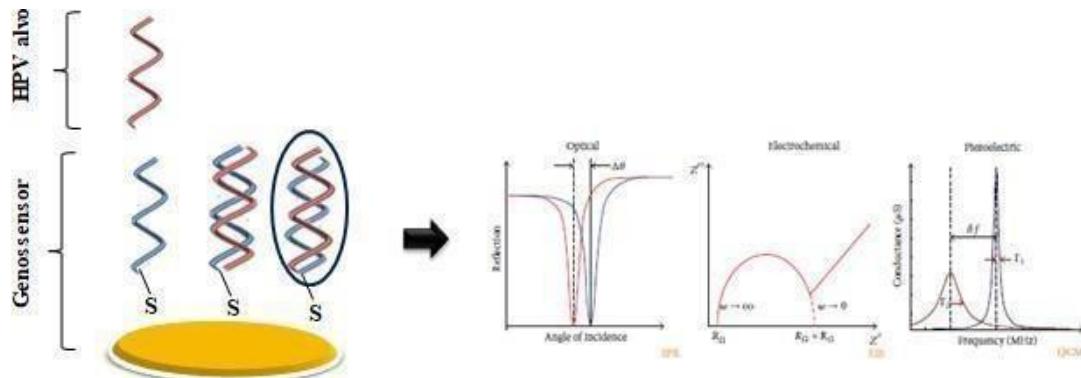
Desenvolver um biosensor com essa característica é associar a seletividade do reconhecimento do analito, pelo componente biológico ativo, com a sensibilidade do transdutor. Os biosensores desenvolvidos são comparados em termos de precisão, reproduzibilidade, regeneração, estabilidade e especificidade.

### 2.4.3 Genossensores

Genossensores eletroquímicos são biossensores baseados em ácidos nucleicos, tanto DNA quanto RNA (HASSEN *et al.*, 2008; ARORA *et al.*, 2018). Definidos como um dispositivo analítico que incorpora um oligonucleotídeo, com uma sequência conhecida de bases, integrada ou intimamente associada ao eletrodo (SINGHAL *et al.*, 2017). A detecção eletroquímica de hibridização de DNA ocorre através do reconhecimento do par de bases que é convertido em um sinal elétrico mensurável, sendo considerados candidatos adequados para o rápido e barato diagnóstico de doenças genéticas e detecção de espécies biológicas patogênicas de interesse clínico (URREGO *et al.*, 2015; NARANG *et al.*, 2016).

A Figura 9, mostra a representação de um biossensor de DNA construído para detecção de HPV, apresentando as principais técnicas de transdução de sinal usados atualmente, que permite rápida progressão dos sistemas de sensores.

**Figura 9.** Representação esquemática de um biossensor desenvolvido para detectar o HPV e técnicas utilizadas na conversão de sinal através de SPR, EIE e QCM.



Fonte: Adaptada de FRÍAS *et al.*, (2015).

Essas técnicas são capazes de avaliar fenômenos em superfícies einterfaces, a espectroscopia de impedância eletroquímica tem adquirido grande importância, pois possibilita a obtenção de grande número de informações a partir de um único experimento, bem como a obtenção de informações complementares às obtidas por SPR e QCM (DAMOS *et al.*, 2004; MATSISHIN *et al.*, 2016).

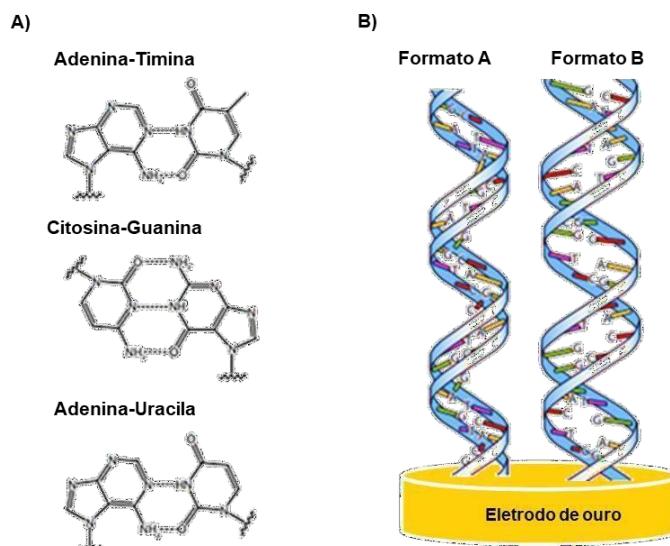
A técnica de ressonância de plasma de superfície (SPR) apresenta propriedades ópticas e pode ser empregada para estudos de fenômenos de superfície, monitorando a medida da mudança do índice de refração através da ligação de uma camada orgânica à superfície do sensor (BREČKO *et al.*, 2014; MATSISHIN *et al.*, 2016). A microbalança de cristal de quartzo (QCM) mede uma variação de massa por unidade de área através da medição da alteração na frequência de um cristal de quartzo ressonador (CARVALHO *et al.*, 2003; DAMOS *et al.*, 2004). E a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é uma técnica útil para a caracterização de uma grande variedade de sistemas eletroquímicos e para a determinação da contribuição de processos individuais de eletrodo ou eletrólito nestes sistemas. Pode ser usada para investigar a dinâmica de cargas ligadas ou móveis nas regiões de volume ou de interface de qualquer tipo de material líquido ou sólido (ZHONG *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2016). SPR e QCM são exemplos de técnicas utilizadas na conversão de sinal, mas vale salientar que o foco deste trabalho é para a técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.

Os genossensores são utilizados na detecção de sequências de ácidos nucleicos específicas, sendo capazes de realizar o diagnóstico e identificação de doenças genéticas de maneira precisa e simples. Os genossensores possuem um mecanismo baseado na detecção das mudanças de propriedades elétricas devido à interação de ácidos nucleicos com moléculas alvo, proporcionando ao sistema alta sensibilidade e seletividade (BORGmann *et al.*, 2011; ZUCOLOTTO *et al.*, 2018). Nos últimos anos, a compreensão das propriedades e comportamentos eletroquímicos do processo interfacial de ácidos nucléicos nos eletrodos vem alcançando vários progressos (KIRSCH *et al.*, 2013; FERAPONTOVA., 2018). Estes conhecimentos resultam no aumento do desenvolvimento de sensores baseados em DNA, que apresentam vantagens como sensibilidade, especificidade, precisão, simplicidade e baixo custo (FERAPONTOVA, 2017).

O desenvolvimento destas técnicas eletroquímicas é aplicado em diversas áreas, como diagnósticos clínicos, monitoramento do tratamento de câncer, análise ambiental, controle de qualidade de alimentos e bebidas, análise biomédica de agentes infecciosos (BARTOSIK; HRSTKA, 2017). Desta forma, para o desenvolvimento destes genossensores precisamos ter uma melhor compreensão dos aspectos estruturais de ácidos nucléicos e seus processos de imobilização na superfície do eletrodo que são essenciais no processo eletroquímico (FERAPONTOVA, 2018). As estruturas moleculares do DNA e as interações

bioespecíficas entre as bases nitrogenadas são representadas na Figura 10.

**Figura 10.** Representação esquemática da formação de ligações de hidrogênio entre DNA e RNA nucleobases complementares (A) e estruturas das formas A e B do DNA.



Fonte: Adaptada de FERAPONTOV, (2018).

A Figura 10A, podemos observar unidades nucleotídicas repetidas capazes de realizar uma formação específica de ligações de hidrogênio entre nucleobases individuais e complementares. Na Figura 10B, demonstra a estrutura em dupla hélice formado na hibridação de DNA de fita simples com a sequência de DNA complementar. As fitas duplas do DNA mostram as ligações hidrogênio entre os pares de bases nitrogenadas: Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) e Guanina (G) (KEKEDY-NAGY; FERAPONTOVA; BRAND, 2017).

#### 2.4.4 Estratégias de imobilização de DNA

Os biossensores de DNA eletroquímicos vêm se tornando uma alternativa clínica, explorando eventos de reconhecimento de DNA e conversão de sinal eletroquímico (ULIANAS *et al.*, 2012).

Biossensores eletroquímicos são altamente sensíveis e rápidos, e também pode ser facilmente miniaturizado e possuem grande potencial como estratégia de detecção. Para o desenvolvimento de um sensor eletroquímico de DNA promissor, o uso de estratégia de imobilização e mecanismos de detecção do DNA torna estes

dispositivos altamente sensíveis e seletivos (LIU *et al.*, 2012; CHAO *et al.*, 2016; RASHID *et al.*, 2017). As descobertas sobre o DNA apresentaram grande relevância nos avanços científicos e tecnológicos. Para realização de uma boa estratégia de imobilização, é preciso conhecer bem a estrutura do DNA, que se compõem por duas fitas aminadas, enroladas uma em volta da outra em uma dupla hélice (WATSON, 2014). O DNA é um polímero composto por nucleotídeos, que são formados por um fosfato, uma desoxirribose e uma das quatro bases aminadas, repetidos milhões de vezes num cromossomo. A maioria das estratégias de detecção do DNA é baseado na fita simples de DNA (ssDNA) para hibridização (ARIAS, 2004; WATSON, 2014; FERAPONTOVA, 2018).

A imobilização pode ser definida como a ligação de moléculas a uma superfície, resultando em redução ou perda de mobilidade. Várias técnicas de imobilização de sondas de DNA têm sido empregadas na detecção eletroquímica de DNA (XU *et al.*, 2017; RAVAN *et al.*, 2014), como os métodos físicos, métodos químicos e processos de biointeração, tendo como exemplo respectivamente a adsorção física (A), ligação covalente (B) e interação avidina-biotina (C) mostrado na Figura 10.

Os métodos de adsorção física (Figura 11A) utilizam a combinação de algumas forças, como Van der Waals e interações hidrofóbicas, que apresentam ligações de hidrogênio e forças iônicas que contribuem na fixação do biomaterial na superfície do biosensor (KURBANOGLU *et al.*, 2016). É um método bastante simples utilizado para imobilização de sondas de DNA na construção de sensores eletroquímicos, onde não necessitam de produtos químicos na modificação de reagentes e sondas de DNA, as forças que são empregadas não são de características fortes, sendo assim, podem liberar as moléculas imobilizadas com grande facilidade (MONOSIK *et al.*, 2012; NIMSE *et al.*, 2014).

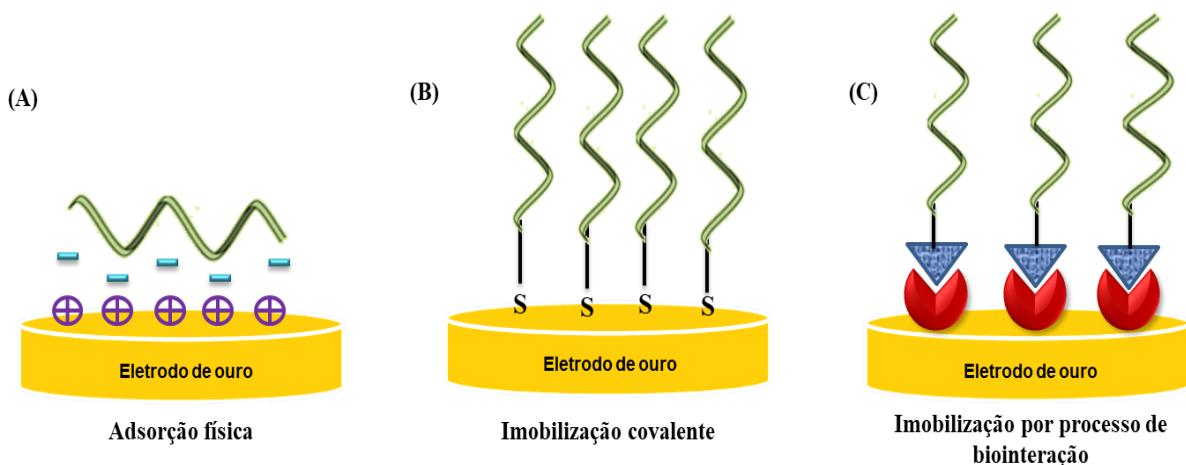
Em particular, a imobilização covalente é considerada uma imobilização forte por oferecer estabilidade. A imobilização do DNA em superfícies de estado sólido usando a interação eletrostática como força motriz, são susceptíveis às mudanças ambientais como força iônica, pH e temperatura podem causar dessorção das sondas de DNA adsorvidas. Desta forma, a utilização da imobilização covalente para sondas de DNA, oferecem vantagens como boa estabilidade, alta força de ligação, flexibilidade, impede a dessorção da monocamada da sonda de DNA a superfície do

eletrodo e uma boa orientação vertical onde o final da sonda de DNA foi enxertado na superfície do eletrodo, o que pode resultar em alta eficiência de hibridação de DNA (RASHID *et al.*, 2017).

Na Figura 11B, podemos observar que interações tiol-metal são frequentemente usadas para ligação covalente de biomoléculas em superfícies de ouro. Os grupos tiol demonstram forte afinidade com as superfícies metálicas nobres, permitindo a formação de ligações covalentes entre os átomos de enxofre e ouro (NIMSE *et al.*, 2014). Esse procedimento levou a uma alta ligação específica da sonda de DNA à superfície do eletrodo e pode impedir ligações não específicas (RASHID *et al.*, 2017). Isso ocorre porque é uma forte interação de afinidade entre o grupo tiol e a superfície de ouro para formar uma ligação covalente de ouro (Au) - sulfridila (S). Alguns agentes de acoplamento são usados na imobilização covalente de sondas de DNA sobre superfícies funcionalizadas, tais como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-hidroxissuccinimida (NHS) e glutaraldeído (MCKENNA *et al.*, 2016).

Outra estratégia de imobilização baseia-se na afinidade entre biomoléculas, como exemplo as moléculas de biotina e avidina /estreptavidina (Figura 11C) (DUPONT-FILLIARD *et al.*, 2004). Avidina e estreptavidina são grandes proteínas tetraméricas que apresentam quatro locais idênticos de ligação à biotina, que pode ser usado para formar ligações tetravalentes avidina/estreptavidina-biotina formando complexos com alta afinidade, que são amplamente utilizadas na construção de biossensores (RAHMAN *et al.*, 2015).

**Figura 11.** Estratégias de imobilização de biomoléculas, como por exemplo, segmentos de ácidos nucleicos, em superfícies transdutoras.



Fonte: Elaborada pelo autor.

## 2.5 NANOESTRUTURAS

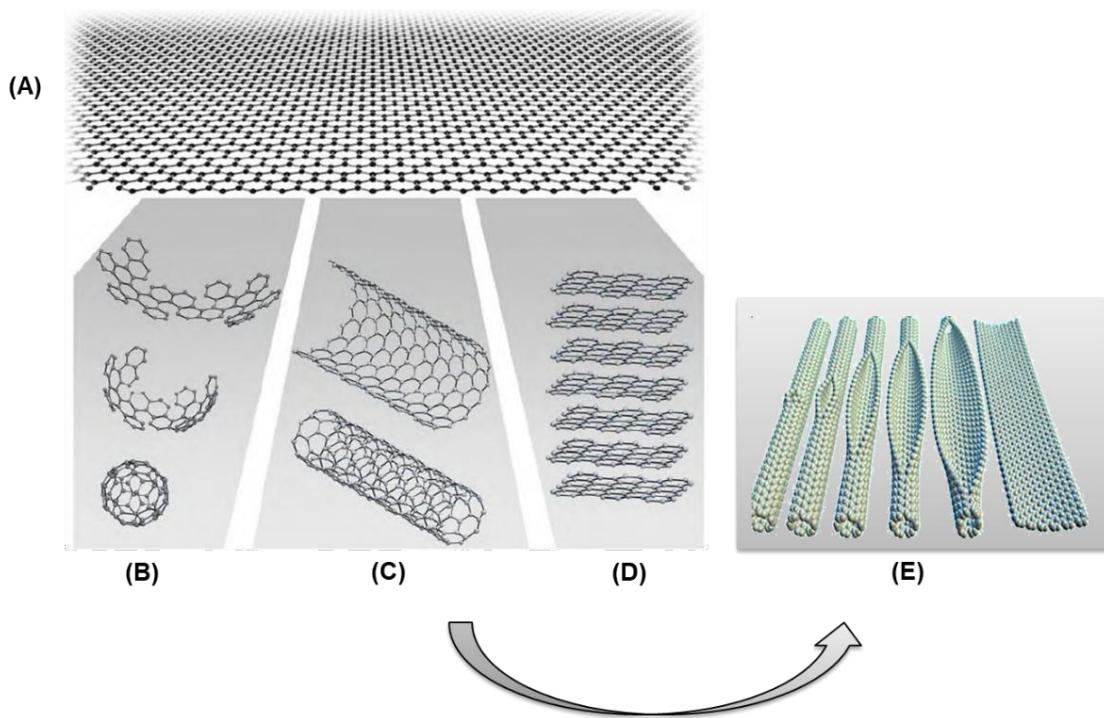
### 2.5.1 Nanofitas de grafeno

O uso de nanomateriais no desenvolvimento de biossensores vem aumentando cada vez mais, facilitando o desenvolvimento de novas tecnologias. Com a descoberta de novos nanomateriais, como nanopartículas, nanotubo de carbono (CNTs), grafeno (ZHU *et al.*, 2012), pontos quânticos, nanofios e entre outros, têm sido largamente aplicados em biodispositivos como nanomatrizes, nanobiossensores e sistemas microanalíticos (*lab on a chip*) (KRUSS *et al.*, 2013). Materiais com escala nanométrica têm sido utilizados para alcançar a nanoestruturação desses dispositivos e suas análises têm sido desenvolvidas para estudar interações a nível celular e molecular em tempo real, fornecendo biossensores com sensibilidade muito alta quando comparada aos métodos convencionais (CALIL *et al.*, 2011; TERSE-THAKOOR; BADHULIKA; MULCHANDANI, 2017).

A nanotecnologia está relacionada aos biodispositivos para aumentar a relação sinal/ruído, reduzir o tempo de resposta, aumentar a estabilidade e a sensibilidade, e obter um baixo limite de detecção. Nanotubo de carbono e grafeno e seus derivados são excelentes nanomateriais para caracterização eletroquímica, são ideais para processos faradaicos e não-faradaicos (KUMAR *et al.*, 2015). Essas estruturas de carbono podem aceitar ou retirar elétrons de moléculas adsorvidas sobre eles, levando a grandes alterações na condutância que podem ser facilmente detectadas. Esses recursos os tornam materiais promissores para o uso em biossensores eletroquímicos (RASHEED *et al.*, 2017).

Nanomateriais à base de carbono, especialmente CNTs e grafeno apresentam uma atraente área bioanalítica para o desenvolvimento de nanobiossensores (ZHU *et al.*, 2012). O grafeno é o elemento estrutural mais básico de alguns alótropos do carbono e, por este motivo, a sua estrutura é considerada a mãe de outras formas alotrópicas do carbono, como se mostra na Figura 12.

**Figura 12.** Representação das principais formas alotrópicas do carbono: (a) Grafeno, (b) fulereno, (c) nanotubo de carbono, (d) grafite e (e) nanofitas de grafeno obtidas apartir de nanotubo de carbono de parede simples.



Fonte: Adaptada de SHAHROKHIAN et al., (2018).

O grafeno é um cristal bidimensional que consiste de átomos de carbono disposto em uma rede hexagonal (UNWIN *et al.*, 2016). O grafeno representa um dos materiais funcionais mais promissores devido às suas excelentes propriedades como dispersão em água (WAJID *et al.*, 2012), grande área de superfície (PATIL *et al.*, 2009), condutividade térmica, mobilidade de elétrons à temperatura ambiente, resistência mecânica e boa biocompatibilidade (ZHANG *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2012; SHAHROKHIAN *et al.*, 2018).

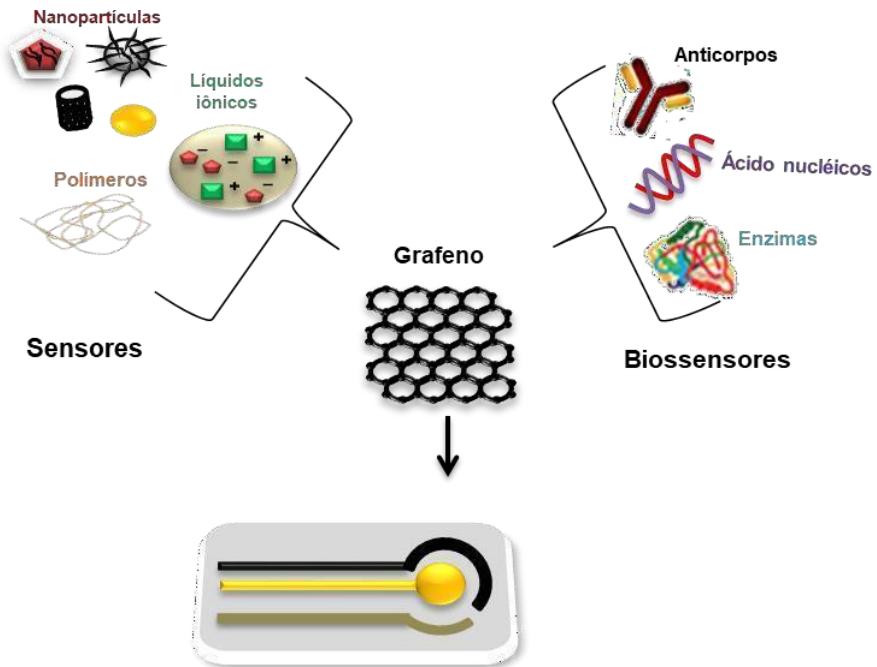
Métodos químicos podem ser utilizados para aumentar os rendimentos de grafeno, como por exemplo, a oxidação do grafeno por efeito de ácido forte, pode criar grande número de substâncias contendo oxigênio (AMBROSI *et al.*, 2014). O grafeno e seus derivados de oxigênio, incluindo óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (rGO), estão se tornando uma classe importante de nanomateriais no campo dos biossensores (PARK *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2012). A presença de uma variedade de grupamentos funcionais oxigenados (-OH, -COOH, -CHO), faz com que o grafeno se torne uma excelente plataforma que possibilita a interação com uma grande variedade de biomoléculas (HU *et al.*, 2014), tornando as nanopartículas GO

fortemente hidrofílicas e facilitando a funcionalização química (KRISHNAN *et al.*, 2019).

Nanofitas de grafeno (NFG) são tiras estreitas e longas de camada única de carbono que apresentam propriedades eletrônicas, magnéticas e com alta solubilidade em água. Grafeno e nanotubo de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) são utilizados para fabricação de NFG com diferentes larguras, bordas e defeitos, através de um corte longitudinal (KOSYNKIN *et al.*, 2009; CHEN; MA; WANG, 2016).

NFG tem sido relatada na literatura devido a sua eficácia em melhorar o desempenho eletroquímico, facilitando a imobilização de biomoléculas e sendo favorável para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos (SHAN *et al.*, 2009; BAO *et al.*, 2011; GURSU *et al.*, 2018). Biosensores baseados em grafeno são classificados pelo biocomponente que incluem enzimas, anticorpos e ácidos nucleicos (Figura 13) (CINTI *et al.*, 2018).

**Figura 13.** Esquema dos principais elementos de reconhecimento biológico que podem ser imobilizados em grafeno para aplicações de biosensor.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O grafeno tem sido amplamente aplicado no desenvolvimento de sensores e diagnósticos para a detecção de vários analitos, como colesterol, glicose, glutamato, hemoglobina, ácido ascórbico, ácido úrico e peróxido de hidrogênio (SANDEEP KUMAR; VENKATESH, 2013). Também tem destaque em dispositivos nanoeletrônicos, como sensores de DNA, sensores de gases tóxicos

quimiorresistentes, sensores plasmônicos, sensores de pH, sensores piezoelétricos de grafeno, detecção de contaminantes ambientais e sensores acústicos de grafeno (SHAO *et al.*, 2010; SONG *et al.*, 2017).

### **2.5.2 Poli (ácido tiofeno-3-acético)**

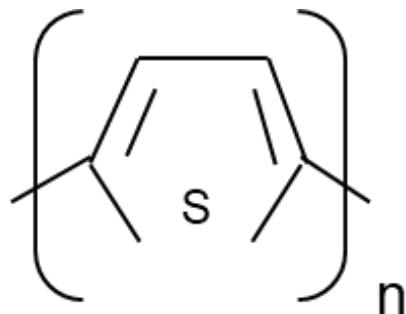
Polímeros condutores têm despertado interesse na aplicação como eletrodos para capacitores eletroquímicos, capazes de conduzir cargas através de suas ligações simples e duplas alternadas ao longo da cadeia (LI *et al.*, 2007). Os polímeros apresentam características estruturais, físicas que podem sofrer alterações reversíveis entre estados eletronicamente isolantes e condutores (WANG; CHEN; JENG, 2014). Esta reação ocorre devido ao processo de oxidação ou redução de espécies não iônicas e isolantes para formar espécies policatônicas com propriedades condutoras. Podem ser funcionalizados com grupos como ácido carboxílico e amina, fornecendo ligações covalentes com materiais biologicamente ativos e nanopartículas inorgânicas. Diante destas características surgiram como excelentes candidatos na aplicação de sistemas de biossensores eletroquímicos, pois oferecem maior sensibilidade (BOROLE *et al.*, 2006; LIU; LUO; PENG, 2012; NAIR; MISHRA; KUMAR, 2019).

Os polímeros condutores podem ser obtidos através da síntese eletroquímica via eletropolimerização dos monômeros realizado em uma célula eletroquímica convencional, composta por três eletrodos (ALVES *et al.*, 2010). A análise é realizada utilizando a técnica de voltametria cíclica, resultando na formação um filme fino de polímeros sobre a superfície do eletrodo e sendo útil na investigação das propriedades físico-químicas do polímero (MEDEIROS *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Estudos envolvendo politiofenos vêm se intensificando, devido à grande estabilidade química, boa condutividade elétrica, excelente estabilidade eletroquímica e baixo impacto ambiental (KIM *et al.*, 2006; NAIR; MISHRA; KUMAR, 2019). O politiofeno e seus derivados são importantes polímeros eletroativos.

O politiofeno (Figura 14) apresenta facilidade de obtenção de diferentes derivados com diferentes afinidades químicas, tornando-se uma ferramenta para melhorar a seletividade de tais dispositivos.

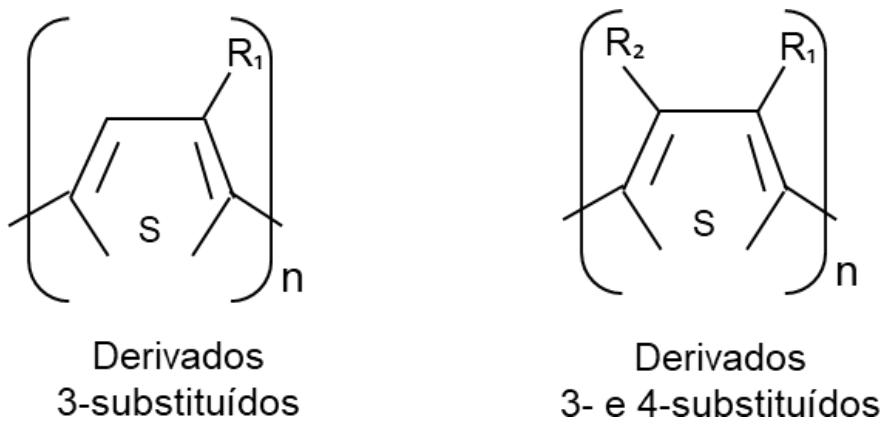
**Figura 14.** Estrutura química do politiofeno.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O politiofeno apresenta derivados que são obtidos pela substituição dos hidrogênios nas posições 3- e/ou 4+ do anel tiofênico por cadeias laterais de interesse, como pode ser observado na Figura 15 (HE *et al.*, 2007; TÓTH *et al.*, 2011).

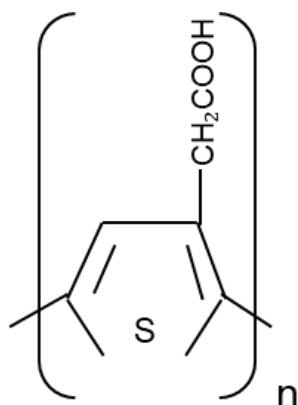
**Figura 15.** Tipos de derivados do politiofeno.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os derivados do politiofeno apresentam diferentes funções químicas em camadas quimicamente seletivas em dispositivos sensores, dentre eles, destacamos na Figura 16 o poli (ácido 3-tiofenoacético) (PTAA). O PTAA apresenta biocompatibilidade, baixa toxicidade, maior sensibilidade, baixo limite de detecção e estabilidade. Excelente plataforma promissora para a imobilização covalente de espécies biologicamente ativas e o desenvolvimento de biossensores (NICHOLAS *et al.*, 2004; ZHANG; SRINIVASAN, 2008; LI *et al.*, 2012).

**Figura 16.** Estrutura química do poli (ácido 3-tiofenoacético).



Fonte: Elaborada pelo autor.

O poli (ácido tiofeno-3-acético) (PTAA) tem atraído muita atenção por sua funcionalidade  $-\text{COOH}$ , e por ser um polímero condutor promissor a imobilização covalente de espécies biologicamente ativas devido ao seu grupo carboxílico (TÓTH *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012; WEN *et al.*, 2013). Portanto, os polímeros condutores substituídos por grupos funcionais se tornam excelentes revestimentos para eletrodos oferecendo perspectivas aplicações em vários campos, em particular, diagnóstico clínico, medicina, biotecnologia, agricultura, monitoramento ambiental, análise de alimentos, sensores de DNA e imunossensores (LIU; LUO; PENG, 2012; WEN *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2018).

