



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

HELOISA DE BARROS DANTAS

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS BIOSSENSÍVEIS BASEADOS EM
DENDRÍMEROS NANOESTRUTURADOS PARA O DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

Recife
2024

HELOISA DE BARROS DANTAS

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS BIOSSENSÍVEIS BASEADOS EM
DENDRÍMEROS NANOESTRUTURADOS PARA O DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Inovação Terapêutica (PPGIT) da
Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial
para obtenção do título de mestra em
Inovação Terapêutica. Área de
concentração: Território,
Desenvolvimento e Inovação
Tecnológica em Saúde.

ORIENTADOR: Prof. César Augusto Souza de Andrade

CO-ORIENTADORES: Profa. Maria Danielly Lima de Oliveira

Dr. Alberto Galdino da Silva Júnior

Recife

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Dantas, Heloisa de Barros.

Desenvolvimento de eletrodos biossensíveis baseados em dendrímeros nanoestruturados para o diagnóstico diferencial de papilomavírus humano / Heloisa de Barros Dantas. - Recife, 2024. 123f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2024.

Orientação: César Augusto Souza de Andrade.

Coorientação: Maria Danielly Lima de Oliveira.

Coorientação: Alberto Galdino da Silva Júnior.

Inclui referências e apêndices.

1. Genossensor; 2. Impedância eletroquímica; 3. Voltametria cíclica. I. Andrade, César Augusto Souza de. II. Oliveira, Maria Danielly Lima de. III. Silva Júnior, Alberto Galdino da. IV. Título.

UFPE-Biblioteca Central

HELOISA DE BARROS DANTAS

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS BIOSSENSÍVEIS BASEADOS EM
DENDRÍMEROS NANOESTRUTURADOS PARA O DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

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

Aprovado em: 05 / 08 / 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. César Augusto Souza de Andrade (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Maurília Palmeira Da Costa (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

A minha mãe, por sempre me lembrar que sou capaz, e aos meus irmãos, por
me moverem a ser cada dia melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha fé em Deus e no universo, por amparar e revigorar as energias, lembrando-me sempre que nunca estarei sozinha. A minha bisavó, dona Cícera (in memoriam), e amiga Ana Beatriz (in memoriam), sei que vocês torcem e vibram por mim, independentemente de onde estejam.

A minha mãe e meus irmãos, por despertarem em mim o desejo de vencer e ser sempre melhor por nós. Também agradeço a minha madrinha e avó, pelas conversas de apoio e incentivo. A minha prima Júlia, por embarcar nessa trajetória de dividir casa juntas e encontrar mais conforto para seguir em busca dos nossos sonhos, obrigada pelas tardes de café e bolo.

Aos meus amigos do FCQTB, e em especial a Marylia e Gleybson, pelas tardes de conversa, incentivo e troca, obrigada por correrem do meu lado e servirem de aconchego, vocês foram essenciais nesse processo. Também agradeço aos meus queridos amigos Marcus e Karla, por não me permitirem ter medo, pelos conselhos, broncas e estarem sempre disponíveis a ouvir nos meus momentos de sufoco. A minha amiga Lavinya, que viveu junto comigo a graduação, o mestrado e futuramente o doutorado, crescer ao seu lado é mil vezes melhor amiga. Sem vocês, não teria chegado até aqui, muito obrigada a todos!

Aos meus orientadores, Prof. Dr. César Andrade, Profa. Dra. Maria Danielly e Dr. Alberto Galdino da Silva Júnior. Agradeço a estes profissionais incríveis pela oportunidade, confiança, paciência, disponibilidade, ensinamentos e somarem no meu crescimento profissional e pessoal. Serei eternamente 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 BIONANO pela troca de conhecimento, aprendizado e risadas. Em especial a Alberto, Antônio, Brenda e Sthefany pelos projetos juntos, companheirismo, suporte, troca de conhecimento e tardes de almoço na bodega. Não se caminha sozinha, e sem vocês, não teria sido possível chegar até aqui!

A todos os professores, alunos e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho se tornasse possível, meu muito obrigada.

RESUMO

O papilomavírus humano (HPV) infecta cerca de 80% dos homens e mulheres com vida sexual ativa pelo menos uma vez até os 45 anos. Ademais, o HPV de alto risco 16 e 18 está presente em 71% dos casos de câncer cervical (CC), sendo o terceiro de maior incidência no mundo. O exame citológico possui baixa sensibilidade e os métodos moleculares possuem limitações como alto custo, complexidade e protocolos demorados. Assim, o desenvolvimento de novas tecnologias voltadas para o diagnóstico rápido e sensível do HPV tornou-se essencial. Uma alternativa promissora é o uso de biossensores eletroquímicos, caracterizados pela rápida análise e elevada sensibilidade na detecção de analitos de interesse clínico. Dessa forma, uma plataforma genossensora baseada em filmes poliméricos de polímero condutor (polipirrol, PPy) e nanomaterial híbrido composto de nanopartículas de ouro (AuNPs) e dendrímero (PAMAM-G5) foi desenvolvido. A associação de polímero condutor e AuNPs no sistema sensor resultou no aprimoramento do sinal elétrico e cinética de elétrons na interface eletrodo-solução, aumentando a sensibilidade da plataforma. A detecção do HPV e identificação das famílias genotípicas ocorreu por meio de uma sequência de oligonucleotídeos degenerada para a identificação do HPV. A plataforma sensora foi inicialmente caracterizada por voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica e microscopia de força atômica, onde demonstrou o processo de imobilização dos componentes do biossensor no eletrodo de ouro, também revelando sua habilidade de detectar o genoma do HPV. As respostas eletroanalíticas indicam que foi possível detectar genótipos de baixo (HPV 6) e alto risco oncogênico (HPV 16, 18, 31 e 33), e cDNA de amostra de pacientes infectados com o HPV 6, 18 e 31. A especificidade do genossensor foi testada frente a amostras de controle negativo. Diferentes perfis eletroanalíticos foram obtidos para genótipos de HPV de alto e baixo risco, permitindo o diagnóstico diferencial de HPV. A variação percentual da transferência de carga ($\Delta R_{CT}\%$) permitiu identificar maior sensibilidade e resposta mais expressiva para o HPV 18, relacionado à maioria dos casos de CC. O genossensor apresentou faixa linear de resposta entre $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ a $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ para genótipos de HPV e $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ a $75 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ para cDNA. Foi obtido limite de detecção (LOD) de $0.23 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ para genótipos e LOD de $0.34 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ para cDNA. O limite de quantificação (LQ) para genótipos de $0.72 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ e LQ de $1.10 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ para cDNA. O genossensor proposto destacou-se como um método de triagem promissor para o diagnóstico diferencial do HPV, com tempo de análise de 5 minutos. Genossensores eletroquímicos podem ser utilizados na triagem do papilomavírus nos estágios iniciais da infecção, permitindo, assim, um melhor prognóstico e consequentemente tratamento dos pacientes, contribuindo para a prevenção do câncer cervical.

Palavras-chave: Genossensor; Impedância eletroquímica; Voltametria cíclica; Nanocompósito híbrido; Papilomavírus humano.

ABSTRACT

The human papillomavirus (HPV) infects about 80% of sexually active men and women at least once by the age of 45. Additionally, high-risk HPV types 16 and 18 are present in 71% of cervical cancer (CC) cases, making it the third most common cancer worldwide. Cytological examination has low sensitivity, and molecular methods have limitations such as high cost, complexity, and lengthy protocols. Thus, the development of new technologies aimed at rapid and sensitive HPV diagnosis has become essential. A promising alternative is the use of electrochemical biosensors, characterized by rapid analysis and high sensitivity in detecting clinically relevant analytes. Therefore, a genosensor platform based on polymeric films of conductive polymer (polypyrrole, PPy) and a hybrid nanomaterial composed of gold nanoparticles (AuNPs) and dendrimer (PAMAM-G5) was developed. The combination of conductive polymer and AuNPs in the sensor system resulted in enhanced electrical signal and electron kinetics at the electrode-solution interface, increasing the platform's sensitivity. HPV detection and genotypic family identification were achieved through a degenerate oligonucleotide sequence for HPV identification. The sensor platform was initially characterized by cyclic voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy, and atomic force microscopy, demonstrating the immobilization process of the biosensor components on the gold electrode and its ability to detect the HPV genome. Electroanalytical responses indicated the ability to detect both low-risk (HPV 6) and high-risk oncogenic genotypes (HPV 16, 18, 31, and 33), as well as cDNA from patient samples infected with HPV 6, 18, and 31. The genosensor's specificity was tested against negative control samples. Different electroanalytical profiles were obtained for high-risk and low-risk HPV genotypes, allowing for differential HPV diagnosis. The percentage variation in charge transfer ($\Delta R_{CT\%}$) indicated greater sensitivity and a more expressive response for HPV 18, associated with most CC cases. The genosensor exhibited a linear response range between $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ and $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ for HPV genotypes and between $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ and $75 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ for cDNA. A detection limit (LOD) of $0.23 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ for genotypes and $0.34 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ for cDNA was achieved. The limit of quantification (LOQ) for genotypes was $0.72 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, and for cDNA, it was $1.10 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. The proposed genosensor stood out as a promising screening method for differential HPV diagnosis, with an analysis time of 5 minutes. Electrochemical genosensors can be used for HPV screening in the early stages of infection, allowing for better prognosis and consequently patient treatment, contributing to cervical cancer prevention.

Keywords: Genosensor; Electrochemical impedance; Cyclic voltammetry; Hybrid nanocomposite; Human papillomavirus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 -** Representação esquemática dos gêneros do HPV e classificação de alto risco e baixo risco.
- Figura 2 -** Cânceres causados pelo HPV em homens e mulheres.
- Figura 3 -** Árvore filogenética do HPV destacando os grupos mais frequentes nos casos de carcinogênese anogenital.
- Figura 4 -** Representação esquemática do vírus do HPV.
- Figura 5 -** Representação esquemática do genoma do HPV, exemplificando o arranjo das proteínas precoces (E), região longa de controle (LCR) e os genes capsídeos (L1 e L2).
- Figura 6 -** Resumo esquemático da entrada do HPV e o caminho para a carcinogênese.
- Figura 7 -** Representação esquemática do ciclo viral do HPV.
- Figura 8 -** Representação esquemática do diagnóstico do HPV.
- Figura 9 -** Correlação do HPV com casos de câncer no Brasil.
- Figura 10 -** Prevalência de HPV por região do Brasil.
- Figura 11 -** Mercado global de biossensores eletroquímicos por área de desenvolvimento.
- Figura 12 -** Representação esquemática dos componentes presentes no biossensor.
- Figura 13 -** Mecanismo de interação de um biossensor.
- Figura 14 -** Representação esquemática da classificação dos biossensores quanto ao transdutor e biorreceptor.
- Figura 15 -** Representação esquemática dos tipos de biossensores com base na natureza do receptor: a) ácido nucleico; b) baseado em células; c) anticorpo/antígeno; d) enzimático; e) aptassensor.
- Figura 16 -** Representação esquemática de um genossensor.
- Figura 17 -** Etapas da produção de AuNPs: a) solução de HAuCl_4 com PAMAM-G5, obtendo coloração amarela b) adição de borohidreto de sódio (NaBH_4), com mudança de coloração

para preto, resultante do processo de redução, c) AuNPs-PAMAM-G5.

Figura 18 - Estrutura química do PAMAM.

Figura 19 - Esquema exemplificando as conformações e comportamentos de AuNPs-PAMAM-G5 em pH neutro.

Figura 20 - Estrutura química do pirrol e polipirrol.

Figura 21 - Protonação do pirrol.

Figura 22 - Eletrodo de ouro eletropolimerizado com PPy.

Figura 23 - Representação esquemática de componentes de um espectrofotômetro.

Figura 24 - Representação esquemática (a) elementos do circuito e (b) circuito RLC.

Figura 25 - Representação esquemática do diagrama de Nyquist.

Figura 26 - Representação esquemática da relação do circuito equivalente de Randles com os processos existentes na interface eletrodo/solução.

Figura 27 - Representação esquemática de uma célula eletroquímica com único compartimento.

Figura 28 - Voltamograma exemplificando as regiões de potencial anódica (E_{pa}), catódicas (E_{pc}), correntes de redução (I_{pc}) e pico de oxidação (I_{pa}). b) potencial triangular aplicado gerando um voltamograma.

Figura 29 - Representação esquemática de funcionamento da AFM e principais componentes.

Figura 30 - Modos de operação do AFM.

Figura 31 - Esquema de construção do genossensor (PPy-AuNPs+PAMAM-BSA) para identificar diferentes amostras de DNA alvo de HPV. a) Adsorção de AuNPs+PAMAM-G5 com grupos- NH_2 e na superfície do ouro. b) Imobilização de sonda oligonucleotídica (MY09) degenerada com grupos $-NH_2$ por Glutaraldeído c) hibridização do HPV alvo.

Figura 32 - Representação dos equipamentos utilizados na análise dos biossensores, a) gaiola de Faraday, b) célula eletroquímica

contendo os três eletrodos (eletrodo de referência, contra-eletrodo e eletro de trabalho), c) potenciostato/galvanostato e d) sistema de amplificação de sinal e processamento.

Figura 33 - Análise topográfica da plataforma genossensora PPy-AuNPs+PAMAM-G5-MY09-BSA e de amostra positiva de HPV 18.

Figura 34 - Espectro de FTIR do PPy e PPy-AuNPs+PAMAM-G5.

Figura 35 - Espectroscopia de absorção UV-visível da AuNPs redução pelo borohidreto de sódio e AuNPs+PAMAM-G5.

Figura 36 - Eletropolimerização do PPy por voltametria cíclica.

Figura 37 - Voltamograma cíclico (a) e diagramas de Nyquist (b) da montagem da plataforma sensora PPy-AuNps+PAMAM-G5-MY09-BSA. Os experimentos foram feitos utilizando 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ em PBS (10 mM, pH 7,4).

Figura 39 - Voltamogramas cíclicos de plasmídeos recombinantes contendo o gene L1: genótipos de baixo risco HPV 6 (a) e de alto risco 16 (b), 18 (b), 31 (c) e 33 (d) (1, 10, 25, 50, 75 e 100 $pg.\mu L^{-1}$).

Figura 40 - Espectros de impedância de plasmídeos recombinantes contendo o gene L1: genótipos de baixo risco HPV 6 (a) e de alto risco 16 (b), 18 (b), 31 (c) e 33 (d) (1, 10, 25, 50, 75 e 100 $pg.\mu L^{-1}$).

Figura 41 - Curvas de calibração, coeficiente de correlação (R^2), desvio padrão (DP) e probabilidade de significância (P) dos plasmídeos recombinantes de baixo risco HPV 6 (a) e de alto risco 16 (b), 18 (b), 31 (c) e 33 (d) (1, 10, 25, 50, 75 e 100 $pg.\mu L^{-1}$).

Figura 42 - $\Delta R_{CT}(\%)$ da camada sensora PPy-AuNPs+PAMAM-G5-MY09-BSA após exposição a diferentes concentrações de amostras de plasmídeo HPV.

Figura 43 - Quantificação do recobrimento da camada sensora (θ) após exposição a amostras de plasmídeos recombinantes do HPV

6, 16, 18, 31 e 33 em diferentes concentrações (1 - 100 pg.µL⁻¹).

Figura 44 - Resposta voltamétrica do genossensor para amostras de cDNA de paciente do sexo feminino infectada pelo HPV 6 (a), 18 (b) e 31 (c) na concentração 1-75 pg.µL⁻¹.

Figura 45 - Resposta impedimétrica do genossensor para amostras de cDNA de paciente do sexo feminino infectada pelo HPV 6 (a), 18 (b) e 31 (c) na concentração 1-75 pg.µL⁻¹.

Figura 46 - Curvas de calibração, coeficiente de correlação (R^2), desvio padrão (DP) e probabilidade de significância (P) das amostras de cDNA 6 (a), 18 (b) e 31 (c).

Figura 47 - Gráfico tridimensional para os valores de RCT, N, CPE obtidos como resultado do ajuste do circuito equivalente de Randles.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Função dos genes do papilomavírus humano.
- Tabela 2** - Propriedades de dendrímeros PAMAM terminados em amina, peso molecular, número de grupos terminais e tamanho.
- Tabela 3** - Valores dos elementos do circuito equivalente obtidos a partir do ajuste dos resultados de impedância da plataforma biossensora.
- Tabela 4** - Variação da corrente anódica (I_{pa}) dos resultados dos voltamogramas derivados da hibridização com o gene L1 do HPV inserido em plasmídeos recombinantes.
- Tabela 5** - Valores dos elementos do circuito equivalente obtidos a partir do ajuste dos resultados de impedância dos plasmídeos recombinantes HPV 6, 16, 18, 31 e 33.
- Tabela 6** - Valores de LOD e LQ obtidos do genossensor PPy-AuNPs+PAMAM-MY09-BSA
- Tabela 7** - Desempenho analítico de biossensores para detecção de HPV comparado ao genossensor PPy-AuNPs+PAMAM-G5-MY09-BSA.
- Tabela 8** - Variação da corrente anódica (I_{pa}) para as etapas de construção da plataforma genossensora PPy-AuNPs+PAMAM-G5-MY09-BSA após exposição a amostras de cDNA.
- Tabela 9** - Valores dos elementos do circuito equivalente obtidos de amostras de cDNA de uma paciente do sexo feminino infectada com HPV 6, 18 e 31 na concentração de $1-75 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ e controles negativos *Candida albicans*, *tnf- α* e leucemia linfóide aguda.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica (do inglês, <i>Atomic Force Microscopy</i>)
AuNPs	Nanopartículas de Ouro (do inglês, <i>Gold Nanoparticles</i>)
AuNPs-PAMAM	Nanopartículas de Ouro funcionalizadas com Polímero de Poliamidoamina (do inglês, <i>Gold Nanoparticles Functionalized with Polyamidoamine Polymer</i>)
BSA	Albumina do Soro Bovino (do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CECPO	Carcinoma Espinocelular de Orofaringe (do inglês, <i>Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma</i>)
CC	Câncer cervical
CCPD	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CPE	Elemento de Fase Constante
E	Potencial
I	Corrente elétrica
I_{pa}	Corrente de pico anódica
I_{pc}	Corrente de pico catódica
GA	Glutaraldeído
LCR	Região Longa de Controle
MS	Ministério da Saúde
ne^-	Número de elétrons
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORFs	Regiões de Leitura Aberta
ORI	Origem de Replicação
PAMAM	Polímero de Poliamidoamina (do inglês, <i>Polyamidoamine</i>)
PoC	Ponto de Atendimento (do inglês, <i>Point-of-care</i>)
PV	Papillomaviridae
PPy	Polipirrol
MWCNTs	Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas
qPCR	PCR em tempo real
R_{CT}	Resistência à transferência de carga

rGO	Óxido de grafeno reduzido
R_s	Resistência da solução
RT- qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UV-vis	Espectroscopia na região do UV-visível
VC	Voltametria Cíclica
Z	Impedância
Z'	Componente real da impedância
$-Z''$	Componente imaginária da impedância
Z_w	Impedância de Warburg

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	PAPILOMA VÍRUS HUMANO	21
2.1.1.	Aspectos moleculares e relação filogenética.....	21
2.1.2.	Ciclo de vida do HPV	25
2.1.3.	Manifestações clínicas e métodos diagnósticos	27
2.1.4.	Epidemiologia do HPV	30
2.2	BIOSSENSORES.....	32
2.2.1.	Classificação quanto ao elemento transdutor	35
2.2.2.	Classificação quanto ao elemento receptor	37
2.2.3.	Biossensores de DNA	40
2.3	MÉTODOS DE FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE SENSORA ..	41
2.3.1.	Nanomateriais	42
2.3.2.	Polímeros condutores	45
2.4	TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS.....	47
2.4.1.	Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	47
2.4.2.	Espectroscopia na região do UV-visível (UV-vis)	48
2.5.1.	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	49
2.5.4	Voltametria cíclica.....	53
2.5	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)	55
3	OBJETIVOS	59
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	59
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
4.1	MATERIAIS.....	60
4.2	SONDA DE OLIGONUCLEOTÍDIO E AMOSTRAS BIOLÓGICAS	60
4.3	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULA DE OURO REVESTIDA POR PAMAM (AuNPs+PAMAM)	61
4.4	MEDIÇÕES DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	61
4.5	MEDIÇÕES DE ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA VISÍVEL (UV-VIS).....	61
4.6	MONTAGEM DO SISTEMA SENSOR NANOESTRUTURADO	62

4.7	INSTRUMENTAÇÃO.....	63
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1	CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA DA PLATAFORMA GENOSENSORA.....	65
5.2	CARACTERIZAÇÃO POR FTIR.....	66
5.3	CARACTERIZAÇÃO DAS AUNPS+PAMAM-G5 POR MEIO DA UV- vis.....	67
5.4	CARACTERIZAÇÃO DO PPY POLIMERIZADO ELETROQUIMICAMENTE.....	68
5.5	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DA PLATAFORMA SENSORA.....	69
5.6	DESEMPENHO ANALÍTICO DA PLATAFORMA SENSORA FRENTE A SUBTIPOS DE HPV.....	72
5.6.1	Análise dos dados voltamétricos frente a genótipos de HPV.....	72
5.6.2	Análise dos dados impedimétricos frente a genótipos de HPV..	74
5.6.3	Amostras clínicas e teste de especificidade.....	82
5.6.4	Gráfico tridimensional para avaliar a resposta do HPV.....	86
6	CONCLUSÕES	88
7	PERSPECTIVAS	90
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
	APÊNDICE A.....	104

1 INTRODUÇÃO

O papiloma vírus humano (HPV) é uma infecção sexualmente transmissível (IST) que infecta peles e mucosas, e é constituído de DNA circular de fita dupla. A região genética inicial do vírus possui E6 e E7 responsáveis por regular a transcrição dos genes virais e L1 na região tardia que codifica a proteína principal do capsídeo (Thapa; Unger; Querec, 2023). São atualmente conhecidos mais de 200 genótipos de papilomavírus e a Agência Internacional de pesquisa sobre o câncer (IARC) os classifica conforme o seu potencial oncogênico em tipos de alto risco que causam o câncer (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) e baixo risco provocando verrugas anogenitais (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73 e 81) (Ozcelikay *et al.*, 2022).