## 2.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

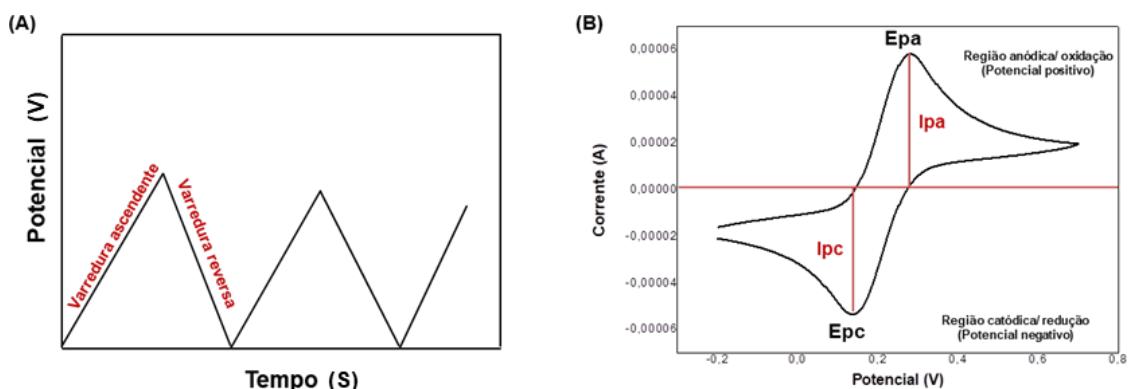
### 2.6.1 Voltametria cíclica

Os sensores voltamétricos levam em consideração os fenômenos que ocorrem na interface entre o eletrodo e a solução, onde operam na presença de corrente, e com potencial controlado. São os mais sensíveis dentre os eletroquímicos para o estudo de espécies eletroativas (PACHECO *et al.*, 2013). A voltametria estuda a relação entre a voltagem, a corrente e o tempo, durante a eletrólise em uma célula eletroquímica. O procedimento voltamétrico envolve o uso de uma célula com três eletrodos: (I) um eletrodo de trabalho, no qual ocorre a eletrólise; (II) um eletrodo de referência e (III) um contra eletrodo. De modo a minimizar o fenômeno de migração dos íons eletroativos, causada pelo campo elétrico, é necessária a adição de uma solução contendo uma concentração elevada de eletrólito inerte, chamado eletrólito suporte.

Dentre diversas voltametrias, a voltametria cíclica (VC) se destaca por ser uma técnica eletroquímica simples, rápida, barata e mais usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos (JARA-PALACIOS *et al.*, 2017). A eficiência desta técnica resulta de sua característica de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos (PACHECO *et al.*, 2013).

Em um experimento voltamétrico, é realizada a aplicação do potencial em um valor inicial no qual a variação desse potencial ocorre à redução do composto em solução para regiões mais negativas (catódica), gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto (Figura 17A). Quando o potencial já tiver atingido o valor no qual a reação de redução ocorre, o potencial é variado no sentido inverso, que ocorre das regiões de potencial negativo para potencial positivo gerando a reação de oxidação (anódica) até o valor inicial (Figura 17B).

**Figura 17.** Aplicação do potencial para a voltametria cíclica: A) potencial com varredura linear e B) voltamograma obtido para um sistema reversível.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Geralmente, a varredura tem a forma de um triângulo isóscele, onde este processo traz a vantagem de que o produto da reação redox que ocorreu na primeira etapa de varredura (na ida) pode ser avaliado novamente na varredura reversa (na volta). A voltametria cíclica é uma ferramenta muito favorável para estudos

exploratórios. As análises voltamétricas podem ser aplicadas para caracterizar o comportamento redox de compostos, determinar processos químicos que precedem ou sucedem reações eletroquímicas, avaliar a cinética de transferência eletrônica e análise quantitativa (PACHECO *et al.*, 2013).

Na voltametria cíclica utilizamos dois parâmetros, o parâmetro ajustado que é representado pelo potencial ( $E$ ) e o parâmetro medido que é a corrente resultante ( $i$ ). A corrente em função do potencial forma um voltamograma a partir da corrente obtida pela transferência de elétrons durante o processo de oxirredução (Equação 1), que está diretamente proporcional a quantidade de analito presente na superfície do eletrodo, imerso em uma célula eletroquímica (PACHECO *et al.*, 2013).

#### **Equação 1**



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

A voltametria cíclica representa uma técnica com propriedades eletroquímicas para o desenvolvimento de biossensores. Nos últimos anos, inúmeros trabalhos descritos na literatura baseados em grafeno, nanotubo de carbono e grafite, vêm se destacando como excelentes plataformas sensoras (MOHAMED *et al.*, 2017; GÜRSU *et al.*, 2017). Ji e colaboradores desenvolveram eletrodos impressos a base de óxido demonstrando vantagens do processo miniaturização, baixo preço e obtenção de dados em tempo real (JI *et al.*, 2017).

#### **2.6.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica**

Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é uma poderosa ferramenta para a investigação do comportamento de interfaces eletroquímicas, incluindo processos corrosivos, avaliação de revestimentos e capaz de fornecer informações em tempo real (ŽIVCOVÁ *et al.*, 2015). Essa técnica tem como base a aplicação de um potencial ou corrente alternada, sendo uma delas a variável controlada, medindo-se a intensidade e diferença de fase da outra variável. No

entanto, a impedância eletroquímica através de uma interface eletrodo-eletrolito é capaz de fornecer medida em uma ampla faixa de frequências para obter informações sobre as propriedades da interface (WARD *et al.*, 2018).

A impedância é a medida da capacidade que um circuito elétrico tem de resistir à passagem de corrente elétrica. Pode ser vista como uma combinação de elementos de circuito elétricos passivos, isto é, resistência, capacitância e indutância. As medidas são realizadas em uma faixa de frequências, de forma que diferentes processos físicos e químicos possam ser separados por suas constantes de tempo (MELO *et al.*, 2016). Quando uma corrente alternada é aplicada a esses elementos, a corrente resultante é obtida usando a lei de Ohm. A Lei de Ohm é apenas aplicável a resistências (elementos resistentes). De acordo com a Lei de Ohm, a resistência é dada pela razão entre a tensão aplicada V e a intensidade de corrente que flui através do elemento:

#### Equação 2

$$R = \frac{V}{I}$$

The diagram shows a standard resistor symbol (a zigzag line) with a voltage arrow labeled 'V' pointing across it and a current arrow labeled 'I' pointing through it.

É importante salientar que a perturbação inicial é uma perturbação de potencial ( $\Delta E$ ), do tipo senoidal, que deve ser imposta no estado estacionário do sistema, e a resposta do eletrodo é uma corrente ( $\Delta I$ ), também senoidal, porém com uma diferença de fase  $\Phi$  em relação ao sinal aplicado (CARVALHO *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2015). Portanto, a impedância representada por Z, mede a relação entre  $\Delta E$  e  $\Delta I$ .

O espectro de impedância tem como valores elementos complexos, os componentes imaginária e real ( $-Z''$  vs  $Z'$ ), segundo a variação do campo aplicado. Estes valores são avaliados de acordo com as equações 3 e 4 descritas abaixo. Onde,  $R_s$  - resistência da solução,  $R_{ct}$  - resistência à transferência de carga,  $\omega$  - frequência angular e  $C_{dl}$  - capacitância da dupla camada elétrica (PAJKOSSY *et al.*, 2017).

### Equação 3

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

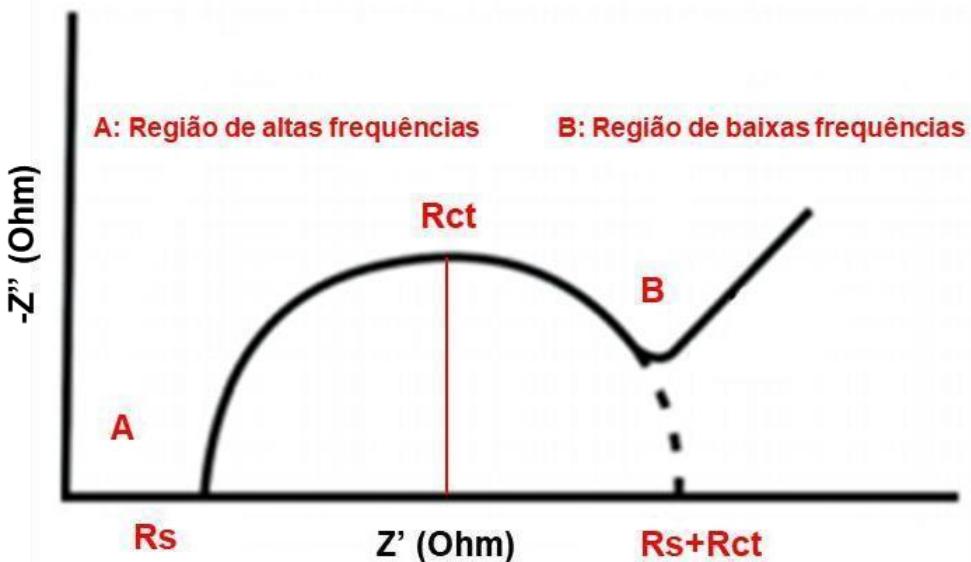
### Equação 4

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

Logo depois, as respostas elétricas (na forma de semicírculos) são associadas de acordo com a resposta de um circuito elétrico. O circuito escolhido é aquele cujo modelo matemático se ajusta ao resultado do gráfico de Nyquist, sendo então chamado de circuito equivalente.

O diagrama de Nyquist (Figura 18), também conhecido como representação de Cole-Cole, consiste em uma série de pontos, cada um representando a grandeza e a direção do vetor de impedância para uma frequência em particular (PAJKOSSY *et al.*, 2017). O diagrama é um plano complexo (real e imaginário) de coordenadas cartesianas, em que se tem na abscissa a parte real (termos resistivos) e na ordenada à parte imaginária (termos capacitivos ou indutivos). Os dados de impedância representados no plano cartesiano sob uma larga variação de frequência (100 KHz a 10 mHz; em geral 10 KHz a 10<sup>1</sup> Hz) gera configurações típicas, de acordo com o mecanismo eletroquímico predominante. Uma vez construído o diagrama de Nyquist, faz-se a extrapolação da parte direita do semicírculo até encontrar o eixo horizontal (RIBEIRO *et al.*, 2015).

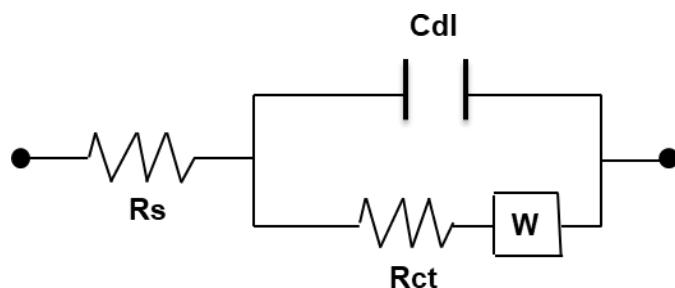
**Figura 18.** Representação de um diagrama de Nyquist.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A resistência elétrica resulta da oposição à passagem de corrente elétrica por um dado elemento de circuito. O modelo mais estudado do circuito elétrico para uma simples reação eletroquímica é o modelo de circuito equivalente elétrico Randles-Ershler (Figura 19), que inclui a resistência do eletrólito ( $R_s$ ), a resistência de transferência de carga ( $R_{ct}$ ) no eletrodo / eletrólito, a capacitância que ocorre na interface da dupla camada elétrica ( $C_{dl}$ ), e a resistência à transferência de massa (RMT) que quando ocorre livremente é também conhecida como difusão de Warburg ( $W$ ) (CARVALHO *et al.*, 2006; CÓRDOBA-TORRES *et al.*, 2015).

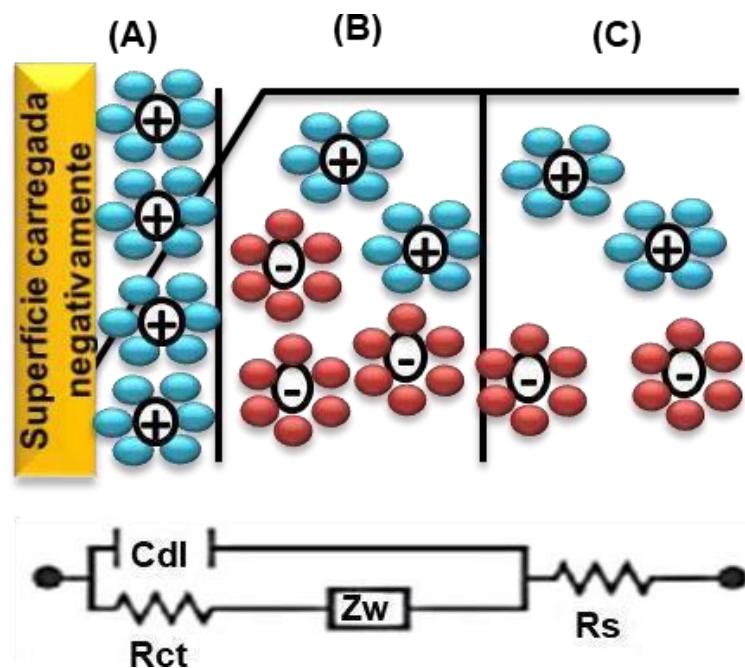
**Figura 19.** Representação circuito equivalente de Randles.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Em estudos de espectroscopia de impedância, informações adicionais podem ser determinadas através do uso de circuitos equivalentes ou modelos matemáticos. A interface eletrodo / eletrólito possui um comportamento similar a um capacitor de placas paralelas (Figura 20) devido à distribuição de íons na dupla camada elétrica (CÓRDOBA-TORRES *et al.*, 2015).

**Figura 20.** Representação esquemática demonstrando a relação do circuito equivalente com os processos que ocorrem na interface eletrodo/solução. Onde, (A) Camada de Helmholtz, (B) Camada difusa, (C) Seio da solução.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A EIE é uma valiosa técnica que apresenta excelentes propriedades para o desenvolvimento de biossensores, como alta sensibilidade, investigação de superfícies modificadas, monitoramento de processos interfaciais e estudos de reações eletroquímicas. Tem como destaque na caracterização estrutural de biodispositivos, possibilitando a compreensão de fenômenos interfaciais (RIBEIRO *et al.*, 2015).

Essa técnica apresenta algumas vantagens e desvantagens, como desvantagens apresentam uma aplicação somente em meio condutores (eletrólito) e interpretação dos diagramas de impedância necessita de certo grau de conhecimento em eletroquímica. Tem como principais vantagens, possibilidade de identificar mecanismos de corrosão, fornecem informações sobre a cinética, efeitos eletroquímicos atrás dos diversos parâmetros obtidos com os diagramas de impedância, separação dos efeitos de resistência da solução, resistência de polarização e permite o acompanhamento da evolução do estado passivo ou ativo ao longo do tempo (CARVALHO *et al.*, 2006).

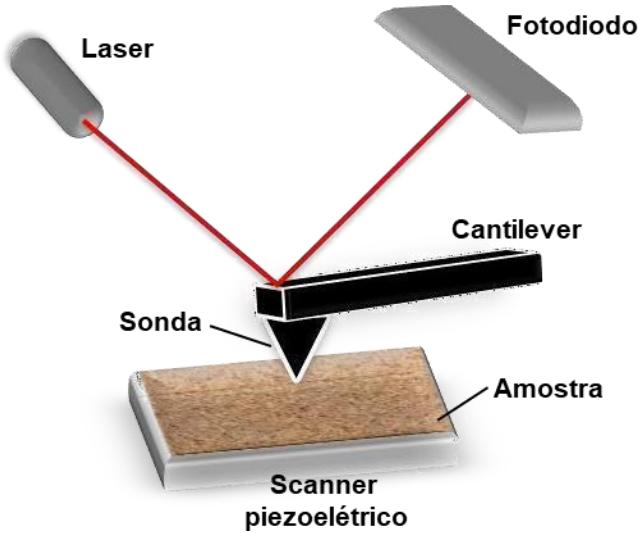
## 2.7 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A microscopia de força atômica (AFM) é uma ferramenta poderosa usada para investigar transições de microestruturas, alterações conformacionais, forças intermoleculares e estudo morfológico de superfícies condutoras ou não em escala nanométrica. (KING *et al.*, 2001; FOTIADIS *et al.*, 2012). A AFM é uma técnica complementar que apresenta uma superfície versátil com vários modos de operação que permitem escala em nanômetros, e sob algumas condições escala atômica, topográfica, caracterização elétrica e mecânica. Embora a técnica seja usada para visualizar as características da superfície, é mais parecido com o senso de toque do que com a visão (MATIVETSKY *et al.*, 2014). Uma característica da AFM é criar imagens da superfície de células vivas, que permite que amostras biológicas sejam visualizadas e manipuladas, revelando detalhes estruturais, onde as imagens são obtidas através da medição da força em uma ponta afiada criada pela proximidade com a superfície da amostra (SCHEURING *et al.*, 2010).

O AFM tem como componente essencial uma sonda que varre a superfície da amostra detectando mudanças em seu relevo através de variações de grandezas físicas que variam do modo escolhido. E também baseado na interação que ocorre ao longo da varredura entre átomos presentes na sonda e na superfície da amostra (GARCIA; PEREZ, 2002). Desta forma, o equipamento é composto por um cantilever com uma ponta ou sonda integrada para detectar as características da superfície, um fotodiodo para receber um feixe de laser e um scanner piezoeletrico responsável pelo posicionamento tridimensional das amostras (Figura 21). A sonda é uma ponta afiada no final de um cantilever flexível, onde pode ser escaneada sobre uma

superfície e a detecção do cantilever é monitorado e mantido a um valor constante (MÜLLER; ENGEL, 2007; HODEL *et al.*, 2016).

**Figura 21.** Esquema ilustrativo do mecanismo de funcionamento básico do AFM.

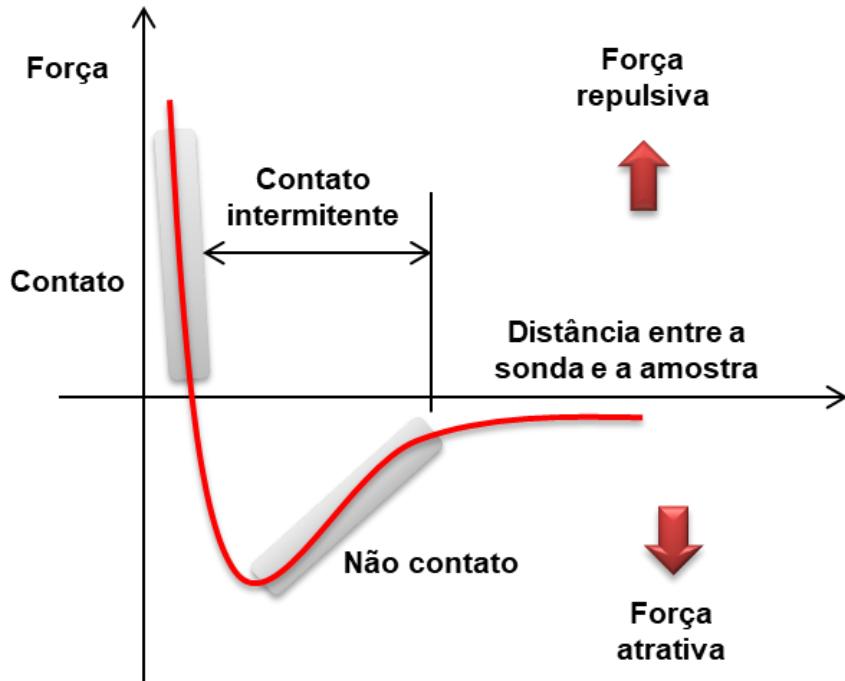


Fonte: Elaborada pelo autor.

O princípio de funcionamento do AFM ocorre no processo de varredura entre os átomos da ponta do AFM que interage com os átomos da superfície da amostra, dependendo da distância entre ponta-amostra essas interações têm como base as forças de interação (atrativas ou repulsivas). Durante a varredura, o cantilever sofre deflexões devido à interação atômica, desviando o feixe do laser incidente. Este desvio é detectado por um fotodiodo que conduz a informação para um computador, onde a topografia digitalizada da superfície é construída (CASUSO; RICO; SCHEURING, 2011; WHITED; PARK, 2014).

Na Figura 22 é possível observar a curva teórica formada a partir da energia potencial resultante das interações entre os átomos da sonda e os átomos da amostra em função da distância de separação. Quando a força de interação é positiva, ocorre uma força repulsiva que empurra a ponta da sonda para longe da amostra. De maneira oposta, quando a força de interação é negativa ocorre uma força atrativa que aproxima a ponta da sonda em direção à amostra. (ANDO; UCHIHASHI; KODERA, 2013; BUTT; CAPPELLA; CAPPELLA, 2016).

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



Fonte: Elaborada pelo autor.

O sistema de operação do cantilever é baseado em três modos distintos de operação: modo de não contato, modo de contato e modo de contato intermitente (Figura 23). O modo de contato a sonda do cantilever permanece em contato com amostra alvo, monitorando a força de repulsão (Figura 23A). O modo sem contato é utilizado para sondar forças elétricas, magnéticas e atômicas de uma amostra específica, onde utiliza o cantilever de forma distanciada da superfície da amostra (Figura 23B). E o modo de contato intermitente que varia na combinação dos modos com e sem contato, recolhendo informações da amostra alvo (Figura 23C) (ASHBY et al., 2003; SCHEURING; DUFRÊNE, 2010; DUFRÊNE et al., 2013; HODEL et al., 2016).

**Figura 23.** Modos de operação do AFM: modo de contato (A), modo de não contato (B) e modo de contato intermitente (C).



Fonte: Elaborada pelo autor.

A técnica do AFM apresenta vantagem particular comparado aos outros microscópios, apresenta capacidade de gerar imagens sem rótulo, maior resolução, imagem funcional de biomoléculas, não exige métodos específicos de preparação prévia da amostra, e possui apenas como limitação o tamanho das amostras (PINTO; RAMOS; DA FONSECA FILHO, 2015; HODEL *et al.*, 2016).

As análises de AFM têm sido amplamente utilizadas na caracterização de biossensores, para obter informações topográficas sobre a amostra sendo analisada e as forças envolvidas nas interações das amostras no processo de bioreconhecimento (FERREIRA; YAMANAKA, 2006; MOREAU *et al.*, 2011). Estudo da morfologia da superfície, nanoestruturas, conformações de cadeias, rugosidade, porosidade, entre outras. Recentemente, Simão et al. utilizaram na caracterização de um biossensor para detecção de arbovírus à base de lectinas, a técnica de AFM para avaliar a morfologia do filme composto por Cys-ZnONp-ConA e o reconhecimento de arbovírus. O AFM é capaz de revelar imagens topográficas da superfície do eletrodo, com diferentes características morfológicas em cada etapa de montagem do sistema sensor (SIMÃO *et al.*, 2020). Em adição, Povedano et al. utilizaram AFM para realizar uma análise topológica do nanocompósito, discriminando as folhas de grafeno com morfologia planar e a presença de nanopartículas de metal, sendo claramente identificada, com destaque a estruturas coloidais com variedade de tamanho (POVEDANO *et al.*, 2017).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver dois genossensores eletroquímicos: plataforma 1 baseado em nanofitas de grafeno (NFG-sondaMY11) para detecção e identificação de génotipos de HPV e plataforma 2 baseado ácido-politiofeno (PTAA- sondaP53) para avaliação da expressão do gene P53 em amostras cervicais.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

##### a) Genossensor baseado em NFG-sondaMY11

- Funcionalizar quimicamente as nanofitas de grafeno (NFG) e analisar através da microscopia de varredura eletrônica (MEV);
- Avaliar características elétricas das NFG sobre eletrodo de ouro;
- Avaliar o sistema composto por NFG-sondaMY11 através de voltametria cíclica e impedância eletroquímica;
- Determinar o circuito equivalente para os sistemas analisados;
- Avaliar a performance do genossensor frente a amostras de plasmídeos contendo diversas concentrações de HPV;
- Avaliar as características morfologia do processo de biodetecção através de microscopia de força atômica;
- Diferenciar as famílias de HPV através de técnicas eletroquímicas;
- Obtenção de dados estatísticos de desempenho tais como reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade.

##### b) Genossensor baseado em PTAA-sondaP53

- Funcionalizar o PTAA quimicamente;
- Avaliar a formação do filme de PTAA sobre a superfície do eletrodo de ouro através da voltametria cíclica;
- Analisar o processo de eletrodeposição de PTAA para otimização da adsorção das sondas de HPV através da impedância eletroquímica;

- Avaliar o sistema composto por PTAA-sondapP3 através de voltametria cíclica e impedância eletroquímica;
- Avaliar a biodetectção do gene supressor de tumor p53 em diferentes tipos de HPV alto e baixo risco;
- Diferenciar as famílias de HPV de acordo com seu potencial oncogênico;
- Obtenção de dados estatísticos de desempenho tais como reproducibilidade, sensibilidade e especificidade.

#### **4. METODOLOGIA**

##### **4.1 MATERIAIS**

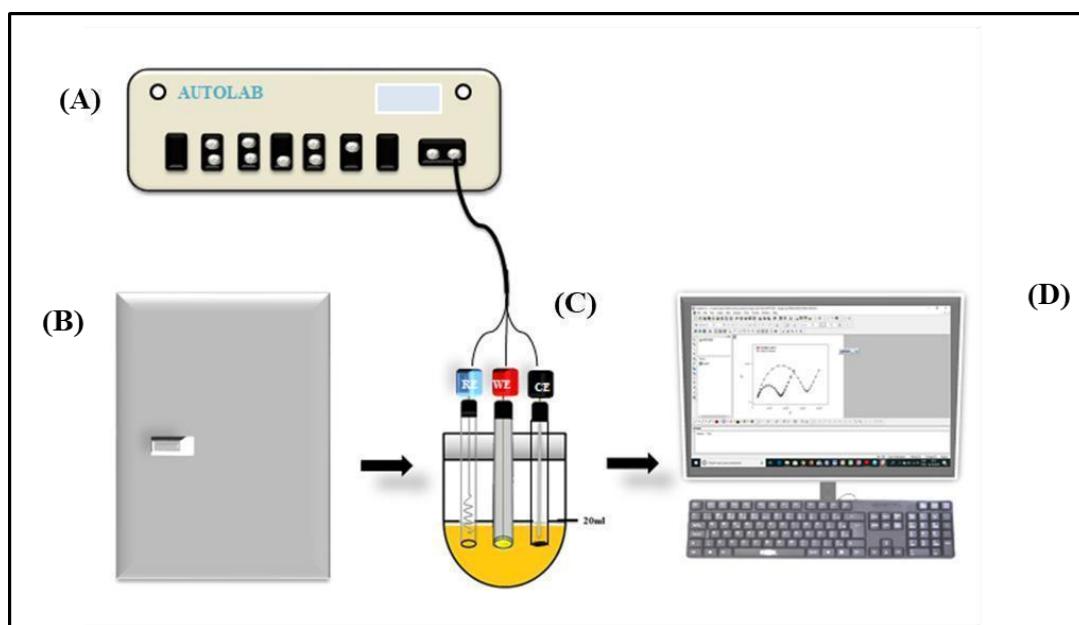
As nanofitas de grafeno foram sintetizadas e modificadas quimicamente com grupos terminais sulfidrilas e grupos carboxílicos segundo o protocolo de patente registrada sob o número BR1020150012705. O 1,4-ditiotreitol (DTT), ácido 3-tiofeno acético (TAA), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (USA). Ferricianeto de potássio ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ), ferrocianeto de potássio ( $K_4[Fe(CN)_6]$ ), fosfato de sódio monobásico ( $NaH_2PO_4$ ) e fosfato de sódio dibásico ( $Na_2HPO_4$ ) foram obtidos da VETEC (Brasil).

Vale ressaltar que foram realizadas análises experimentais da sonda degenerada MY11 com amostras de plasmídeos de DNA recombinante utilizando a sequência (5' – 3') GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG, adquirida na Invitrogen (EUA). Os genótipos de HPV são reconhecidos através da região conservada do gene HPV L1 presente neste primer degenerado, e a sonda de HPV (p53) com amostras decDNA de pacientes infectados por HPV. As amostras clínicas foram obtidas após concedimento dos pacientes e os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética local. Para realização das análises, foi utilizada água ultrapura obtida pelosistema de purificação Milli-Q plus (Billerica, USA) em todos os ensaios. O estudo foiaprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE N°. 23698513.0.0000.5190).

## 4.2 INSTRUMENTAÇÃO

A análise eletroquímica foi realizada através de um potenciómetro/galvanostato PGSTAT 128N, utilizando uma célula eletroquímica composta por três eletrodos (Figura 24), sendo um contra eletrodo de platina, um eletrodo de referência Ag/AgCl e um eletrodo de trabalho de disco de ouro de 3mm de diâmetro. Como sonda redox, foi utilizada uma solução de 20 mL de  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  (1:1).

**Figura 24.** Representação esquemática dos equipamentos de análise dos biossensores, (a) potenciómetro/galvanostato PGSTAT 128N, (b) Gaiola de Faraday, (c) célula eletroquímica composta por três eletrodos (eletrodo de trabalho, contra-eletrodo e eletrodo de referência), (d) sistema de amplificação e processamento.



Fonte: Elaborada pelo autor.

As análises de voltametria cíclica (VC) foram realizadas a um potencial de varredura fixo de -0,2 a 0,7 V. A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foi obtida numa faixa de frequência entre 100 mHz a 100 KHz com um potencial de amplitude alternada de 10 mV. As análises de circuito equivalente obtidos na caracterização de EIE representados na forma de um diagrama de Nyquist e serão

ajustados utilizando o software NOVA 1.11. As curvas obtidas analisadas para deduzir e estudar o comportamento interfacial dos componentes do biosensor.

O software origin 8.0 foi utilizado para confecção dos gráficos e obtenção de dados matemáticos. A análise morfológica das fibras antes e após a modificação foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JSM-5900, JEOL, Japan). As modificações nas superfícies do eletrodo foram realizadas utilizando um microscópio de força atômica (AFM) SPM-9700 (Shimadzu, Japão) com ponta de prova (cantilever) ajustado para o modo não contato.