Conforme estudos, aproximadamente 80% dos homens e mulheres ativos sexualmente devem contrair a infecção pelo menos uma vez até os 45 anos. Em indivíduos com o sistema imune saudável a clínica pode se limitar a quadros agudos temporários sem complicações, já em situações de fragilidade da imunidade a sintomatologia poderá ser agravada (Rasouli *et al.*, 2023). Em adição, o HPV é o principal responsável por causar o câncer cervical (CC) que no Brasil, com exceção dos tumores de pele não melanoma, é o terceiro câncer mais incidente entre mulheres. No ano de 2022 foram contabilizados cerca de 16.710 casos novos com risco de 15 infecções a cada 100 mil mulheres, sendo a região nordeste a segunda com maior número de incidência (Inca, 2021).

O diagnóstico da doença é feito mediante exames clínicos e laboratoriais, a depender das condições clínicas. O exame preventivo Papanicolau é comum para visualizar lesões que possam levar a pessoa a desenvolver o câncer do colo do útero, no entanto, não é capaz de identificar o vírus. Detectar de forma precoce o HPV permite um melhor prognóstico do paciente, e testes moleculares como a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) e ensaios de captura híbrida são bastante eficientes, específicos, mas necessitam de grande instrumentação, profissionais qualificados e protocolos de alto custo e complexos (Ferreira, 2023).

Desenvolver um instrumento econômico, portátil e de aplicação clínica, é

necessário para melhor prognóstico dos pacientes. Assim, os biossensores surgem como novas metodologias de diagnóstico que se destacam por ser uma ferramenta inovadora com características como alta sensibilidade, especificidade e portabilidade. São dispositivos responsáveis por converter uma informação química, como, concentração de um analito, num sinal analítico (John *et al.*, 2021). No biossensor, o reconhecimento ocorre por mecanismo bioquímico entre o transdutor e um receptor biológico imobilizado numa superfície.

Se tratando da imobilização de biomoléculas na superfície transdutora, os polímeros vêm sendo vistos como opção promissora na construção dos biodispositivos. Estes podem atuar como intermediários no processo de interação entre analito e receptor, e também na transdução do sinal, objetivando melhorar a sensibilidade, limite de detecção e tempo de resposta (Oliveira *et al.*, 2013), além disso estão associados a custo reduzido de produção e elevada reprodutibilidade. O polipirrol (PPy) é um dos mais utilizados por oferecer características vantajosas como: alta condutividade, baixo custo, estabilidade química e fácil síntese, visto que o monômero pirrol sofre oxidação por processos simples (Morawski, 2021).

Os nanomateriais como nanopartículas também podem ser utilizados na otimização de biossensores eletroquímicos. No entanto, uma desvantagem é que algumas partículas podem se aglomerar e afetar a resposta analítica, para isso, estabilizadores, como os polímeros auxiliam na preparação destes nanocompósitos impedindo a agregação de suas partículas. Assim, nanopartículas de ouro (AuNPs) encapsuladas em dendrímeros de poli (amidoamina) de 5^o Geração (PAMAM-G5) são uma aposta na construção de sensores, visto que o (PAMAM-G5) atua como estabilizador devido a sua estrutura tridimensional, baixa polidispersidade, tamanho nanométrico (2-100 nm) e flexibilidade da superfície (Razzino *et al.*, 2020).

Para identificar o HPV na superfície transdutora é possível utilizar técnicas baseadas na hibridação das cadeias de ácido desoxirribonucleico (DNA) complementares que ocorrem na superfície do transdutor por meio do monitoramento da variação do sinal de corrente, antes e depois da ligação das fitas complementares. As técnicas voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de

impedância eletroquímica (EIS) permitem detectar mudanças que acontecem durante este fenômeno na interface entre o eletrodo e a solução eletrolítica adjacente, com a vantagem de fornecer medição no tempo real (Rosario; Mutharasan, 2014). Estas técnicas são úteis para o desenvolvimento de biossensores portáteis, em que há convergência dos dados diagnósticos com conectividade baseada em telefone móvel, permitindo tecnologias potencialmente disruptivas (do Nascimento *et al.*, 2017).

Dada à gravidade dos cânceres causados pelo HPV e a ausência de tratamento específico, conforme descrito pelo centro de controle e prevenção de doenças (CCPD), torna-se latente a necessidade de um método de rastreamento precoce. Por isso, neste trabalho foi avaliado a construção de um genossensor, dispositivo capaz de detectar o DNA viral usando uma plataforma composta por: PPy-AuNPs+PAMAM-G5-MY09-BSA. O PPy irá estabilizar a superfície de reconhecimento, e as AuNPs+PAMAM-G5 possuem grupos amina em sua estrutura química que podem se ancorar na superfície e imobilizar a sonda degenerada MY09 (5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC -3'), a qual, identifica diferentes genótipos do HPV. O biossensor foi testado frente a plasmídeos recombinantes contendo o gene L1 do capsídeo viral e amostras de DNA complementar (cDNA) de pacientes infectados com HPV de baixo e alto risco. A sua seletividade foi testada frente a amostras de controle negativo de *Candida albicans* e células humanas hematológicas não infectada por HPV.

Visando desenvolver novas tecnologias para diagnóstico rápido e sensível do HPV, construiu-se uma plataforma biossensora baseada em filmes poliméricos de PPy e nanomaterial híbrido de ouro e dendrímeros (AuNPs+PAMAM-G5). A dissertação foi dividida em seis capítulos, onde o capítulo 1 discorre sobre os motivos para o desenvolvimento da pesquisa, o capítulo 2 conta com uma revisão da literatura contando com temas, como, o HPV e aspectos moleculares, ciclo de vida, principais métodos diagnósticos, biossensores e principais técnicas eletroquímicas VC e EIS. Também foi descrito sobre nanomateriais e polímeros condutores com enfoque em AuNPs+PAMAM-G5 e PPy. O capítulo 3 traz os objetivos para construção da dissertação, o capítulo 4 materiais e métodos usados nos experimentos, bem como técnicas de caracterização. O capítulo 5 mostra e discute os resultados relacionados à

plataforma genossensora e detecção de plasmídeos recombinantes contendo o gene L1 do HPV e cDNA de pacientes infectados pelo HPV. Por fim, o capítulo 6 traz as conclusões e perspectivas futuras.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

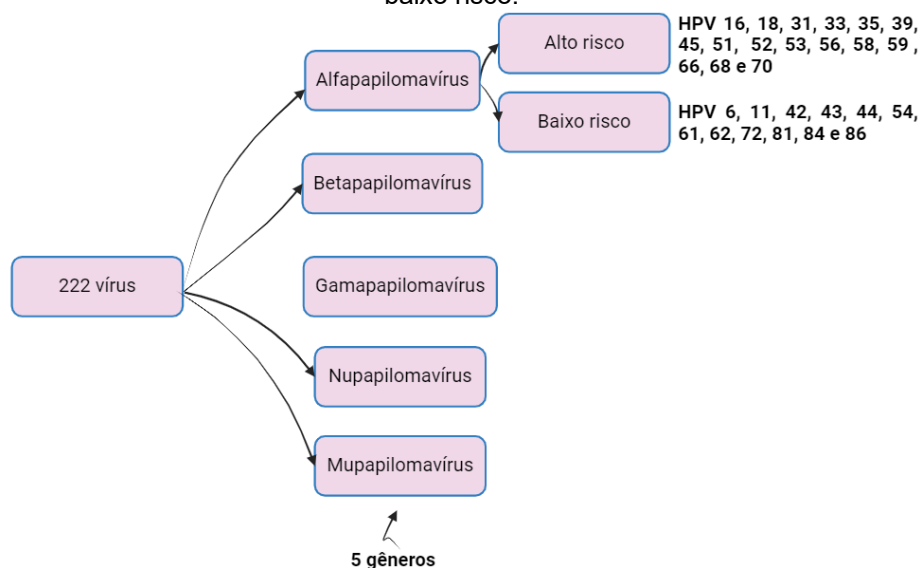
2.1 PAPILOMA VÍRUS HUMANO

2.1.1. Aspectos moleculares e relação filogenética

O HPV se trata de um vírus não envelopado, de DNA pertencente à família papillomaviridae (PV). Eles se adaptam especificamente ao organismo do hospedeiro pela sua capacidade de se mascarar a resposta imunológica (Oyouni, 2023). Atualmente, 222 vírus e 5 gêneros principais que infectam humanos foram caracterizados e associados a diferentes doenças: 65 alfapapilomavírus, 54 betapapilomavírus, 99 gamapapilomavírus, 3 mupapilomavírus e 1 nupapilomavírus. A depender do gênero difere o tropismo, a qual é a preferência de entrada viral desencadeada pela interação com a proteína do capsídeo L1 com a superfície celular (Cosper *et al.*, 2021).

Os gêneros beta, mu, nu e gama têm tropismo cutâneo, resultando geralmente em verrugas, já o alfa é preferencial pela mucosa, estando correlacionado as doenças mais graves, inclusive o câncer. Os papilomavírus alfa, são conhecidos como de baixo risco (LR) ou alto risco (HR) devido a sua capacidade de transformar células causando câncer (Fig. 1).

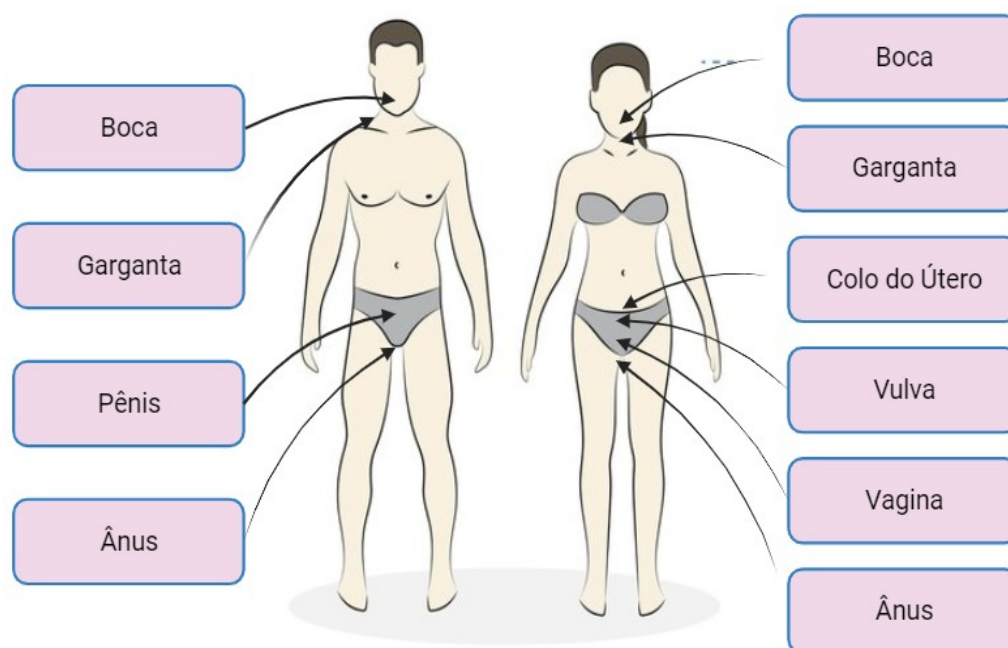
Figura 1 - Representação esquemática dos gêneros do HPV e classificação de alto risco e baixo risco.



Fonte: Autoria própria (2024).

Os LR como HPV 6 e HPV 11 normalmente ocasionam verrugas anogenitais (condiloma acuminado). Já o HR pode resultar em câncer como de boca, garganta, cervical, vulvar, anal, peniano, cabeça e pescoço e vaginal (Fig. 2). Dentro destes temos os tipos 16, 18, 33, 31, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 e 68, entre outros, e são eles os causadores de cerca de 5% de todos os tipos de cânceres a nível mundial (Cospes *et al.*, 2021).

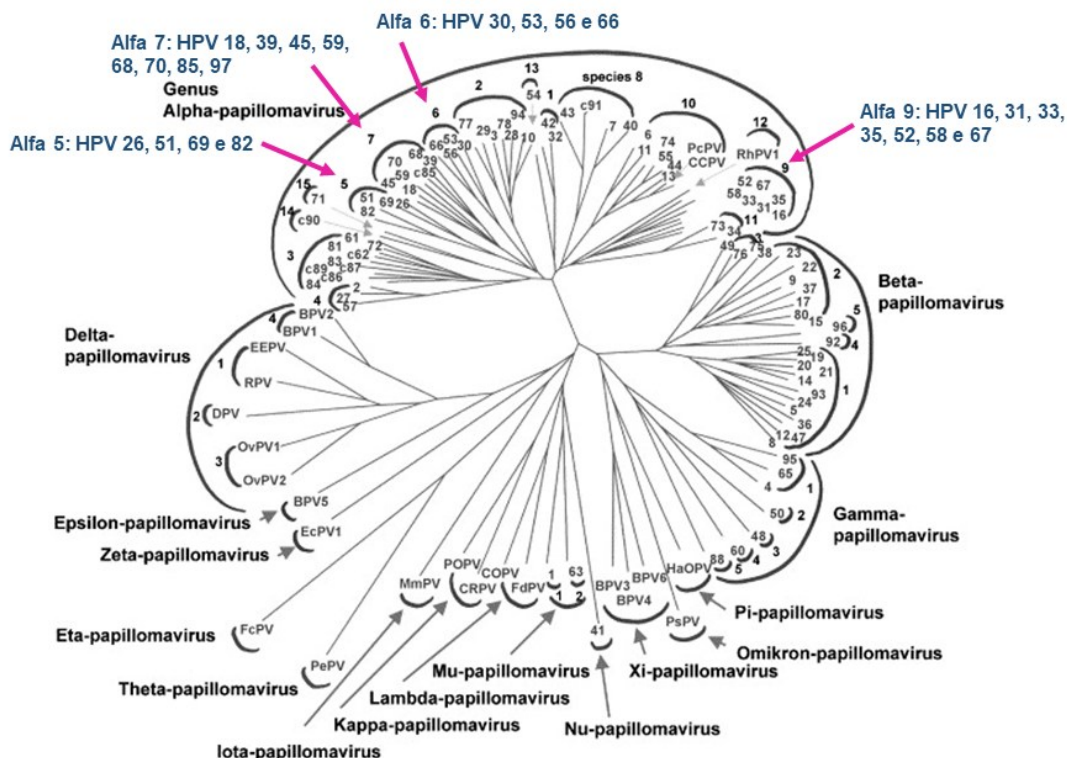
Figura 2 - Cânceres causados pelo HPV em homens e mulheres.



Fonte: Autoria própria (2024).

Os alfafapilomavírus se classificam ainda nas seguintes espécies: alfa-9 (HPV 16, 31, 33, 35, 52, 58 e 67), alfa-7 (HPV 18, 39, 45, 59, 68, 70, 85, 97), alfa-5 (HPV 26, 51, 69 e 82), alfa-6 (HPV 30, 53, 56 e 66), alfa-11 (HPV 34 e 73); alfa-10 (HPV 6 e 11), alfa-13 (HPV 54) e alfa-3 (HPV 61). Dentre estes, os grupos alfa-5, alfa-6, alfa-7 e alfa-9 estão mais frequentemente associados a carcinogênese anogenital (Chen *et al.*, 2018). Na Fig. 3, é possível analisar a diversidade filogenética do papilomavírus humano, que diferencia os subtipos de HPV. Em decorrência disto, subtipos de HPV pertencentes a um mesmo ramo são similares geneticamente entre si, quando comparado àqueles localizados em outros ramos (Combes; Franceschi, 2018).

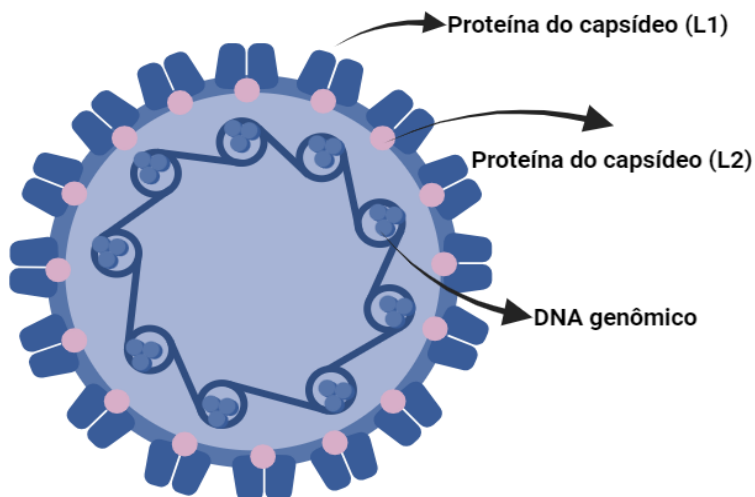
Figura 3 - Árvore filogenética do HPV destacando os grupos mais frequentes nos casos de carcinogênese anogenital.



Fonte: Adaptado de VILLIERS et al., (2004).

O PV possui cerca de 50 nm de diâmetro e tem em sua estrutura um capsídeo não envelopado com simetria icosaédrica. O DNA viral consiste numa dupla-hélice com variação do genoma de 5.784 a 8.607 nucleotídeos. Se tratando do capsídeo, este contém 12 moléculas da proteína L2 secundária e 72 pentâmeros da proteína L1 principal (Fig. 4) (Magalhães *et al.*, 2021).

Figura 4 - Representação esquemática do vírus do HPV.



Fonte: Autoria própria (2024).

Geneticamente, o HPV é um vírus estável dividido em três regiões: região longa de controle (LCR) e regiões de leitura aberta (ORFs) classificadas em região precoce (E). A região precoce (E) ocupa aproximadamente mais de 50% do genoma viral, e é responsável por transformar a célula humana infectada e codificar 6 ORFs, as proteínas: E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Cada proteína possui importância e funções diferentes, discutidas em detalhes na Tab. 1.

Tabela 1 - Função dos genes do papilomavírus humano.

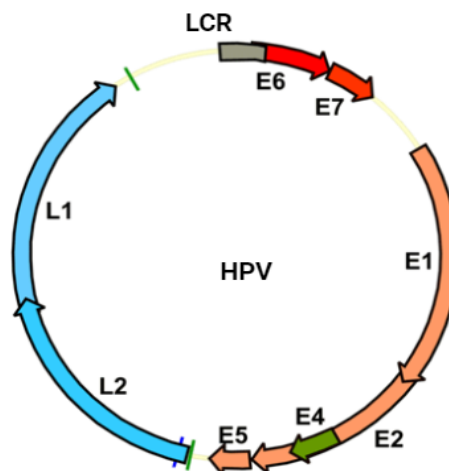
Genes	Função
E1	Helicase dependente de ATP essencial para a replicação do genoma viral e recruta proteínas de replicação do DNA da célula hospedeira.
E2	Responsável por ativar ou reprimir a transcrição do gene viral. Inicia a replicação do DNA viral interagindo com E1 e amarra os genomas virais aos cromossomos hospedeiros na mitose.
E4	Expressado durante estágios posteriores da infecção. Atua amplificando o genoma viral e possui papel na síntese viral, além de promover e contribuir para a liberação de vírions.
E5	Ativa vias de sinalização mitogênica e inibe a expressão de MHC I. Supressão de IFN- κ , além de modular o trânsito de proteínas de sinalização através do RE. Melhora as capacidades de transformação de E6 e E7.
L1	Principal proteína do capsídeo viral.
L2	Proteína menor do capsídeo viral, envolvida na encapsidação do DNA viral, associa-se ao DNA viral para auxiliar no tráfego para o núcleo hospedeiro.

E, genes precoces; L, genes tardios.

Fonte: Adaptado de Cosper *et al.*, (2021).

A região tardia (L) induz produção de proteínas L1 e L2 que constituem a cápsula do vírus. Os genes centrais E1, E2, L1 e L2 desempenham funções essenciais durante o ciclo de vida do vírus. E6, E5 e E7 são acessórios, por isso, não são encontrados em todos os tipos de PVs. A região LCR se localiza entre as ORFs L1 e E6, abrange a origem da replicação viral e é o local para fatores de transcrição celulares e virais. A proteína L1 se destaca como a principal formadora do capsídeo viral, além de ser altamente imunogênica e utilizada como base vacinal para prevenir a infecção por HPV (Magalhães *et al.*, 2021). Na Fig. 5 abaixo é demonstrado a estrutura do genoma do HPV:

Figura 5: Representação esquemática do genoma do HPV, exemplificando o arranjo das proteínas precoces (E), região longa de controle (LCR) e os genes capsídeos (L1 e L2).

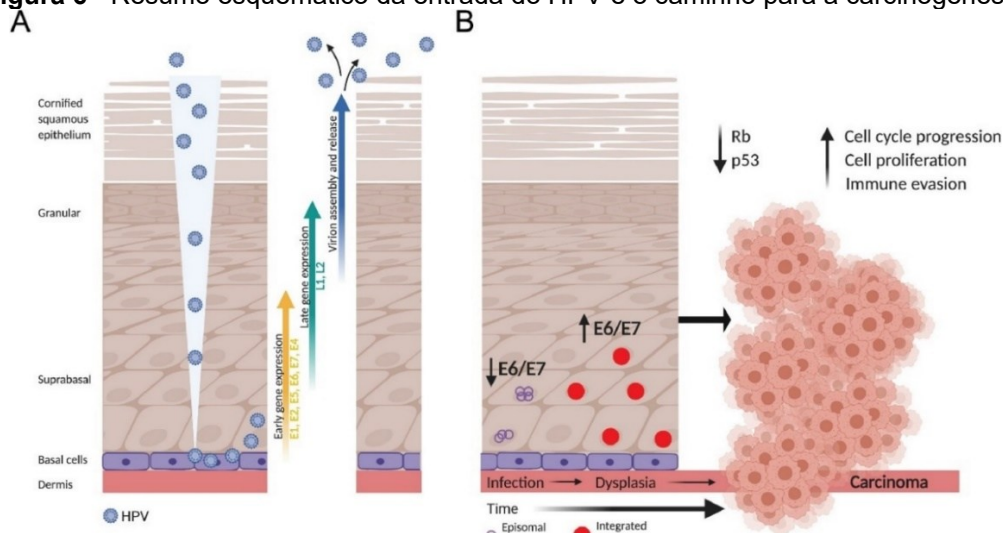


Fonte: Adaptado de Stanley, (2012).

2.1.2. Ciclo de vida do HPV

O ciclo de vida viral do HPV, é essencial para entender o mecanismo de transformação celular, o qual, ocorre na oncogênese. O vírus possui como alvo os epitélios escamosos cutâneos ou da mucosa, que possuem uma camada basal de células indiferenciadas, seguido de células escamosas, suprabasais, granulares e cornificadas como a mais externa. Estas vão se tornando mais diferenciadas na direção externa, e o ciclo depende desta diferenciação das células-alvo, os queratinócitos (Cospier *et al.*, 2021; Crosbie *et al.*, 2013) (Fig. 6).

Figura 6 - Resumo esquemático da entrada do HPV e o caminho para a carcinogênese.



Fonte: Cospier *et al.*, (2021).

Para dar início a infecção, o HPV entra nas células basais mitoticamente ativas, localizadas no epitélio escamoso, por meio de feridas e micro abrasões na pele, áreas orofaríngeas e órgãos genitais (Fig. 6a). Seguida a infecção, inicia-se o ciclo de replicação do próprio genoma viral por meio das proteínas E1, E2 e E4, já a proliferação das células hospedeiras e prevenção da apoptose ocorre por meio de E6 e E7. Enquanto ocorre a diferenciação dos queratinócitos (mostrado na direção para cima da Fig. 6), L1 e L2 são transcritos para em seguida empacotar as cópias do DNA viral recém-replicado em capsídeos; os vírions completos são então eliminados da superfície (Fig. 6b). Com a integração do genoma viral ao DNA do hospedeiro, e consequente superexpressão de E6 e E7, a regulação do ciclo celular é interrompida, causando a imortalização de células anômalas (Cosper *et al.*, 2021; Crosbie *et al.*, 2013).

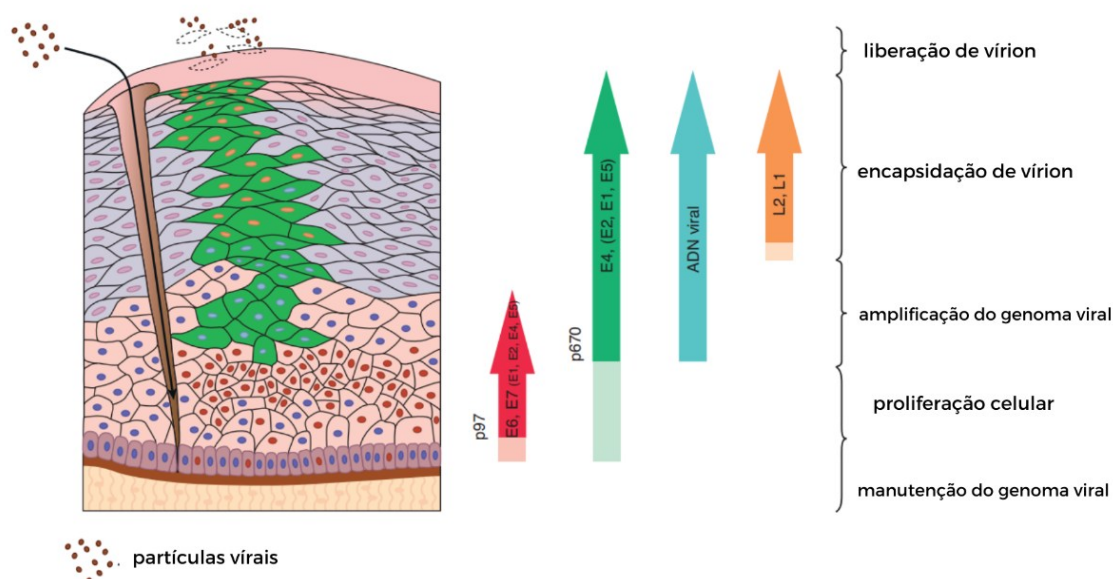
O ciclo de vida produtivo do HPV pode ser dividido em três fases: estabelecimento, manutenção e amplificação vegetativa/proliferativa. Uma vez dentro da célula, as partículas virais perdem o capsídeo e entram no núcleo. Inicialmente, o vírus replica-se e se estabelece no núcleo da célula hospedeira, utilizando a maquinaria do hospedeiro para sua autorreplicação. Nesta etapa de estabelecimento, ocorre o processo de transcrição viral e amplificação do genoma após entrada no núcleo. As proteínas E1 e E2 auxiliam na amplificação do genoma, e o DNA viral é mantido como epissomas. E1 recruta E2, que possui importante função no início da replicação do DNA viral, por se ligar à origem de replicação (ORI) no LCR. A E1 recruta proteínas de replicação do DNA para formar um complexo específico. E2 então se dissocia do complexo E1/E2/ori com gasto de energia e o complexo E1 resultante tem capacidade de desenrolar o vírus de DNA (ADN) e recrutar fatores no hospedeiro para sua replicação (Crosbie *et al.*, 2013).

A fase de manutenção se inicia no intuito de manter constante o número de genomas virais e estabelecer o curso da infecção. O genoma viral é replicado uma vez por fase S do ciclo celular. Nesta etapa, E2 é crucial para ligar o genoma aos cromossomos do hospedeiro, auxiliando a partição do genoma em células-filhas durante a mitose. Durante este período, os genomas do HPV podem permanecer nas células epiteliais por anos ou décadas após a infecção inicial, possibilitando a formação de lesões precursoras pré-malignas com displasia

celular, que podem ser revertidas ou avançar de forma espontânea para o cancro invasivo (Reinson *et al.*, 2015).

Durante certo tempo, os HPVs saem da manutenção estável. Após ter sido infectada, as células diferenciam-se e seguem em direção à superfície do epitélio. O processo de síntese de DNA viral é suportado, o que normalmente não seria possível, devido às proteínas virais E6 e E7 que ativam a maquinaria de replicação do DNA da célula hospedeira. E6 e E7 são produzidas em quantidades rigorosamente controladas nas camadas profundas do epitélio. Essas proteínas inibem as proteínas p53 e pRb, que são fundamentais na regulação do ciclo celular. Esta é a fase proliferativa da infecção, a qual, o HPV replica seu genoma e o número de células infectadas aumenta. L1 e L2 vão ser expressas posteriormente, causando a montagem, maturação e liberação viral das células epiteliais mais externas de forma não-lítica (Fig. 7) (Reinson *et al.*, 2015).

Figura 7 – Representação esquemática do ciclo viral do HPV.



Fonte: Adaptado de Mirghani, (2016).

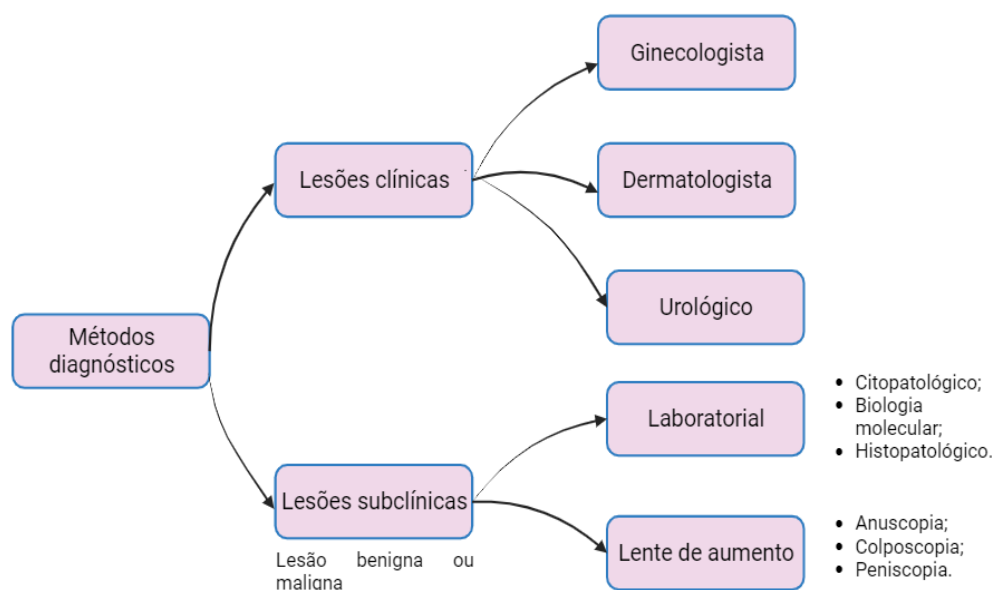
2.1.3. Manifestações clínicas e métodos diagnósticos

Como citado anteriormente, os tipos de HPV apresentam tropismo tecidual diferenciado, e consequentemente podem apresentar sintomatologias distintas, desde lesões, como verrugas, até alto grau de potencial oncogênico. Assim, o diagnóstico deste vírus pode ser realizado por meio de exames clínicos

ou laboratoriais a depender da lesão, se for clínica ou subclínica (Prates *et al.*, 2020). Por isso, é importante ressaltar as três formas de apresentação da infecção pelo HPV e como pode ser feita a identificação da doença mediante estas, sendo elas: latente, subclínica e clínica (Saúde, 2020).

1. **Latente:** o paciente não apresenta lesão e pode permanecer assim por toda a vida, com exceção de alguns indivíduos que após anos manifestam sintomas, como condilomas ou alterações celulares no colo do útero. Nesse caso, sem sintomas e manifestações clínicas, citológicas ou histológicas, apenas exames de biologia molecular detectariam a infecção pelo vírus;
2. **Subclínica:** se dá quando microlesões são identificadas por meio de exames de papanicolau e/ou colposcopia, sem ou com biópsia. Os tipos de HPV oncogênicos podem causar lesões precursoras do carcinoma escamoso da cervical uterina;
3. **Clínica:** conhecida comumente como verruga genital ou condiloma acuminado. A depender da localização anatômica são dolorosas ou pruriginosas. Em homens afeta regiões como a glândula, sulco bálano-prepucial e região perianal. Já na mulher, a vulva, região perianal, vagina, períneo e colo. Com menor frequência é possível estar presente em áreas extragenitais, como, mucosa nasal, oral e laríngea.

Com relação aos exames diagnósticos para as lesões clínicas, a depender do tecido afetado pelas verrugas genitais, como, por exemplo, pele, pênis ou vulva, o paciente deverá ser encaminhado para o dermatologista, urologista e ginecologista respectivamente. Quando as lesões forem subclínicas, são recomendados testes que utilizam lentes de aumento (poder de magnificação): anoscopia, colposcopia e peniscopia; como, exames laboratoriais: citopatológico ou papanicolau, biologia molecular e histopatológico que permitem distinguir a lesão benigna da maligna (Fig. 8). Conforme o Ministério da Saúde (MS), não há atualmente testes que identifiquem os diferentes tipos de HPV no rastreamento de pessoas assintomáticas e na rotina clínica, para diagnosticar a infecção (Saúde, 2020).

Figura 8 - Representação esquemática do diagnóstico do HPV.

Fonte: Autoria própria (2024).

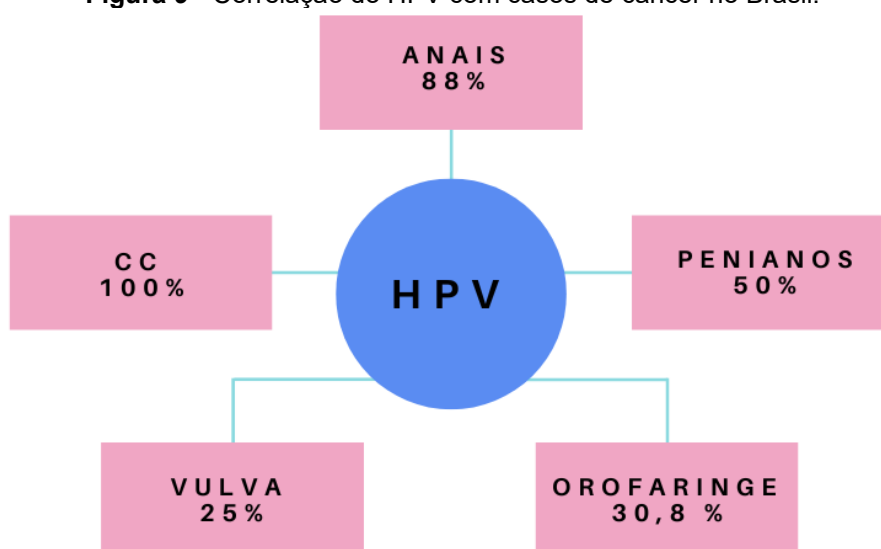
Para identificar os diferentes genótipos do HPV, já existem alguns outros métodos em estudo, como os baseados em ácidos nucleicos, southern blotting, diferentes modificações em cadeia da polimerase (qPCR), hibridização in situ e hibridização dot-blot. Algumas outras técnicas como histoquímica ou imunocitoquímica, ensaios de captura híbrida, reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) são eficazes, entretanto, apresentam limitações, como alto custo, processos laboriosos e necessitam de profissionais bem instruídos (Pareek *et al.*, 2023).

Técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas para realizar a amplificação gênica e é útil como padrão ouro para diagnóstico do HPV por ser bastante específico e sensível. No entanto, a demanda de altos investimentos, aquisição de reagentes, mão de obra e equipamentos revelam a necessidade de métodos mais práticos e acessíveis com a mesma precisão (Saúde, 2020). Os biossensores eletroquímicos têm sido estudados como possibilidade promissora para a detecção do vírus, pelas suas vantagens como baixo custo, fácil fabricação, portabilidade, alta sensibilidade, compatível fabricação em grande escala e manuseio simples. Assim, estes biodispositivos são uma possibilidade de diagnóstico de DNA no local de atendimento (Pareek *et al.*, 2023).

2.1.4. Epidemiologia do HPV

O HPV é a IST de maior prevalência no mundo, e a maioria dos indivíduos com vida sexual ativa já contraíram o vírus. Os efeitos carcinogênicos do HPV são evidenciados mundialmente, sendo responsável por 5,1% dos cânceres. Atrelado a isso, no Brasil, o HPV está presente em aproximadamente 100% dos casos de CC, 88% dos tumores anais, 50% dos tumores penianos, 30,8% orofaringe e 25% vulva (Inca, 2021) (Fig. 9).

Figura 9 - Correlação do HPV com casos de câncer no Brasil.



Fonte: Adaptada de Inca, (2021).

Em 2023, um estudo multicêntrico que incluiu o Brasil, estimou 10.700 mortes por HPV que poderiam ser evitadas (Rumgay *et al.*, 2023). Dentre os genótipos de HPV descritos na literatura, os 16 e 18 são responsáveis por aproximadamente 71% dos casos de CC e por mais da metade dos outros tipos de cânceres causados pelo HPV. Já o HPV de baixo risco 6 e 11 estão presentes em cerca de 90% dos casos de verrugas genitais (Ambiente, 2024).