#### 4.3 SINTESE DAS NANOFITAS DE GRAFENO

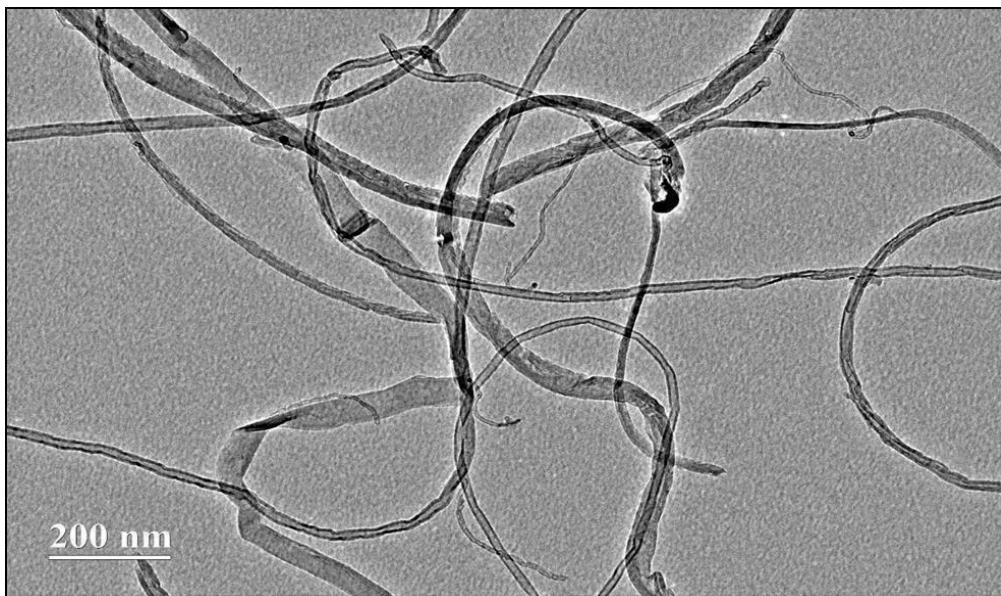
A síntese das nanofitas de grafeno foi baseada no protocolo de patente registrada sob o número BR1020150012705. As nanofitas de grafeno (NFG) foram preparadas a partir da exfoliação de uma pequena quantidade (0.5g) de nanotubos de carbono com múltiplas paredes (MWCNT) dentro de um balão contendo uma solução de ácido nítrico 3 M, seguido de sua exposição em um banho ultrassônico a 40KHz por 5 minutos. Logo em seguida, o balão foi colocado em agitação magnética por 5 minutos, e depois desse tratamento os MWCNT foram lavados com água destilada. Posteriormente, o procedimento foi repetido, utilizando uma solução oxidante (peróxido 5% v/v) e, em seguida, os MWCNT foram lavados com uma solução de TBA 0,1 M e logo foram secos na estufa a 40°C sob vácuo.

O resultado final foi composto por uma mistura de MWCNT esfoliados (MWE) e subprodutos da exfoliação. Para recuperar unicamente as NFG, foram dispersos uma quantidade de MWE numa solução contendo um tri-alcoxi-silano. Depois de algum tempo de reação, as nanofitas de grafeno foram funcionalizadas com grupos tiol (NFGTh), para favorecer a imobilização sobre um eletrodo de ouro, e também com grupos carboxila (NFG-COOH) para promover a ancoragem covalente da sonda degenerada aminada. Em seguida, as NFGs foram separadas e lavadas com um solvente apolar contendo algum catalisador de transferência de fase para removermos o excesso de silano. Finalmente, o material foi lavado e seco.

As amostras foram estudadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As dimensões médias destas NFG são de aproximadamente 50-80 nm de largura e um comprimento de pelo menos 5 micrômetros. Na Figura 25, é possível observar um maior número de nanotubos exfoliados e abertos longitudinalmente por

comprimentos até de 5  $\mu\text{m}$ . A abertura de um maior número de camadas permite a criação de um maior número de defeitos nas bordas do material. Com isto, se tem uma maior área para permitir a ligação ao dos grupos funcionais.

**Figura 25.** Analise MEV das nanofitas de grafeno empregadas como transdutor no desenvolvimento do genossensor para HPV.



Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.4 PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE ELETRODO E OBTEÇÃO DOS SISTEMAS SENSORES

##### 4.4.1 Ouro-NFG-sondaMY11

Primeiramente, foi preparada uma solução de NFG para caracterização do eletrodo, 10mg de NFG foi dissolvida em 20 mL de acetona. Em seguida, a solução foi colocada em um banho ultrassônico por 10 minutos para homogeneização do sistema junto com 0.01mM de 1,4-ditiotreitol (DTT) para promover a redução dos grupos dissulfeto para sulfidrila, de acordo com o protocolo de patente registrada sob o número BR1020150012705.

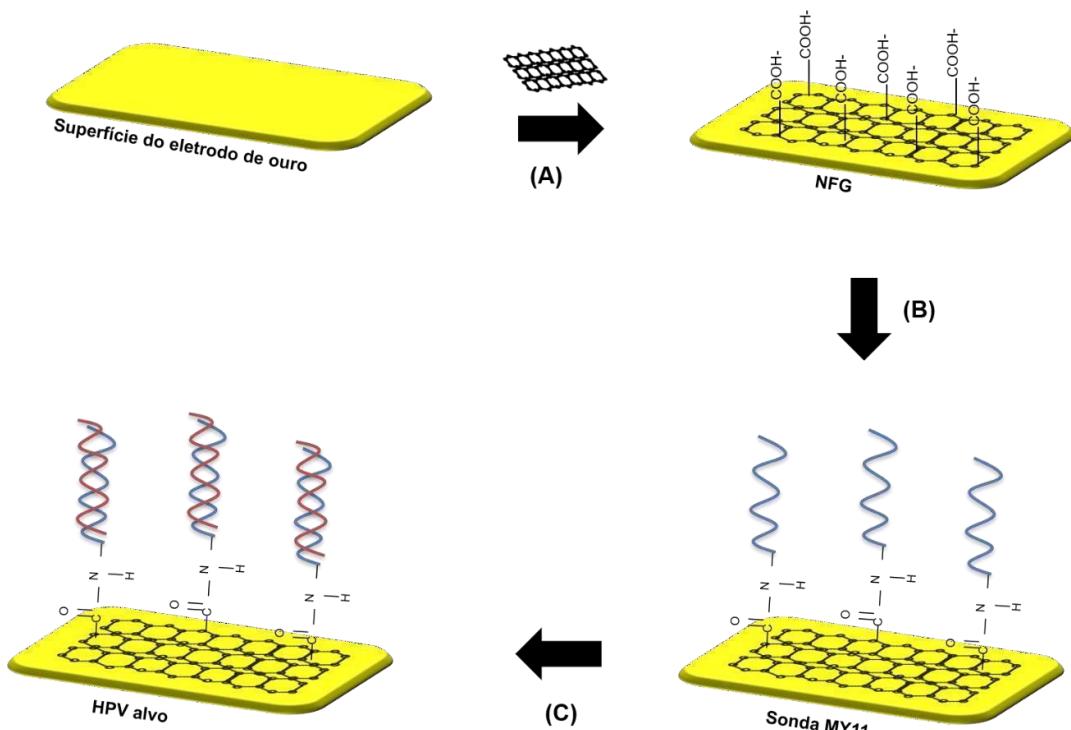
Os mesmos se fazem necessários para conseguir a imobilização do nanomaterial na superfície do eletrodo de ouro pela interação enxofre-ouro.

Inicialmente, foi realizado o procedimento de limpeza por meio de polimento com alumina e posterior imersão em hipoclorito de sódio por 10 minutos. Após a avaliação da resposta do eletrodo limpo inicial, foram realizados os procedimentos

de montagem do genossensor. Para caracterizar a base transdutora, 2 $\mu$ L da solução de grafeno foram gotejados sobre o disco de ouro, deixando passar 10 minutos incubando antes de começar as análises de VC e EIE. Posteriormente, para promover a imobilização covalente da sonda de DNA, os grupos carboxílicos das NFGs foram ativados durante 10 minutos empregando 4 $\mu$ L de uma solução de EDC:NHS (1:1) através de gotejamento sobre o eletrodo modificado com NFG. Em seguida, 2 $\mu$ L da solução de oligonucleotídeo degenerado aminado (0.1  $\mu$ M) foram gotejados sobre o eletrodo, que depois foi incubado por 30 minutos para permitir a imobilização covalente da sonda.

Por fim, o sistema genossensor foi avaliado frente a genótipos de HPV (tipos 33, 51, 53, 62, 66, 11 e 16). Essas amostras foram aquecidas numa temperatura 90°C, e gotejado 2 $\mu$ L na plataforma sensora, em seguida foi feita as análises de VC e EIE. Diante das informações descritas acima, podemos observar na Figura 26, as etapas realizadas para obtenção da plataforma sensora.

**Figura 26.** Representação esquemática do genossensor impedimétrico (NFG-sondaMY11) para detecção de diferentes amostras de DNA alvo de HPV. Adsorção de nanofitas de grafeno com grupos -COOH e -SH na superfície do ouro (a), imobilização de sonda oligonucleotídica degenerada com grupos -NH<sub>2</sub> via EDC:NHS (b) e hibridização do HPV alvo (c).



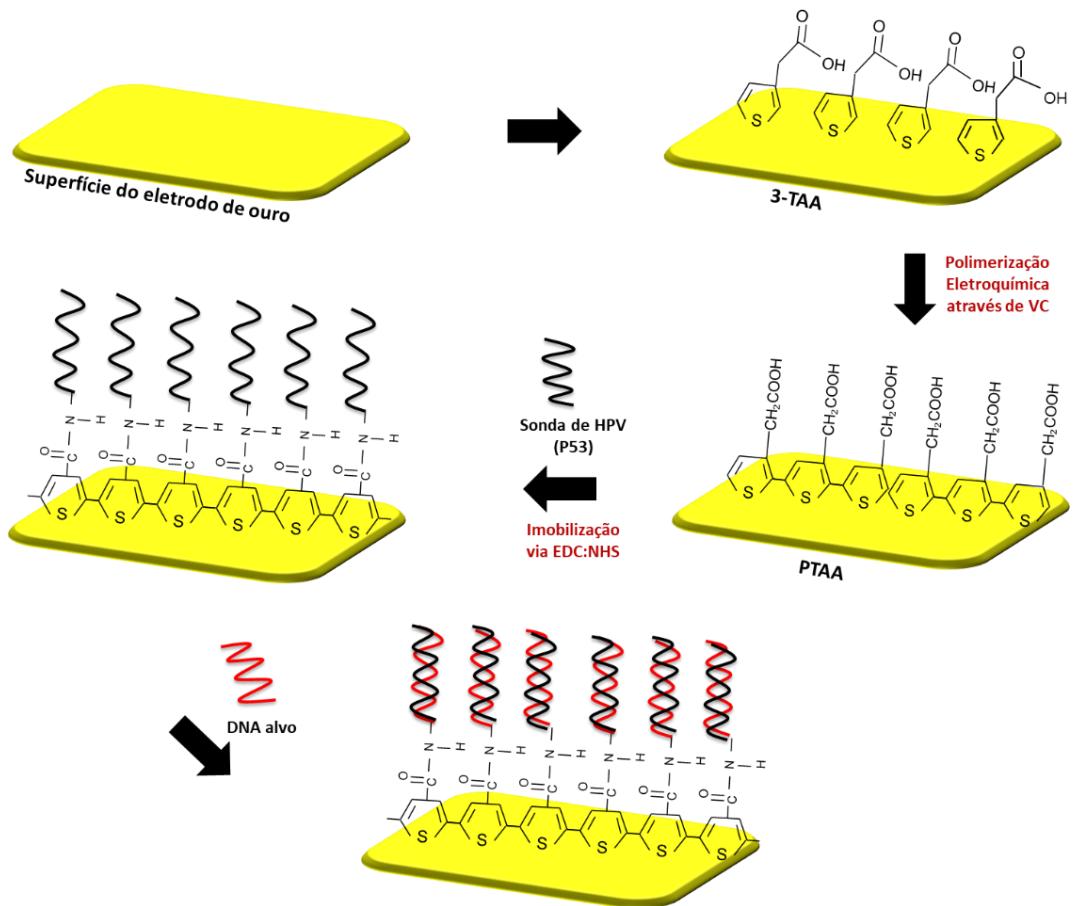
Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.4.2 Ouro-PTAA-sondaP53

Inicialmente, foi preparado 20 mL de uma solução 0,1 M de ácido 3-tiofeno acético (TAA) em ácido clorídrico (HCl), para realização do processo de polimerização do monômero TAA em um filme poli (ácido tiofeno-3-acético) (PTAA). A síntese foi realizada na célula eletroquímica composto por três eletrodos convencionais imersos em uma solução de TAA (0,5 M) dissolvida em 20 mL de HCl (0,1 M). O filme PTAA foi preparado por polimerização potenciostática pela técnica de voltametria cíclica (VC) na superfície do eletrodo de ouro, posicionado paralelamente ao eletrodo de referência e ao contra-eletrodo. Através da VC, foi aplicado 40 ciclos de varredura em uma faixa de potencial de -0,2 a +1,5 V com uma velocidade de varredura de 100mV.s<sup>-1</sup>. Este parâmetro foi suficiente para formação do filme PTAA na superfície do eletrodo de ouro. Finalmente, o filme foi lavado com água deionizada para remover monômeros não adsorvidos.

Após a formação do filme PTAA, foi adicionado 4µL de uma solução de EDC:NHS (1:1) para promover a imobilização covalente da sonda de DNA por 10 minutos. Logo em seguida, foi gotejado 2µL da solução da sonda P53, que ficou incubando por 30 minutos para permitir a imobilização covalente da sonda. Após caracterizar o sistema, o genossensor foi avaliado frente a HPV (tipos 16, 11, 6, 31, 33, 45 e 58) em espécimes cervicais (amostras de cDNA). As amostras foram aquecidas numa temperatura 90°C, e gotejado 2µL na plataforma sensora. O sistema foi caracterizado por espectroscopia impedimétrica eletroquímica (EIE) imersa em uma solução de PBS (10 mM, pH 7,4) contendo K4 [Fe (CN) 6] / K3 [Fe (10 mM) CN)6] (1:1, v / v) em uma frequência que varia de 100 mHz a 100 kHz sob um potencial de onda senoidal de +10 mV. Uma representação esquemática do processo de desenvolvimento do genossensor demonstrado na Figura 27, e todas as medidas foram realizadas em duplicatas.

**Figura 27.** Representação esquemática do sistema sensor PTAA-sondaHPV (p53).



Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

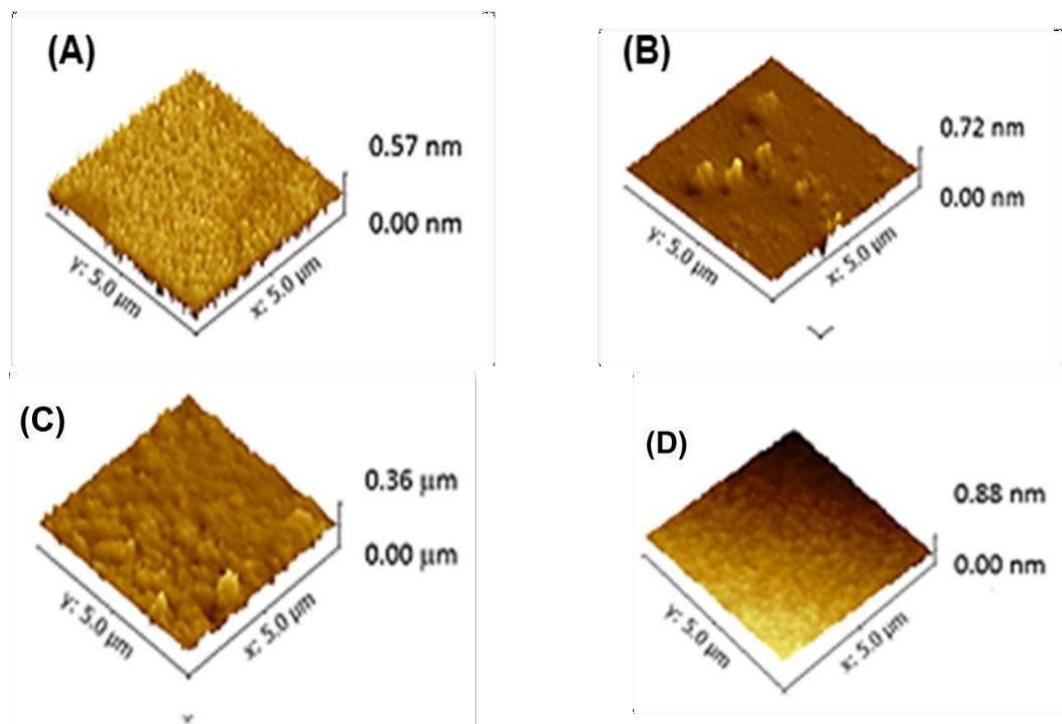
### 5.1 PLATAFORMA 1 (GENOSENSOR NFG-SONDAMY11)

#### 5.1.1 Caracterização topográfica das etapas de modificação do eletrodo de ouro

A análise topográfica da construção do genossensor e as mudanças na superfície após o processo de hibridação entre o primer degenerado MY11 e amostras de HPV foram avaliadas por microscopia de força atômica (Figura 28). A imagem A, mostra a superfície do eletrodo revestido por NFG que apresentou uma superfície mais áspera e plana, com uma altura de 0.57nm, devido à interação química entre a superfície do eletrodo de ouro e o tiol terminal grupos (-SH) presente nas NFG (BOUJAKHROUT *et al.*, 2015; POVEDANO *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Após immobilização da sonda MY11 via EDC:NHS observamos um aumento para 0.72nm na altura e variação na rugosidade baixa com presença de alguns picos (imagem B). Na imagem C, apresentamos a topografia do genossensor após exposição com o genótipo de HPV (tipo 16). Um aumento significativo na altura e rugosidade do sistema do sensor foi observado após a interação com o HPV 16. O sistema revelou alterações morfológicas com altura de 0,36 $\mu$ m que caracterizam a hibridização (SALIMI; KAVOSI; NAVAEE, 2019; AVELINO *et al.*, 2020). Na interação do genossensor com um controle negativo (imagem D), podemos observar um alinhamento da base, que caracteriza a ausência de alterações morfológicas significativas. Observamos uma superfície homogênea e um aumento na altura de 0.88nm, entretanto os picos anteriores desapareceram. Desta forma, os resultados AFM sugerem a especificidade do dispositivo sensor (SALIMI; KAVOSI; NAVAEE, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

**Figura 28.** Imagens topográficas do AFM em 3D revestidas com NFG (A), NFG-MY11 (B), NFG-MY11-HPV16 (C) e NFG-MY11-Controle negativo (D). Área de varredura 5 $\mu$ m × 5 $\mu$ m.



Fonte: Elaborada pelo autor.

### **5.1.2 Estudos eletroquímicos dos processos de montagem do biosensor**

As análises voltamétricas e impedimétricas (Figura 29) foram realizadas para demonstrar cada etapa de modificação da superfície do eletrodo de ouro na fabricação do genossensor.

A Figura 29A corresponde à caracterização voltamétrica da camada nanoestruturada constituída por NFG. Inicialmente o eletrodo de ouro limpo apresenta picos anódicos / catódicos bem definidos com carga reversível da taxa de transferência na presença da solução  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  em PBS (pH 7,4) como uma sonda redox.

A partir da análise dos voltamogramas cíclicos, observa-se mudança no comportamento eletroquímico do eletrodo de ouro após a adsorção das NFG, onde se verifica uma pequena redução das correntes de pico anódicas e catódicas. Logo, pode-se afirmar que a imobilização deste elemento origina uma camada auto- organizada sobre a superfície do eletrodo de trabalho, bloqueando parcialmente o processo de oxido-redução dos eletrólitos na dupla camada elétrica (RASHEED; SANDHYARANI, 2017).

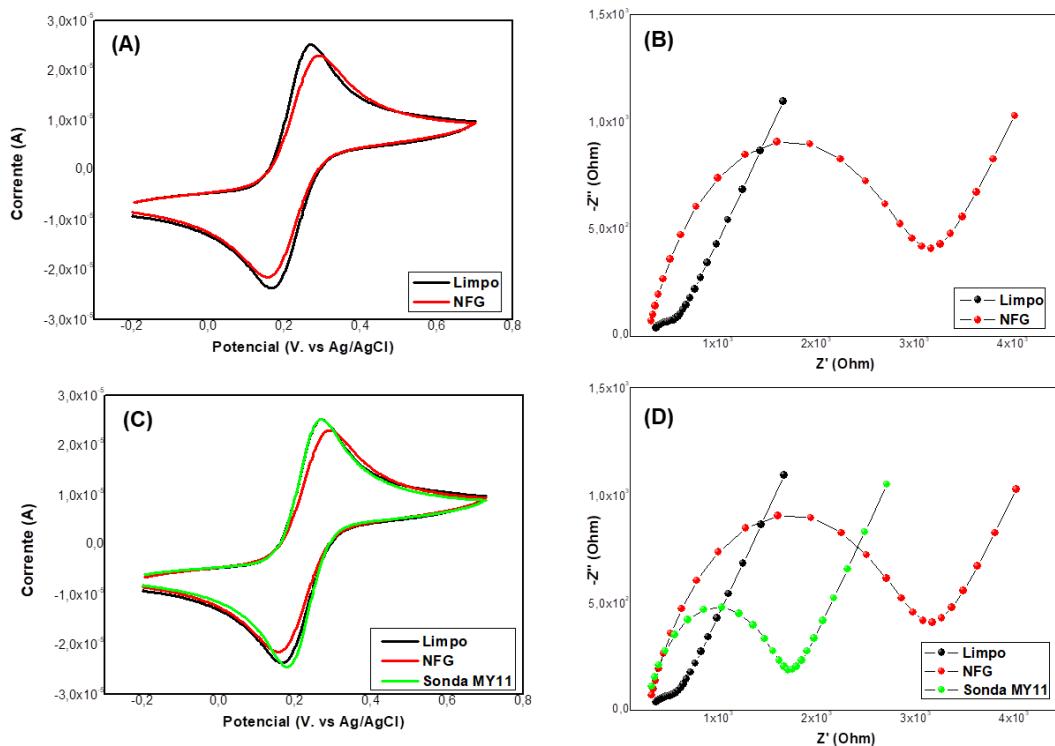
Os gráficos de Nyquist do estudo de EIE (Figura 29B) estão de acordo com os voltamogramas cíclicos apresentados anteriormente, o que demonstra o adequado processo de adsorção da NFG sobre o eletrodo de ouro limpo. O  $R_{ct}$  da curva do eletrodo limpo é baixo ( $189 \Omega$ ). Assim, o aumento da resistência de transferência de carga ( $2.29k \Omega$ ) reflete a presença de moléculas imobilizadas sobre a superfície em estudo (AZIMZADEH *et al.*, 2017).

A Figura 29C evidencia um aumento da magnitude dos picos nos voltamogramas cíclicos correspondentes ao processo de adsorção da sonda degenerada MY11 via EDC:NHS sobre o eletrodo revestido com NFG. Depois de ativado pelo EDC:NHS, o grupo carboxílico terminal carregado negativamente presentes na NFG, são substituídos pelo éster do NHS. O aumento é devido à atração eletrostática das cargas positivas/neutras presentes no éster do NHS, que promoveu a transferência do par redox negativo para a superfície do eletrodo (GENG *et al.*, 2008; LOCKETT *et al.*, 2008).

Após a adição da sonda MY11 (Figura 29D) observa-se uma diminuição do semicírculo de cole-cole e, portanto o  $R_{ct}$  diminuiu ( $562 \Omega$ ) (CHEN; DEFREITAS;

BURK, 2015). Esta redução eletroquímica acontece devido a presença dos agentes de acoplamento EDC:NHS que vão resultar em uma ligação amina estável. Esta ligação é estabelecida entre o grupo carboxílico das NFG modificadas e o grupo amina do extremo 5' da sonda de DNA (SAMANTA; SARKAR, 2011; RASHEED; SANDHYARANI, 2014; RASHEED *et al.*, 2016).

**Figura 29.** Análises de VC e EIE do processo de modificação do sistema: Voltamograma cíclico (A) e diagrama de Nyquist (B) após a adsorção do grafeno sobre o eletrodo de ouro e voltamograma cíclico (C) e diagrama de Nyquist (D) do processo de imobilização do primer após ativação via EDC:NHS.



Fonte: Elaborada pelo autor.

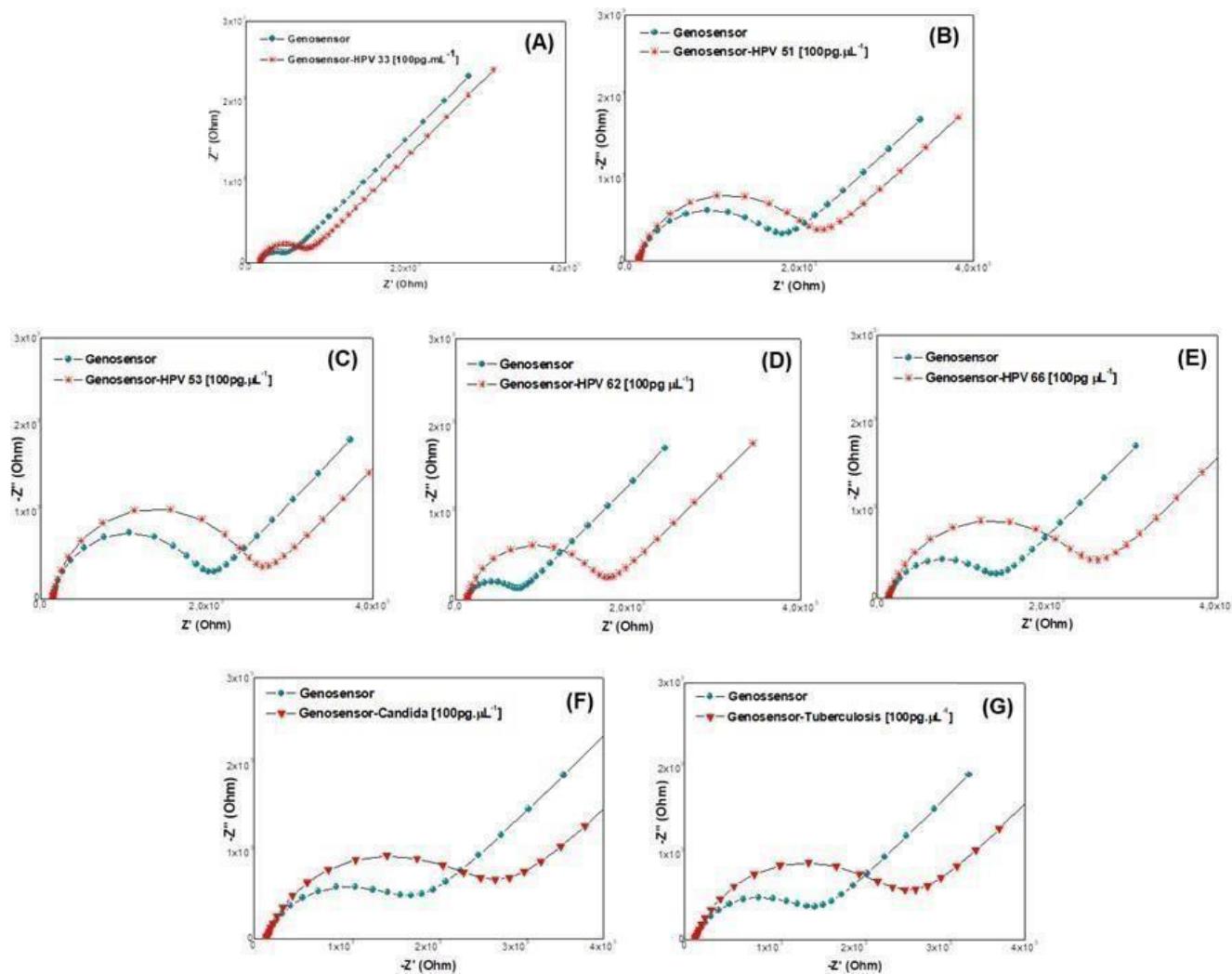
### 5.1.3 Caracterização por espectroscopias de impedância eletroquímica para detecção de subtipos de HPV

A técnica de EIE é eficaz para investigar as alterações da superfície do eletrodo modificado. E cada processo é avaliado com a formação de um semicírculo característico, onde o diâmetro do semicírculo apresenta as maiores frequências correspondente às resistências a transferência de cargas ( $R_{ct}$ ) (ZHANG; JIANG, 2012). Os espectros de impedância foram registrados na faixa de frequências de 100mHz a 100 kHz para caracterizar o processo de montagem na superfície do eletrodo de ouro. Os dados de impedância são usados para o desenvolvimento de uma plataforma baseada em nanofitas de grafeno e oligonucleoídeos aminado degenerado para detecção e identificação do DNA de diferentes subtipos de HPVem amostras de plasmideos, usando um circuito equivalente que ajuda a entender o comportamento da interface eletrodo-eletrólito na superfície do genossensor.

O genossensor (NFG-sondaMY11) foi exposto as amostras de HPV 33, HPV 51, HPV 53, HPV 62 e HPV 66 que foram escolhidas por pertecer ao gênero *Alphapapillomavirus* (BURK; HARARI; CHEN, 2013). Atualmente disponíveis nos grupos alfa-5 (Hpv51), alfa-6 (HPV53 E 66), alfa-9 (Hpv 33 e 58), onde estão envolvidos na maioria dos canceres anogenitais em todo o mundo (LI *et al.*, 2011; BRAY *et al.*, 2018).

Visto que o HPV 53 e 66 se encontram no mesmo ramo filogenético, e por outro lado, as amostras HPV 33, 51 e 62 se encontram em diferentes ramos filogenéticos respectivamente (BERNARD *et al.*, 2010). Ao analisar a resposta impedimétrica das amostras analisadas pelo nosso genossensor encontramos uma notória diferença entre elas. Os parâmetros impedimétricos foram obtidos a partir das respostas espectroscópicas mostradas na Figura 30, ao realizar o ajuste matemático com o circuito equivalente. Da mesma forma, amostras de *Candida albicans* e *Mycobacterium tuberculosis* foram analisadas como controles negativos para avaliar a especificidade do genossensor.

**Figura 30.** Diagramas de Nyquist do sistema genossensor NFG-sondaMY11 para a) HPV33, b) HPV 51, c) HPV53, d) HPV62, e) HPV66, e amostras negativas f) *Candida Albicans* e g) *Mycobacterium tuberculosis* na concentração ( $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ).



Fonte: Elaborada pelo autor.