Um estudo epidemiológico sobre a prevalência do HPV no Brasil, que contou com 26 capitais, incluindo na população homens e mulheres na faixa etária de 16 a 25 anos. Revelou taxas de prevalência de 52,3% a 63,5% de infecção pelo HPV, e 39,8% a 53,1% de HPV de alto risco (Associação Hospitalar Moinhos de Vento, 2020). A Fig. 10 demonstra a prevalência geral por cidades:

Figura 10 - Prevalência de HPV por região do Brasil.



Fonte: Associação Hospitalar Moinhos de Vento (2020).

Os Carcinomas Espinocelulares de Orofaringe (CECPO) são considerados um desafio de saúde pública. Em 2020, a IARC registrou 98.421 casos de CECPO no mundo. O perfil epidemiológico dos pacientes sofreu alterações principalmente nos fatores etiológicos, antes, o tabaco e álcool eram os principais contribuidores, atualmente o HPV é reconhecido como a principal causa destes tumores. Ademais, várias pesquisas indicam o HPV 16 como agente etiológico dos cânceres de cabeça e pescoço, e o HPV 16 está frequente em 90% dos casos de HPV (Ferreira, 2023).

Se tratando dos fatores de prevalência, destacam-se a idade e questões socioeconômicas. Uma meta-análise, incluindo 78 estudos ao nível mundial, revelou que há maior prevalência da infecção por HPV em mulheres com menos de 35 anos. Outro fator, é o grau de desenvolvimento do país, países subdesenvolvidos apresentam alta prevalência desta condição. Isto pode ser explicado, pelo diferente acesso e assistência do sistema de saúde aos diversos grupos da sociedade, sendo mais carente de informação nestes países (Kops *et al.*, 2021).

No Brasil, segundo uma revisão sistemática, a maioria dos estudos epidemiológicos encontrados na literatura dizem respeito às regiões Sul e Sudeste, as quais são mais populosas e desenvolvidas socioeconomicamente. O CC se mostrou mais prevalente nas regiões Centro-Oeste e Nordeste, o que pode ser justificado por serem mais populosas, pobres e com piores indicadores de saúde no geral (Colpani *et al.*, 2020).

Outro ponto que merece destaque é que, 5 a 30% dos indivíduos estão infectados por mais de um genótipo do HPV (Saúde, 2020). O CC é considerado como terceira causa de morte em mulheres, que afeta primordialmente a faixa etária entre 25 a 64 anos, com vida sexual ativa. Por ano, estima-se que são identificados 570 mil novos casos de CC, considerado como a quarta maior causa de câncer em mulheres, levando a cerca de 311 mil óbitos por ano (Tallon *et al.*, 2020).

Apesar da eliminação do CC ser uma prioridade da OMS, a pandemia do Coronavírus 2019 (COVID-19) causou um impacto que poderá comprometer o alcance das metas propostas. No Brasil, os exames de rastreamento e diagnóstico de câncer diminuíram em 2020 em comparação com 2019, os exames citopatológicos caíram 42%. Este cenário pode ser uma oportunidade de reavaliar as ações de controle, como, por exemplo, a inovação de novas tecnologias. Incorporar testes moleculares na triagem clínica traria pontos interessantes a serem analisados. Como, um possível aumento da idade de início dos exames de 25 para 30 anos, maior intervalo entre os testes de triagem, devido à alta sensibilidade proposta pela tecnologia e consequente melhor prognóstico dos pacientes (Corrêa *et al.*, 2022).

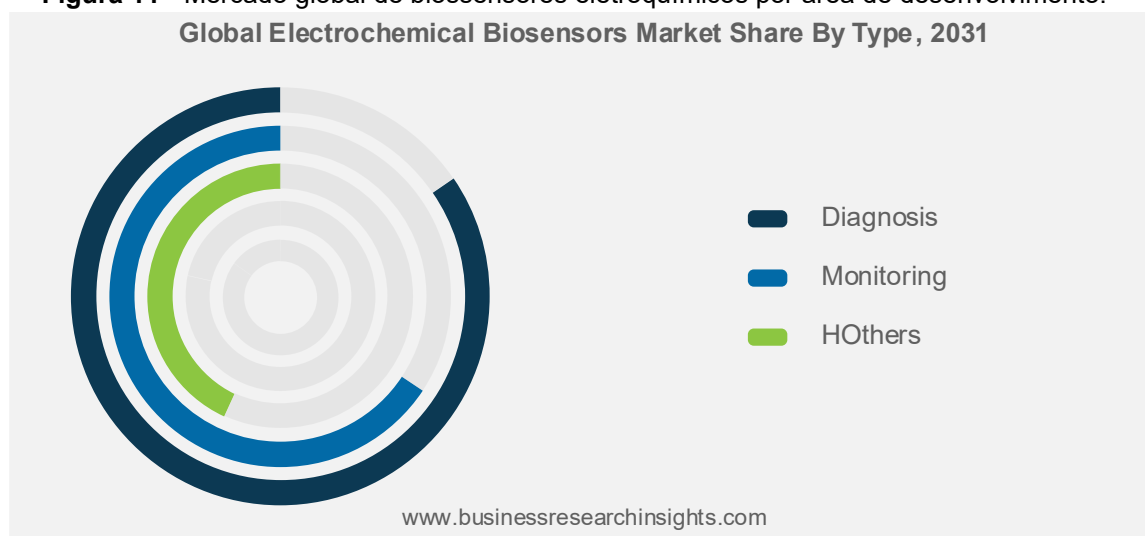
2.2 BIOSSENSORES

O corpo humano dispõe de sensores, os quais, vão captar e reconhecer as informações do ambiente, ou seja, são responsáveis por reagir a estímulos e processar em um sinal. A primeira aplicação de dispositivos sensores na área de saúde foi em 1962, aonde Clark e Lyons construíram um sensor para detectar a glicose no sangue, por meio de transdução potenciométrica e usando a enzima

glicose oxidase, como molécula de biorreconhecimento do analito alvo (Clark; Lyons, 1962).

Segundo uma pesquisa divulgada, o mercado de biossensores têm crescido de forma considerável nos últimos anos. Os biossensores eletroquímicos, em escala global, teve o mercado estimado num valor de US\$ 24,60 bilhões em 2022, e a previsão é de atingir US\$ 54,21 bilhões até 2031. Atrelado a isso, os biossensores possuem variadas aplicações, como, por exemplo, monitoramento de toxinas alimentares, controle ambiental, qualidade de água e diagnóstico clínico; e o mercado se segmenta em diagnóstico, monitoramento e outros. Nos últimos anos, ocorreu aumento acentuado da necessidade de haver dispositivos descartáveis que sejam de fácil portabilidade, acessível e com resposta em curto tempo. Assim, a previsão é de uma dominância do mercado de diagnóstico, por detectar de forma precoce as doenças e auxiliar no tratamento (Insights, 2023) (Fig. 11).

Figura 11 - Mercado global de biossensores eletroquímicos por área de desenvolvimento.

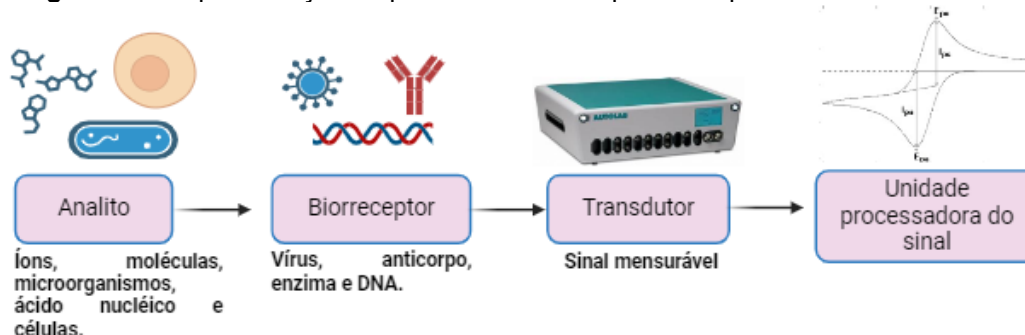


Fonte: Insights (2023).

O biossensor é capaz de dispor de informações analíticas, usando os seguintes componentes: analito, biorreceptor, transdutor e uma unidade processadora de sinal (Fig. 12). Neste sentido, o analito será a substância que se deseja quantificar e detectar, como, por exemplo, células, microrganismos, moléculas e íons. Se tratando do elemento de reconhecimento biológico, estes podem ser enzimas, bactérias, anticorpos, DNA e até mesmo receptores de drogas. O reconhecimento específico entre o analito a ser analisado e o

biorreceptor é convertido pelo transdutor em sinais elétricos, como potencial (E), corrente elétrica (i), capacitância (C) e outros. Desta forma, usando uma unidade processadora de sinal é possível realizar a detecção do analito alvo por meio de técnicas como a Voltametria Cíclica (VC) e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) (Amaral *et al.*, 2023).

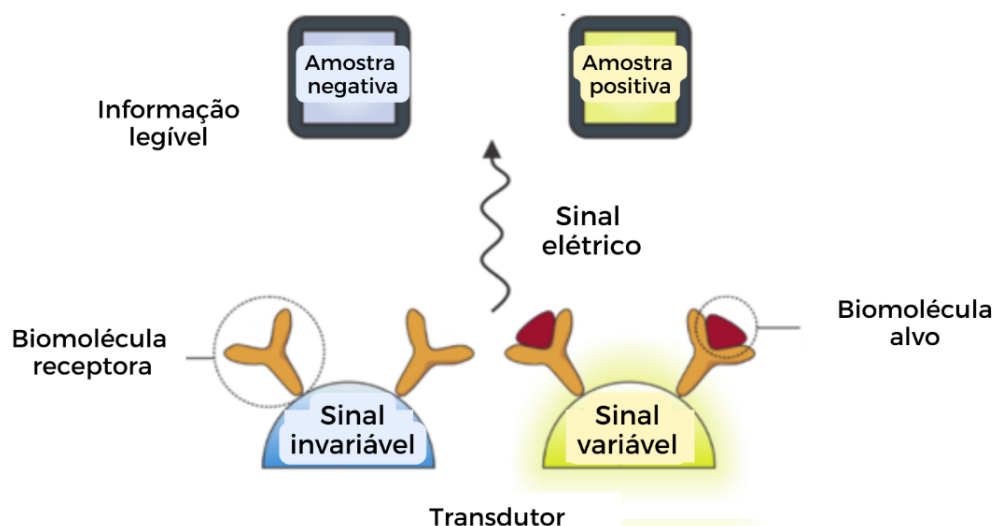
Figura 12 - Representação esquemática dos componentes presentes no biossensor.



Fonte: Autoria própria (2024).

Como citado anteriormente, diversos elementos biológicos podem ser usados para a construção de uma plataforma sensora. Mas, é preciso fazer a escolha adequada do elemento biológico para garantir a especificidade do sensor desenvolvido (Fig. 13) (Vo-Dinh; Cullum, 2000).

Figura 13 - Mecanismo de interação de um biossensor.



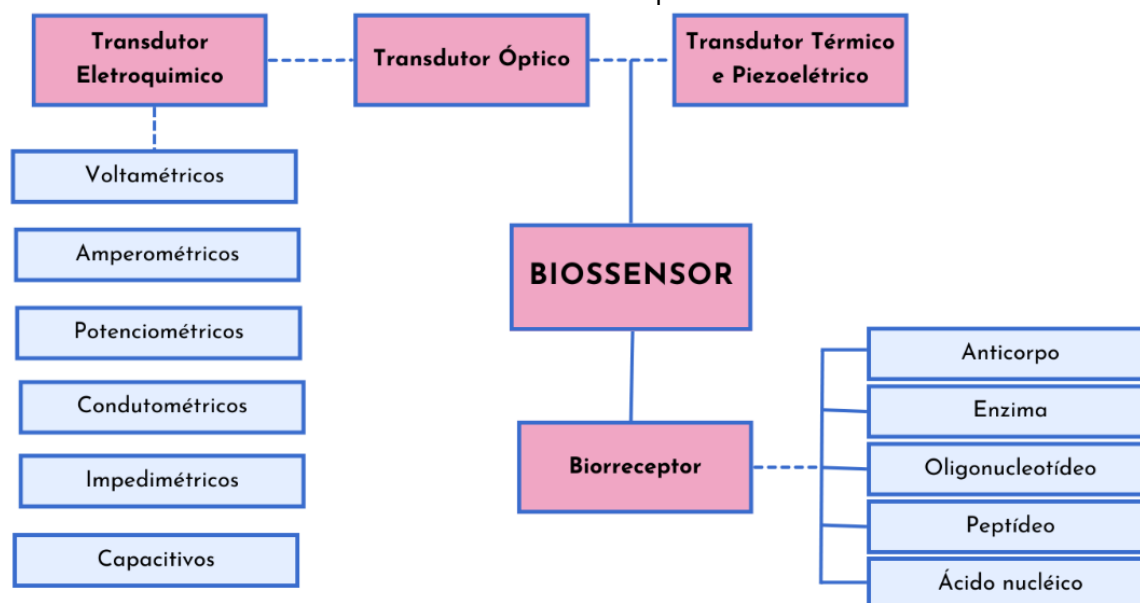
Fonte: Adaptado de Garrote; Santos; Bueno (2020).

Os biossensores tem se destacado pela sua elevada seletividade, estabilidade, sensibilidade, tempo de resposta e baixo custo. Estes são uma

aposta tecnológica, já que podem ser usados em formato miniaturizado, permitindo a sua aplicação no local em que a análise médica for solicitada, ou seja, no formato *point-of-care* (PoC).

Com relação a estes biodispositivos, podem se classificar ainda com base na natureza do receptor e pela forma de transdução do sinal físico-químico. A Fig. 14 traz de forma esquemática a classificação.

Figura 14 - Representação esquemática da classificação dos biossensores quanto ao transdutor e biorreceptor.



Fonte: Autoria própria (2024).

2.2.1. Classificação quanto ao elemento transdutor

Consoante ao método de transdução de sinal e a natureza da energia medida, os biossensores podem ser classificados em:

- **Biossensores térmicos:** também conhecidos como biossensores calorimétricos. Os primeiros biossensores baseados na utilização de enzimas, foram desenvolvidos por Clark e Lyons em 1962, esses dispositivos detectam variações de calor ou temperatura durante a interação receptor-analito. As mudanças na quantidade de calor ou temperatura estão relacionadas com a entalpia molar das substâncias, o número de reagentes consumidos ou produtos formados durante a reação (Burk; Harari; Chen, 2013; Ramanathan; Danielsson, 2001). Enzimas, células, DNA e anticorpos são elementos comuns de biodeteção

utilizados na construção desses biodispositivos, úteis para uma variedade de aplicações, como estudos de hibridação de DNA, ensaios enzimáticos, controle de qualidade e vigilância ambiental (Li *et al.*, 2017).

- **Biossensores piezoelétricos:** esses biossensores empregam cristais anisotrópicos, como o quartzo, como transdutores de sinal devido à sua frequência de ressonância natural. O princípio de funcionamento consiste em aplicar uma tensão alternada sobre o cristal, e assim detecta-se uma frequência específica correlacionada à massa e às constantes elásticas do material. No entanto, algumas alterações no valor de frequência são perceptíveis na superfície do cristal, ao imobilizar o elemento receptor, e expor o biossensor a um analito. Tais mudanças podem ser explicada pela massa da substância em estudo. A microbalança de cristal de quartzo é uma das técnicas mais comuns para o desenvolvimento de biossensores piezoelétricos (do Nascimento *et al.*, 2017; Zhou; Du, 2022).
- **Biossensores ópticos:** são instrumentos que utilizam mudanças nas propriedades da luz para caracterizar o processo de construção de biossensores e monitorar a concentração do analito. Isso inclui analisar medições como absorção e transmissão de energia eletromagnética, índice de refração, fluorescência, fosforescência e refletividade. As vantagens destes biossensores incluem alta sensibilidade, facilidade de integração de sinal, detecção sem necessidade de marcadores e respostas em tempo real. A técnica de ressonância de plásmons de superfície é especialmente destacada no desenvolvimento de ensaios ópticos de biossensibilidade (Zhang *et al.*, 2017).
- **Biossensores eletroquímicos:** representam uma das principais categorias de biossensores devido à sua alta sensibilidade e facilidade de uso em ensaios analíticos. Esses dispositivos medem mudanças nas propriedades físico-químicas do meio, como a difusão de espécies eletroativas, armazenamento de carga e transferência de elétrons na interface. Os transdutores são eletrodos feitos de materiais inertes, como ouro, carbono vítreo e platina. Dependendo da propriedade que irá ser estudada, durante o processo de reconhecimento biológico, os biossensores eletroquímicos podem ser categorizados como:

amperométricos, potenciométricos, condutimétricos ou impedimétricos (Vásquez *et al.*, 2017; Wang; Dai, 2015).

2.2.2. Classificação quanto ao elemento receptor

Inicialmente podem ser classificados pelo mecanismo de interação entre a molécula imobilizada e o analito alvo, e os eventos bioquímicos resultantes. Assim, são descritos como biocatalíticos ou de bioafinidade. Os biocatalíticos se caracterizam pela enzima agir como elemento sensível e gerar um sinal eletroquímico por meio de uma reação catalítica específica; o receptor biológico ao catalisar a reação química converte o analito em subprodutos que serão identificados futuramente. Já a bioafinidade, é quando o receptor biológico reconhece um alvo molecular e forma um complexo estável, que gera como resposta um sinal de transdução. Nesta situação, a interação entre analito/receptor não irá levar ao consumo do analito, pela molécula biológica imobilizada. Exemplos, os quais, são aplicados neste sistema: antígenos, anticorpos, aptâmeros, ácidos nucleicos, lectinas e receptores proteicos (Amaral *et al.*, 2023; Oliveira *et al.*, 2008; Vo-Dinh; Cullum, 2000).

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o elemento receptor em diversas categorias, dependendo do tipo de biomolécula utilizada para reconhecer o analito alvo. Alguns exemplos são:

- **Biossensores enzimáticos:** enzimas são usadas como elemento receptor, associadas a biocatalisadores contendo uma camada de detecção. Um transdutor irá quantificar o produto que será consumido ou formado, e servirá como princípio de detecção. As enzimas mais utilizadas nesses biossensores são oxidases, estas vão reagir com o oxigênio dissolvido para gerar peróxido de hidrogênio (Córcoles; Boutelle, 2013). Outros exemplos de enzimas utilizadas são: álcool desidrogenase, glicose oxidase e penicilinase (Lee *et al.*, 2018; Ramanavicius *et al.*, 2017). Clark e Lyons em 1962, foram os pioneiros na criação de um biossensor enzimático, eles desenvolveram um biossensor amperométrico para detectar a glicose (Sumitha; Xavier, 2023). Esses biossensores operam

com base no modelo "chave e fechadura", seguindo o mecanismo altamente específico da enzima-substrato, o que acarreta um alto grau de especificidade. Algumas aplicações são o monitoramento ambiental, alimentar, detecção de metais e pesticidas. A desvantagem é que é possível a perda da atividade, com necessidade de reposição da camada enzimática em períodos específicos (Loguercio, 2019).

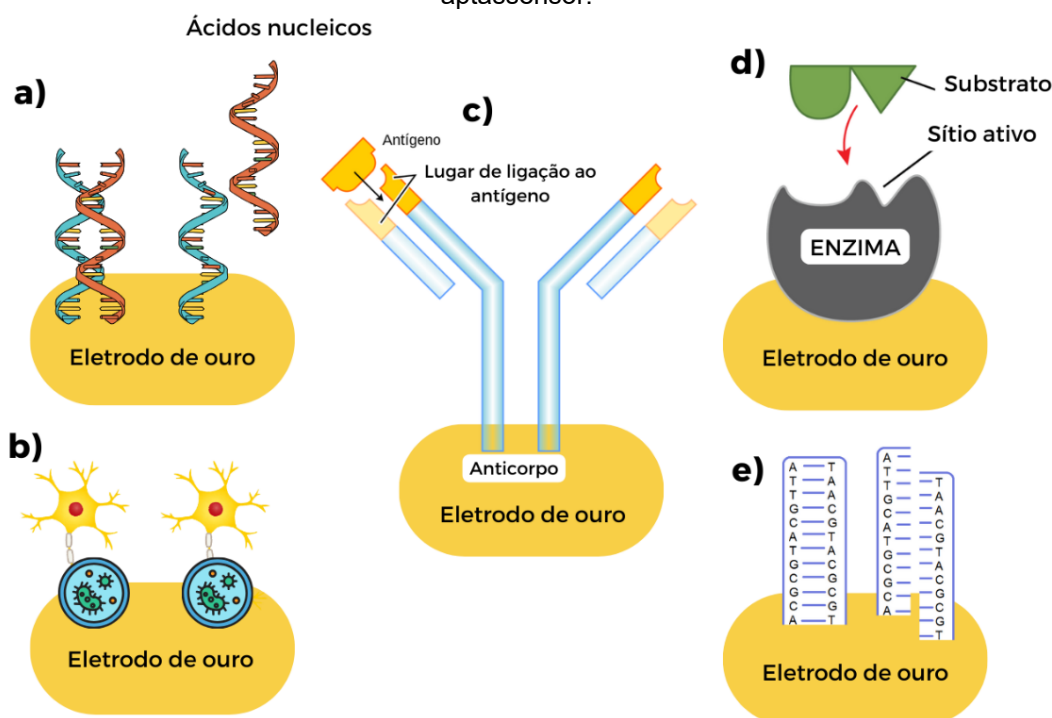
- **Imunossensores:** São dispositivos que imobilizam antígenos ou anticorpos numa superfície transdutora. A estrutura do anticorpo consiste na imunoglobulina (Ig), duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L), com partes constantes e variáveis, com a última específica para determinado antígeno (Holford; Davis; Higson, 2012). A biodetecção é dada pela reação imunológica que irá conduzir a formação de complexos antígeno-anticorpo, com alta especificidade, estabilidade e versatilidade. Diversos métodos podem ser usados para imobilizar os reagentes imunológicos, tais como automontagem, adsorção física, ligação covalente, incorporação e reticulação. Analitos, os quais, podem ser investigados por imunossensores, são hormônios proteicos, toxinas alimentares, drogas, bactérias e vírus (D'Orazio, 2011; Luppá; Sokoll; Chan, 2001).
- **Aptassensores:** o elemento receptor são os aptâmeros, que consistem em sequências sintéticas de ácido nucleico, os quais, segmentos de oligossacarídeos, aminoácidos, proteínas e peptídeos (Fu; Manthiram, 2012; Zhao *et al.*, 2018). Os biossensores baseados em aptâmeros têm como vantagem eficiente capacidade de ligação, estes são sintetizados para ter uma conformação estrutural que garanta alta especificidade e afinidade para alvos de interesse biológico ou farmacêutico, como íons, pequenas moléculas ou proteínas (Cincotto *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2011). No entanto, um desafio significativo no desenvolvimento de biossensores baseados em aptâmeros é que, por serem ácidos nucleicos, podem reduzir a eficiência do ensaio e aumentar os custos de produção (Wang *et al.*, 2017).
- **Microbiológicos e celulares:** são biossensores baseados em células como elemento receptor, e biossensores microbiológicos na maioria das

vezes também se classificam como celulares. Entretanto, na classe celular qualquer célula viva é usada como elemento de biodeteção, seja de microrganismo ou não. Entre suas aplicações, podem ser usados para detectar doenças de forma precoce, identificar patógenos e em testes toxicológicos. Também servem para caracterizar a ação de diversos fármacos, como ação de drogas antineoplásicas sobre células cancerígenas (Liu *et al.*, 2014). Já nos biossensores microbiológicos bactérias, fungos e leveduras atuam como elemento de biodeteção. Nestes, microrganismos são imobilizados na superfície transdutora, exemplos de aplicações estão principalmente na área ambiental e no diagnóstico de doenças infecciosas (Sun *et al.*, 2015).

- **Genossensores:** Os genossensores ou biossensores de DNA são dispositivos que detectam moléculas de DNA como analito. Eles operam com sondas de DNA de fita simples (ssDNA) como elementos de bioreconhecimento, as quais são fixadas na superfície do transdutor, convertendo o evento de hibridação do DNA em um sinal elétrico mensurável. Os genossensores ou biossensores de DNA são dispositivos que detectam moléculas de DNA como analito. Eles operam com sondas de DNA de fita simples (ssDNA) como elementos de bioreconhecimento, as quais são fixadas na superfície do transdutor, convertendo o evento de hibridação do DNA em um sinal elétrico mensurável. Esses biossensores utilizam uma sonda complementar como bioreceptor, a qual se liga ao alvo de interesse, desencadeando uma reação bioquímica que permite a conversão por meio do transdutor de um sinal químico em um sinal elétrico. A principal vantagem dos biossensores de DNA é seu baixo custo, possibilidade de miniaturização e análise rápida, o que os torna uma alternativa valiosa aos ensaios genéticos convencionais. São utilizados no diagnóstico de doenças, detecção de patógenos em amostras biológicas, como, saliva, urina e sangue, em testes de segurança alimentar, monitoramento ambiental e até identificação de espécies de plantas (Lima, 2023; Lin *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017).

A Fig. 15 esquematiza a classificação dos biossensores quanto ao elemento receptor. A seção seguinte dará enfoque aos genossensores como biorreceptores na identificação de analitos.

Figura 15 - Representação esquemática dos tipos de biossensores com base na natureza do receptor: a) ácido nucleico; b) baseado em células; c) anticorpo/antígeno; d) enzimático; e) aptassensor.

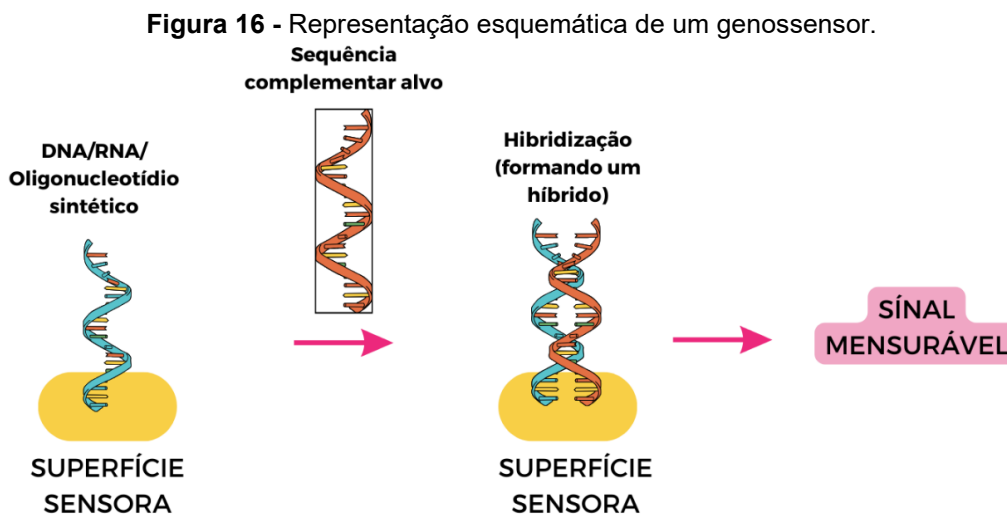


Fonte: Autoria própria (2024).

2.2.3. Biossensores de DNA

Ainda com relação ao genossensor, estes podem ter como elementos de biorreconhecimento oligonucleotídeos sintéticos, DNA ou ácido ribonucleico (RNA), o qual, se ligam de forma específica ao alvo de interesse, detectando e quantificando com precisão sequências de ácidos nucleicos. O alvo é detectado por meio da interação que ocorre entre a molécula imobilizada no transdutor (ssDNA) e sua sequência complementar alvo, resultando num híbrido (hibridização) que ao adquirir o estado conformacional de dupla hélice (dsDNA) gera um sinal proporcional à concentração do alvo na amostra. Este tipo de detecção é altamente seletivo devido às propriedades de especificidade de interação das bases nitrogenadas presente na estrutura dos oligonucleotídeos

(Lima, 2023) (Fig. 16).



Fonte: Autoria própria (2024).

Os aptâmeros, sequência de oligonucleotídeo sintético, também servem como elemento de biorreconhecimento. Ao interagir com seu alvo formam uma estrutura 3D ligando-se apenas em locais específicos com alta afinidade. Sua especificidade é resultante da ligação e reconhecimento organizados com o alvo, com interações complexas sem sofrer com interferentes externos (Lima, 2023).

No método de detecção direta, é medido o sinal eletroquímico resultante da oxidação das bases nitrogenadas presentes no híbrido. Esta resposta depende da eletro-oxidação característica de nucleobases de guanina e adenina presentes na cadeia de DNA. A diferença no potencial de oxidação distingue a resposta da sonda e da hibridização com o DNA alvo (Abedi *et al.*, 2022). Na detecção indireta, marcadores fluorescentes e redox são utilizados, monitorando de forma indireta os ácidos nucleicos no eletrodo com base no sinal redox.

2.3 MÉTODOS DE FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE SENSORA

Para construção de biossensores, depois de ter escolhido a superfície de detecção, precisa seguir para a primeira etapa que é a de funcionalização, que pode ocorrer por meio da formação de monocamadas automontadas (MAM) e/ou eletropolimerização de polímeros condutores ou eletrodeposição de nanomateriais. Estas servem como estratégia para minimizar a passivação da

superfície e com isso melhorar a aplicabilidade e eficiência dos sensores eletroquímicos (Ferretti *et al.*, 2000; Mandler; Turyan, 1996).

Alguns estudos experimentais têm revelado que a velocidade de transferência de elétrons pode ser significativamente influenciada pela modificação da superfície dos eletrodos. As reações no eletrodo podem ser classificadas baseadas no nível de interação entre a superfície e os reagentes, durante o processo de transição da transferência de elétrons. Os processos de transferência de elétrons podem ser descritos como sobreposições fracas e não específicas, ou fortes. As transferências fortes abrangem a maioria dos processos eletroquímicos e a velocidade deste pode ser controlada e afetada alterando-se a superfície do eletrodo. Por isso, diferentes abordagens para construção de eletrodos são avaliadas e estudadas (Freire; Pessoa; Kubota, 2003).

2.3.1. Nanomateriais

Nanomateriais tem sido explorado no desenvolvimento de biossensores para detectar nanoestruturas e fornecer uma interface de eficiência entre biomoléculas e eletrodo, sem gerar perda de moléculas de reconhecimento (Pareek *et al.*, 2023). Alguns exemplos mais utilizados são materiais baseados em carbono e as nanopartículas metálicas.

O óxido de grafeno reduzido (rGO) possui uma estrutura de folha planar com átomos de carbono e amplifica o sinal eletroquímico. Sua disposição garante propriedades como elevada área de superfície, boa estabilidade química e alta condutividade elétrica. Outro nanomaterial são os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) em matrizes de rGO auxiliam na transferência de elétrons e conferem mais porosidade, sendo uma forma de aumentar a sensibilidade do biodispositivo (Mahmoodi *et al.*, 2020).

Ademais, as nanofitas de óxido de grafeno (GONRs) que possuem uma estrutura semelhante à do grafeno e contam com boa condutividade. Estas podem ser incorporadas em nanopartículas de ouro revestidas com prata (Ag@AuNPs) (Pareek *et al.*, 2023). Algumas substâncias são analisadas com relação à imobilização de sondas de DNA. Como, por exemplo, as

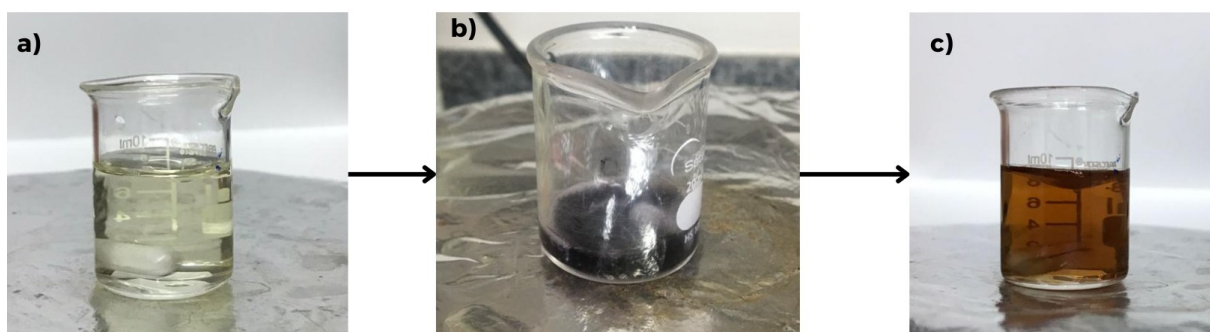
nanopartículas de ouro (AuNPs) amplamente aplicadas no campo biológico e farmacêutico devido as suas propriedades ópticas, ressonância plasmônica de superfície e espalhamento de luz por ressonância (RLS) com eficiência para revestir diversas superfícies e ter boa biocompatibilidade (Ma; Liu; Wang, 2010).

Outras características das AuNPs merecem destaque, como as optoeletrônicas devido a sua forma: banda de plásmons de superfície, fluorescência, transição de elétrons e condutividade elétrica. Ainda apresentam alta energia de superfície e possibilitam a transferência direta de elétrons entre a biomolécula e o eletrodo (Avelino *et al.*, 2020).

No entanto, partículas nanométricas podem se aglomerar afetando a aplicabilidade analítica, e agentes de capeamento, também conhecidos como agentes estabilizantes, são uma solução para esta problemática, atuando no controle das partículas e na prevenção da segregação em solução (Razzino *et al.*, 2020). As AuNPs podem ser preparadas por métodos físicos ou químicos, neste último inclui-se método sintético, redox, eletroquímico, fotoquímico, crescimento de sementes e outros (Ma; Liu; Wang, 2010).

A mais tradicional metodologia adotada para a produção de AuNPs é a de Turkevich-Frens otimizada por Frens. Nesta, é usado agentes redutores/estabilizadores e derivados de ouro (tetracloroaurato de hidrogênio/sódio (III)), reduzindo Au (III) a íons Au (0) sob aquecimento até a ebulição de um sal de ouro (Frens, 1973). Outro método de síntese é adotado por Razzino *et al.*, (2020) que se baseia na redução de íons Au^{3+} encapsulados em dendrímeros por H_2 formados pela redução de borohidreto de sódio (Fig. 17).

Figura 17 - Etapas da produção de AuNPs pelo método de Razzino et al., 2020: a) solução de HAuCl_4 com PAMAM(G5), obtendo coloração amarela b) adição de borohidreto de sódio (NaBH_4), com mudança de coloração para preto, resultante do processo de redução, c) AuNPs+PAMAM(G5).

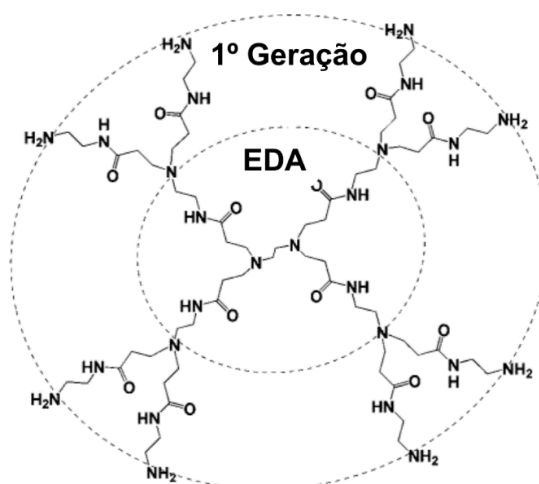


Fonte: Autoria própria (2024).

Os dendrímeros são definidos como macromoléculas sintéticas, nanoestruturadas, com escala tridimensional, bem definida quimicamente e alto grau de funcionalidade da superfície (Elancheziyan *et al.*, 2020). Somado a isso, são moléculas ramificadas, com as ramificações irradiando de um núcleo comum (Yang *et al.*, 2017). Diversos estudos avaliaram os dendrímeros de PAMAM como estabilizador na síntese de nanopartículas metálicas como Cu, Au, Pt, Ag e Pd. O PAMAM possui grau de polidispersidade estreito, flexibilidade da superfície e densos grupos funcionais com grupamentos amina ativos em sua extremidade. A sua composição química se torna um atrativo para a conjugação com vários ligantes e imobilização das moléculas de biorreconhecimento (Bahadır; Sezgintürk, 2016).

AuNPs+PAMAM-G5 são apostas na construção de biossensores com afinidade eletroquímica, por juntos terem homogeneidade estrutural, boa biocompatibilidade e condutividade. As AuNPs podem se ligar à superfície do PAMAM por afinidade amida-Au. Graças à elevada área de superfície do PAMAM, a quantidade de cargas das AuNPs pode ser aumentada (Dong *et al.*, 2013). O PAMAM é composto por um núcleo de etilenodiamina (EDA) e uma amidoamina se repetindo como unidade monomérica (Fig. 18).

Figura 18 - Estrutura química do PAMAM-G1.



Fonte: Tavares (2019).

A superfície das AuNPs+PAMAM-G5 pode ser funcionalizada por amina primária (NH₂), carboxilato (-COO), cadeias hidrofóbicas e outros. O tamanho da

família deste dendrímero varia conforme a geração e o número de grupos finais (Tab. 2). No geral, são uma opção promissora de plataforma para a fixação de biomoléculas a um transdutor sem influenciar na funcionalidade do biorreceptor e sensor (Tavares, 2019).

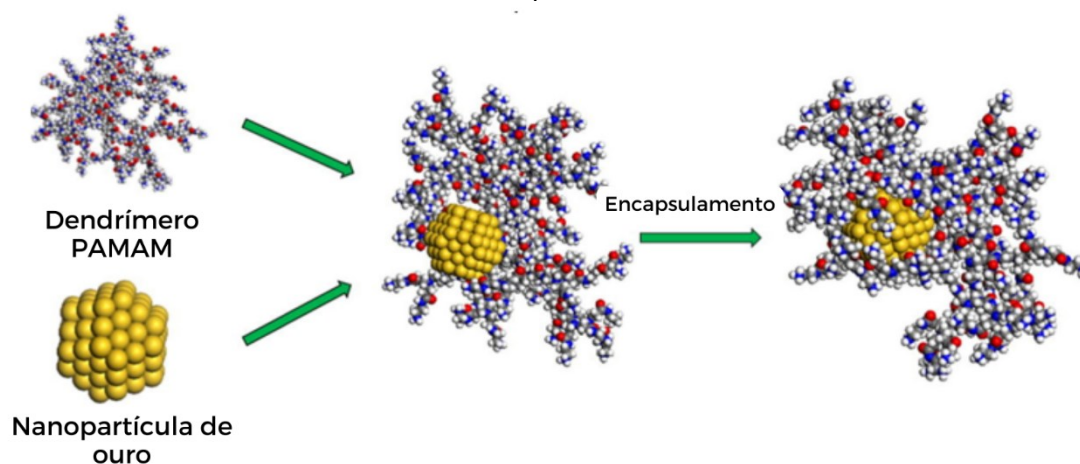
Tabela 2 - Propriedades de dendrímeros PAMAM terminados em amina, peso molecular, número de grupos terminais e tamanho.