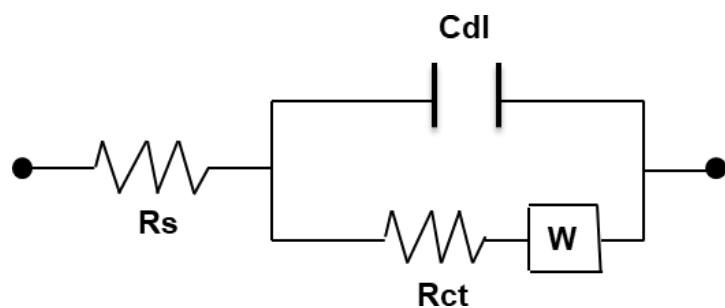
Os resultados impedimétricos revelam respostas diferentes para cada genótipo de HPV (Figura 30 A-E), onde podemos observar a interação do genossensor com genótipos de HPV que resultam em um aumento nos diâmetros dos semicírculos Cole-Cole. A análise revela um impedimento à transferência de carga na superfície do eletrodo. Assim, o processo específico de hibridação provoca uma intensificação da resposta impedimétrica. Os estudos de EIE foram realizados

em triplicatas para determinar o intervalo de detecção do bioeletrodo, e um tempo ideal de 30 minutos para hibridização (SANTOS AVELINO, DOS *et al.*, 2018).

A interação do sistema genossensor frente às amostras genômicas de *Candida sp* e de *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 30 F-G) revelou uma alteração insignificante na resposta impedimétrica total do sistema. Esses resultados indicam que as amostras negativas analisadas podem produzir um pequeno aumento na resposta impedanciométrica. Este aumento do diâmetro é provavelmente devido ao processo de adsorção física de sequências de DNA não complementares (AVELINO *et al.*, 2020). Desta forma, a sensibilidade deste genossensor ao HPV está relacionada a maior resposta impedimétrica.

O circuito equivalente de Randles, representado na Figura 31, foi utilizado para ajustar os dados experimentais de impedância. Onde  $R_s$  representa a resistência ôhmica da solução eletrolítica,  $C_{dl}$  é o elemento constante de fase,  $W$  é a impedância de Warburg e  $R_{ct}$  é a resistência de transferência de carga (CHANG; PARK, 2010; ANDRADE *et al.*, 2015).

**Figura 31.** Circuito equivalente de Randle.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Diante dos resultados já descritos, foi observado que o genossensor apresenta capacidade de detectar e identificar eletroquimicamente genótipos de HPV (BARZON *et al.*, 2011). Por este motivo, vimos à necessidade de avaliar em termo de variação relativa do  $R_{ct}$  ( $\Delta R_{ct}$ ) para caracterizar o desempenho analítico do genossensor, de acordo com a equação (SIMÃO *et al.*, 2016):

### Equação 5

$$\Delta R_{CT} (\%) = \left| \frac{R_{CT} (\text{Genosensor-HPV}) - R_{CT} (\text{Genosensor})}{R_{CT} (\text{Genosensor})} \right| \times 100$$

Onde, o  $R_{ct}$  (genossensor) corresponde a resposta inicial do genossensor (NFG-MY11) e o  $R_{ct}$  (DNA alvo do genossensor) é o valor medido da resistência à transferência de carga após o reconhecimento dos HPV 33, HPV 51, HPV 53, HPV 62 e HPV 66 (BUTTERWORTH et al., 2019; AVELINO et al., 2020).

Na Tabela 1 podem ser encontrados os parâmetros obtidos a partir do ajuste matemático das respostas impedimétrica dos genótipos de HPV e amostras negativas, apresentadas anteriormente na Figura 30.

**Tabela 1.** Parâmetros obtidos pelo ajuste das respostas impedimétricas com o circuito equivalente.

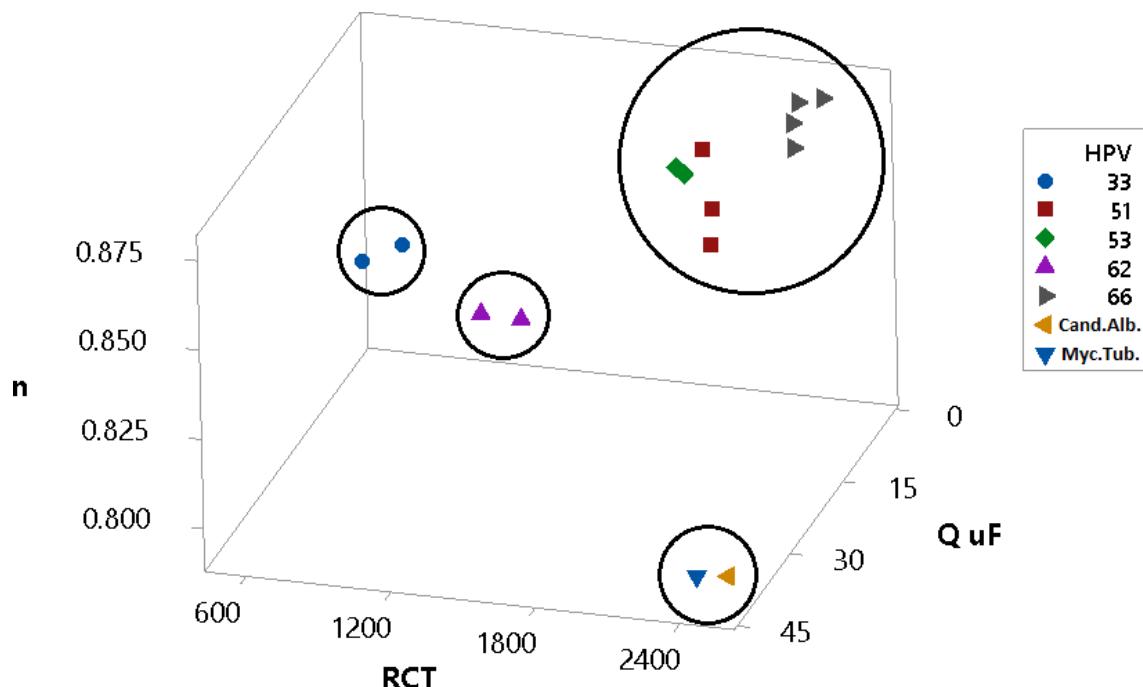
Modificação do eletrodo de ouro	R <sub>ct</sub> (kΩ)	R <sub>s</sub> (Ω)	Q (μF)	W	N	%ΔR <sub>ct</sub>
Superfície de ouro	323	128	110	431	0.538	-
NFG	2180	163	5.08	426	0.778	-
NFG - sondaMY11	961	133	34.8	108	0.44	-
Genossensor - HPV 33	1340	140	2.15	495	0.833	39,43
Genossensor - HPV 51	1590	160	1.67	445	0.849	65,45
Genossensor - HPV 53	1580	183	1.88	387	0.838	64,41
Genossensor - HPV 62	1100	144	2.34	464	0.821	14,46
Genossensor - HPV 66	2300	132	1.98	496	0.816	139,33
Genossensor - Candida	790	140	5.15	376	0.768	17,79
Genossensor - Tuberculose	695	124	3.62	441	0.793	27,67

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 5.1.4 Identificação da relação filogenética entre diferentes genomas de HPV

Uma avaliação dos elementos do circuito  $R_{ct}$ , Q e n, foram obtidas a partir da simulação teórica dos espectros de Nyquist que permitiu a construção de um gráfico 3D (Figura 32). Onde é apresentada a relação existente entre os parâmetros impedimétricos obtidos pelo ajuste com o circuito equivalente das respostas eletroquímicas (AVELINO *et al.*, 2020; SIMÃO *et al.*, 2020).

**Figura 32.** Gráfico tridimensional para os valores  $R_{ct}$ , Q e n, obtidos como resultado do ajuste dos resultados com o circuito equivalente.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Acontece um agrupamento das respostas correspondentes às amostras HPV 51, HPV 53 e HPV 66. Já as amostras HPV 33 e 62 se encontram distanciadas. Quando as amostras de HPV são comparadas com as amostras negativas, podemos observar que as amostras de HPV se encontram mais próximas entre elas, mantendo certa distância dos controles negativos.

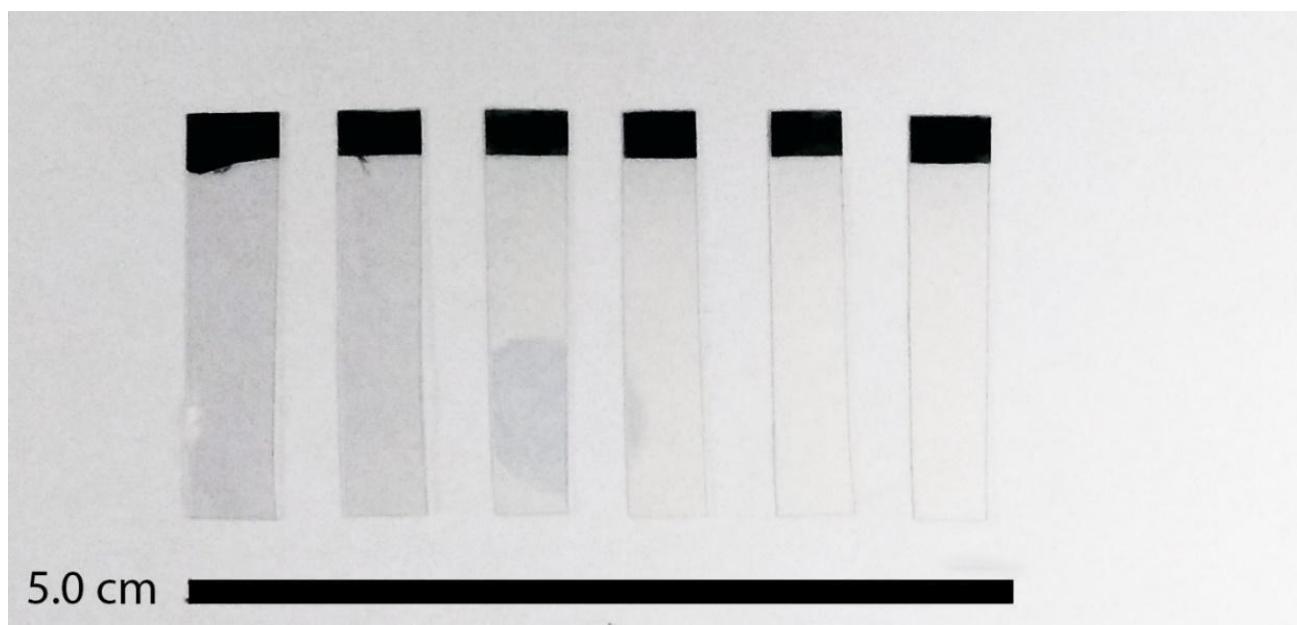
O resultado esperado era que as amostras HPV 53 e HPV 66 fossem às únicas agrupadas, porque pertencem ao mesmo ramo filogenético. Contudo, ao analisar a relação filogenética entre estas amostras e nossos resultados

encontramos que os subtipos HPV 51, HPV 53 e HPV 66 têm em comum serem subtipos de HPV associadas às lesões anogenitais (CHEN et al., 2011; BURK; HARARI; CHEN, 2013; MCBRIDE, 2017; AVELINO et al., 2020). Desta forma, neste trabalho reportamos que a plataforma desenvolvida é capaz de analisar eletroquimicamente a relação filogenética entre os distintos genomas de HPV.

### **5.1.5 Desenvolvimento de protótipo de diagnóstico portátil para identificação e diferenciação de subtipos oncogênicos de HPV**

Devido sucesso da plataforma genossensora descrita na secção anterior. Nosso grupo de investigação e desenvolvimento utilizou um eletrodo flexível recoberto por um fino filme condutor de óxido de estanho/índio (AVELINO et al., 2021). Sobre este substrato, uma cama de polianilina (Pani) foi eletrodepositado a maneira de funcionar como substrato para immobilizar as nanofitas de grafeno, e ao mesmo tempo, como material transdutor que ao estar em contato com o ITO, conduzirá a resposta elétrica de bioreconhecimento. Na Figura 33 é mostrada uma imagem do eletrodo sensor desenvolvido. O referido eletrodo possui superfície de 5 mm de comprimento x 3 mm de largura.

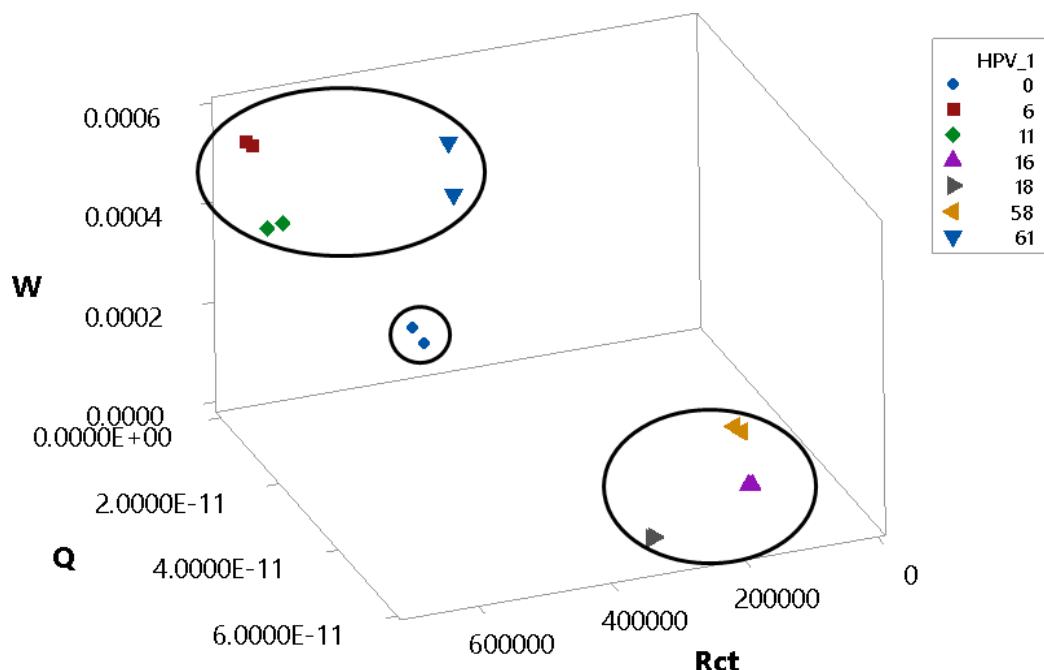
**Figura 33.** Biosensor desenvolvido sobre substrato flexível para identificação e diferenciação de subtipos oncogênicos de HPV.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A plataforma biosensora foi montada sobre este novo substrato de maneira similar aos protocolos apresentados na secção 4.4.1. Cumpre destacar que naprimeira plataforma descrita no presente, o substrato no qual se monta a plataforma genossensora é um disco de ouro de 3 mm de diâmetro. Outra diferença importante entre os dois substratos é que devido às propriedades eletroquímicas intrínsecas da polianilina, o processo de medição usa solução eletrolítica de Ferro-Ferri, sendo neste caso, a medição realizada em água ultrapura mediante uma análise não- faradaica. Uma vez montada a plataforma biosensora sobre este novo substrato flexível, amostras genéticas de pacientes infectados por subtipos oncogênicos de HPV foram testadas. Ao tudo foram testadas HPV 16, 18 e 58 como amostras oncogênicas de alto risco, e HPV 6, 11 e 61 como amostras de baixo risco. Uma amostra negativa de paciente feminino foi incluída como controle (HPV 0). Na Figura 34 pode ser observada a relação existente entre os parâmetros impedimétricos característicos da interação de cada amostra com a plataforma biosensora.

**Figura 34.** Biosensor desenvolvido sobre substrato flexível para identificação e diferenciação de subtipos oncogênicos de HPV.



Fonte: Elaborada pelo autor.

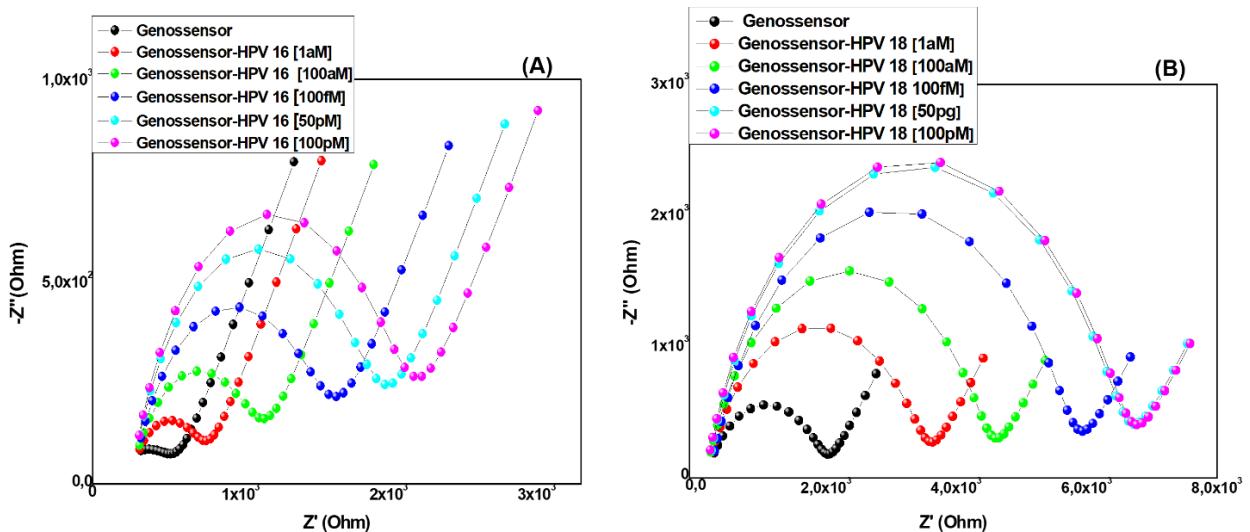
Podemos observar que as respostas obtidas com o novo protótipo podem ser claramente agrupadas em HPV de alto risco HPV 16, 18 e 58 e HPV de baixo risco HPV 6, 11 e 61. Podemos observar também como os parâmetros das amostras HPV 16 e 58 se encontram mais próximos um do outro do que a resposta do HPV 18. As respostas vindas de amostras de HPV de baixo risco pode ser agrupadas da mesma maneira. Ao analisar a relação filogenética das amostras testadas, podemos notar na Figura 33 que evidentemente, nossos resultados são congruentes com o distanciamento filogenético existente entre elas.

Enfatizamos que os resultados aqui apresentados, estão diretamente relacionados com o fenômeno de biointeração que ocorre entre a sonda MY11 e o material genético de HPV presente na amostra. Os diferentes parâmetros impedimétricos obtidos ocorrem a partir do arranjo estrutural das cadeias de DNA de HPV hibridizadas ao oligonucleotídeo e seu impacto direto sobre os processos eletroquímicos ocorrendo na dupla camada elétrica da interface do eletrodo. Desta maneira, diferentemente da interface ouro/NFG/MY11-HPV que foi estudada na primeira parte deste trabalho, em este novo protótipo, os processos eletroeletrônicos ocorrendo na interação dos distintos materiais Substrato ITO/Pani/NFG/MY11-HPV devem ser devidamente estudados.

### 5.1.6 Ensaios de sensibilidade

A sensibilidade do genossensor foi a avaliada frente a diferentes concentrações de genótipos de HPV de alto risco oncogênico associado a lesões cervicais (tipo 16 e 18). As análises impedimétricas representadas pelo diagrama de Nyquist (A) e (B) na Figura 35 revelaram um aumento sequencial no diâmetro do semicírculo de acordo com o aumento da concentração das amostras de plasmídeos (1aM, 100aM, 100fM, 50pM, 100pM). Estes resultados confirmam a interação entre a sonda MY11 e o gene L1 de HPV 16 e HPV 18.

**Figura 35.** Diagrama de Nyquist do sistema genossensor exposto a diferentes concentrações de plasmídeo recombinantes contendo genomas de HPV 16 e HPV 18 [DNA alvo – 1aM, 100aM, 1E5 (100fM), 50E7 (50pM), 1E8 (100pM)].



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Tabela 2 mostra os resultados  $R_{ct}$ , que apresenta uma razão proporcional entre a concentração das amostras de plasmídeos dos HPV 16 e HPV18 e os valores obtidos de  $R_{ct}$ . Tais dados revelam respostas diferentes paraos HPV 16 e HPV 18, demostrando que o genossensor proposto pelo estudo é capaz de reconhecer genótipos de HPV em baixas concentrações.

**Tabela 2.** Valores dos elementos de circuito equivalente dos resultados de impedância de genótipos de HPV de alto risco.

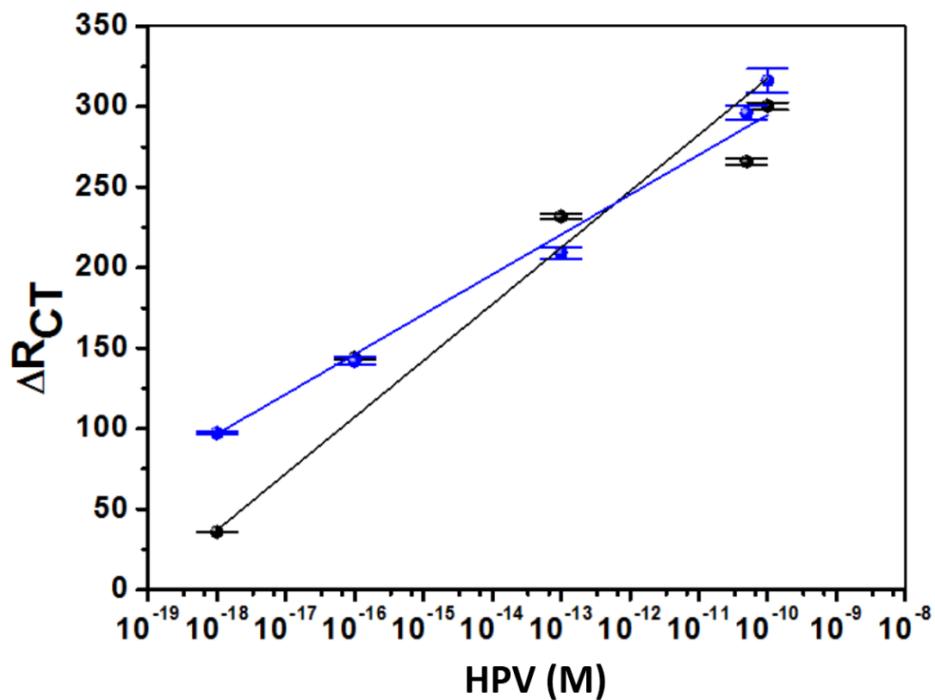
Modificação do eletrodo de ouro	R <sub>ct</sub> (kΩ)	R <sub>s</sub> (Ω)	Q (μF)	W	N	%ΔR <sub>ct</sub>
NFG – sonda MY11	961	133	34.8	108	0.44	-
Genossensor - HPV 16 (1aM)	993	246	9.25	1.12	0.672	3.32
Genossensor - HPV 16 (100aM)	1040	256	7.07	1.14	0.704	8.22
Genossensor - HPV 16 (100fM)	1340	262	5.13	1.08	0.724	39.43
Genossensor - HPV 16 (50pM)	1660	271	3.42	1.01	0.765	72.73
Genossensor - HPV 16 (100pM)	1850	273	2.90	978	0.783	92.50
Genossensor - HPV 18 (1aM)	3300	191	8.77	954	0.787	243.39
Genossensor - HPV 18 (100aM)	4330	199	7.46	834	0.798	350.57
Genossensor - HPV 18 (100fM)	5560	218	6.65	823	0.804	478.56
Genossensor - HPV 18 (50pM)	6380	241	6.15	769	0.813	563.89
Genossensor - HPV 18 (100pM)	6450	274	6.02	719	0.816	571,17

Fonte: Elaborada pelo autor.

A sensibilidade do genossensor foi avaliada através da criação de uma curva de calibração a partir das respostas do EIE obtidas a partir da exposição frente a amostras de plasmídeos de HPV 16 e HPV 18. Para avaliar a reprodutibilidade e o desvio experimental padrão (S.D.), os seguintes dados são apresentados como resultado de três repetições realizadas para cada amostra. O desempenho do genossensor para detecção do HPV 16 e 18 foi avaliado através da variação relativa

de  $R_{ct}$  ( $\Delta R_{ct}\%$ ), visto anteriormente na equação 5. Na Figura 36 mostra a relação existente entre o  $\Delta R_{ct}\%$  e a concentração de HPV 16 e HPV 18.

**Figura 36.**  $\Delta R_{ct}$  para o sistema genossensor NFG-sondaMY11 após exposição com as diferentes concentrações de genomas de HPV 16 e HPV 18. Os dados usados para obtenção do  $\Delta R_{ct}$  foram demonstrados na tabela 2.



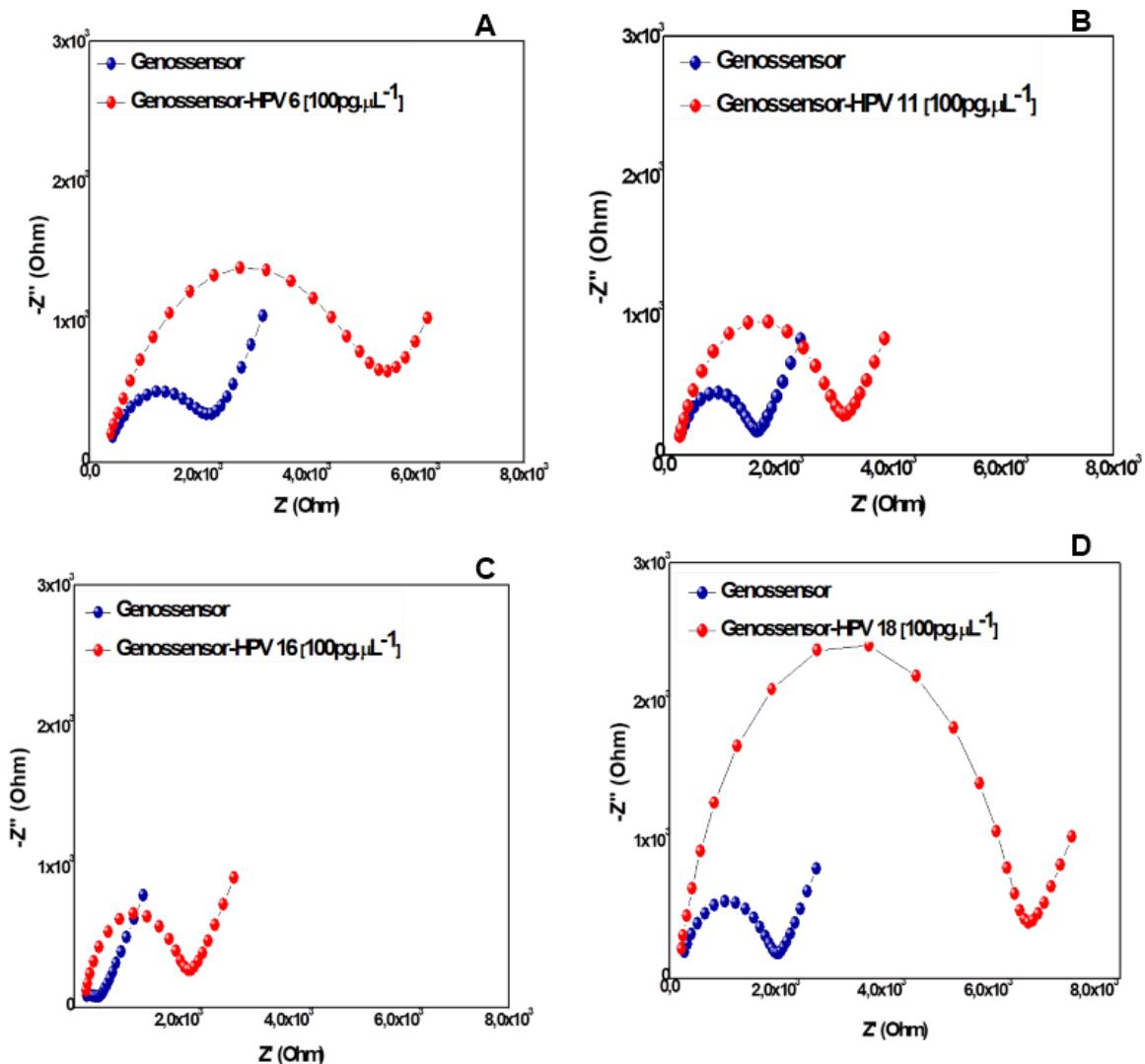
Fonte: Elaborada pelo autor.

Podemos observar um aumento na  $R_{ct}$  com o aumento da concentração das amostras contendo plasmídeos recombinantes de HPV 16 e HPV 18 (Figura 36). Os pontos dispersos representam os resultados experimentais, e as linhas pretas mostram as curvas de encaixe resultantes do circuito equivalente. Cabe salientar que as resistências encontradas foram diferentes entre os HPV 16 e HPV 18, o que revela uma interação diferenciada do genossensor com cada um deles. Calculamos uma relação linear de acordo com os dados extraídos da análises impedimétrica, o genossensor apresentou uma excelente capacidade sensora com limite de detecção ( $LOD_{HPV16}$  de 3,5 aM;  $LOD_{HPV18}$  de 1,2 aM).

### 5.1.7 Identificação impedimétrica de HPV de alto e baixo risco

O sistema genossensor foi avaliada frente a genótipos de HPVs de baixo e alto risco (tipo 6, 11, 16 e 18). Na Figura 37, apresentamos as respostas impedimétricas do genossensor após exposição a amostras de HPV 6 e HPV 11 (baixo risco) e HPV 16 e HPV 18 (alto risco) na concentração de  $100\text{pg}/\mu\text{L}^{-1}$ .

**Figura 37.** Diagrama de Nyquist dos HPV 6, 11, 16, 18.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Após exposição do genossensor com genótipos de HPV, os diagramas de Nyquist apresentam um aumento no diâmetro do semicírculo. Os valores obtidos de  $R_{ct}$  estão demonstrados na Tabela 3.

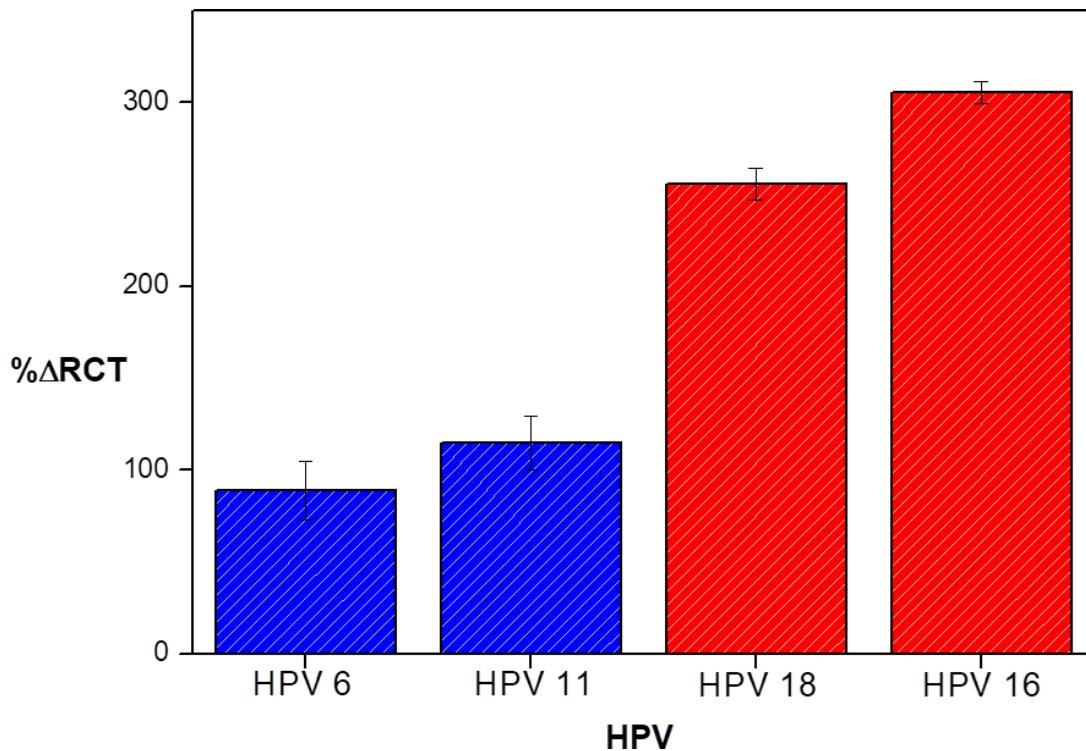
**Tabela 3.** Valores dos elementos de circuito equivalentes dos resultados da impedância ajustada de genótipos de HPV de alto e baixo risco oncogênico.

<b>Tipo de HPV</b>	<b>Rct (kΩ)</b>	<b>Q (μF)</b>	<b>N</b>	<b>%ΔRct</b>
Genossensor - HPV 6 (100pM)	6110	6.33	0.652	100.32
Genossensor - HPV 11 (100pM)	3510	5.08	0.815	125.00
Genossensor - HPV 18 (100pM)	7800	6.15	0.816	249.77
Genossensor - HPV 16 (100pM)	1850	2.90	0.783	301.30

Fonte: Elaborada pelo autor.

A bioatividade experimental foi analisada através de respostas de  $\Delta Rct\%$  relacionadas com o grau de baixo e alto risco oncogênico. Na Figura 38, as colunas azuis representam o  $\Delta Rct\%$  dos HPVs de baixo risco (HPV 6 e HPV 11) e as colunas vermelhas representam o  $\Delta Rct\%$  dos HPVs de alto risco (HPV 16 e HPV 18). Podemos observar que existe uma grande variação linear do  $\Delta Rct\%$  em relação aos grupos de baixo e alto risco, onde podemos visualizar diferenças expressivas do  $\Delta Rct\%$  no gráfico de barra. Esse comportamento desmonstra a seletividade do genossensor em diferenciar subtipos de HPV de baixo risco e alto risco.

**Figura 38.** Valores do  $\Delta R_{ct}$  obtidos a partir dos ensaios com genótipos de HPV (tipos 6, 11, 16 e 18) [Concentração de  $100\text{pg}.\mu\text{L}^{-1}$ ].



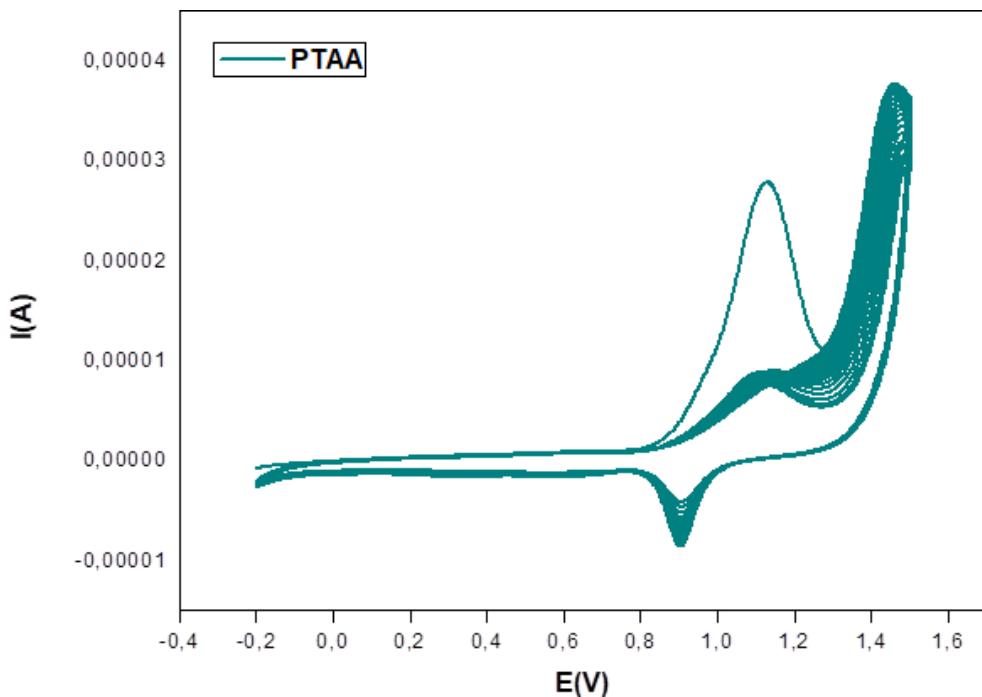
Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5.2 PLATAFORMA 2 (GENOSENSOR PTAA-P53)

### 5.2.1 Síntese eletroquímica do filme de PTAA

O processo de eletropolimerização de TAA foi realizado através de VC, onde foram aplicados 40 ciclos de polimerização em uma faixa de potencial de -0,2 a +1,5 V com uma velocidade de varredura de  $100\text{ mV.s}^{-1}$  para eletropolimerização do filme PTAA na superfície do eletrodo de trabalho. Após a varredura foi possível obter a formação do filme de PTAA na superfície do eletrodo de trabalho. O aumento das correntes de pico caracteriza a quantidade de filme de polímero PTAA eletrossintetizado na superfície do eletrodo de ouro. Além disso, foi possível observar a formação de alguns picos na região catódica devido à presença de grupos carboxílicos no PTAA durante o processo de oxido-redução (Figura 39). Todos estes fenômenos indicaram que o filme PTAA foi formado na superfície do eletrodo de ouro (LEE *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2012).

**Figura 39.** Gráfico voltamétrico do processo de polimerização do PTAA.



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 5.2.2 Caracterização eletroquímica da detecção das amostras de cDNA pelo genossensor (PTAA-sondaHPVp53)

As análises de VC e EIE foram realizadas para caracterização do filme de PTAA formado na superfície do eletrodo. A Figura 40 mostra o voltamograma cíclico e o espectro de impedância da modificação da superfície do eletrodo de ouro. Na Figura 40 (A) podemos observar um voltamograma cíclico reversível com picos anódicos e catódicos bem definidos. Obteve-se uma diminuição na resposta da corrente de pico depois da modificação com o PTAA, certificando a formação do filme.

O filme de PTAA apresenta na sua composição grupo tiol (-SH) que são capazes de se ligar espontaneamente a superfícies metálicas como ouro, prata, platina, cobre e entre outros, que facilitam a sua imobilização na superfície do eletrodo de ouro. As unidades de ácido carboxílico (-COOH) presentes nas estruturas são capazes de formar ligações de hidrogênio com grupos amina terminal (-NH<sub>2</sub>) presentes na sonda de HPV (p53).

A imobilização da sonda p53 foi possível através do uso dos ativadores EDC:NHS, onde o éster NHS reage com o grupamento amina presente no eixo terminal da estrutura da sonda p53, resultando em uma ligação amida estável (Samanta e Sarkar, 2011). Devido às cargas positivas/negativas presente no éster NHS, o voltamograma cíclico revela um aumento das correntes de pico, resultando na transferência do par redox negativo à superfície do eletrodo (Geng *et al.*, 2008). Os grupos amina também foram ativados por meio do EDC:NHS que favoreceu uma ligação covalente com o grupo carboxílico livre da estrutura do PTAA, revelando esta diminuição dos picos catódicos e anódicos do voltamograma cíclico (Wang *et al.*, 2011).

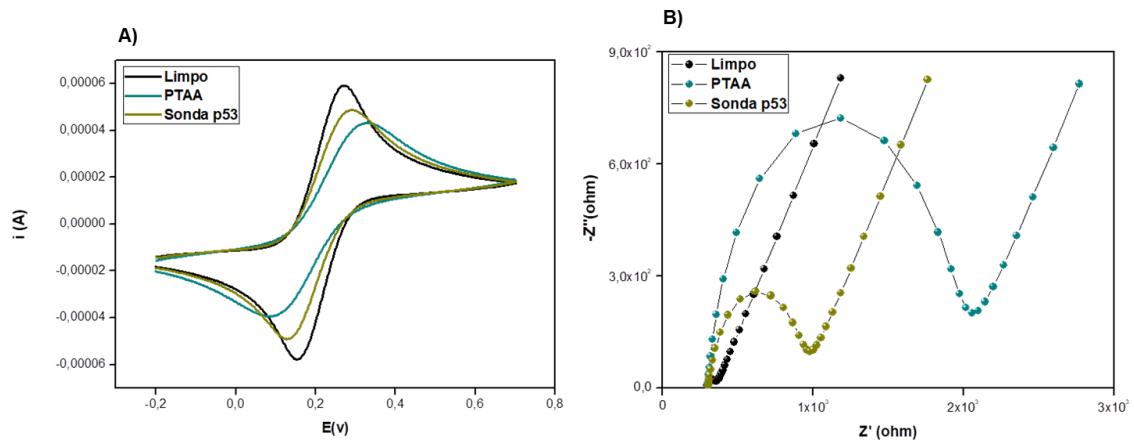
Na Figura 40 (B), o diagrama de Nyquist dos espectros de impedância revela uma variação na impedância que está diretamente relacionada ao processo de modificação de superfície do eletrodo, que ocorreu em uma frequência entre 100mHz a 100kHz. O diâmetro do semicírculo no espectro de impedância equivale à resistência de transferência de carga ( $R_{ct}$ ) na superfície do eletrodo. O aumento ou diminuição nos valores de  $R_{ct}$  caracterizam a modificação da superfície do eletrodo (LEE *et al.*, 2006).

Inicialmente o diagrama obtido apresenta um pequeno semicírculo na  $R_{ct}$  do eletrodo de ouro sem modificação ( $R_{ct}= 72 \Omega$ ). Após a adição do PTAA no eletrodo, obteve-se um aumento na resistência à transferência de carga ( $R_{ct}=744 \Omega$ ), indicando a formação do filme de PTAA na superfície do eletrodo.

O PTAA apresenta alta resistividade superficial em comparação com outros politiofenos eletroativos, que está relacionada à presença de seus grupos laterais carboxílicos, por serem fortemente polares, podem afetar o transporte de elétrons no polímero (ZHANG; SRINIVASAN, 2008).

Após a primeira modificação do eletrodo com o filme de PTAA, houve a imobilização da sonda p53 por agente aclopadores EDC:NHS, refletindo na diminuição do  $R_{ct}$  ( $R_{ct}= 127 \Omega$ ). As respostas de espectro de impedância se corroboram com os voltamogramas cíclicos vistos anteriormente, certificando seu aclopamento na superfície do eletrodo e finalizando a plataforma genossensoraPTAA-sondaHPV (p53) (PENG *et al.*, 2007).

**Figura 40.** Análises de VC e EIE do processo de imobilização da sonda de HPV (p53) no PTAA após ativação via EDC:NHS.

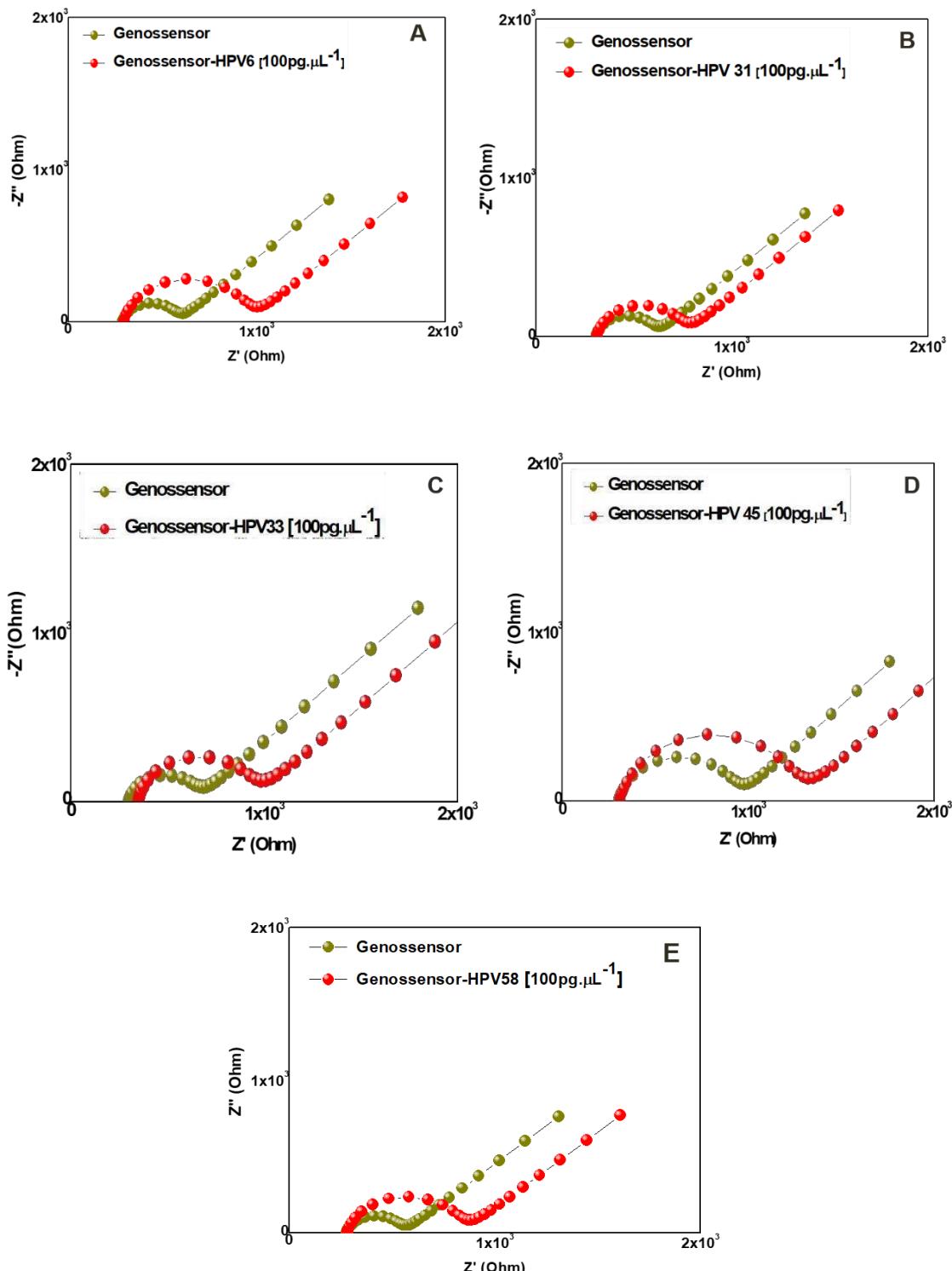


Fonte: Elaborada pelo autor.

### 5.2.3 Caracterização eletroquímica da plataforma do genossensor [PTAA-sondaHPV(p53)]

As medidas de EIE foram usadas para avaliar o processo de interação entre a plataforma genossensora PTAA-sondaHPV (p53) e as amostras de cDNA de pacientes com genomas de diferentes tipos de HPV, sendo representada na Figura 41a-e estão representadas pelos HPVs 6, 31, 33, 45, 58, respectivamente na concentração de  $100 \text{ pg}/\mu\text{L}^{-1}$ .

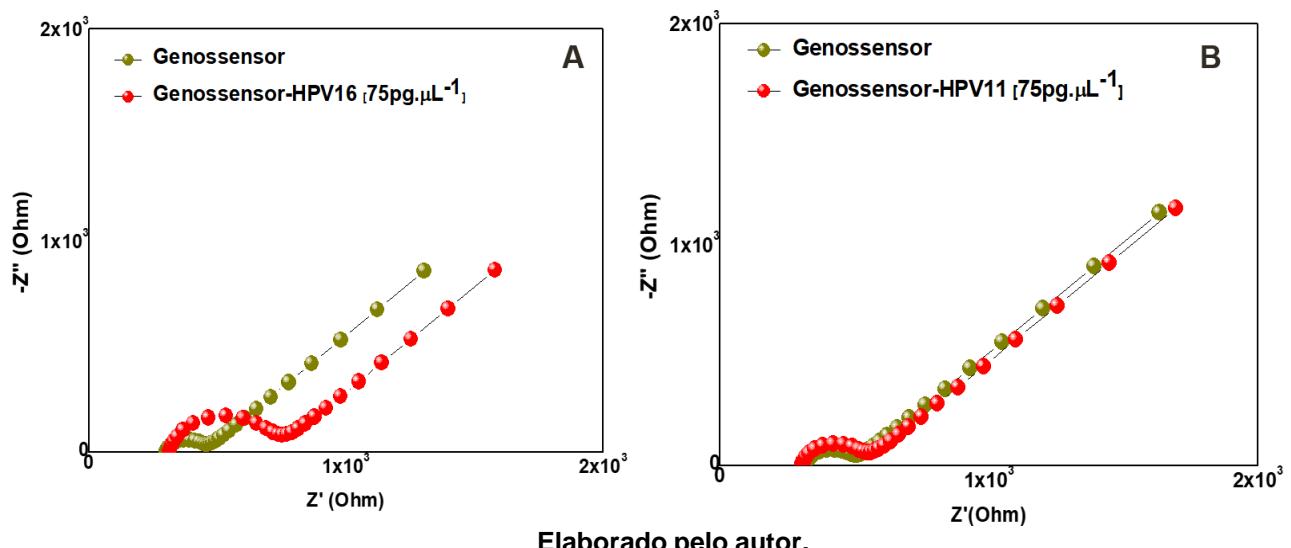
**Figura 41.** Resposta impedimétrica do genossensor PTAA-sondaHPV (p53) para amostras de cDNA de pacientes infectados com diferentes tipos de HPV. Os gráficos a) HPV 6, b) HPV 31, c) HPV33, d) HPV45 e e) HPV 58 na concentração 100 pg. $\mu$ L $^{-1}$ .



Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a deposição das amostras de cDNA, os diagramas de Nyquist revelaram um aumento no diâmetro do semicírculo, processo este diretamente relacionado ao processo de hibridização, confirmando assim a aderência das amostras de cDNA na plataforma genossensor. Desta forma, é possível perceber a viabilidade de se utilizar o PTAAs como nanoestrutura para a imobilização da sonda e utilização como genossensor para HPV (WANG, Jianxiu *et al.*, 2008). A sonda de HPV (p53) revela um aumento nas respostas impedimétricas ao DNA danificado presente nas amostras de cDNA infectadas com diferentes tipos de HPV.

**Figura 42.** Resposta impedimétrica do genossensor PTAAs-sondaHPV(p53) para amostras de cDNA de pacientes infectados com HPV 16 e HPV 11 na concentração ( $75 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ).



Elaborado pelo autor.

A Figura 42 mostra os resultados impedimétricos da interação do genossensor com as amostras de cDNA de pacientes infectados com HPV 16 e HPV 11. As amostras dos pacientes resultam no aumento do diâmetro dos semicírculos de Cole-Cole. O HPV 11 revela um pequeno aumento na resposta impedimétrica que reflete na detecção baixa devido ao reconhecimento não específico da sonda de HPV (p53) com a amostra de cDNA. Diferente do HPV 16, que apresentou um aumento significativo por ser pressuposto ao desenvolvimento do câncer (AVELINO *et al.*, 2020).

O circuito equivalente de Randles, representado anteriormente na Figura 30, também foi utilizado para facilitar a interpretação dos dados experimentais de impedância. Segundo os resultados já descritos, podemos observar na Tabela 4 os dados extraídos do  $R_{ct}$ , demonstrando a habilidade do sistema em reconhecer diferentes subtipos de HPVs. Foram obtidas magnitudes diferenciadas para cada tipo de HPV de acordo com seu grau de oncogenidade (LU *et al.*, 2020).

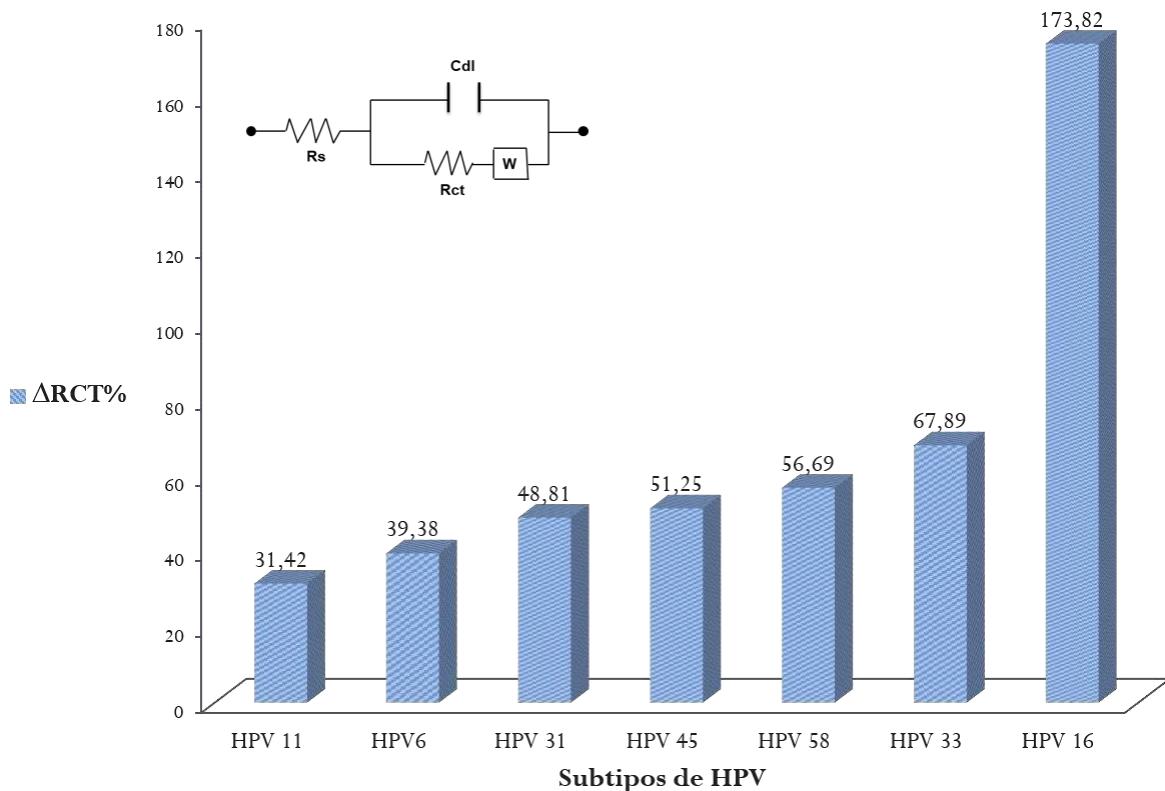
**Tabela 4.** Valores dos elementos de circuito equivalente dos resultados de impedância das amostras de cDNA contendo HPV de alto e baixo risco oncogênico.

Modificação do eletrodo de ouro	R <sub>ct</sub> (kΩ)	Q (μF)	N	%ΔR <sub>ct</sub>
Genossensor - HPV 6 (100pM)	453	1.90	0.876	39.38
Genossensor - HPV 31 (100pM)	439	1.72	0.909	48.81
Genossensor - HPV 33 (100pM)	591	1.22	0.906	67.89
Genossensor - HPV 45 (100pM)	245	1.45	0.863	103.20
Genossensor - HPV 58 (100pM)	199	1.26	0.882	56.69
Genossensor - HPV 16 (75pM)	408	1.79	0.876	173.82
Genossensor - HPV 11 (75pM)	230	1.48	0.875	31.42

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 42 podemos visualizar um gráfico de  $\Delta R_{ct}$  em função as amostras de cDNA com genótipos diferentes de HPV. Estes dados foram extraídos pelo circuito equivalente de Randles. Os resultados demonstram o aumento gradual dos valores de  $\Delta R_{ct}$ , em função com o grau de gravidade das lesões que induzem o câncer (SERRANO *et al.*, 2015; SERRANO, 2017).

**Figura 43.** Gráfico de barra a partir da extração de dados  $\% \Delta R_{ct}$  de amostra de cDNA de diferentes genomas de HPV e circuito equivalente de Randles.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Foram obtidos valores baixos de  $\Delta R_{ct}$  do HPV 6 e 11, que pertencem ao grupo de baixo risco, e desta forma apresentam baixo potencial de transformação decélulas hospedeiras, portanto, são responsáveis pelas lesões benignas. Os HPVs 31, 33 e 58 revelaram um aumento relativo de  $\Delta R_{ct}$  e estão inclusos no grupo de risco intermediário, podendo ser incluídos como subtipos de alto risco pela eventual gravidade de lesão. No HPV 45 e 16 foi observado um aumento expressivo na resposta impedimétrica comparado aos demais subtipos, pois estão associados ao desenvolvimento de câncer (COMBES; FRANCESCHI, 2018; CHEN et al., 2018).

## 6. CONCLUSÕES

- Dois genossensores eletroquímicos: plataforma 1 baseados em grafeno (NFG-sondaMY11) e plataforma 2 baseado em ácido-politofeno (PTAA-sondaP53) foram fabricados para a detecção e identificação de diferentes subtipos oncogênicos de papiloma vírus humanos.
- As análises de AFM, VC e EIE proporcionaram a caracterização e compreensão de cada etapa de construção dos genossensores na superfície do eletrodo de ouro.
- A plataforma genossensora baseada em NFG-sondaMY11 apresentou sucesso na resposta impedimétrica do processo de modificação da superfície do eletrodo.
- As NFG proporcionaram uma grande área superficial, facilitando a imobilização da sonda MY11. A característica degenerada da sonda MY11 permite a discriminação dos genótipos de HPV.
- As sequências são consideradas de alta especificidade na sua interação com o DNA, demonstrado pelo baixo sinal eletroquímico após interação do sistema com amostra negativa. A plataforma 1 (NFG-sondaMY11) apresentou um limite de detecção (LOD) de 3,5 aM e 1,2 aM para HPV16 e HPV18, respectivamente.
- A plataforma genossensora baseada em PTAA-sonda de HPV (p53) apresentou excelentes propriedades para imobilização da sonda de HPV (p53) e reconhecimento das amostras de cDNA de pacientes com diferentes genomas de HPV.
- Após o bioreconhecimento da sonda de HPV (p53) com as amostras de cDNA de pacientes com diferentes genótipos de HPV, apresentou amplificação de sinal eletroquímico de acordo com o grau de gravidade de lesões.
- Foi identificado o potencial de diagnóstico nos dois genossensores desenvolvidos que apresentaram a capacidade de detectar e identificar eletroquimicamente a relação filogenética existente entre amostras contendo diferentes subtipos de HPV.
- Os genossensores apresentam uma importante capacidade sensora, um excelente desempenho analítico para detecção de genótipo de HPV com alta sensibilidade e seletividade, além de possuir potencial para automação e, como consequência, aplicação em análises clínicas.

- Quando comparadas aos métodos atuais, os genossensores eletroquímicos podem ser considerados uma nova alternativa inovadora para detecção de genótipos de HPV. Apresentam uma fabricação simples e com respostas rápidas de identificação dos genótipos de HPV, permitindo um diagnóstico precoce e prevenindo o desenvolvimento de câncer anogenitais.

## 7. PERSPECTIVAS

Após a construção eletroquímica dos genossensores baseados em a) NFG-sondaMY11 e b) PTAA-sondap53 embora apresentem resultados promissores, estudos mais aprofundados, deverão ser realizados para assegurar a diferenciação entre as amostras de HPV de alto risco e baixo risco. A separação dos parâmetros impedimétricos das diversas amostras está associada à dissimilaridade genômica dos subtipos de HPV. Desta forma, amostras de baixo risco com elevada relação filogenética com amostras de alto risco, que podem ser caracterizadas como falsos positivos. Por estes motivos, caracterizações elétricas e eletroquímicas adicionais deverão ser realizadas tanto para o novo eletrodo como para sua validação como método de diagnóstico. Ademais, a sonda biológica MY11 deverá ser substituída por sondas específicas para um único subtipo ou grupo filogenético de subtipos de HPV. Apesar dos genossensores apresentarem capacidade de reconhecimento bioespecífico frente às amostras de plasmídeos e cDNA de genótipos de HPV, há a necessidade de estudos complementares, como estabilidade, reusabilidade e ação de interferentes sobre a resposta eletroquímica. Desta forma, as plataformas nanoestruturadas propostas nesta dissertação apresentam efetividade para detecção de outros alvos de DNA.

## REFERÊNCIAS

ABREU, Mery Natali Silva et al. Knowledge and perception of HPV in the population over 18 years of age in the city of Ipatinga–state of Minas Gerais, Brazil. **Ciencia & saude coletiva**, v. 23, n. 3, p. 849-860, 2018.