Geração	0	1	2	3	4	5	6
Peso molecular (g/mol)	517	1430	3256	6909	14215	28826	58048
Tamanho (nm)	1.5	2.2	2.9	3.6	4.5	5.4	6.7
Grupos finais	4	8	16	32	64	128	256

Fonte: Adaptado de Tavares (2019).

Estudos realizados por Yang *et al.*, (2017) simularam a dinâmica molecular para esclarecer a conformação química de AuNPs-PAMAM em diferentes pH. Assim, comprovou-se que AuNPs podem ser estabilizadas de forma efetiva no pH neutro, pois neste, as conformações dos dendrímeros PAMAM tornam-se mais estáveis e compactas (Fig.19).

Figura 19 - Esquema exemplificando as conformações e comportamentos de AuNPs-PAMAM-G5 em pH neutro.



Fonte: Yang *et al.* (2017).

2.3.2. Polímeros condutores

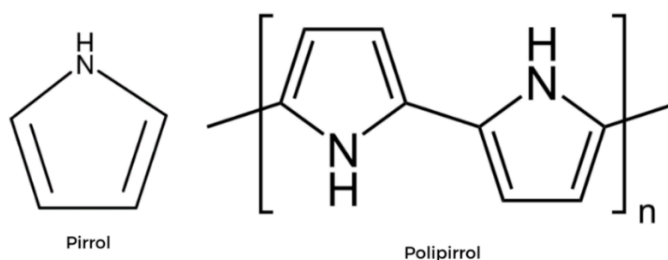
O termo "polímero" deriva do grego "poli" (muitos) e "meros" (unidades de repetição), indicando materiais compostos por macromoléculas contendo

milhares de unidades repetidas. Dentro dessas moléculas, os átomos são ligados por ligações covalentes (ligações intramoleculares), enquanto as macromoléculas se unem umas às outras por meio de ligações de Van der Waals. O número de unidades de repetição em uma cadeia é conhecido como grau de polimerização (Silva, 2017).

Os polímeros condutores, ou conjugados, são materiais orgânicos formados por uma cadeia principal tendo ligações duplas alternadas, ou conjugadas e simples. Em comparação a ligação pi, a simples (sigma) é mais forte e contém uma maior concentração de elétrons. Neste sentido, a π têm maior mobilidade de elétrons e devido a essa estrutura acredita-se que esses polímeros são mais condutores. Para possibilitar a condução é preciso adicionar ou remover elétrons por meio de dopagem, em semicondutores formando consequentemente vacâncias (regiões vazias). Um elétron ao se mover para uma região desocupada, deixa, consequentemente, uma nova vacância, a qual, poderá ser ocupada por outros elétrons. Este movimento resulta na condução elétrica nos polímeros, os quais, em seu estado dopado ou condutor, são comumente denominados por polímeros condutores (Medeiros *et al.*, 2012).

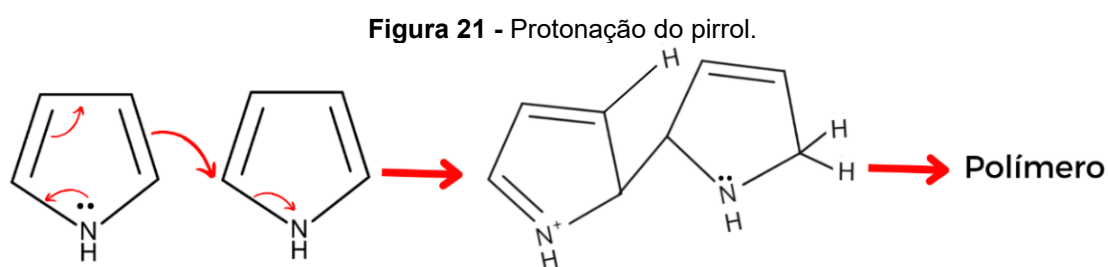
Uma opção para prospecção de biossensores com eletroquímica avançada são os suportes poliméricos com sensibilidade a analitos. Um polímero orgânico bastante condutor é o polipirrol (PPy), que quando conjugado passa a ter propriedades eletrônicas de metais com alta condutividade, biocompatibilidade, baixo custo e estabilidade ambiental. O polipirrol é produzido pela reação de monômeros de pirrol na presença de contra-íons. O PPy é geralmente insolúvel em muitos solventes comuns, a menos que seja dopado com agentes que aumentam sua solubilidade. A Fig. 20 ilustra a estrutura tanto do pirrol quanto do polipirrol.

Figura 20 - Estrutura química do pirrol e polipirrol.



Fonte: Autoria própria (2024).

Quimicamente, o PPy é formado por um processo de oxidação do monômero pirrol, seguido de acoplamento entre os radicais. Assim, a protonação (Fig. 21) de átomos de carbono do anel do pirrol causam a formação de cátions e em consequência oligômeros. Este processo se repete nos anéis aromáticos até formar uma cadeia polimérica.



Os biossensores eletropolimerizados com PPy tem sido estudado graças a sua simplicidade e fácil manuseio (Avelino *et al.*, 2022). Diversas abordagens de síntese podem ser exploradas para funcionalizar a superfície de um eletrodo de trabalho com o pirrol, sendo a eletropolimerização uma opção destacada. Este processo é ilustrado na Fig. 22, onde um eletrodo com superfície de ouro foi submetido à eletropolimerização para formar PPy (Silva Junior, 2021).



Fonte: Adaptado de SILVA JUNIOR (2021).

2.4 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

2.4.1. Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Atualmente há uma variedade de técnicas de caracterização de polímeros, em que as mais utilizadas são: Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia RAMAN e espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN). Tais metodologias possuem importância no desenvolvimento de estudos acerca das estruturas moleculares e propriedades dos polímeros (Silva, 2017).

O FTIR identifica de forma quantitativa e qualitativa moléculas principalmente orgânicas, e determina características da estrutura química e de grupos funcionais de um dado material (Tayebi; Kargari; Akbari, 2023). Possui como vantagem a possibilidade de estudar a amostra em qualquer estado físico. Conceitualmente, a técnica baseia-se na vibração de átomos e moléculas presentes na amostra que levam a absorção de diferentes frequências (Queiroz, 2016).

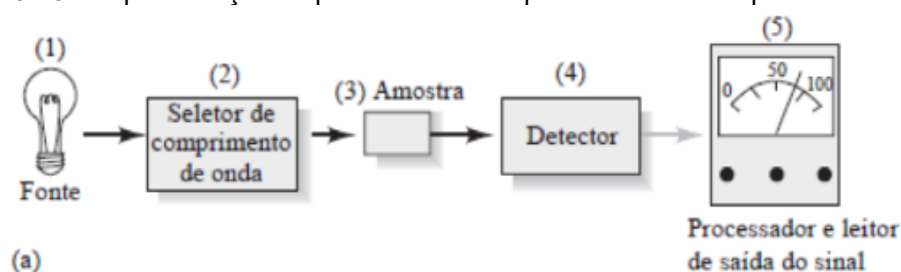
De forma geral, o FTIR é uma técnica de rápida execução, simples e não destrutiva, que se fundamenta num espectro que irá indicar de forma gráfica a radiação infravermelha em frequência adequada, aonde a região do espectro em que ocorre a absorção da radiação emitida é denominada por banda de absorção. Além disso, as moléculas podem vibrar em diferentes graus de liberdade, no entanto, apenas alguns tipos de vibrações podem gerar variação no momento dipolar da molécula; estas vibrações têm capacidade de entrar em ressonância com a radiação infravermelha, formando uma banda de absorção numa dada frequência específica (Silva, 2017).

2.4.2. Espectroscopia na região do UV-visível (UV-vis)

A espectroscopia é uma técnica que estuda interações da luz e outros tipos de radiação eletromagnética com uma determinada matéria. A faixa de região visível do espectro é de 380-780 nm e o método de espectroscopia é baseado em medir a quantidade de radiação absorvida ou produzida pela espécie atômica, ou molécula de interesse. Um espectro obtido no ultravioleta gera um gráfico do comprimento de onda versus intensidade de absorção (transmitância ou absorbância) e o comprimento de onda é expresso em nanômetros ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ nm}$) (Crews *et al.*, 1998).

O princípio básico de funcionamento do espectrofotômetro consiste numa luz emitida por fonte de energia, podendo ser lâmpada de tungstênio ou de deutério, que emitirá radiação na região do ultravioleta. Essa luz passará por um monocromador responsável por selecionar um comprimento de onda ou fazer a varredura em uma determinada região do UV-vis. Após passar pelo monocromador a luz chega até a amostra, aonde parte da radiação é absorvida e emitida e ao chegar no detector a luz emitida pela amostra é transformada num sinal elétrico mensurável e assim, medido como absorbância da amostra (Fig. 23) (Prates, 2021).

Figura 23 - Representação esquemática de componentes de um espectrofotômetro.



Fonte: West; Skoog; James (2006).

As propriedades ópticas das AuNPs são estudadas pela espectroscopia UV-vis por ser uma técnica excelente na caracterização de uma amostra à luz numa faixa de comprimento de onda. Somado a isso, é possível por meio deste método garantir a estabilidade das amostras e ajustar suas características físicas, químicas e ópticas. A análise não altera a amostra e pode ser feita de forma rápida (Unser *et al.*, 2015).

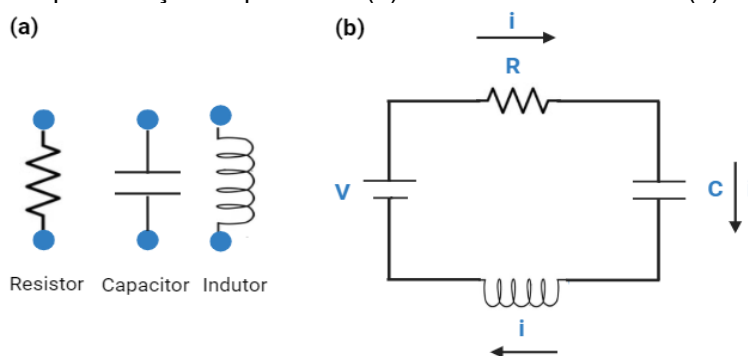
2.4.3. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A EIS permite identificar propriedades intrínsecas de materiais utilizados na transdução de sinal em biossensores. Sua aplicação serve para estudar os processos do eletrodo em relação aos parâmetros da difusão, cinética, dupla camada e reações homogêneas acopladas. Na EIS é aplicado uma perturbação de potencial, geralmente do tipo senoidal, por corrente alternada ou potencial, em ampla faixa de frequência e uma variável permanece sob controle, enquanto

a outra é registrada a diferença em amplitude e fase (Gandarilla, 2009).

A impedância tem como base conceitual a utilização de circuitos elétricos de corrente alternada e os elementos presentes, isto é, resistor, capacitor e indutor, representados na Fig. 24 (Ferreira *et al.*, 2023).

Figura 24 - Representação esquemática (a) elementos do circuito e (b) circuito RLC.



Fonte: Autoria própria (2024).

Os resistores obedecem à lei de Ohm (Eq. 1) e a resistência elétrica (R) é a capacidade do circuito elétrico de resistir ao fluxo de elétrons e pode ser descrita como a relação entre tensão aplicada em V e a intensidade de corrente elétrica. Nota-se pela equação que corrente e resistência são inversamente proporcionais, assim, quanto maior a corrente menor será a resistência que flui pelo circuito (Ferreira *et al.*, 2023).

$$R = \frac{V}{I} \quad \text{Eq.1}$$

Nesta equação, R é a resistência (Ω), V é a diferença de potencial (V) e I a corrente elétrica gerada em ampere (A). A partir dos resistores ainda se tem a Resistência Ôhmica (R_s) e a Resistência a Transferência de Carga (R_{CT}), aonde R_s diz respeito a todas as resistências ôhmicas presentes na solução, incluindo cabos e contatos elétricos. Já o R_{CT} está ligado à densidade de corrente faradaica, pois segundo a lei de Faraday, sempre que houver passagem de corrente elétrica na interface eletrodo/eletrólito ocorrerá uma reação eletroquímica. Assim, a R_{CT} corresponde a transferência eletrônica e concentração iônica dos produtos e reagentes na interface em um dado intervalo de tempo (Viégas; Silva; Rodrigues, 2021).

Os capacitores armazenam a carga elétrica (Q) e se definem pela sua

capacitância (C) e tem como função armazenar energia potencial elétrica, é usualmente descrito pela Eq. 2, em que C, ω e Z_c são respectivamente a capacitância do capacitor, frequência angular e reatância capacitiva.

$$Z_c = -\left(\frac{1}{\omega C}\right)j \text{ Eq.2}$$

Já os indutores conseguem armazenar a energia criada em um campo e são úteis na aplicação de células eletroquímicas, em que o comportamento indutivo é estimulado pela adsorção de reagentes numa amostra. Matematicamente Eq. 3 tem-se L que a indutância do indutor, ω frequência angular e Z_L reatância indutiva.

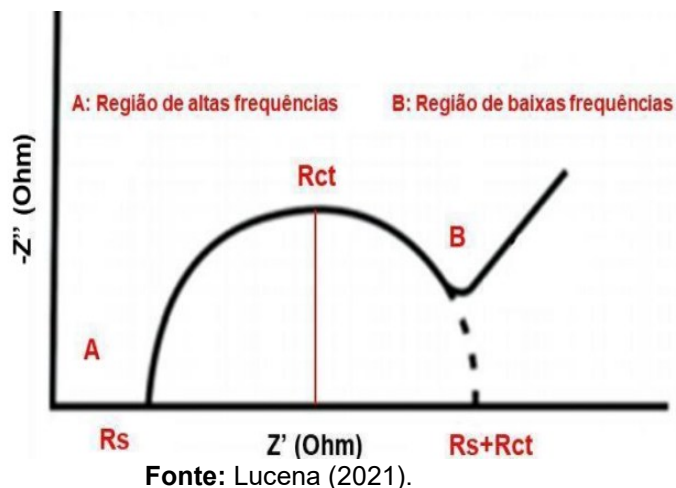
$$Z_L = (\omega L)j \text{ Eq.3}$$

A técnica de EIS é também conhecido como método de impedância AC, por utilizar corrente alternada (AC). Assim, um circuito DC (sinais contínuos), se diferencia do AC, pois a resistência será mais ampla, visto que além dos resistores, oferecendo resistência à passagem de corrente, se tem os capacitores e indutores. A resistência gerada pelo capacitor e indutor se denominam por reatância ou resistência reativa e compõem a parte imaginária da impedância, e a resistência ôhmica é a parte real. Nesse sentido, a Eq. 4, determina a impedância, em que Z é o valor total, Z_r parte real e Z_i parte imaginária e j os valores complexos de reatância (Viégas; Silva; Rodrigues, 2021).

$$Z = Z_r + jZ_i \text{ Eq.4}$$

Graficamente a EIS é representada pelo diagrama de Nyquist (Fig. 25). O diagrama de Nyquist possui em seus eixos x e y, a impedância real (Z_r) em função da imaginária (Z_i), respectivamente, e o gráfico em função da frequência forma o espectro de impedância (Viégas; Silva; Rodrigues, 2021).

Figura 25 - Representação esquemática do diagrama de Nyquist.



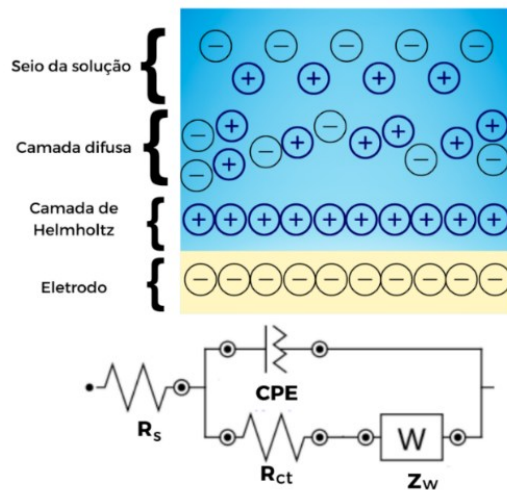
A resistência ôhmica (R_s) é o primeiro encontro da curva com o eixo real (eixo x), localizada na região de altas frequências. Já o segundo encontro nesse eixo representa a resistência de transferência de carga (R_{ct}), que se dá em regiões de baixas frequências. Em regiões de frequência intermediária encontra-se o arco capacitivo, e o pico desse arco permite calcular a capacitância da dupla camada no sistema investigado (Franco, 2014).

O circuito de RandlessErshler tem sido o mais usado e expressa a resistência ôhmica da solução eletrolítica (R_s), elemento de fase constante (CPE), a resistência a transferência de carga (R_{ct}) e a difusão de Warburg (Z_w), resultado da difusão de íons da solução para a superfície do eletrodo. A cinética eletroquímica existente na superfície de um eletrodo, é alterada quando qualquer material for adsorvido a essa superfície, resultando na modificação dos processos de transporte e difusão dos reatantes do seio da solução para a interface. Essas modificações impactarão diretamente a dupla camada elétrica (DCE) criada na interface eletrodo-solução (Gandarilla, 2022).

Assim, dado que as alterações na superfície do eletrodo resultam em mudanças na resposta eletroquímica, é crucial compreender a camada presente na interface eletrodo-eletrólito. O termo "DCE" refere-se a uma interface entre uma superfície carregada e uma fase líquida onde a eletroneutralidade é perturbada, resultando na formação de um campo elétrico. Esse fenômeno provoca a realocação e reorientação dos íons no líquido para minimizar os efeitos do campo elétrico formado. A DCE se forma imediatamente após o contato do eletrodo com a solução eletrolítica (Khademi; Barz, 2020). A Fig. 26 esquematiza os 3 diferentes modelos de DCE e sua relação com o circuito

equivalente de Randles.

Figura 26 – Representação esquemática da relação do circuito equivalente de Randles com os processos existentes na interface eletrodo/solução.



Fonte: Autoria própria (2024).

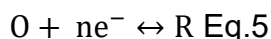
A EIS é uma técnica excelente e com sensibilidade para aplicação no desenvolvimento de biossensores, podendo ser usada para monitorar processos interfaciais e analisar superfícies modificadas. Suas principais vantagens são: identificar mecanismo de corrosão, estudo cinético, análise eletroquímica com base no diagrama de Nyquist e efeitos de resistência da solução (Gandarilla, 2022).

2.4.4. Voltametria Cíclica

A VC uma das principais técnicas para estudar os processos eletroquímicos interfaciais, esta, dispõe de informações relacionadas a cinética de transferência de carga, potenciais redox de substâncias eletroativas e reversibilidade de reações eletroquímicas. Na construção de biossensores a VC possui diversas aplicabilidades, como, por exemplo, na eletropolimerização e eletrodeposição de nanomateriais. Somado a isso, caracteriza os fenômenos físico-químicos que ocorrem entre o eletrodo e a solução eletrolítica, associados ao biorreconhecimento e imobilização de moléculas (Avelino, 2017).

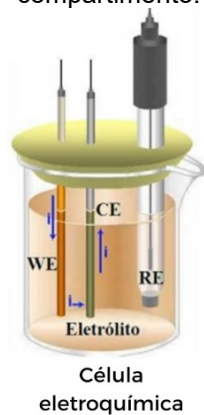
A técnica da voltametria cíclica (VC) se baseia nos processos eletroquímicos que ocorrem na interface entre o eletrodo de trabalho e a solução

eletrolítica adjacente. Os sinais de corrente medidos durante a voltametria estão relacionados com as espécies eletroquímicas que participam das reações de oxirredução (Eq. 5). Essas reações fornecem elétrons para permitir a passagem da corrente elétrica. Alguns fatores podem influenciar a intensidade deste fluxo de carga, incluindo o consumo ou a geração de espécies eletroquímicas, assim como a presença de moléculas e nanoestruturas no eletrodo, que conseguem interferir na condutividade do sistema. Assim, identificando estes fatores, torna-se viável obter informações sobre o analito, com base nas variações vistas (Ronkainen; Halsall; Heineman, 2010).



Nesta, O é a forma oxidada, R a forma reduzida e ne^- representa o número de elétrons no processo de oxirredução, que geralmente é $n=1$. Os experimentos de voltametria são conduzidos em uma célula eletroquímica que consiste em três eletrodos: o eletrodo de trabalho, o eletrodo auxiliar (também conhecido como contra-eletrodo) e o eletrodo de referência (Fig. 27).

Figura 27 - Representação esquemática de uma célula eletroquímica com único compartimento.



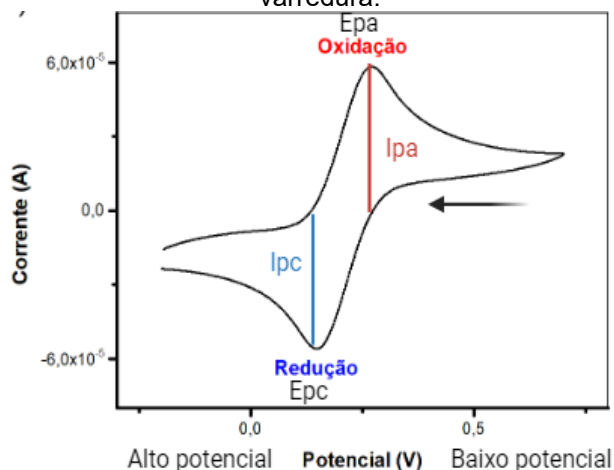
Fonte: Autoria própria (2024).

A corrente elétrica gerada no sistema é medida entre o eletrodo auxiliar e o eletrodo de trabalho, já a voltagem é aplicada entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar. Portanto, matematicamente o parâmetro ajustado na voltametria é o potencial (E) em função da corrente resultante (i), assim, $i = f(E)$. Os resultados da voltametria são apresentados graficamente por meio de

voltamogramas cíclicos, que mostram a relação entre a corrente elétrica e o potencial aplicado. Assim, é necessário utilizar analitos que tenham capacidade de sofrer reações redox na janela de potencial estabelecida como parâmetro (Pacheco *et al.*, 2013).

Na VC é avaliado a transferência de elétrons de uma molécula, pelo monitoramento de uma corrente elétrica numa faixa de potencial estabelecido, neste sistema é aplicado uma sequência de pulso de modo a realizar uma varredura obtendo um voltamograma cíclico. O voltamograma é obtido pela diferença de potencial que gera picos de potencial anódica (E_{pa}) e catódicas (E_{pc}), é possível ainda com o pulso de corrente do sentido positivo para o negativo medir correntes de redução (I_{pc}) e do negativo para o positivo o pico de oxidação (I_{pa}). A seta apresentada na Fig. 28 indica onde começa e a direção da varredura do primeiro segmento. É por essa amplitude que se obtém informações das moléculas, vale ressaltar, que em casos de material com propriedades isolantes haverá uma menor taxa de transferência de elétrons com redução dos picos redox (Teixeira, 2022).

Figura 28 - Voltamograma exemplificando as regiões de potencial anódica (E_{pa}), catódicas (E_{pc}), correntes de redução (I_{pc}) e pico de oxidação (I_{pa}) com a seta indicando o sentido da varredura.



Fonte: Autoria própria (2024).

2.5 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

A Microscopia de Força Atômica (AFM) é caracterizada por possuir alta resolução e obter imagens detalhadas da superfície de materiais na escala

nanométrica. Binnig, Quate e Gerber em meados de 1986 desenvolveram a AFM, que apresenta vantagens, comparada às limitações da luz visível nos microscópios ópticos convencionais, o qual, só permite usar amostras condutoras e semicondutoras (Binnig; Quate; Gerber, 1986).

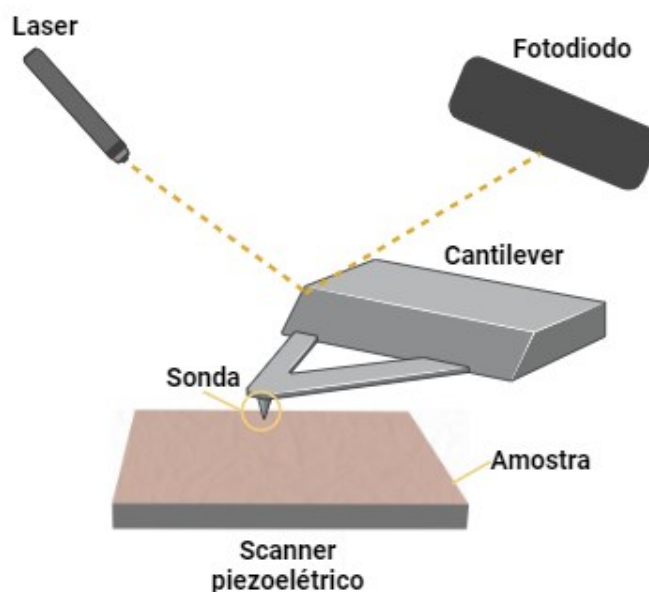
Por possuir ampla aplicação e as amostras serem de fácil preparo, a AFM é usada em diversas áreas, como, ciências biológicas, ambientais, da terra, física e dos materiais. Além disso, é possível detectar *in situ* estruturas cristalinas e avaliar o grau de defeito superficial de amostras condutoras e não condutoras, e observar a morfologia tridimensional de amostras em escala nanométrica. É possível, também, estudar amostras líquidas identificando o processo de reação superficial (Liu *et al.*, 2023).

Uma das características mais importantes do AFM é a ampliação da imagem em três dimensões: x, y e z. Com isso, é fornecido informações quantitativas de altura ao varrer a superfície horizontalmente com baixos níveis de ruído. O princípio de funcionamento básico da técnica consiste em obter uma imagem medindo forças atômicas entre a ponta e a superfície da amostra, dobrando ou desviando o cantilever (Burgo *et al.*, 2022).

Metodologicamente, o AFM usa uma sonda para varrer a superfície da amostra, e identificar alterações no seu relevo por meio de variações de grandeza física, e por interações ao longo da varredura entre átomos da sonda e da amostra (Martínez-García *et al.*, 2016). Essas interações ocorrem por meio de forças que podem ser atrativas ou repulsivas. A configuração básica de funcionamento da AFM é uma ponta piramidal colocada sob um cantilever, montado em um scanner piezoelétrico (Fig. 29).

Na fase de aproximação, a força de Van Der Waals é a que atua entre a superfície da amostra e a ponta. Tais forças induzem a deflexão do cantilever na direção da superfície da amostra, que ao entrar em contato com a mesma, é gerada uma força de repulsão. Esta reação é denominada por repulsão de Pauli. Com a deflexão, o feixe de laser muda de direção e é refletido na traseira do cantiléver, permitindo medir de forma precisa a deflexão. O fotodiodo é responsável por detectar o desvio da deflexão e transmitir essa informação para um computador, aonde será construída a topografia digitalizada da superfície da amostra (Amarouch; El Hilaly; Mazouzi, 2018).

Figura 29 - Representação esquemática de funcionamento da AFM e principais componentes.

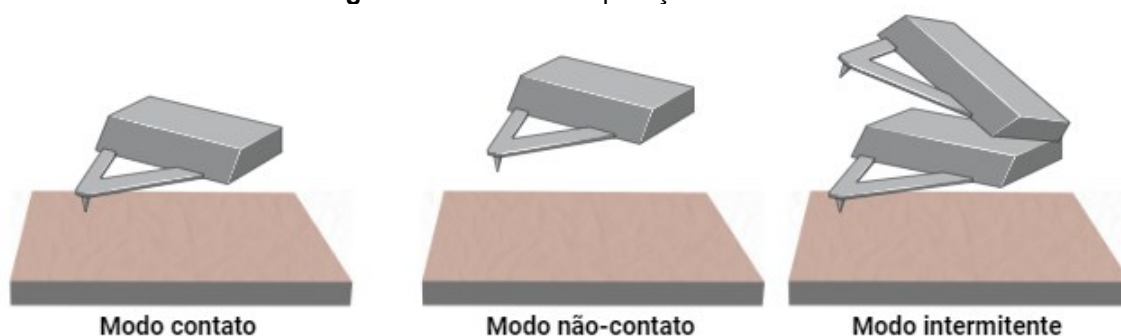


Fonte: Autoria própria (2024).

De forma prática a AFM opera basicamente de três formas de análises (Fig. 30), conforme o tipo de aplicação:

- **Modo contato (também denominado por modo não-oscilante/repulsivo):** a ponta da AFM pode interagir em pontos únicos da amostra. A sonda se move de maneira não oscilante e se acomoda de forma adequada a superfície de leitura. Este modo é aplicado na análise de superfícies sólidas e resistentes;
- **Modo não-contato:** o cantiléver oscila numa frequência ressonante com baixa amplitude e a sonda se desloca a cerca de 100 Å da superfície, em decorrência disso, a predominância das forças atrativas. É usado na análise de materiais poliméricos, semicondutores e biológicos;
- **Modo intermitente:** varia entre o modo com e sem contato, tendo dessa forma as forças atrativas e repulsivas. A sonda se move em grande amplitude de oscilação, e é indicado para analisar polímeros hidrofílicos e materiais biológicos.

Figura 30 - Modos de operação da AFM.



Fonte: Autoria própria (2024).

A interação ponta-superfície permite obter características dos materiais, como, por exemplo, módulo de elasticidade e energia de adesão, por meio das teorias de contato citadas. No caso da deflexão do cantiléver durante a interação da sonda com a amostra, esta é medida pela lei de Hooke: $F = -k \cdot x$, sendo x a deflexão do cantiléver e k a constante da mola (Zhou; Du, 2022).

Vale destacar também, a aplicação da AFM para auxiliar no desenvolvimento de ferramentas de biodeteção, como os biossensores. Sob esta perspectiva, um pesquisador propôs usar a AFM pelo modo de contato intermitente e contato para estudar a dinâmica molecular no processo de biorreconhecimento do HPV 16 com base em teorias mecânicas (Lin *et al.*, 2016). Outra pesquisa de Jaapar *et al.*, (2023), fez uso da AFM objetivando caracterizar a modificação DNA-AuNPs e descrever a morfologia das AuNPs. Assim, fica claro a aplicação e alto potencial da AFM no desenvolvimento de biodispositivos clínicos (Millán *et al.*, 2023).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolvimento de genossensor eletroquímico, baseado em filmes de polímero condutor e nanopartículas de ouro funcionalizadas com dendrímero PAMAM-G5 para detecção e identificação de genótipos de HPV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revestir eletrodos de superfície de ouro com o PPy através da VC;
- Sintetizar AuNPs pela técnica da redução do borohidreto e revesti-las com o dendrímero PAMAM-G5;
- Avaliação físico-química dos parâmetros relacionados às etapas de modificação da superfície do eletrodo metálico;
- Caracterização da interação do sistema PPy-AuNPs+PAMAM-G5-MY09-BSA frente aos plasmídeos recombinantes contendo o gene L1 de diferentes tipos de HPV (HPV 6, 16, 18, 31 e 33), através das técnicas EIS e VC;
- Avaliação teórica do elemento de fase constante (CPE) e da resistência à transferência de carga (R_{CT}) através de circuitos equivalentes e determinação das correntes de pico anódicos (I_{pa}) e catódicos (I_{pc}) dos voltamogramas cíclicos;
- Caracterização da interação do sistema PPy-AuNPs+PAMAM-G5-MY09-BSA frente a DNA complementar (cDNA) de amostras de paciente infectado com HPV (HPV 6, 18 e 31), através das técnicas de EIS e VC;
- Caracterizar as nanopartículas funcionalizadas pelas técnicas ópticas de FTIR e espectroscopia UV-vis;
- Análise morfológica e estrutural da superfície dos eletrodos metálicos pela técnica de AFM.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Dendrímero PAMAM de 5ª geração, glutaraldeído ($C_5H_8O_2$), pirrol (98 %), albumina de soro bovino (BSA), ácido clorídrico (37 %), boro-hidreto de sódio ($NaBH_4$) e ácido tetracloroáurico ($HAuCl_4$) ($\geq 49,0\%$), foram obtidos da Sigma AldrichCo. (St Louis, EUA). Ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$), ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram adquiridos da VETEC (Brasil). Água ultrapura foi utilizada em todos os experimentos, obtida por um sistema MilliQ. Todos os produtos químicos e solventes de grau analítico.

4.2 SONDA DE OLIGONUCLEOTÍDIO E AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Para os ensaios de biodeteção se utilizou uma sonda de DNA funcionalizada com grupos amino terminais, que será testada frente a plasmídeos recombinantes e amostras de cDNA de pacientes infectados pelo HPV. A sonda MY09 é um oligonucleotídeo degenerado que possui a seguinte sequência: 5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC -3' e foi adquirida pela Invitrogen Co. (Carlsbad, CA, EUA).

Se tratando dos plasmídeos recombinantes, estes foram adquiridos por subclonagem da sequência do gene L1 de diferentes tipos de HPV (HPV 6, 11, 16, 18, 33, 45, 51, 53, 58, 61, 62, 66, 72, 81 e 84). O sequenciamento dos plasmídeos recombinantes foi feito usando *primers* complementares para confirmar a subclonagem do gene L1 de papilomavírus.

Com relação às amostras clínicas só se realizaram a coleta das mesmas após consentimento dos pacientes e com a aprovação do comitê de ética local (processo nº CAAE 23698513.0.0000.5190). Amostras de cDNA foram obtidas por meio da transcrição reversa de segmentos de RNA total pelo método trizol, subsequentemente foi feita a síntese de cDNA a partir do RNA mensageiro. As amostras clínicas foram submetidas a técnicas de PCR para detectar a presença

do HPV, e o produto da PCR foi sequenciado para identificar o genótipo de HPV. Foram feitas diluições de todas as amostras biológicas com solução salina de tampão fosfato (PBS) a 10 mM, pH 7,4 e mantidas congeladas.

4.3 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULA DE OURO REVESTIDA POR PAMAM (AuNPs+PAMAM)

Seguiu-se o protocolo de Razzino et al., 2020, adotando alguns ajustes. O PAMAM-G5 10 uM em aproximadamente 6 mL de água deionizada, foi levada ao banho ultrassônico a 40KHz por cerca de 2 minutos. Posteriormente, retirou-se 5 mL desta solução e adicionou em 2,2 mL de HAuCl_4 2mM, esta foi levada ao agitador magnético por 30 minutos, obtendo coloração amarela. Por fim, adicionou NaBH_4 1.5 M, observando mudança imediata para preto, ficando sob agitação pelo período de 1 hora e 30 minutos, obtendo coloração rosa. As AuNPs+PAMAM-G5 foram estocadas a 4 °C até sua utilização. As amostras foram caracterizadas por FTIR e UV-vis.

4.4 MEDIÇÕES DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Para a análise foi utilizado um espectrômetro FTIR Agilent Cary 630 (Agilent Technologies, Rowville, Austrália) tendo a refletância total atenuada por diamante (ATR). O espectro de transmitância se obtém na faixa de 650 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} . O grau de umidade relativa em 50% e temperatura de 21 °C.

4.5 MEDIÇÕES DE ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA VISÍVEL (UV-vis)

A caracterização da síntese de AuNPs+PAMAM-G5 foi realizada pelo método de UV-vis por varredura das amostras na faixa de 200 a 600 nm com o espectrofotômetro Kasvi. Utilizou-se cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm e a solução de água destilada foi padronizada como o branco.

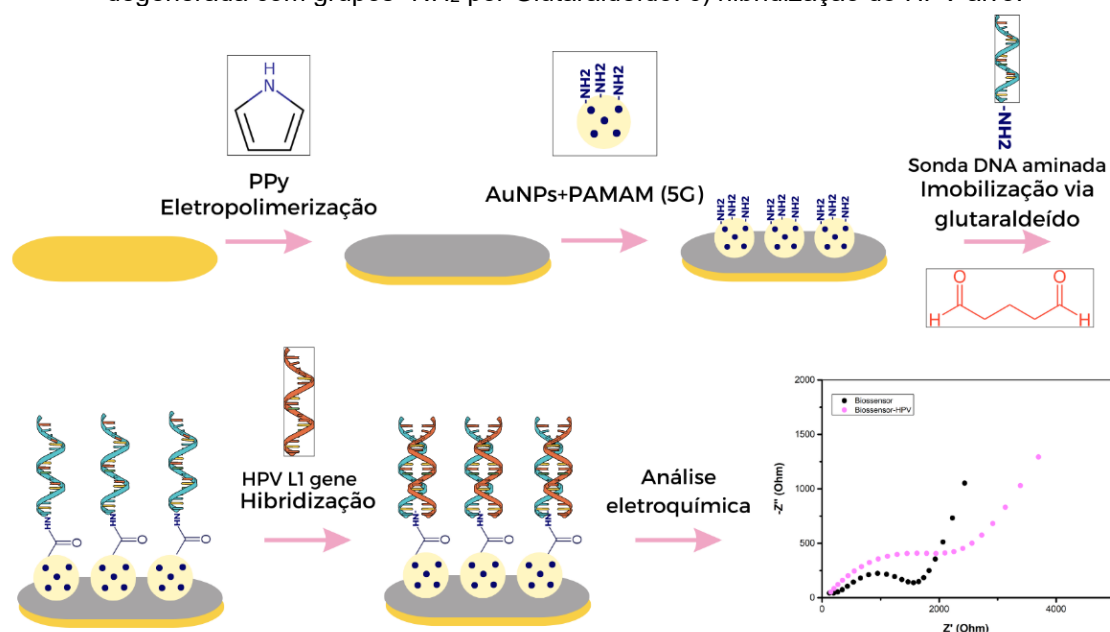
4.6 MONTAGEM DO SISTEMA SENSOR NANOESTRUTURADO

Como substrato para montagem do sistema sensor foi utilizado um eletrodo de trabalho com superfície de ouro ($\phi = 2$ mm). Este passou por um processo de limpeza com Al_2O_3 (0,5 μM) e água deionizada em banho ultrassônico por 1 minuto, sendo submetido a ciclagem via VC e EIS até ser obtido um voltamograma e impedância padrão para o eletrodo limpo. A primeira etapa de modificação do eletrodo de trabalho de ouro, para melhor sinal analítico, foi a eletropolimerização do PPY usando o monômero pirrol (30 mM). VC foi aplicada para realizar dois ciclos de polimerização, em potencial entre $-0,398$ a $+1,0$ V com velocidade de varredura de 100 mV.s^{-1} .

Em seguida, dando início a formação de monocamadas automontadas, o eletrodo foi recoberto com 2 μL da AuNPs+PAMAM-G5 até completa adsorção. A AuNPs+PAMAM-G5 possui em sua extremidade numerosos grupos amino que permitem a imobilização da sonda de DNA. Para isso, GA 2% foi gotejado na superfície do eletrodo durante 5 minutos. s. Em seguida, a sonda MY09 (500 pM) foi imobilizada na plataforma pelo método drop-coating. 2 μL da solução de MY09 foi adicionado ao eletrodo modificado com PPy-AuNPs-PAMAM-G5, e depois incubado por 30 minutos. O Ga é um agente de reticulação bifuncional, usado para formar bases de Schiff entre os grupos amino AuNPs-PAMAM-G5 e a sonda de DNA aminada. BSA 1% foi adicionado para bloquear sítios não específicos de ligação ao HPV. O sistema sensor foi testado frente a genótipos de HPV (tipos 6, 16, 18, 31 e 33). As amostras de genótipos de HPV foram submetidas a aquecimento durante 1 minuto em temperatura a 90°C , e em seguida adicionou-se 2 μL no eletrodo por 5 minutos com posterior leituras de VC e EIE. Amostras de cDNA (tipos 6, 18 e 31) também foram adsorvidas no sensor por 5 minutos para posterior leitura das medidas de impedância e voltametria.