ACHA, Victor et al. Tissue-based biosensors. In: **Recognition Receptors in Biosensors**. Springer, New York, NY, 2010. p. 365-381.

AHMED, Minhaz Uddin et al. **Food biosensors**. Royal Society of Chemistry, 2016.

ALBERTS, Bruce et al. **Biologia molecular da célula**. Artmed Editora, 2010.

ALVES, Marcos Roberto de Abreu et al. Oligômeros e polímeros derivados do tiofeno: síntese e aplicações. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2165-2175, 2010.

AMBROSI, Adriano et al. Eletroquímica do grafeno e materiais relacionados. **Chemical reviews**, v. 114, n. 14, p. 7150-7188, 2014.

ANDO, Toshio; UCHIHASHI, Takayuki; KODERA, Noriyuki. AFM de alta velocidade e aplicações em sistemas biomoleculares. **Revisão anual de biofísica**, v. 42, p. 393-414, 2013.

ANDRADE, C. A. S. et al. Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavanin A for bacterial detection. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2015.

ARALDI, Rodrigo Pinheiro et al. Papillomaviruses: a systematic review. **Genetics and molecular biology**, n. AHEAD, p. 0-0, 2017.

ARALDI, Rodrigo Pinheiro et al. The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1537-1556, 2018.

ARAQUE, Elena et al. Crumpled reduced graphene oxide–polyamidoamine dendrimer hybrid nanoparticles for the preparation of an electrochemical biosensor. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 17, p. 2289-2296, 2013.

ARIAS, Gerardo. Em 1953 foi descoberta a estrutura do DNA. **Passo Fundo: Embrapa Trigo**, 2004.

ARORA, S. et al. Detecting food borne pathogens using electrochemical biosensors: An overview. **IJCS**, v. 6, n. 1, p. 1031-1039, 2018.

ASKIM, Jon R.; MAHMOUDI, Morteza; SUSLICK, Kenneth S. Optical sensor arrays for chemical sensing: the optoelectronic nose. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 22, p. 8649-8682, 2013.

AVELINO, Karen YPS et al. Metal-polymer hybrid nanomaterial for impedimetric detection of human papillomavirus in cervical specimens. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, p. 113249, 2020.

AZIMZADEH, Mostafa et al. Detecção precoce da doença de Alzheimer usando um biosensor à base de óxido de grafeno eletroquimicamente reduzido e nanofiosde ouro para quantificação do microRNA-137 sérico. **Avanços do RSC**, v. 7, n. 88, p. 55709-55719, 2017.

BADHULIKA, Sushmee et al. Graphene hybrids: synthesis strategies and applications in sensors and sensitized solar cells. **Frontiers in chemistry**, v. 3, p. 38, 2015.

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

BANSAL, Anshuma; SINGH, Mini P.; RAI, Bhavana. Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 6, n. 2, p. 84, 2016.

BAO, Hongqian et al. Chitosan-functionalized graphene oxide as a nanocarrier for drug and gene delivery. **Small**, v. 7, n. 11, p. 1569-1578, 2011.

BARTOSIK, Martin; HRSTKA, Roman. Bioelectrochemistry of nucleic acids for early cancer diagnostics—analysis of DNA methylation and detection of microRNAs. **Reviews in Analytical Chemistry**, v. 36, n. 1, 2017.

BARZON, Luisa et al. Human papillomavirus genotyping by 454 next generation sequencing technology. **Journal of Clinical Virology**, v. 52, n. 2, p. 93-97, 2011.

BELKIN, Shimshon; GU, Man Bock (Ed.). **Whole Cell Sensing System II: Applications**. Springer Science & Business Media, 2010.

BERDAT, Daniel et al. DNA biosensor using fluorescence microscopy and impedance spectroscopy. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 118, n. 1-2, p. 53-59, 2006.

BERNARD, Hans-Ulrich et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70-79, 2010.

BHATTARAI, Pravin; HAMEED, Sadaf. Basics of Biosensors and Nanobiosensors. **Nanobiosensors: From Design to Applications**, p. 1-22, 2020.

BOHRN, U. et al. Monitoring of irritant gas using a whole-cell-based sensor system. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 175, p. 208-217, 2012.

- BONANNI, Alessandra; PUMERA, Martin. Graphene platform for hairpin-DNA-based impedimetric genosensing. **ACS nano**, v. 5, n. 3, p. 2356-2361, 2011.
- BORGmann, Sabine et al. Biosensores amperométricos. **Avanços em Ciência e Engenharia Eletroquímica**, v. 2, 2011.
- BOROLE, Dinesh D. et al. Conducting polymers: an emerging field of biosensors. **Designed monomers and polymers**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2006.
- BOSCH, F. Xavier et al. Controle abrangente de infecções por papilomavírus humano e doenças relacionadas. **Vacina**, v. 31, p. H1-H31, 2013.
- BOUJAKHROUT, Abderrahmane et al. Decorating graphene oxide/nanogold with dextran-based polymer brushes for the construction of ultrasensitive electrochemical enzyme biosensors. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 17, p. 3518-3524, 2015.
- BOUSSICAULT, Fabien; ROBERT, Marc. Electron transfer in DNA and in DNA-related biological processes. Electrochemical insights. **Chemical reviews**, v. 108, n. 7, p. 2622-2645, 2008.
- BRAVO, Ignacio G.; DE SANJOSÉ, Silvia; GOTTSCHLING, Marc. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. **Trends in microbiology**, v. 18, n. 10, p. 432-438, 2010.
- BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- BRECKZO, Joanna et al. Three-Component EC-SPR Biosensor Based on Graphene Oxide, SiO<sub>2</sub> and Gold Nanoparticles in NADH Determination. **ECS Journal of Solid State Science and Technology**, v. 5, n. 8, p. M3018, 2016.
- BRENNAN, Linda M. et al. Preparation and testing of impedance-based fluidic biochips with RTgill-W1 cells for rapid evaluation of drinking water samples for toxicity. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 109, p. e53555, 2016.
- BRUNI L et al. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 17 June 2019.
- BUCUR, Bogdan et al. Avanços nos biosensores baseados em enzimas para detecção de pesticidas. **Biosensores**, v. 8, n. 2, p. 27, 2018.
- BURK, Robert D.; HARARI, Ariana; CHEN, Zogui. Human papillomavirus genome variants. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 232-243, 2013.
- BUTT, Hans-Jürgen; CAPPELLA, Brunero; KAPPL, Michael. Medições de força com o microscópio de força atômica: técnica, interpretação e aplicações. **Relatórios de ciências da superfície**, v. 59, n. 1-6, p. 1-152, 2005.

BUTTERWORTH, Adrian et al. SAM composition and electrode roughness affect performance of a DNA biosensor for antibiotic resistance. **Biosensors**, v. 9, n. 1, p. 22, 2019.

CAMPUZANO, Susana; YÁÑEZ-SEDEÑO, Paloma; PINGARRÓN, José M. Estratégias de diagnóstico com biosensores de afinidade eletroquímica usando nanomateriais de carbono como modificadores de eletrodos. **Diagnostics**, v. 7, n. 1, p. 2 de 2017.

CAPPELLA, Brunero. Princípios físicos das curvas força-distância por microscopia de força atômica. In: **Propriedades mecânicas de polímeros medidos através de curvas de força-distância AFM**. Springer, Cham, 2016. p. 3-66.

CARVALHO, Rosangela M. de; RATH, Susanne; KUBOTA, Lauro T. SPR: Uma nova ferramenta para biosensores. **Quimica Nova**, v. 26, n. 1, p. 97-104, 2003.

CASUSO, Ignacio; RICO, Felix; SCHEURING, Simon. AFM biológico: de onde viemos - onde estamos - para onde podemos ir. **Journal of Molecular Recognition**, v. 24, n. 3, p. 406-413, 2011.

CHAMORRO-GARCIA, Alejandro; MERKOÇI, Arben. Nanobiosensors in diagnostics. **Nanobiomedicine**, v. 3, p. 1849543516663574, 2016.

CHANG, B. Y.; PARK, S. M. Electrochemical impedance spectroscopy. **Annual review of analytical chemistry**, v. 3, p. 207–229, 2010.

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

CHEN, Chao et al. Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review. **Rsc Advances**, v. 3, n. 14, p. 4473-4491, 2013.

CHEN, Mei et al. An electrochemical DNA biosensor based on nitrogen-doped graphene/Au nanoparticles for human multidrug resistance gene detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 684-691, 2016.

CHEN, Mei et al. A sensitive electrochemical DNA biosensor based on three-dimensional nitrogen-doped graphene and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 239, p. 421-429, 2017.

CHEN, Qian; MA, Liang; WANG, Jinlan. Making graphene nanoribbons: a theoretical exploration. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 6, n. 3, p. 243-254, 2016.

CHEN, Zogui; DE FREITAS, Luciana Bueno; BURK, Robert D. Evolution and classification of oncogenic human papillomavirus types and variants associated with cervical cancer. In: **Cervical Cancer**. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 3-26.

CHEN, Zigui et al. Classification and evolution of human papillomavirus genome variants: Alpha-5 (HPV26, 51, 69, 82), Alpha-6 (HPV30, 53, 56, 66), Alpha-11 (HPV34, 73), Alpha-13 (HPV54) and Alpha-3 (HPV61). **Virology**, v. 516, p. 86-101, 2018.

CINTI, Stefano et al. Efforts, Challenges, and Future Perspectives of Graphene-Based (Bio) sensors for Biomedical Applications. In: **Graphene Bioelectronics**. Elsevier, 2018. p. 133-150.

COMBES, Jean-Damien; FRANCESCHI, Silvia. Human papillomavirus genome variants and head and neck cancers: a perspective. **Infectious agents and cancer**, v. 13, n. 1, p. 13, 2018.

CONROY, Paul J. et al. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2009. p. 10-26.

COOPER, Matthew A. et al. Direct and sensitive detection of a human virus by rupture event scanning. **Nature biotechnology**, v. 19, n. 9, p. 833-837, 2001.

CÓRCOLES, Emma P.; BOUTELLE, Martyn G. **Biosensors and invasive monitoring in clinical applications**. Springer International Publishing, 2013.

CÓRDOBA-TORRES, Pedro; MESQUITA, Thiago J.; NOGUEIRA, Ricardo P. Relationship between the origin of constant-phase element behavior in electrochemical impedance spectroscopy and electrode surface structure. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 8, p. 4136-4147, 2015.

COSER, Janaina et al. Human papillomavirus detection and typing using anested-PCR-RFLP assay. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15,n. 5, p. 467-472, 2011.

COSTA, Telma Maria Lubambo et al. Papilomavírus humano e fatores de risco para adenocarcinoma cervical no estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 19, n. 3, p. 641-649, 2019.

DAMOS, Flávio Santos; MENDES, Renata Kelly; Kubota, Lauro Tatsuo. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio) sensores. **Química Nova** , v. 27, n. 6,p. 970-979, 2004.

DA SILVA, Maria Aparecida et al. Fatores que, na Visão da Mulher, Interferem no Diagnóstico Precoce do Câncer do Colo do Útero. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 64, n. 1, p. 99-106, 2018.

DE CARVALHO, Karine Faria; COSTA, Liliane Marinho Ottoni; FRANÇA, Rafaela Ferreira. A relação entre HPV e Câncer de Colo de Útero: um panorama a partir da produção bibliográfica da área. 2019.

DE LA ESCOSURA-MUÑIZ, Alfredo et al. Magnetic Bead/Gold Nanoparticle Double-Labeled Primers for Electrochemical Detection of Isothermal Amplified Leishmania DNA. **Small**, v. 12, n. 2, p. 205-213, 2016.

DE MARTEL, Catherine et al. Carga mundial de câncer atribuível ao HPV por local, país e tipo de HPV. **Revista Internacional de Câncer**, v. 141, n. 4, p. 664-670, 2017.

DE VILLIERS, Ethel-Michele et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

DING, Jiawang; QIN, Wei. Potentiometric sensing of nuclease activities and oxidative damage of single-stranded DNA using a polycation-sensitive membrane electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 47, p. 559-565, 2013.

DONAHUE, Amber C.; ALBITAR, Maher. Antibodies in biosensing. In: **Recognition Receptors in Biosensors**. Springer, New York, NY, 2010. p. 221-248.

DO NASCIMENTO, N. M. et al. Label-free piezoelectric biosensor for prognosis and diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 90, p. 166-173, 2017.

DOS SANTOS, Marcelle Fonseca Seixas Miranda; FONSECA, Márjorie Gonçalves. ESTUDO COMPARATIVO DAS TÉCNICAS DE PCR E CAPTURA HÍBRIDA PARA O DIAGNÓSTICO DO HPV: REVISÃO DE LITERATURA. **Revista Atualiza Saúde**, p. 59.

DOS SANTOS SILVA, Quele et al. Otimização de Biosensores em Estudos Eletroquímicos. **Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes-SEMPESq**, n. 18, 2018.

D'ORAZIO, Paul. Biosensors in clinical chemistry—2011 update. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 19-20, p. 1749-1761, 2011.

DU, Dan et al. Functionalized graphene oxide as a nanocarrier in a multienzyme labeling amplification strategy for ultrasensitive electrochemical immunoassay of phosphorylated p53 (S392). **Analytical chemistry**, v. 83, n. 3, p. 746-752, 2011.

DUFRÊNE, Yves F. et al. Imagem multiparamétrica de sistemas biológicos por AFM baseado em curva força-distância. **Métodos da natureza**, v. 10, n. 9, p. 847-854, 2013.

DUPONT-FILLIARD, A. et al. Biotin/avidin system for the generation of fully renewable DNA sensor based on biotinylated polypyrrole film. **Analytica Chimica Acta**, v. 515, n. 2, p. 271-277, 2004.

DZYADEVYCH, S. V. et al. Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. **Irbm**, v. 29, n. 2-3, p. 171-180, 2008.

DZYADEVYCH, S.; JAFFREZIC-RENAULT, N. Conductometric biosensors. In: **Biological Identification**. Woodhead Publishing, 2014. p. 153-193.

ENSAFI, Ali A. An introduction to sensors and biosensors. In: **Electrochemical Biosensors**. Elsevier, 2019. p. 1-10.

FENG, Lingyan et al. A graphene functionalized electrochemical aptasensor for selective label-free detection of cancer cells. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 2930-2937, 2011.

FERAPONTOVA, Elena E. Hybridization biosensors relying on electrical properties of nucleic acids. **Electroanalysis**, v. 29, n. 1, p. 6-13, 2017.

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

FERRIER, David C.; SHAVER, Michael P.; HANDS, Philip JW. Micro-and nano-structure based oligonucleotide sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 798-810, 2015.

FERREIRA, Antonio Aparecido Pupim; YAMANAKA, Hideko. Atomic force microscopy applied to immunoassays. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2006.

FERRARO, Cíntia Tereza Lima et al. Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 451-459, 2011.

FOTIADIS, Dimitrios. Atomic force microscopy for the study of membrane proteins. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 510-515, 2012.

FOWLER, Jeremy M. et al. Recent developments in electrochemical immunoassays and immunosensors. In: **Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications**. Academic press, 2008. p. 115-143.

FREDERIX, PLTM et al. Microscopia de força atômica de amostras biológicas. **Boletim da MRS**, v. 29, n. 7, p. 449-455, 2004.

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

GARCIA, Ricardo; PEREZ, Ruben. Métodos dinâmicos de microscopia de força atômica. **Relatórios de ciências da superfície**, v. 47, n. 6-8, p. 197-301, 2002.

GENG, Ping et al. Self-assembled monolayers-based immunosensor for detection of Escherichia coli using electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 14, p. 4663-4668, 2008.

GUPTA, A.; AKIN, D.; BASHIR, Rashid. Single virus particle mass detection using microresonators with nanoscale thickness. **Applied Physics Letters**, v. 84, n. 11, p. 1976-1978, 2004.

GUPTA, Niharika et al. Cell-based biosensors: Recent trends, challenges and future perspectives. **Biosensors and Bioelectronics**, p. 111435, 2019.

GUPTA, Vinod Kumar et al. A novel impedimetric biosensor based on graphene oxide/gold nanoplateform for detection of DNA arrays. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 188, p. 1201-1211, 2013.

GURGEL, Lucineide Coqueiro et al. Percepção de mulheres sobre o exame de prevenção de colo de útero Papanicolaou: Uma Revisão Integrativa da Literatura/Perception of women on uterine cervix prevention Papanicolaou: An Integrative Review of Literature. **ID on line REVISTA DE PSICOLOGIA**, v. 13, n. 46, p. 434-445, 2019.

GÜRSU, Hürmüs; GENÇTEN, Metin; ŞAHİN, Yücel. One-step electrochemical preparation of graphene-coated pencil graphite electrodes by cyclic voltammetry and their application in vanadium redox batteries. **Electrochimica Acta**, v. 243, p. 239-249, 2017.

GURSU, Hurmus; GENCTEN, Metin; SAHIN, Yucel. Preparation of sulphur-doped graphene-based electrodes by cyclic voltammetry: a potential application for vanadium redox flow battery. **Int. J. Electrochem. Sci.**, v. 13, p. 875-885, 2018.

GRUHL, Friederike J.; RAPP, Bastian E.; LÄNGE, Kerstin. Biosensors for diagnostic applications. In: **Molecular Diagnostics**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 115-148.

HAMMOND, Jules L. et al. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. **Essays in biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 69-80, 2016.

HASSEN, Walid Mohamed et al. Um sensor de DNA impedimétrico baseado emnanopartículas magnéticas funcionalizadas para detecção de HIV e HBV. **Sensores e atuadores B: Chemical**, v. 134, n. 2, p. 755-760, 2008.

HE, Jie et al. The effects of different side groups on the properties of polythiophene. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 989-993, 2007.

HODEL, Adrian W. et al. Atomic force microscopy of membrane pore formation by cholesterol dependent cytolysins. **Current opinion in structural biology**, v. 39, p. 8-15, 2016.

HOLFORD, Timothy RJ; DAVIS, Frank; HIGSON, Séamus PJ. Recent trends in antibody based sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 34, n. 1, p. 12-24, 2012.

HOMOLA, Jiří. Present and future of surface plasmon resonance biosensors. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 377, n. 3, p. 528-539, 2003.

HU, Kesong et al. Nanocompósitos de grafeno-polímero para aplicações estruturais e funcionais. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 11, p. 1934-1972, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2020. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2020.

INSINGA, Ralph P. et al. Incidência, duração e reaparecimento de infecções por vírus do colo do útero em mulheres jovens. **Biomarcadores de Prevenção e Epidemiologia do Câncer**, v. 19, n. 6, p. 1585-1594, 2010.

JACOBS, Michael et al. Antibody-conjugated gold nanoparticle-based immunosensor for ultra-sensitive detection of troponin-T. **Journal of laboratory automation**, v. 19, n. 6, p. 546-554, 2014.

JAIN, Ankur; GOODSON, Kenneth E. Thermal microdevices for biological and biomedical applications. **Journal of Thermal Biology**, v. 36, n. 4, p. 209-218, 2011.

JARA-PALACIOS, M. José et al. Cyclic voltammetry to evaluate the antioxidant potential in winemaking by-products. **Talanta**, v. 165, p. 211-215, 2017.

JI, Daizong et al. Smartphone-based cyclic voltammetry system with graphene modified screen printed electrodes for glucose detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 98, p. 449-456, 2017.

JUSTINO, Celine IL et al. Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 68, p. 2-17, 2015.

KAUR, Hardeep et al. Biosensors: Classification, Fundamental Characterization and New Trends: A Review. **International Journal of Health Sciences and Research**, v. 8, n. 6, p. 315-333, 2018.

KAWASAKI, Hideya et al. ph-Dependent synthesis of pepsin-mediated gold nanoclusters with blue green and red fluorescent emission. **Advanced Functional Materials**, v. 21, n. 18, p. 3508-3515, 2011.

KE, Hongyang et al. A femtomolar level 17 $\beta$ -estradiol electrochemical aptasensor constructed on hierachical dendritic gold modified boron-doped diamond electrode. **Electrochimica Acta**, v. 137, p. 146-153, 2014.

KEKEDY-NAGY, Laszlo; FERAPONTOVA, Elena E.; BRAND, Izabella. Submolecular structure and orientation of oligonucleotide duplexes tethered to gold electrodes probed by infrared reflection absorption spectroscopy: effect of

the electrode potentials. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 121, n. 7, p. 1552-1565, 2017.

KERMAN, Kagan; KOBAYASHI, Masaaki; TAMIYA, Eiichi. Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology. **Measurement Science and Technology**, v. 15, n. 2, p. R1, 2003.

KIM, Hyun-Chul et al. Functional polythiophene bearing hydroxyethyl groups and their derivatives. **Macromolecular research**, v. 14, n. 2, p. 173-178, 2006.

KIM, Soung Min. Human papilloma virus in oral cancer. **Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 42, n. 6, p. 327-336, 2016.

KIM, Yoon-Jin et al. Electrochemical aptasensor for tetracycline detection. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 33, n. 1, p. 31, 2010.

KING, William P. et al. Atomic force microscope cantilevers for combined thermomechanical data writing and reading. **Applied Physics Letters**, v. 78, n. 9, p. 1300-1302, 2001.

KOSHIOL, Jill et al. Common genetic variation in TP53 and risk of human papillomavirus persistence and progression to CIN3/cancer revisited. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 18, n. 5, p. 1631-1637, 2009.

KOSYNKIN, Dmitry V. et al. Longitudinal unzipping of carbon nanotubes to form graphene nanoribbons. **Nature**, v. 458, n. 7240, p. 872-876, 2009.

KOUSHIK, Anita et al. The p53 codon 72 polymorphism and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Cancer detection and prevention**, v. 29, n. 4, p. 307-316, 2005.

KRISHNAN, Siva Kumar et al. A review on graphene-based nanocomposites for electrochemical and fluorescent biosensors. **RSC advances**, v. 9, n. 16, p. 8778-8881, 2019.

KRUSS, Sebastian et al. Carbon nanotubes as optical biomedical sensors. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 15, p. 1933-1950, 2013.

KUMAR, Sandeep et al. Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 70, p. 498-503, 2015.

KURBANOGLU, S. et al. Advances in electrochemical DNA biosensors and their interaction mechanism with pharmaceuticals. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 775, p. 8-26, 2016.

LABUDA, Jan et al. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n. 5, p. 1161-1187, 2010.

LECA-BOUVIER, Béatrice D.; BLUM, Loïc J. Enzyme for biosensing applications. In: **Recognition receptors in biosensors**. Springer, New York, NY, 2010. p. 177-220.

LEE, Jeong-O. et al. Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 390, n. 4, p. 1023-1032, 2008.

LEE, Joo-Woon et al. Carboxylic acid-functionalized conductive polypyrrole as a bioactive platform for cell adhesion. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 6, p. 1692-1695, 2006.

LEE, Seunghyun et al. Bi nanowire-based thermal biosensor for the detection of salivary cortisol using the Thomson effect. **Applied Physics Letters**, v. 103, n. 14, p. 143114, 2013.

LEE, Wonhee; LEE, Jinyoung; KOH, Joonyoung. Development and applications of chip calorimeters as novel biosensors. **Nanobiosensors in Disease Diagnosis**, v. 1, p. 17-29, 2012.

LETO, Maria das Graças Pereira et al. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2011.

LI, Bo et al. Inkjet printed chemical sensor array based on polythiophene conductive polymers. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 123, n. 2, p. 651-660, 2007.

LI, Dong et al. An amperometric biosensor based on covalent immobilization of ascorbate oxidase on biocompatible and low-toxic poly (thiophene-3-acetic acid) matrix. **Chinese Journal of Polymer Science**, v. 30, n. 5, p. 705-718, 2012.

LI, Jianping; LI, Shuhuai; YANG, Catherine F. Electrochemical biosensors for cancer biomarker detection. **Electroanalysis**, v. 24, n. 12, p. 2213-2229, 2012.

LI, Ni et al. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. **International journal of cancer**, v. 128, n. 4, p. 927-935, 2011.

LIMA, Pedro Henrique Correia et al. Polímeros Condutores com Propriedades Eletrocrônicas: Uma Revisão. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 13, n. 1, 2018.

LING, Z. H. O. U. et al. Application of biosensor surface immobilization methods for aptamer. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 39, n. 3, p. 432-438, 2011.

LIU, Ailin et al. Development of electrochemical DNA biosensors. **TrAC Trends inAnalytical Chemistry**, v. 37, p. 101-111, 2012.

LIU, Mengqin; LUO, Chunhua; PENG, Hui. Electrochemical DNA sensor based on methylene blue functionalized polythiophene as a hybridization indicator. **Talanta**, v. 88, p. 216-221, 2012.

LIU, Tingyu et al. PD-L1 expression and CD8+ infiltration shows heterogeneity in juvenile recurrent respiratory papillomatosis. **International journal of pediatric otorhinolaryngology**, v. 95, p. 133-138, 2017.

LIU, Wei; SPERANZA, Giorgio. Functionalization of Carbon Nanomaterials for Biomedical Applications. **C—Journal of Carbon Research**, v. 5, n. 4, p. 72, 2019.

LIU, Yuxin; Dong, Xiaochen; Chen, Peng. Sensores biológicos e químicos baseados em materiais de grafeno. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 6, p. 2283-2307, 2012.

LOGUERCIO, Lara Fernandes. Biosensor enzimático eletroquímico para detecção do pesticida carbaril utilizando filme funcional de polipirrol. 2019.

LU, Jiong et al. One-pot synthesis of fluorescent carbon nanoribbons, nanoparticles, and graphene by the exfoliation of graphite in ionic liquids. **ACS nano**, v. 3, n. 8, p. 2367-2375, 2009.

LU, Qing et al. Direct electrochemistry-based hydrogen peroxide biosensor formed from single-layer graphene nanoplatelet–enzyme composite film. **Talanta**, v. 82, n. 4, p. 1344-1348, 2010.

LU, Xiaohui et al. Detection of mutant genes with different types of biosensor methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, p. 115860, 2020.

LUU, Hung N. et al. Comparing the performance of Hybrid Capture II and polymerase chain reaction (PCR) for the identification of cervical dysplasia in the screening and diagnostic settings. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, v. 7, p. CMO. S12811, 2013.

MAHMOODI, Pegah et al. Early detection of cervical cancer based on high-risk HPV DNA-based genosensors: A systematic review. **Biofactors**, v. 45, n. 2, p. 101-117, 2019.

MALHOTRA, Shagun et al. Biosensors: principle, types and applications. **Int. J. Adv. Res. Innov. Ideas Educ**, v. 3, n. 2, p. 3639-3644, 2017.

MANDISHORA, RS Dube et al. Diversidade genotípica do papilomavírus humano anogenital em mulheres atendidas no rastreamento do câncer do colo do útero em Harare, Zimbábue. **J. Med. Virol**, 2017.

MASKOW, Thomas et al. Potentials and limitations of miniaturized calorimeters for bioprocess monitoring. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 1, p. 55, 2011.

MASKOW, Thomas et al. Rapid analysis of bacterial contamination of tap water using isothermal calorimetry. **Thermochimica acta**, v. 543, p. 273-280, 2012.

MATIVETSKY, Jeffrey M.; LOO, Yueh-Lin; SAMORÌ, Paolo. Elucidating the nanoscale origins of organic electronic function by conductive atomic force microscopy. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 2, n. 17, p. 3118-3128, 2014.

MATSISHIN, M. J. et al. SPR detection and discrimination of the oligonucleotides related to the normal and the hybrid bcr-abl genes by two stringency control strategies. **Nanoscale research letters**, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2016.

MCBRIDE, Alison A. Oncogenic human papillomaviruses. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1732, p. 20160273, 2017.

MCKENNA, Milena et al. Click chemistry as an immobilization method to improve oligonucleotide hybridization efficiency for nucleic acid assays. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 236, p. 286-293, 2016.

MEDEIROS, Eliton Souto et al. Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 1: Introdução aos polímeros condutores. **Embrapa Instrumentação-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2012.

MEHROTRA, Parikha. Biosensors and their applications—A review. **Journal of oral biology and craniofacial research**, v. 6, n. 2, p. 153-159, 2016.

MELAMED, Sahar; ELAD, Tal; BELKIN, Shimshon. Microbial sensor cell arrays. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 2-8, 2012.

MELO, Rodrigo de S.; MAIA, Fernanda TM. Avaliação do Uso de Circuitos Equivalentes na Análise por Impedância Eletroquímica de Revestimentos Anticorrosivos. **Revista de Engenharias da Faculdade Salesiana**, n. 02, p. 2-9, 2016.

MOHAMMED, Shamayel et al. Cancer vaccines: past, present, and future. **Advances in anatomic pathology**, v. 23, n. 3, p. 180-191, 2016.

MOHAMED, Mona A. et al. Novel MWCNTs/graphene oxide/pyrogallol composite with enhanced sensitivity for biosensing applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 1034-1041, 2017.

MOLINA, J.; CASES, F.; MORETTO, L. M. Graphene-based materials for the electrochemical determination of hazardous ions. **Analytica chimica acta**, v. 946, p. 9-39, 2016.

MONOŠÍK, Rastislav; STREĎANSKÝ, Miroslav; ŠTURDÍK, Ernest. Classificação de biosensores, caracterização e novas tendências. **Acta Chimica Slovaca**, v. 5, n. 1, p. 109-120, 2012.

MOREAU, Alberto Luís Dario et al. Microscopia de força atômica em materiais biológicos= biossensores e nanoferramentas. 2011.

MORSHED, Kamal et al. Human papillomavirus (HPV)–structure, epidemiology and pathogenesis. **Otolaryngologia Polska**, v. 68, n. 5, p. 213-219, 2014.

MOTSHAKERI, Mahsa; PHILLIPS, Anthony RJ; KILMARTIN, Paul A. Application of cyclic voltammetry to analyse uric acid and reducing agents in commercial milks. **Food chemistry**, v. 293, p. 23-31, 2019.

MOURA, Escolástica Rejane Ferreira et al. Panorama clínico, terapêutico e sexual de mulheres portadoras de Papiloma Vírus Humano e/ou Neoplasia Intraepitelial Cervical. **Revista de Enfermagem Referência**, n. 3, p. 113-120, 2014.

MÜLLER, Daniel J.; ENGEL, Andreas. Atomic force microscopy and spectroscopy of native membrane proteins. **Nature protocols**, v. 2, n. 9, p. 2191, 2007.

MULLER, Patricia AJ; VOUSDEN, Karen H. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. **Cancer cell**, v. 25, n. 3, p. 304-317, 2014.

NAIR, Sarita S.; MISHRA, Sujeeet K.; KUMAR, Devendra. Recent progress in conductive polymeric materials for biomedical applications. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 30, n. 12, p. 2932-2953, 2019.

NARANG, Jagriti et al. Genosensor imedimétrico para detecção ultratrace do DNA do vírus da hepatite B em amostras de pacientes assistidas por zeólitos e nanocompósitos MWCNT. **Biosensores e Bioeletrônica**, v. 86, p. 566-574, 2016.

NICHO, M. E. et al. Synthesis of derivatives of polythiophene and their application in an electrochromic device. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, v. 82, n. 1-2, p. 105-118, 2004.

NIEN, Po-Chin; CHEN, Po-Yen; HO, Kuo-Chuan. Fabricating an amperometric cholesterol biosensor by a covalent linkage between poly (3-thiopheneacetic acid) and cholesterol oxidase. **Sensors**, v. 9, n. 3, p. 1794-1806, 2009.

NIMSE, Satish Balasaheb et al. Immobilization techniques for microarray: challenges and applications. **Sensors**, v. 14, n. 12, p. 22208-22229, 2014.

NOMNGONGO, Philiswa N. et al. Determination of selected persistent organic pollutants in wastewater from landfill leachates, using an amperometric biosensor. **Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C**, v. 50, p. 252-261, 2012.

NUOVO, Gerard J. et al. Novos biomarcadores da infecção pelo papilomavírus humano na neoplasia intraepitelial cervical aguda. **Anais da patologia diagnóstica**, v. 36, p. 21-27, 2018.

- OLIVEIRA, Danielle A. et al. Carbon nanomaterial as platform for electrochemical genosensor: A system for the diagnosis of the hepatitis C in real sample. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 844, p. 6-13, 2019.
- OLIVEIRA, Juliano E. et al. Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 3: Biosensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 8, n. 1, 2013.
- PACHECO, Wagner Felipe et al. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.
- PAJKOSSY, Tamás; JURCZAKOWSKI, Rafal. Electrochemical impedance spectroscopy in interfacial studies. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 1, n. 1, p. 53-58, 2017.
- PANIS, Carolina et al. Revisão crítica da mortalidade por câncer usando registros hospitalares e anos potenciais de vida perdidos. **Einstein (São Paulo)**, v. 16, n. 1, p. -, 2018.
- PARK, Sungjin; RUOFF, Rodney S. Chemical methods for the production of graphenes. **Nature nanotechnology**, v. 4, n. 4, p. 217, 2009.
- PARMIN, nem Azizah; Hashim, Uda; GOPINATH, Subash CB. Projeto de sondada região do genoma E6 do Papillomavírus humano 16 para aplicações de detecção. **Revista internacional de macromoléculas biológicas**, v. 107, p. 1738-1746, 2018.
- PATIL, Avinash J. et al. Aqueous stabilization and self-assembly of graphene sheets into layered bio-nanocomposites using DNA. **Advanced Materials**, v. 21, n. 31, p. 3159-3164, 2009.
- PENG, Hui et al. Synthesis of a functionalized polythiophene as an active substrate for a label-free electrochemical genosensor. **Polymer**, v. 48, n. 12, p. 3413-3419, 2007.
- PEREIRA, Éven Aline; DE CASTRO, Kelen Cristina Estavanate. Avaliação do conhecimento de estudantes de um centro universitário do interior de Minas Gerais sobre o papilomavírus humano. **Revista Brasileira de Saúde Review**, v.3, n. 2, p. 2058-2073, 2020.
- PERUMAL, Veeradasan; HASHIM, Uda. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2014.
- PINHEIRO, Mironeide Matos et al. HPV e o desenvolvimento de neoplasias: uma revisão integrativa de literatura. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 1, 2013.
- PINTO, Erveton Pinheiro; RAMOS, Glenda Quaresma; DA FONSECA FILHO, Henrique Duarte. O Microscópio de Força Atômica (AFM): importante ferramenta

no estudo da morfologia de superfícies na escala nanométrica. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 3, n. 2, p. 41-50, 2015.

POHANKA, Miroslav; SKLÁDAL, Petr. Electrochemical biosensors--principles and applications. **Journal of Applied Biomedicine (De Gruyter Open)**, v. 6, n. 2, 2008.

POHANKA, M. The Piezoelectric Biosensors: Principles and Applications. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 12, p. 496-506, 2017.

POVEDANO, Eloy et al. Decoration of reduced graphene oxide with rhodium nanoparticles for the design of a sensitive electrochemical enzyme biosensor for 17 $\beta$ -estradiol. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 343-351, 2017.

RAHMAN, Md et al. Sensores eletroquímicos de hibridação de DNA baseados em polímeros condutores. **Sensores**, v. 15, n. 2, p. 3801-3829, 2015.

RAO, C. emsp14N emsp14R et al. Grafeno: o novo nanomaterial bidimensional. **Edição Internacional da Angewandte Chemie**, v. 48, n. 42, p. 7752-7777, 2009.

RASHEED, P. Abdul; SANDHYARANI, N. Graphene-DNA electrochemical sensor for the sensitive detection of BRCA1 gene. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 204, p. 777-782, 2014.

RASHEED, P. Abdul et al. Reduced graphene oxide-yttria nanocomposite modified electrode for enhancing the sensitivity of electrochemical genosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 83, p. 361-367, 2016.

RASHEED, P. Abdul; SANDHYARANI, N. Carbon nanostructures as immobilization platform for DNA: a review on current progress in electrochemical DNA sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 97, p. 226-237, 2017.

RASHID, Jahwarhar Izuan Abdul; YUSOF, Nor Azah. The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review. **Sensing and bio-sensing research**, v. 16, p. 19-31, 2017.

RAVAN, Hadi et al. Strategies for optimizing DNA hybridization on surfaces. **Analytical biochemistry**, v. 444, p. 41-46, 2014.

RIBEIRO, D. V.; SOUZA, C. A. C.; ABRANTES, J. C. C. Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) to monitoring the corrosion of reinforced concrete. **Revista IBRACON de Estruturas e Materiais**, v. 8, n. 4, p. 529-546, 2015.

RICCI, Francesco; ADORNETTO, Gianluca; PALLESCHI, Giuseppe. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 74-83, 2012.

RODRIGUES, Adriana Dalpicolli et al. Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 6, p. 457-462, 2009.

RONKAINEN, Niina J.; HALSALL, H. Brian; HEINEMAN, William R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747-1763, 2010.

ROSSI, Liane M. et al. Fluorescent silica nanospheres for digital counting bioassay of the breast cancer marker HER2/nue. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 10, p. 1900-1906, 2006.

SALIMI, Abdollah; KAVOSI, Begard; NAVAEE, Aso. Amine-functionalized graphene as an effective electrochemical platform toward easily miRNA hybridization detection. **Measurement**, v. 143, p. 191-198, 2019.

SALOUTI, Mojtaba; DERAKHSHAN, Fateme Khadivi. Biosensors and Nanobiosensors in Environmental Applications. In: **Biogenic Nano-Particles and their Use in Agro-ecosystems**. Springer, Singapore, 2020. p. 515-591.

SAMANTA, Debasis; SARKAR, Amitabha. Immobilization of bio-macromolecules on self-assembled monolayers: methods and sensor applications. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 5, p. 2567-2592, 2011.

SANDEEP KUMAR, V.; VENKATESH, A. Avanços em sensores e dispositivos baseados em grafeno. **J. Nanomed. Nanotecol**, v. 4, p. e127, 2013.

SASSOLAS, Audrey; BLUM, Loïc J.; LECA-BOUVIER, Béatrice D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 3, p. 489-511, 2012.

SAYLAN, Yeneren et al. Um método alternativo de diagnóstico médico: biosensores para detecção de vírus. **Biosensores**, v. 9, n. 2, p. 65, 2019.

SCHEURING, Simon; DUFRÊNE, Yves F. Microscopia de força atômica: investigando a organização espacial, interações e elasticidade de envelopes de células microbianas em resolução molecular. **Microbiologia molecular**, v. 75, n. 6, p. 1327-1336, 2010.

SCHIFFMAN, Mark et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. **Virology**, v. 337, n. 1, p. 76-84, 2005.

SERRANO, Beatriz et al. Epidemiology and burden of HPV-related disease. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 47, p. 14-26, 2018.

SHAHROKHIAN, Saeed; SALIMIAN, Razieh. Ultrasensitive detection of cancer biomarkers using conducting polymer/electrochemically reduced graphene oxide-based biosensor: Application toward BRCA1 sensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 266, p. 160-169, 2018.

SHANKARAN, Dhesingh Ravi; GOBI, K. Vengatajalabathy; MIURA, Norio. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 121, n. 1, p. 158-177, 2007.

SHAO, Yuyan et al. Graphene based electrochemical sensors and biosensors: a review. **Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis**, v. 22, n. 10, p. 1027-1036, 2010.

SILVA, Nelson Alberto Fraude da. Desenvolvimento de diversos biosensores para determinação de acrilamida baseados em células inteiras de *Pseudomonas aeruginosa*: um estudo comparativo. 2016.

SILVESTRE, Cristina IC et al. Enzyme based assays in a sequential injection format: A review. **Analytica chimica acta**, v. 689, n. 2, p. 160-177, 2011.

SIMÃO, E. P. et al. Biosensor based on cysteine monolayer and monoclonal antibody for specific detection of aflatoxin b1 in rice. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 1040–1047, 2016.

SIMÃO, Estefani P. et al. Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection. **Talanta**, v. 208, p. 120338, 2020.

SINGHAL, Chaitali et al. Impedimetric genosensor for detection of hepatitis C virus (HCV1) DNA using viral probe on methylene blue doped silica nanoparticles. **International journal of biological macromolecules**, v. 98, p. 84-93, 2017.

SIQUEIRA, Juliana D. et al. Identification of novel human papillomavirus lineages and sublineages in HIV/HPV-coinfected pregnant women by next-generation sequencing. **Virology**, v. 493, p. 202-208, 2016.

SOHRABI, Nasrin et al. Noções básicas de biosensores de DNA e diagnóstico de câncer. **Células artificiais, nanomedicina e biotecnologia**, v. 44, n. 2, p. 654-663, 2016.

SONG, Hyun Seok et al. 3D hydrogel scaffold doped with 2D graphene materials for biosensors and bioelectronics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 187-200, 2017.

SONG, Shiping et al. Aptamer-based biosensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 2, p. 108-117, 2008.

SOUSA, Priscilla Tarsis Luso. Papiloma vírus humano: papel dos pais na adesão à vacina de alunas em uma escola na rede pública de ensino no município de São Luís—MA. 2018.

SRINIVASAN, Balaji; TUNG, Steve. Development and applications of portable biosensors. **Journal of laboratory automation**, v. 20, n. 4, p. 365-389, 2015.

STRUSS, Anjali Kumari; PASINI, Patrizia; DAUNERT, Sylvia. Biosensing systems based on genetically engineered whole cells. In: **Recognition Receptors in Biosensors**. Springer, New York, NY, 2010. p. 565-598.

TAN, Lei et al. A fluorescent turn-on detection scheme for  $\alpha$ -fetoprotein using quantum dots placed in a boronate-modified molecularly imprinted polymer with high affinity for glycoproteins. **Microchimica Acta**, v. 182, n. 15-16, p. 2615-2622, 2015.

TANG, Longhua et al. Preparation, structure, and electrochemical properties of reduced graphene sheet films. **Advanced Functional Materials**, v. 19, n. 17, p. 2782-2789, 2009.

TERSE-THAKOOR, Trupti; BADHULIKA, Sushmee; MULCHANDANI, Ashok. Graphene based biosensors for healthcare. **Journal of Materials Research**, v. 32, n. 15, p. 2905-2929, 2017.

TÓTH, Péter S. et al. Eletrossíntese e estudos comparativos de derivados de politiofeno funcionalizados com carboxil. **Electrochimica acta**, v. 56, n. 10, p. 3447-3453, 2011.

TOUHAMI, Ahmed. Biosensors and nanobiosensors: design and applications. **Nanomedicine**, v. 15, p. 374-403, 2014.

ULIANAS, Alizar et al. An electrochemical DNA microbiosensor based on succinimide-modified acrylic microspheres. **Sensors**, v. 12, n. 5, p. 5445-5460, 2012.

UNWIN, Patrick R.; GUÈLL, Aleix G.; ZHANG, Guohui. Nanoscale electrochemistry of sp<sub>2</sub> carbon materials: from graphite and graphene to carbon nanotubes. **Accounts of chemical research**, v. 49, n. 9, p. 2041-2048, 2016.

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

USHAA, S. M.; MADHAVILATHA, M.; RAO, G. Madhusudhan. Design and analysis of nanowire sensor array for prostate cancer detection. **International Journal of Nano and Biomaterials**, v. 3, n. 3, p. 239-255, 2011.

VASHIST, Sandeep Kumar; LUONG, John HT. Recent advances in electrochemical biosensing schemes using graphene and graphene-based nanocomposites. **Carbon**, v. 84, p. 519-550, 2015.

WAJID, Ahmed S. et al. Polymer-stabilized graphene dispersions at high concentrations in organic solvents for composite production. **Carbon**, v. 50, n. 2, p. 526-534, 2012.

WANG, Hsing-Ju; CHEN, Chih-Ping; JENG, Ru-Jong. Polythiophenes comprising conjugated pendants for polymer solar cells: a review. **Materials**, v. 7, n. 4, p. 2411-2439, 2014.

WANG, Jianxiu et al. Capture of p53 by electrodes modified with consensus DNA duplexes and amplified voltammetric detection using ferrocene-capped gold nanoparticle/streptavidin conjugates. **Analytical chemistry**, v. 80, n. 3, p. 769- 774, 2008.

WANG, Joseph. Electrochemical nucleic acid biosensors. **Analytica chimica acta**, v. 469, n. 1, p. 63-71, 2002.

WANG, Joseph. Electrochemical glucose biosensors. **Chemical reviews**, v. 108, n. 2, p. 814-825, 2008.

WANG, Sai et al. Aptasensor with expanded nucleotide using DNA nanotetrahedra for electrochemical detection of cancerous exosomes. **ACS nano**, v. 11, n. 4, p. 3943-3949, 2017.

WANG, Xu et al. Gold nanoparticle-catalyzed uranine reduction for signal amplification in fluorescent assays for melamine and aflatoxin B1. **Analyst**, v. 140, n. 21, p. 7305-7312, 2015.

WARD, AC et al. Identificação e caracterização de *Staphylococcus aureus* em eletrodos de carbono impressos em tela de baixo custo utilizando espectroscopia de impedância. **Biosensores e Bioeletrônica** , v. 110, p. 65-70, 2018.

WATSON, James D. **A dupla hélice: como descobri a estrutura do DNA**. Editora Schwarcz-Companhia das Letras, 2014.

WEN, Yangping et al. Electrosynthesis of poly (thiophene-3-acetic acid) film in ionic liquids for covalent immobilization of biologically active species. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 62, n. 8, p. 437-443, 2013.

WENDLAND, Eliana Marcia et al. POP-Brazil study protocol: a nationwide cross-sectional evaluation of the prevalence and genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in Brazil. **BMJ open**, v. 8, n. 6, p. e021170, 2018.

WENG, Chen-Hsun; HUANG, Chao-Jyun; LEE, Gwo-Bin. Screening of aptamers on microfluidic systems for clinical applications. **Sensors**, v. 12, n. 7, p. 9514- 9529, 2012.

WHITED, Allison M.; PARK, Paul S.-H. Microscopia de força atômica: uma ferramenta multifacetada para estudar proteínas da membrana e suas interações com ligantes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Biomembranes** , v. 1838, n. 1, p. 56-68, 2014.

XIAO, L. et al. Microelectrode array (MEA) as cell-based biosensors. **Cell-Based Biosensors. Principles and Applications**, p. 65-96, 2010.

XU, Biyan et al. An ultrasensitive DNA biosensor based on covalentimmobilization of probe DNA on fern leaf-like  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and chitosan Hybrid film using terephthalaldehyde as arm-linker. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 72,p. 175-181, 2015.

YAKOVLEVA, M.; BHAND, S.; DANIELSSON, B. The enzyme thermistor - A realistic biosensor concept. A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 766, p. 1-12, 2013.

YANG, Linlin et al. Single-walled carbon nanotubes–carboxyl-functionalized graphene oxide-based electrochemical DNA biosensor for thermolabile hemolysin gene detection. **Analytical Methods**, v. 7, n. 12, p. 5303-5310, 2015.

YANG, Penghao et al. Sandwich-type amperometric immunosensor for cancer biomarker based on signal amplification strategy of multiple enzyme-linked antibodies as probes modified with carbon nanotubes and concanavalin A. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 732, p. 38-45, 2014.

YETE, Subuhi; D'SOUZA, Wendy; SARANATH, Dhananjaya. High-risk human papillomavirus in oral cancer: clinical implications. **Oncology**, v. 94, n. 3, p. 133-141, 2018.

YI-XIAN, W. A. N. G. et al. Application of aptamer based biosensors for detection of pathogenic microorganisms. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 40, n. 4, p. 634-642, 2012.

YOO, Eun-Hyung; LEE, Soo-Youn. Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. **Sensors**, v. 10, n. 5, p. 4558-4576, 2010.

YOU, Xueqiu; PAK, James Jungho. Graphene-based field effect transistor enzymatic glucose biosensor using silk protein for enzyme immobilization and device substrate. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 202, p. 1357-1365, 2014.

ZARE, Hamid R.; SHEKARI, Zahra. Types of monitoring biosensor signals. In: **Electrochemical Biosensors**. Elsevier, 2019. p. 135-166.

ZHANG, Fengxiang; SRINIVASAN, M. P. Structure-related lower surface resistivity and faster doping of poly (thiophene-3-acetic acid-co-3-hexylthiophene)compared with poly (thiophene-3-acetic acid). **Materials Chemistry and Physics**,v. 112, n. 1, p. 223-225, 2008.

ZHANG, Lei et al. An impedimetric biosensor for the diagnosis of renal cell carcinoma based on the interaction between 3-aminophenyl boronic acid and sialic acid. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 92, p. 434-441, 2017.

- ZHANG, Xueji; JU, Huangxian; WANG, Joseph (Ed.). **Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications**. Academic Press, 2011.
- ZHANG, Yuyan; TADIGADAPA, Srinivas. Calorimetric biosensors with integrated microfluidic channels. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 12, p. 1733-1743, 2004.
- ZHANG, Yuzhong; JIANG, Wei. Decorating graphene sheets with gold nanoparticles for the detection of sequence-specific DNA. **Electrochimica Acta**, v. 71, p. 239-245, 2012.
- ZHANG, Zhao et al. Tryptamine functionalized reduced graphene oxide for label-free DNA impedimetric biosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 60, p. 161-166, 2014.
- ZHONG, Guang-Xian et al. Electrochemical biosensor for detection of BCR/ABL fusion gene based on isorhamnetin as hybridization indicator. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 204, p. 326-332, 2014.
- ZHOU, L. et al. Silver nanocluster based sensitivity amplification of a quartz crystal microbalance gene sensor. **Microchimica Acta**, v. 183, n. 2, p. 881-887, 2016.
- ZHOU, Lu et al. Um aptasensor fluorescente para detecção sensível de marcador tumoral com base no FRET de um QDs-AFP-AuNPs estruturados em sanduíche. **Talanta**, v. 197, p. 444-450, 2019.
- ZHU, Ying-Di et al. Fluorescent immunosensor based on CuS nanoparticles for sensitive detection of cancer biomarker. **Analyst**, v. 139, n. 3, p. 649-655, 2014.
- ZHU, Zhigang et al. A critical review of glucose biosensors based on carbon nanomaterials: carbon nanotubes and graphene. **Sensors**, v. 12, n. 5, p. 5996-6022, 2012.
- ŽIVCOVÁ, Zuzana Vlčková et al. Electrochemical impedance spectroscopy of polycrystalline boron doped diamond layers with hydrogen and oxygen terminated surface. **Diamond and Related Materials**, v. 55, p. 70-76, 2015.
- ZUCOLOTTO, Valtencir et al. Biosensor eletroquímico de DNA, processo para sua preparação e uso do mesmo. 2018.

**APÊNDICE A – IMPEDIMETRIC GENOSENSOR BASED ON GRAPHENE NANORIBBONS FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF ONCOGENICTYPES OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS**

**IMPEDIMETRIC GENOSENSOR BASED ON GRAPHENE NANORIBBONS FOR  
DETECTION AND IDENTIFICATION OF ONCOGENIC TYPES OF HUMAN  
PAPILLOMAVIRUS**

Raiza P.S. Lucena<sup>1</sup>, Isaac A.M. Frías<sup>1</sup>, Norma Lucena-Silva<sup>2</sup>, César A.S. Andrade <sup>1,3</sup>, Maria D. L. Oliveira <sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco,  
50670-901 Recife, PE, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação  
Oswaldo Cruz(FioCruz), 50670-420 Recife, PE, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-  
901 Recife, PE, Brazil.

\*To whom correspondence should be addressed:

Maria D.L. Oliveira, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife,  
PE, Brazil Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547  
E-mail: [m\\_danielly@yahoo.com.br](mailto:m_danielly@yahoo.com.br)

**Abstract**

BACKGROUND: Human Papillomavirus (HPV) infection affects the skin and mucosa, causing warts and papillomas, and when it reaches the genital regions, it is considered a sexually transmitted disease. Due to the lack of rapid and inexpensive methods available to identify the HPV serotypes, herein we report a nanodevice as an alternative to HPV identification. In this work, we developed an electrochemical genosensor for the detection and identification of different HPV genotypes. In view of this need, creating an impedimetric genosensor based on graphene nanofibers (GNR) to promote DNA probe immobilization was intended to recognize different HPV types. Cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS), and atomic force microscopy (AFM) were used to characterize the GNR-based genosensor. MY11 degenerate probe was used to develop recognition layer, a consensus genomic sequence generally employed in PCR amplification of a broad spectrum of HPV DNA types. RESULTS: Oncogenic subtypes of human papillomavirus were quickly detected and identified in the picogram range. GNR-based genosensor demonstrated a similar impedimetric response pattern of recognition for the HPV 51, 53 and 66 subtypes. The impedimetric responses indicate that the proposed sensor could detect HPV (types 16 and 18) in cervical specimens (cDNA samples) in the concentrations of 1 aM, 100 aM, 100 fM, 50 pM and 100 pM. The genosensor system presented a detection limit (LOD) for HPV 16 and HPV 18, with 5.20 aM and 2.49 aM, respectively. CONCLUSION: Therefore, the proposed genosensor platform can be considered a new tool for detecting and identifying HPV genomes.

*Keywords:* Biosensor electrochemistry; Graphene nanoribbons; HPV diagnostics.

## 1. Introduction

Human papillomavirus (HPV) is a sexually transmissible infection of high prevalence globally, causing several damages, identified as common lesions or genital warts in both men and women [1]. Actually are identified more than 200 types of HPV are classified as high risk and low oncogenic risk. HPV infection with high risk, may cause neoplasms or persist asymptomatic depending on the kind of virus, which can cause anogenital cancer and cervical cancer [2]. The incidence of HPV in the Brazilian population is a matter of health concern, having high prevalence among young people [3]. According to the National Cancer Institute (INCA), in Brazil are expected 16,590 new cervical cancer cases, with an estimated 12.6 cases per 100,000 women. The Northeast Region of Brazil is the second in many occurrences of cervical cancer.

In most cases, hosts of the human papillomavirus show no signs or symptoms, because the immune system fights the virus and regression is a naturally expected response. In cases where the pathogen persists, its genetic material is replicated within the host, causing cell damage that commonly evolves to cancer-like strict processes. The prevalence of genital HPV infection in men is higher than in women. In men, HPV is found in the penis and urethra, among women, the majority of HPV is higher in the cervix, vagina and vulvar epithelium [4].

Different types of HPV can be grouped according to their oncogenic risk as low or high. The most common HPVs are HPV 16, 18, 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68, where evidenced infections by these types are associated with most anogenital cancers. The low-risk types HPV 6 and 11 are commonly associated with warts and anogenital lesions. HPV 16 and 18 are the dominant HPV genotypes responsible for causing 70% of cervical cancers and precancerous lesions [5].

Diagnosis of HPV infection can be performed through clinical evaluation by colposcopy and cytological and histological alterations detected by the Papanicolaou test. Furthermore, biopsies can be analyzed by the polymerase chain reaction to

detect the presence of HPV DNA directly and identify different types of HPV strains [6]. However, this technology requires a complex laboratory structure that, in most cases, is poorly accessible to primary health services.

The development of analytical methods with innovative potential that enable sensitive and early diagnosis would minimize the costs of complex sanitary attention is necessary. To improve the patient's quality of life electrochemical biosensors have used in the detection of HPV–DNA hybridization [7]. These biosensors have some important properties as high sensitivity, simplicity in instrumentation, the possibility of miniaturization and portability, for DNA diagnostics. Cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) have several advantages in comparison with others electrochemical diagnostic tools, and they are used to evaluate biorecognition, reusability and stability [8][9]. These techniques can be used to study the interaction between biomolecules and nanomaterials, such as chemicallymodified graphene nanoribbons.

Graphene is a two-dimensional biocompatible semiconducting nanomaterial. It consists of a single sp<sub>2</sub> thick atom sheet in a hexagonal arrangement of connected carbon atoms. Graphene nanoribbons (GNRs) are similar to graphene but result from the axial cut of carbon nanotubes. Synthesized graphene nanoribbons can grow in one dimension, with a higher relation area/edge according to the number of functionalization sites. [10].

The impedimetric detection of HPV will allow identifying the virus's genetic material more practically from an electrochemical impedance analysis [11].

This study describes the construction of an impedimetric genosensor based on graphene nanoribbons to rapid detection and identifying oncogenic subtypes of the human papilloma virus. For this, we synthesized graphene nanofibers, whose high electrical sensitivity increased the effect of the transducer capable of analyzing genetic samples in the picogram/microliter range. The biological recognition layer was

constructed with a consensusgenomic sequence (MY11) to amplify a broad spectrum of DNA from the HPV types.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

Graphene nanoribbons (GNR) were synthesized and chemically modified with sulfhydryl terminal groups and carboxylic groups according to the patent protocol registered under number BR1020150012705. 1,4-Dithiothreitol (DTT), 1-ethyl-3- (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Potassium ferrocyanide ( $K_4[Fe(CN)_6]$ ) and potassium ferricyanide ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) were obtained from Dinamica (São Paulo, Brazil). Deionized water was obtained using a Millipore system (Milli-Qplus, Billerica, USA). MY11 degenerateprobe (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3') was purchased from IDT Technologies and used in PCR to determine the presence of HPV DNA in samples of recombinant plasmids. The plasmid and cDNA samples were prepared in 10 mM phosphate buffer saline (PBS) at pH 7.4 and stored frozen. For carrying out the analyzes, ultrapure water obtained by the Milli-Q plus purification system was used for all experiments. In addition, the study was approved by the ethics committee (number of register is CAAE 23698513.0.0000.5190).

### 2.2 Nanoribbons Graphene synthesis

Graphene nanoribbons were synthesized and chemically modified with sulfhydryl and carboxylic chemical groups according to patent protocol number BR1020150012705. Briefly, GNRs were prepared from the exfoliation of a small amount of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) inside a flask containing an acidic solution, followed by its exposure in an ultrasonic bath. Subsequently, the material was washed with distilled water and the procedure was repeated, using an oxidizing solution.

After drying the material, the GNRs were functionalized by dispersion in a solution containing alkyltrialoxysilane by stirring for less than 5 minutes to perform thiolation. After functionalization with the groups -OH and -COOH(GNRsTh), they were used to favor immobilization on a gold electrode. The remaining carboxyl groups helped to promote covalent anchoring of the degenerate amine probe.

#### *2.4 Construction of the sensor system*

Initially, we prepared the solution of GNRsTh, using 10 mg of GNRsTh dissolved in 20 ml of acetone. Then, the solution was placed in an ultrasound bath for 10 minutes to homogenize the solution together with 0.01mM 1,4-dithiothreitol (Cleland's reagent), an excellent reagent to keep the SH groups in a reduced state. This reagent is capable of reducing the disulfide bonds to the sulphydryl group, promoting the immobilization of the nanomaterial (GNRsTh) on the surface of the gold electrode. All characterizations were in triplicate systems.

The construction of the genosensor platform was carried out simultaneously to carry out the analyzes. Initially, the gold electrode (3mm) was polished with 0.05 µm α-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> paste, then it was immersed in sodium hypochlorite (NaClO) for 10 minutes, rinsed with deionized water and sonicated for 10 min. After evaluating the response of the initial clean electrode, the genosensor assembly procedures were performed. To characterize the base of the transducer, 2 µL of the GNRsTh solution were dripped onto the gold electrode disk for 10 min, being then characterized by CV and EIS analysis. Subsequently, to promote covalent immobilization of the DNA probe, the carboxylic groups of GNRsTh were activated for 10 min using 4µL of a solution of EDC: NHS (1: 1) by dripping on the electrode modified with GNRsTh. Then, 2 µL of the degenerated amine oligonucleotide solution (0.1 µM) was dripped onto the electrode, which was then incubated for 30 min to allow covalent immobilization of the probe.

Finally, the detection capacity of the genosensor was evaluated against samples of plasmids containing different HPV subtypes. These samples were heated to a temperature of 90 ° C and 2µL were dripped onto the sensor platform, followed by CV and EIS analyzes (Fig. 1).

### *2.5 Electrochemical Measurements*

Electrochemical analysis was performed using a potentiostat / galvanostat PGSTAT 128N, using an electrochemical cell composed of three electrodes, being a platinum counter electrode, a reference electrode Ag/AgCl and a gold disc working electrode. How to redox probe, a solution of 20 mL de K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (1:1).

Cyclic voltammetry analyzes (CV) were performed at a fixed scanning potential of -0,2 a 0,7 V. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) foi obtained in a frequency range between 100 mHz to 100 KHz with the alternating amplitude potential of 10 mV. The equivalent circuit analyzes obtained in the characterization of EIS represented in the form of a Nyquist diagram and will be adjusted using the NOVA 1.11software. The obtained curves analyzed to deduce and study the interfacial behavior of the components of the biosensor. The origin 8.0 software was used to make the graphics and obtain mathematical data.

### *2.6 Scanning electron microscopy*

The morphological analysis of the fibers before and after the modification will be performed by scanning electron microscopy (JSM-5900, JEOL, Japan).

### *2.7 Atomic force microscopy measurements*

Topographic measurements of the electrode surfaces were performed using an atomic force microscope (AFM) SPM-9700 (Shimadzu, Japan) with probe (“cantilever”) set to non- contact mode. The images were set to 512 x 512 pixels

with a scan area of  $5 \times 5 \mu\text{m}$  and analyzed with Gwyddion software.

### **3. Results and discussion**

#### *3.1 Morphological analysis*

GNRsTh sample was evaluated by scanning electron microscopy (Fig. S2). The average dimensions of these GNRsTh are approximately 50-80nm wide and a length and at least 5 micrometers. It is possible to observe a greater number of exfoliated nanotubes and opened longitudinally for lengths up to 5  $\mu\text{m}$  (Fig. 2). Opening more layers allows the creation of a greater number of defects at the edges of the material. With this, there is a larger area to allow the connection to the functional groups [12].

#### *3.2 Topographic analyses*

Three-dimensional images of AFM were obtained from the genosensor construction process and investigation of morphological changes on the surface of the sensor system before and after interaction with HPV plasmid samples. Fig. 1 shows topographic AFM images of the sensor surface. Fig. 1a shows the surface of the electrode coated with GNRsTh. The presence of GNRsTh demonstrates a planar morphology with a height of 0.57 nm according to what has been reported for this 2D nanomaterial [13]. These characteristics are due to the chemical interaction between the surface of the gold electrode and the terminal thiol groups (- SH) present in the GNRsTh [13]. After immobilizing the degenerate probe of the MY11probe via EDC: NHS, we observed a variation in roughness and an increase of 0.72 nm in height (Fig. 1 b). Figure 1c shows the topography of the genosensor after exposure to HPV 16 plasmid samples.

A significant increase in the height and roughness of the sensor system was observed after interaction with the HPV 16 sample. The system revealed

morphological changes from 0.72 nm in height to 0.36 $\mu$ m, this variation characterizes the hybridization process of the genosensor with the high risk HPV genotype. In the interaction of the genosensor with a negative control (Fig. 1d) there were no significant morphological changes. We observed a surface without roughness and with a decrease in height to 0.88 nm. Thus, the AFM results suggest the specificity of the sensor device.

### *3.3 Electrochemistry characterization of genosensor system*

Voltammetric and impedimetric analyzes (Fig. 2) were performed to evaluate each stage of modification of the surface of the gold electrode in the manufacture of the genosensor.

Figure 2a corresponds to the voltammetric characterization of the nanostructured layer consisting of GNRsTh. Initially, the clean gold electrode demonstrated well-defined anode / cathode peaks with reversible transfer rate charge in the presence of Fe (CN)<sup>6<sup>3-</sup></sup> / Fe (CN)<sub>6</sub><sup>-</sup> as a redox probe. From the analysis of cyclic voltamograms, a change in the electrochemical behavior of the gold electrode is observed after the adsorption of the GNRsTh. In this context, we can observe a reduction in the anodic and cathodic peakcurrents, due to the chemical interaction between the gold electrode surface and the groups terminal thiol (-SH) present in the NFG [14]. Therefore, it can be said that the immobilization of this element creates a self-organized layer on the surface of the working electrode, partially blocking the electrolyte oxide-reduction process in the double electrical layer [14].

The Nyquist graphs (Fig.2b) are in accordance with the cyclic voltammograms presented above, which demonstrates the adequate process of adsorption of GNRsTh on the clean gold electrode. The Rct of the clean electrode curve is low (189  $\Omega$ ). After the physical adsorption of the GNRsTh, we can observe an increase in resistance to charge transfer (2.29 k $\Omega$ ), reflecting the presence of immobilized molecules on the surface under study [15].

Figure 2c shows an increase in the magnitude of the peaks in the cyclic voltamograms corresponding to the adsorption of the MY11 degenerate probe via EDC: NHS. Coupling agents activate the amine group present on the terminal axis of the Cys structure and react with the NHS ester, resulting in a stable amide bond, increasing the current response [16].

After adding the degenerate probe MY11 (Fig. 2d), a decrease in the cole-cole semicircle is observed and, therefore, the  $R_{ct}$  decreased ( $562 \Omega$ ) [34]. This electrochemical reduction characterizes the adsorption process of the MY11 degenerate probe via EDC: NHS on the electrode coated with GNRsTh. After the activation process by EDC: NHS, the negatively charged terminal carboxylic group present in the GNRsTh, are replaced by the NHS ester. Due to the electrostatic attraction of the positive / neutral charges present in the NHS ester, which promoted the transfer of the negative redox pair to the electrode surface. In this way, the degenerate probe specific for HPV is fixed in the layer GNRsTh, through the covalent interaction between the carboxylic group of the modified GNRsTh and the amino group at the 5' end of the DNA probe [17]. In fact, the changes in the  $R_{ct}$  during the construction stages of the genosensor corroborate the results of the VC, explained previously.

#### **4. Characterization by electrochemical impedance spectroscopy for detection of HPV subtypes**

The EIS provides additional information on changes in behavior on the electrode surface, an effective technique for measuring resistance to electron transfer ( $R_{ct}$ ), which corresponds to the diameter of semicircle in the Nyquist diagram [15]. The impedance spectra were recorded in the frequency range from 100 mHz to 100 kHz to characterize the steps of gold electrode surface modification. Impedimetric data were used for evaluate the new platform based on graphene nanoribbons as a strategy to

immobilization of MY11 probe for detection and identification DNA from different HPV subtypes (Fig. 3).

The genosensor (GNRsTh-MY11 probe) was exposed to samples of HPV 33, HPV 51, HPV 53, HPV 62 and HPV 66 that were chosen because they belong to the genus Alphapapillomavirus. Currently alpha-5 (HPV 51), alpha-6 (HPV 53 E 66), alpha-9 (HPV 33 and 58) groups are involved in most cervical cancers worldwide [16].

HPV 53 and 66 are in the same phylogenetic branch, and HPV samples 33, 51 and 62 are in different phylogenetic branches respectively [2]. When analyzing the impedimetric response of the samples analyzed by our genosensor, we found a notable difference between them. The impedimetric parameters were obtained from the spectroscopic responses shown in Fig. 3, when performing the mathematical adjustment with the equivalent circuit. Samples of *Candida albicans* and *Mycobacterium tuberculosis* were analyzed as negative controls to assess the specificity of the genosensor.

Our results revealed different responses for each HPV genotype (Fig. 3a-e), whose Rct of the results obtained are shown in Table 1. The interaction of the genosensor with the plasmid samples resulted in an increase in the diameters of the semicircles. This analysis reveals an impediment to charge transfer on the electrode surface. Thus, the specific hybridization process causes an intensification of the impedimetric response. EIE studies were performed in triplicate to determine the detection interval of the bioelectrode, and an ideal time of 30 minutes for hybridization.

The equivalent Randle circuit, shown in Fig. S3, was used to adjust the impedance measurements using the NOVA 1.11 software. In this circuit, Rs represents the ohmic resistance of the electrolyte solution, Cdl is the phase constant element, W is the Warburg impedance and Rct is the charge transfer resistance [17]. From the mathematical data provided by the equivalent circuit, we can perform some

calculations to obtain more specific information about the genosensor. Where, the values obtained by the equivalent circuit are substituted in this equation:  $\Delta R_{ct\%} = (HPV\text{-PRIMER}/PRIMER) \times 100$  to evaluate the relative variation of the load transfer resistance [17].

In view of the results already described, it was observed that the genosensor has the ability to detect and electrochemically identify different HPV subtypes in plasmid samples. For this reason, we saw the need to evaluate in terms of the relative variation of  $R_{ct}$  ( $\Delta R_{ct}$ ) to characterize the analytical performance of the genosensor, according to the equation [44]:

Equação 1

$$\Delta R_{CT}(\%) = \frac{R_{CT\text{ HPV}} - R_{CT\text{ (Genosensor)}}}{R_{CT\text{ (Genosensor)}}} \times 100$$

Where, the  $R_{ct}$ (genosensor) corresponds to the initial response of the genosensor (GNRsTh-MY11 probe) and the  $R_{ct}$  (DNA target of the genosensor) is the measured value of resistance to charge transfer after recognition of HPV 33, HPV 51, HPV 53, HPV 62 and HPV 66 [17].

#### *4.1 Identification of the phylogenetic relationship between different HPV genomes*

An evaluation of the elements of the circuit  $R_{ct}$ ,  $Q$  and  $n$ , were obtained from the theoretical simulation of Nyquist spectra that allowed the construction of a 3D graph (Fig. 4). In this graph the relation between the impedimetric parameters obtained by the adjustment with the equivalent circuit of the electrochemical responses is presented[18].

There is a grouping of responses corresponding to samples HPV 51, HPV 53 and HPV 66. HPV samples 33 and 62 are spaced apart. When HPV samples are compared to negative samples, we can see that the HPV samples are closer together, maintaining a certain distance from the negative controls.

The expected result was that the HPV 53 and HPV 66 samples were the only ones grouped, because they belong to the same phylogenetic branch. However, when analyzing the phylogenetic relationship between these samples and our results, we found that the HPV 51, HPV 53 and HPV 66 subtypes have in common that they are HPV subtypes associated with anogenital lesions.

Thus, in this work we report that the developed platform is capable of electrochemically analyzing the phylogenetic relationship between the different HPV genomes.

#### *4.2 Detection limit*

Figure 5 represents the interaction of the genosensor system with samples of recombinant plasmids containing oncogenic high-risk HPV genomes (HPV 16 and HPV 18). The impedimetric analyzes represented by the Nyquist diagram (A) and (B) revealed a sequential increase in the diameter of the semicircle according to the increase in the concentration of the plasmid samples (1aM, 100aM, 100fM, 50pM, 100pM).

The detection limit of the genosensor was assessed by creating a calibration curve from the EIS responses obtained from exposure to plasmid samples containing HPV 16 and HPV 18. To assess reproducibility and experimental standard deviation (S.D.), the following data are presented as a result of three repetitions performed for each sample. The performance of the genosensor for the detection of HPV 16 and 18 was evaluated through the relative variation of R<sub>ct</sub> ( $\Delta R_{ct}\%$ ), seen previously in equation 1. In addition, Fig. 6 shows the relationship between  $\Delta R_{ct}\%$  and HPV 16 and HPV 18 concentrations. We can observe an increase in R<sub>ct</sub> with increasing concentration of plasmid samples of HPV 16 and HPV 18 (Figure 6).

The scattered points represent the experimental results, and the black lines show the fitting curves resulting from the equivalent circuit. It should be noted that

the resistances found were different between HPV 16 and HPV 18, which reveals a different recognition of the genosensor with each one subtypes. We calculated a linear relationship according to the data extracted from the impedimetric analysis, and genosensor presented an excellent sensing capacity with detection limit (LODHPV16 of 3,5 aM; LODHPV18 1,2 aM).

#### *4.3 Comparative study*

Table 2 shows a comparison of the analytical performance between the proposals of genosensors and other DNA biosensors reported in the literature for HPV detection. The diagnosis of HPV is based on clinical findings in addition to laboratory tests. PCR and CH are able to detect the virus. Although widely used, these techniques have some limitations, such as special equipment and facilities that distance where many health centers operate. There are several electrochemical and optical biosensors for detecting HPV genotypes [23-26]. However, the proposedgenosensors were able to detect and identify different HPV genotypes with the use ofa degenerate MY11 probe using electrochemical techniques [21].

## **5 Conclusion**

The impedimetric responses demonstrate the success of the electrode surface modification process against different HPV genotypes. The diagnostic potential of the genosensor system capable of electrochemically detecting and identifying the phylogenetic relationship associated with anogenital lesions between samples containing different HPV subtypes was identified. The degenerate characteristic of the MY11 probe allows the discrimination of HPV subtypes within the samples. The sequences are considered highly specific in their interaction with DNA, demonstrated by the low electrochemical signal after the interaction of the system with a negative sample. Inadditon, the new system presented a detection limit (LOD) of  $5.20 \text{ aM} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  and  $2.49 \text{ aM} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  was obtained for HPV16 and HPV18, respectively. The genosensor system developed has a simple and portable fabrication, capable of providing an early diagnosis, preventing the development of anogenital cancers. This device can be

considered a new diagnostic alternative, in addition to having the potential for automation and, as a consequence, application in clinical analyzes.

### **Acknowledgements**

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

### **References**

- [1] E.J. Crosbie, M.H. Einstein, S. Franceschi, H.C. Kitchener, Human papillomavirus and cervical cancer, *Lancet.* 382 (2013) 889–899. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60022-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60022-7).
- [2] H.U. Bernard, R.D. Burk, Z. Chen, K. van Doorslaer, H. zur Hausen, E.M. de Villiers, Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments, *Virology.* 401 (2010) 70–79.<https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.002>.
- [3] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA. Cancer J. Clin.* 68 (2018) 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [4] Y.T. Kim, B. Serrano, J.K. Lee, H. Lee, S.W. Lee, C. Freeman, J.K. Oh, L. Alemany, F.X. Bosch, L. Bruni, Burden of Human papillomavirus (HPV)-related disease and potential impact of HPV vaccines in the Republic of Korea, *Papillomavirus Res.* 7 (2019) 26–42. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2018.12.002>.
- [5] R.S. Dube Mandishora, I.K. Christiansen, N. Chin'ombe, K. Duri, B. Ngara, T.B.

- Rounge, R. Meisal, O.H. Ambur, J.M. Palefsky, B. Stray-Pedersen, Z.M. Chirenje, Genotypic diversity of anogenital human papillomavirus in women attending cervical cancer screening in Harare, Zimbabwe, *J. Med. Virol.* 89 (2017) 1671–1677. <https://doi.org/10.1002/jmv.24825>.
- [6] G.J. Nuovo, C.V. de Andrade, S.I. Wells, M. Brusadelli, A.F. Nicol, New biomarkers of human papillomavirus infection in acute cervical intraepithelial neoplasia, *Ann. Diagn. Pathol.* 36 (2018) 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2018.06.008>.
- [7] P. Mahmoodi, M. Fani, M. Rezayi, A. Avan, Z. Pasdar, E. Karimi, I.S. Amiri, M. Ghayour-Mobarhan, Early detection of cervical cancer based on high-risk HPV DNA- based genosensors: A systematic review, *BioFactors*. 45 (2019) 101–117. <https://doi.org/10.1002/biof.1465>.
- [8] M. José Jara-Palacios, M. Luisa Escudero-Gilete, J. Miguel Hernández-Hierro, F.J. Heredia, D. Hernanz, Cyclic voltammetry to evaluate the antioxidant potential in winemaking by-products, *Talanta*. 165 (2017) 211–215. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.058>.
- [9] Z.V. Živcová, V. Petrák, O. Frank, L. Kavan, Electrochemical impedance spectroscopy of polycrystalline boron doped diamond layers with hydrogen and oxygen terminated surface, *Diam. Relat. Mater.* 55 (2015) 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2015.03.002>.
- [10] L. Yang, X. Li, S. Yan, M. Wang, P. Liu, Y. Dong, C. Zhang, Single-walled carbon nanotubes-carboxyl-functionalized graphene oxide-based electrochemical DNA biosensor for thermolabile hemolysin gene detection, *Anal. Methods*. 7 (2015) 5303– 5310. <https://doi.org/10.1039/c5ay01062d>.
- [11] V.K. Gupta, M.L. Yola, M.S. Qureshi, A.O. Solak, N. Atar, Z. Üstündağ, A novel impedimetric biosensor based on graphene oxide/gold nanoplatform for detection of

- DNA arrays, Sensors Actuators, B Chem. 188 (2013) 1201–1211.  
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.08.034>.
- [12] Q. Chen, L. Ma, J. Wang, Making graphene nanoribbons: A theoretical exploration, Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci. 6 (2016) 243–254.  
<https://doi.org/10.1002/wcms.1246>.
- [13] E. Povedano, F.H. Cincotto, C. Parrado, P. Díez, A. Sánchez, T.C. Canevari, S.A.S. Machado, J.M. Pingarrón, R. Villalonga, Decoration of reduced graphene oxide with rhodium nanoparticles for the design of a sensitive electrochemical enzyme biosensor for 17 $\beta$ -estradiol, Biosens. Bioelectron. 89 (2017) 343–351.  
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.018>.
- [14] D.A. Oliveira, J. V. Silva, J.M.R. Flauzino, H.S. Sousa, A.C.H. Castro, A.C.R. Moço, M.M.C.N. Soares, J.M. Madurro, A.G. Brito-Madurro, Carbon nanomaterial as platform for electrochemical genosensor: A system for the diagnosis of the hepatitis C in real sample, J. Electroanal. Chem. 844 (2019) 6–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.04.045>.
- [15] Y. Zhang, W. Jiang, Decorating graphene sheets with gold nanoparticles for the detection of sequence-specific DNA, Electrochim. Acta. 71 (2012) 239–245.  
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.03.136>.
- [16] N. Li, S. Franceschi, R. Howell-Jones, P.J.F. Snijders, G.M. Clifford, Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication, Int. J. Cancer. 128 (2011) 927–935. <https://doi.org/10.1002/ijc.25396>.
- [17] K.Y.P.S. Avelino, L.S. Oliveira, N. Lucena-Silva, C.P. de Melo, C.A.S. Andrade, M.D.L. Oliveira, Metal-polymer hybrid nanomaterial for impedimetric detection of human papillomavirus in cervical specimens, J. Pharm. Biomed. Anal. 185 (2020).

- [https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113249.](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113249)
- [18] E.P. Simão, D.B.S. Silva, M.T. Cordeiro, L.H.V. Gil, C.A.S. Andrade, M.D.L. Oliveira, Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection, *Talanta.* 208 (2020) 120338.  
[https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120338.](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120338)
- [19] L. Farzin, S. Sadjadi, M. Shamsipur, S. Sheibani, Electrochemical genosensor based on carbon nanotube/amine-ionic liquid functionalized reduced graphene oxide nanoplateform for detection of human papillomavirus (HPV16)-related head and neck cancer, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 179 (2020) 112989.  
[https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112989.](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112989)
- [20] N.A. Parmin, U. Hashim, S.C.B. Gopinath, S. Nadzirah, Z. Rejali, A. Afzan, M.N.A. Uda, V.C. Hong, R.D.A.A. Rajapaksha, Voltammetric determination of human papillomavirus 16 DNA by using interdigitated electrodes modified with titanium dioxide nanoparticles, *Microchim. Acta.* 186 (2019).  
[https://doi.org/10.1007/s00604-019-3445-2.](https://doi.org/10.1007/s00604-019-3445-2)
- [21] S. Jampasa, W. Siangproh, R. Laocharoensuk, P. Yanatatsaneejit, T. Vilaivan, O. Chailapakul, A new DNA sensor design for the simultaneous detection of HPV type 16 and 18 DNA, *Sensors Actuators, B Chem.* 265 (2018) 514–521.  
[https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.045.](https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.045)
- [22] P. Teengam, W. Siangproh, A. Tuantranont, C.S. Henry, T. Vilaivan, O. Chailapakul, Electrochemical paper-based peptide nucleic acid biosensor for detecting human papillomavirus, *Anal. Chim. Acta.* 952 (2017) 32–40.  
[https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.071.](https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.071)

## Table captions

**Table 1.** Parameters obtained by adjusting the impedimetric responses with the equivalent circuit.

Gold electrode modification	Rct (kΩ)	Rs (Ω)	Q (μF)	W	N	%ΔR ct	SD ±
Gold surface	323	128	110	431	0.538	-	-
GNRsTh	2180	163	5.08	426	0.778	-	-
GNRsTh - MY11 probe	961	133	34.8	108	0.44	-	-
Genosensor - HPV 33	1340	140	2.15	495	0.833	39,43	13,83
Genosensor - HPV 51	1590	160	1.67	445	0.849	65,45	1,92
Genosensor - HPV 53	1580	183	1.88	387	0.838	64,41	5,83
Genosensor - HPV 62	1100	144	2.34	464	0.821	14,46	9,07
Genosensor - HPV 66	2300	132	1.98	496	0.816	139,3 3	11,43
Genosensor - Candida	790	140	5.15	376	0.768	17,79	6,74
Genosensor - Tuberculose	695	124	3.62	441	0.793	27,67	5,02

**Table 2.** Comparison of the analytical performance of the described electrochemical genosensor for determination of HPV16 e HPV 18 with the other electrochemical biosensors.

Sensor platform	HPV type	Analytical technique	Response time	Detection range	Limit of detection	Reference
Gold surface – GNRsTh – probe	HPV16	CV and EIS	30 min	1aM, 100aM, 100 fM,	5.20 aM	This work
	HPV18			50 pM, 100 pM	2.49 aM	
Gold surface – AuNp/PANI –probe	HPV11	CV and EIS	15 min	1 pg/L to 100 pg/L	2.74 pg/L	[17]
	HPV16				7.43 pg/L	
GCE/MWCNT/NH2- ILrGO/pDNA- HPV16DNA/AQMS	HPV16	DPV	15 min	8.5 nM–10.7 μM	1.3 nM	[19]
IDE/APTES/TiO2/pDNA/H PV16 DNA	HPV16	CV	1h	10 fM–10 μM	~0.1 fM	[20]
SPCE/AuNPs/pDNA1/HPV16 DNA /AQ-pDNA2	HPV16	DPV	15 min	0.5–100 nM	150 pM	[21]
AQ-PNA/G-PANI/SPCE	HPV16	EIS and SWV	15 min	10–200 nM	2,3 nM	[22]

## Figure Captions

**Figure 1.** Schematic representation of the manufacturing process of impedimetric genosensors for the detection of different samples of HPV target DNA. Bare gold electrode (A), adsorption of GNRsTh with the groups -COOH and -SH (B), immobilization of the MY11 probe with the groups -NH<sub>2</sub> via EDC: NHS (C) and hybridization process with HPV L1 gene (D).

**Figure 2.** Topographic images of AFM in 3D coated with GNRsTh (A), GNRsTh-MY11 probe (B), GNRsTh-MY11 probe-HPV16 (C) e GNRsTh-MY11 probe-Negative control (D). Scan area of 5 μm × 5 μm.

**Figure 3.** CV and EIS analyzes of the system modification process: Cyclic voltamogram (A) and Nyquist diagram (B) after adsorption of graphene nanoribbons on the bare gold electrode, cyclic voltamogram (C) and Nyquist diagram (D) of the MY11 probe immobilization process after activation via EDC:NHS.

**Figure 4.** Nyquist diagram of the sensor system followed by the impedimetric response after contact with different HPV subtypes: HPV 33 (A), HPV 51 (B), HPV 53 (C), HPV62 (D), HPV66 (E) and negative samples of Candida Albicans (F) and Mycobacterium tuberculosis (G), in concentration (100 pM).

**Figure 5.** Three-dimensional graph for the R<sub>ct</sub>, Q and n values obtained from equivalent circuit.

**Figure 6.** Nyquist diagram of the genosensor system exposed to different different recombinant plasmids containing genomes of HPV 16 and HPV 18 [target DNA - 1aM, 100aM, 1E5 (100fM), 50E7 (50pM), 1E8 (100pM)].

**Figure 7.** ΔR<sub>ct</sub> for the GNRsTh-MY11 probe genosensor system after exposure to different concentrations of HPV 16 and HPV 18 genomes.

## Electronic Supporting Material

### **IMPEDIMETRIC GENOSENSOR BASED ON GRAPHENE NANORIBBONS FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF ONCOGENIC TYPES OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS**

Raiza P.S. Lucena<sup>1</sup>, Isaac A.M. Frías<sup>1</sup>, Norma Lucena-Silva<sup>2</sup>, César A.S. Andrade<sup>1,3</sup>, Maria D. L. Oliveira<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco,  
50670-901 Recife, PE, Brazil

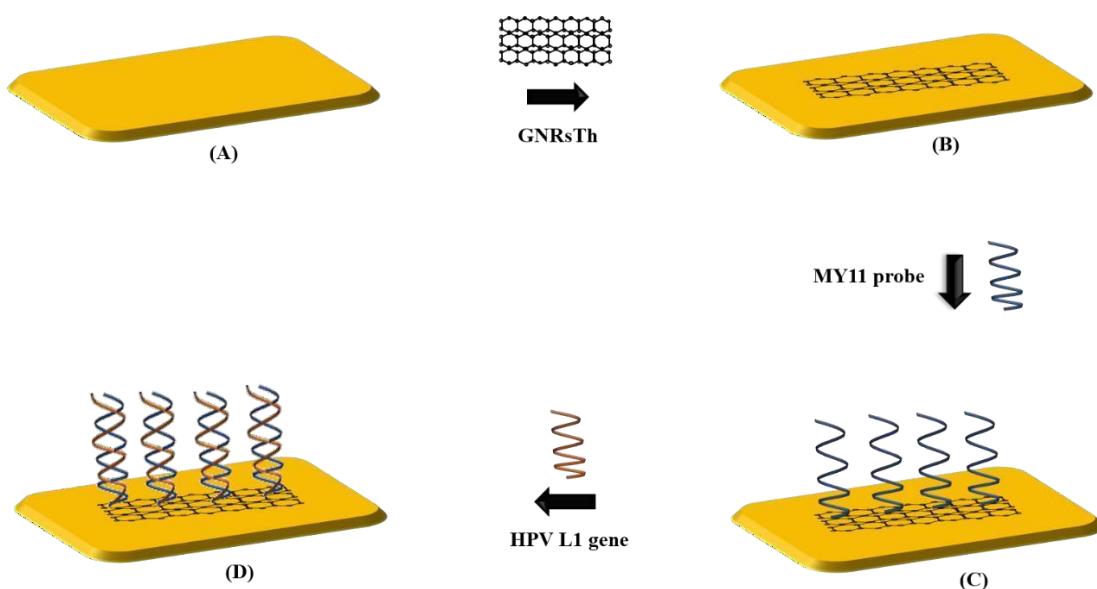
<sup>2</sup> Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação  
Oswaldo Cruz(FioCruz), 50670-420 Recife, PE, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-  
901 Recife, PE, Brazil.

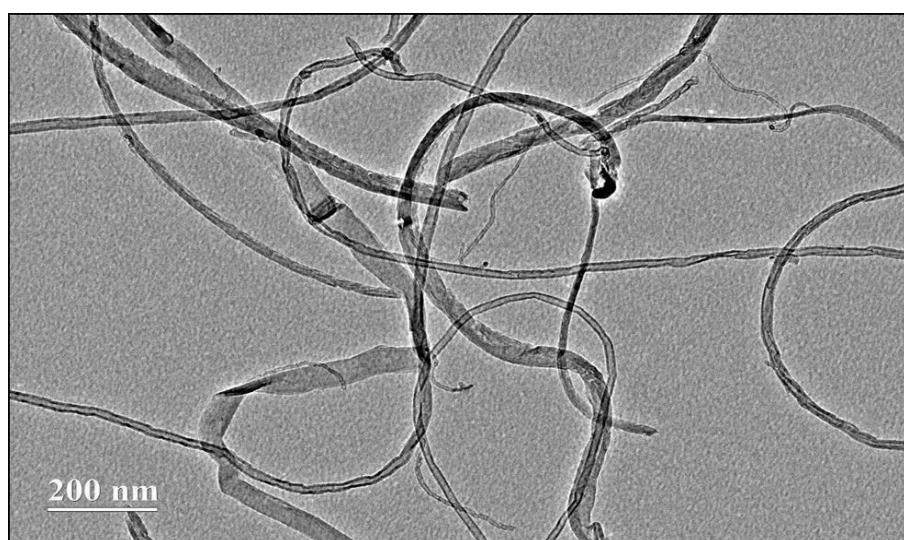
\*To whom correspondence should be addressed:

Maria D.L. Oliveira, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife,  
PE, Brazil Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547  
E-mail: m\_danielly@yahoo.com.br

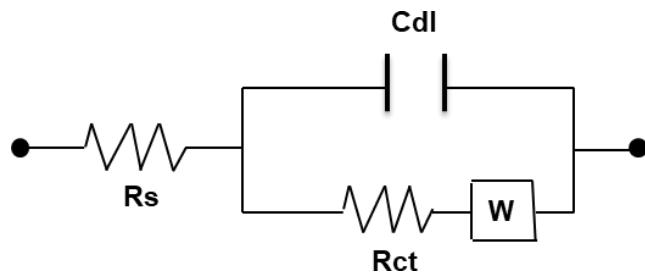
**Figure S1.** Schematic representation of the manufacturing process of impedimetric genosensors for the detection of different samples of HPV target DNA. Bare gold electrode (A), adsorption of GNRsTh with the groups -COOH and -SH (B), immobilization of the MY11 probe with the groups -NH<sub>2</sub> via EDC: NHS (C) and hybridization process with HPV L1 gene (D).



**Figure S2.** SEM morphological image graphene nanoribbons used as a transducer in the development of the HPV genosensor.



**Figure S3.** Randle's equivalent circuit used to fit the impedance measurements, where  $R_s$  represents the ohmic resistance of the electrolyte solution,  $C_{dl}$  is the phase constant element,  $W$  is the Warburg impedance and  $R_{ct}$  is the charge transferresistance.



## ANEXO A – ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY & BIOTECHNOLOGY

12/01/2021 ScholarOne Manuscripts

Journal of Chemical Technology & Biotechnology

Home Author Review Print

### Submission Confirmation

Thank you for your submission

Submitted to  
Journal of Chemical Technology & Biotechnology

Manuscript ID  
JCTB-21-0028

Title  
IMPEDIMETRIC GENOSENSOR BASED ON GRAPHENE NANORIBBONS FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF ONCOGENIC TYPES OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS

Authors  
Lucena, Raiza  
Frias, Isaac  
Lucena-Silva, Norma  
Souza de Andrade, Cesar Augusto  
Olivelra, Marla

Date Submitted  
12-Jan-2021

Author Dashboard