Conforme citado acima, a Fig. 31 exemplifica as etapas para obtenção da plataforma sensora.

Figura 31 - Esquema de construção do genossensor (PPy-AuNPs+PAMAM-G5-BSA) para identificar diferentes amostras de DNA alvo de HPV. a) Adsorção de AuNPs+PAMAM-G5 com grupos -NH₂ na superfície do ouro. b) Imobilização de sonda oligonucleotídica (MY09) degenerada com grupos -NH₂ por Glutaraldeído. c) hibridização do HPV alvo.



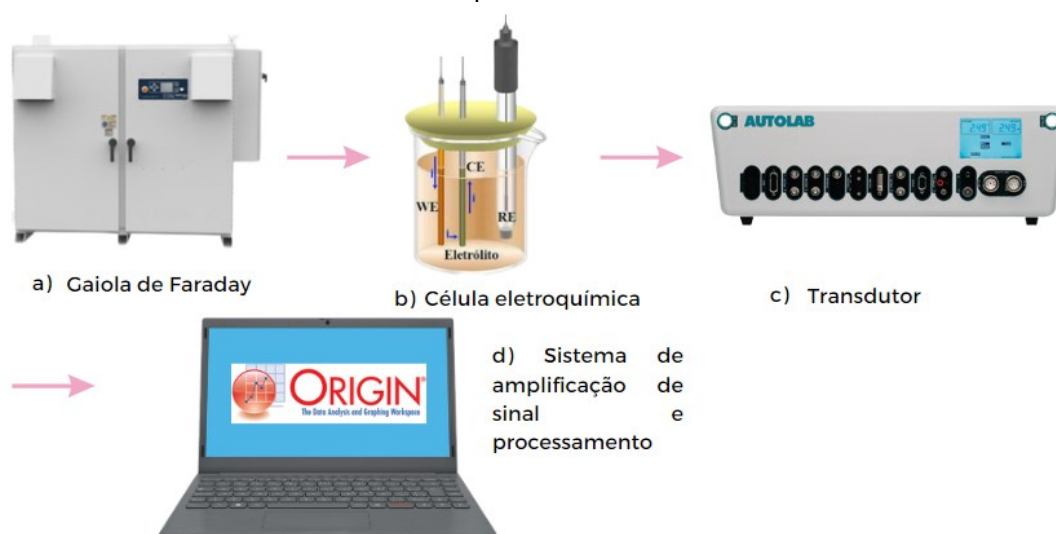
Fonte: Autoria própria (2024).

4.7 INSTRUMENTAÇÃO

Para realizar as análises eletroquímicas utilizou-se um potenciostato/galvanostato (Ecochemie, Países Baixos) interfaceado com o software NOVA 1.11. Uma célula eletroquímica composta por três eletrodos (Fig. 20) foi usada, sendo estes um eletrodo de referência Ag/AgCl, eletrodo de platina e eletrodo de trabalho com disco de ouro de 3 mm de diâmetro. A sonda redox foi uma solução de 20 mL de 10 mM K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] (1:1), a qual, preparou-se com 10 mM de tampão fosfato (PBS) pH 7.

As análises impedimétricas ocorreram na frequência entre 100 mHz e 100 kHz e potencial de 20 mV. Já leituras voltamétricas foram feitas no potencial entre -0.2 a +0.7 V e taxa de varredura de 50 mV.s⁻¹. Os diagramas de Nyquist e voltamogramas foram analisados por meio do software Origin Pro 9 (Fig. 32) (Origin Lab, EUA).

Figura 32 - Exemplificação dos equipamentos utilizados na análise dos biossensores, a) gaiola de Faraday, b) célula eletroquímica contendo os três eletrodos (eletrodo de referência, contra-eletrodo e eletrodo de trabalho), c) potenciostato/galvanostato e d) sistema de amplificação de sinal e processamento.



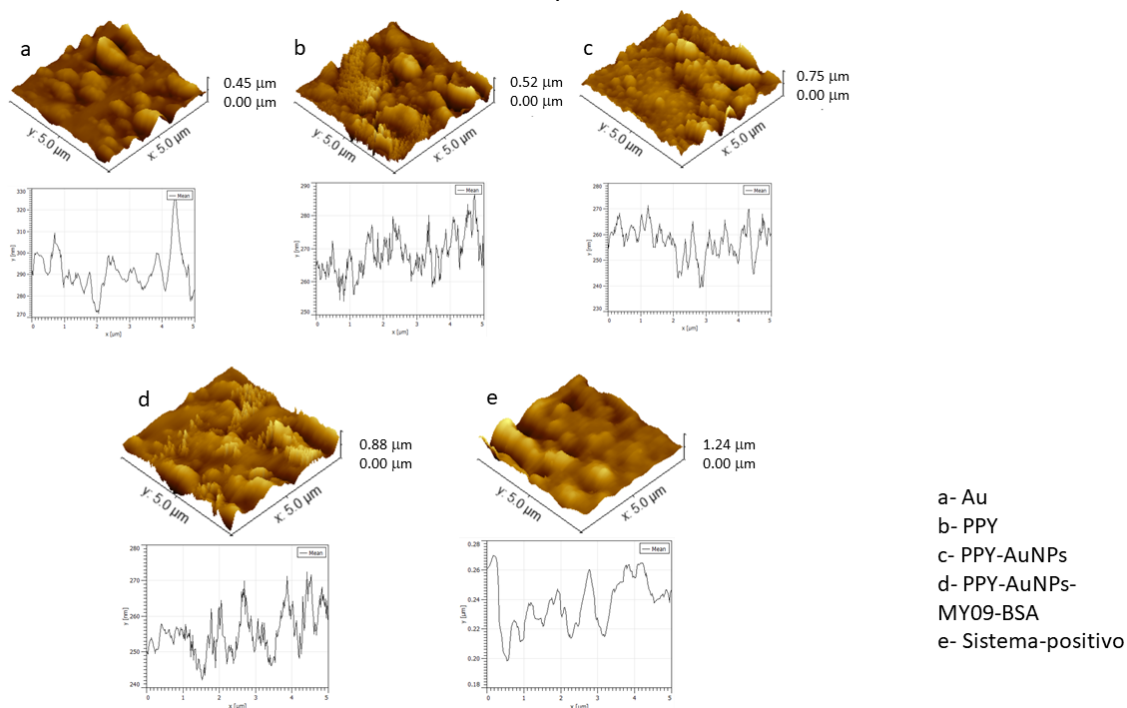
Fonte: Autoria própria (2024).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA DA PLATAFORMA GENOSENSORA

As características topográficas de cada etapa de construção do genossensor foram analisadas por AFM, bem como as mudanças na superfície depois do processo de hibridação entre o primer degenerado MY09 e amostras de HPV (Fig. 33 a-e). Para fins de rugosidade foi avaliada os parâmetros de rugosidade média (Ra) e rugosidade quadrática (Rms).

Figura 33 - Análise topográfica da plataforma genossensora PPy-AuNPs+PAMAM-G5-MY09-BSA e de amostra positiva de HPV 18.



Fonte: Autoria própria (2024).

Na Fig. 33a, é visto a superfície do ouro limpo que possui aspecto de terraços atômicamente lisos com altura máxima de 0.45 μm (Ra = 38.08 nm e Rms = 67.24 nm). Após a adsorção de moléculas é possível analisar mudanças expressivas na morfologia da superfície, com aumento da altura média para 0.52 μm e valores de rugosidade de Ra = 41.50 nm e Rms = 56.05 nm (Nuić *et al.*, 2023). O filme de PPy, revelou morfologia granular e semelhante à couve-flor, o

qual, é o esperado para filmes PPy elaborado pela técnica de eletropolimerização, que contribui na formação de eletrólitos e maior condutividade elétrica (Masumi; Mahdavi; Etminanfar, 2023) (Fig. 33b).

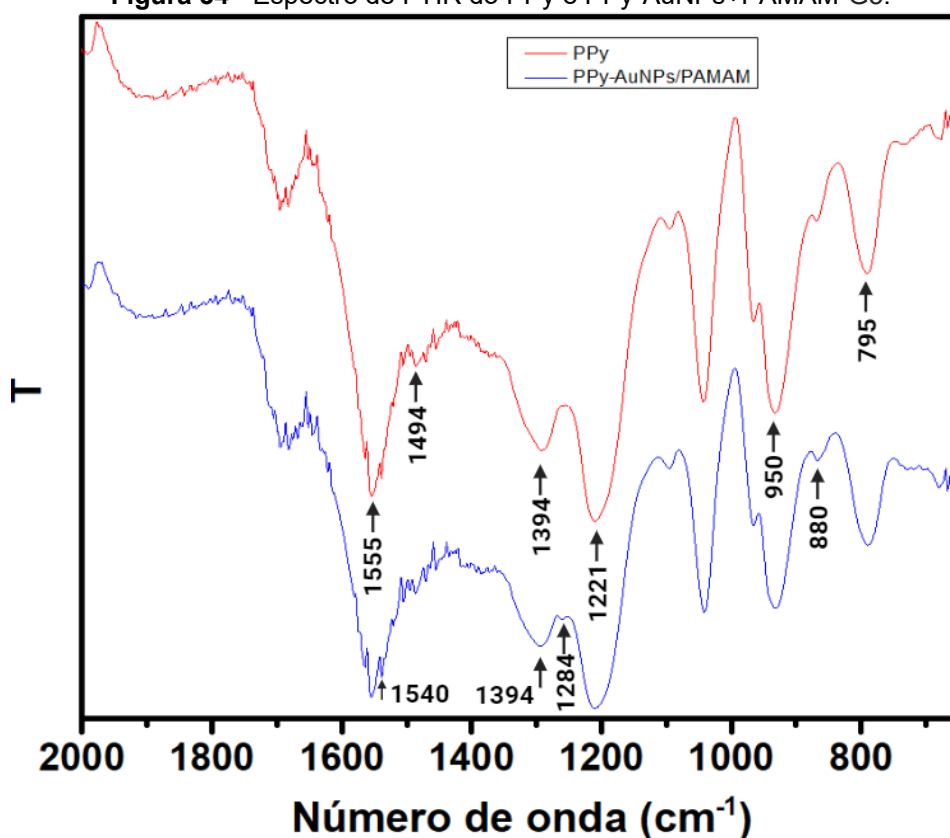
A AuNPs+PAMAM-G5 (Fig. 33c) foi bem adsorvida na superfície do eletrodo de ouro. Na matriz do dendrímero é visualizado ranhuras e cúpulas, as quais, são características da sua superfície com valores de rugosidade de $R_a = 44.11$ nm, $R_{ms} = 57.79$ nm e altura de 0.75 μ m. O valor sugere achatamento das moléculas do dendrímero na superfície do genossensor. Isso se dá devido ao agrupamento dos grupos funcionais que assumem um formato globular. Esta conformação é ideal para biossensores, pois auxilia na eficiência de imobilização dos biorreceptores. Tais resultados estão condizentes com estudos anteriores (Chakkarapani; Arumugam; Brandl, 2024; Satija; Karunakaran; Mukherji, 2014).

O BSA foi utilizado para bloquear sítios não específicos de interação do HPV. Após a imobilização da sonda de reconhecimento, a microscopia mostrou que o genossensor MY09 (Fig. 33d) apresenta um perfil distinto com maior rugosidade em sua superfície tendo valores de $R_a = 47.76$ nm, $R_{ms} = 67.24$ nm e altura de 0.88 μ m. Para o sistema positivo (Fig. 33e) com amostra de paciente infectado com HPV 18 de alto risco, é observado distribuição uniforme da amostra na superfície. A rugosidade passou para $R_a = 57.36$ nm e $R_{ms} = 73.87$ nm com altura de 1.24 μ m, estes achados caracterizam a hibridização e estão conforme outros estudos (Avelino *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2016). Dessa forma, a análise topográfica revela a capacidade do biossensor em identificar amostras de HPV.

5.2 CARACTERIZAÇÃO POR FTIR

Para confirmar a presença do PPy e AuNPs+PAMAM-G5 as amostras foram caracterizadas por FTIR (Fig. 34), aonde foi possível identificar as principais bandas de energia de grupos funcionais.

Figura 34 - Espectro de FTIR do PPy e PPy-AuNPs+PAMAM-G5.



Fonte: Autoria própria (2024).

As bandas entre 1555 e 1494 cm^{-1} são as vibrações características de alongamento do anel de polipirrol (Fu; Manthiram, 2012), C = N vibrações de alongamento (1394 cm^{-1}) (Pasha *et al.*, 2022), = C-H vibrações do plano (1221 cm^{-1}) e vibração de flexão do anel aromático (950 e 795 cm^{-1}) (Turkevich; Stevenson; Hillier, 1951).

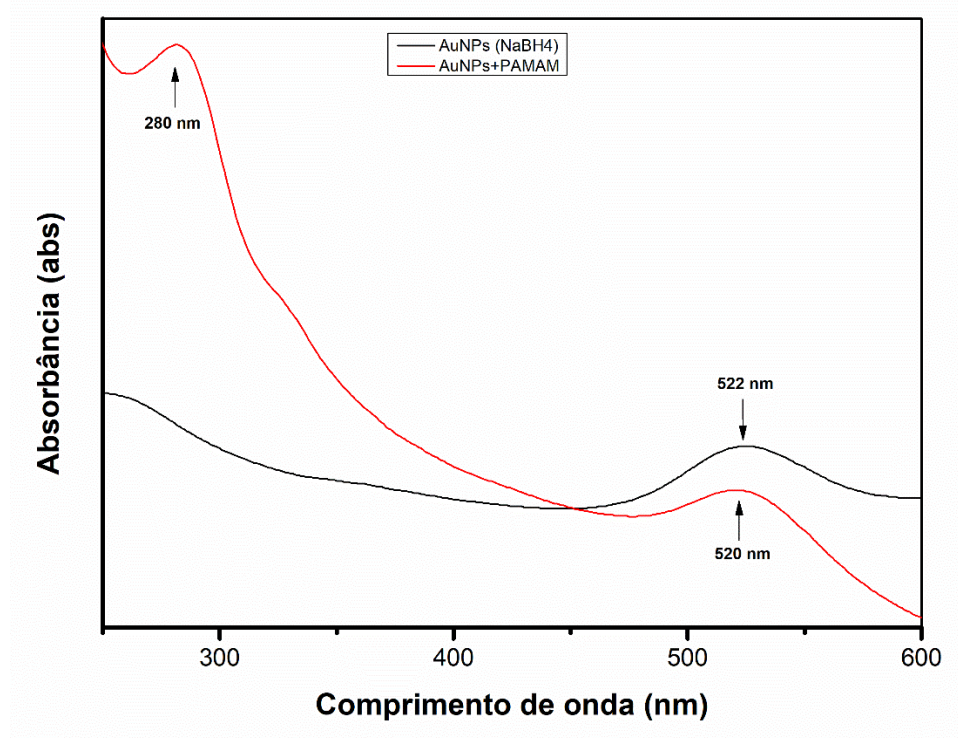
O espectro do PPy-AuNPs+PAMAM-G5 é semelhante ao do polipirrol, demonstrando que as partículas do PPy se aderiram com as de AuNPs+PAMAM(G5). Em adição, é possível identificar algumas bandas em 1540 cm^{-1} correspondente a amida secundária, 1394 cm^{-1} e 1284 cm^{-1} é dado aos grupos carboxilatos das terminações do PAMAM e 880 cm^{-1} é da ligação C – H (Farzin *et al.*, 2020; Wang; Dai, 2015; Zhou; Du, 2022).

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS AUNPS+PAMAM-G5 POR MEIO DA UV-vis

AuNPs revelam fortes espectros de absorção na faixa visível, devido a oscilações de elétrons livres na superfície da partícula, este fenômeno é denominado por SPR (Shamaila *et al.*, 2016). Resumidamente, ocorre uma interação entre matéria e luz, a luz, uma onda eletromagnética consegue “excitar” os elétrons na banda de valência do metal e gerar um movimento de elétrons na camada de valência. Este fenômeno permite identificar e caracterizar soluções de AuNPs por meio da técnica de espectroscopia no UV-vis. Assim, é possível identificar a estrutura e as propriedades ópticas das NPs, a partir, das bandas de absorção.

A AuNPs reduzida por NaBH_4 tem cor característica vermelha, apresentou pico SPR em aproximadamente 520 nm (Fig. 35). Segundo a literatura, picos nesta faixa são características de AuNPs com diâmetro de cerca de 15 nm. O pico é diretamente proporcional ao diâmetro das NPs (SHAMAILA *et al.*, 2016). A AuNPs+PAMAM-G5 apresentou uma banda na faixa de 280 nm, característico do PAMAM-G5, mantendo a banda de 520 nm característica da AuNPs (Jin *et al.*, 2019).

Figura 35 - Espectroscopia de absorção UV-visível da AuNPs redução pelo borohidreto de sódio e AuNPs+PAMAM-G5.

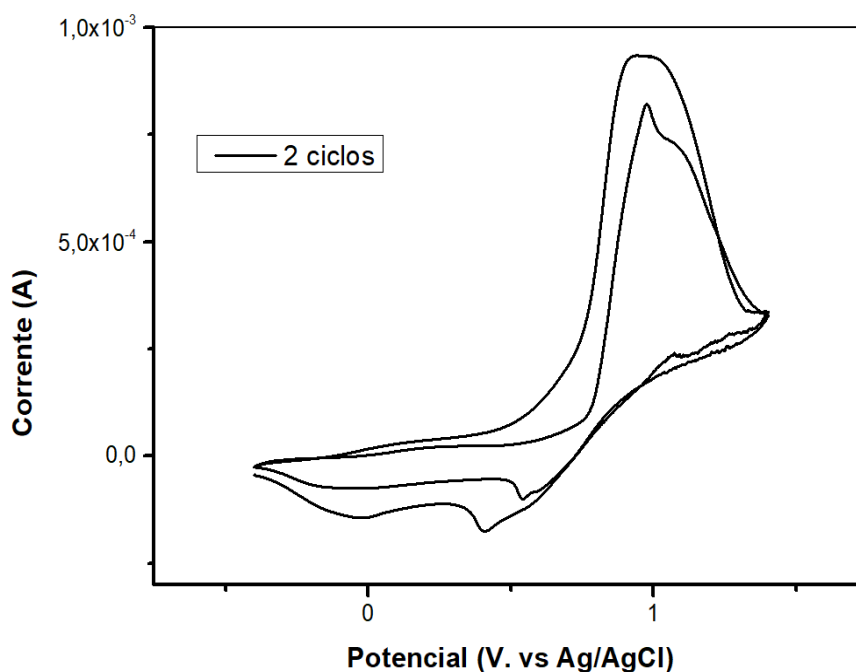


Fonte: Autoria própria (2024).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DO PPY POLIMERIZADO ELETROQUIMICAMENTE

A obtenção do polímero de polipirrol (PPy) se deu pelo processo de eletropolimerização, na superfície do disco de ouro do eletrodo de trabalho, por meio da técnica de voltametria cíclica. Na parte inicial do estágio de deposição é possível observar de forma predominante a alça de nucleação com crescimento reproduzível no estágio seguinte. O pico anódico obtido foi em torno de 1 V, demonstrando a obtenção do filme de PPy após oxidação das espécies poliméricas. Para isso, se realizou 2 ciclos de VC (Fig. 36), podendo ser observado a maximização da corrente. A redução do I_{pa} após os ciclos voltamétricos ocorre pelo aprisionamento de produtos de oxidação, consumo de monômeros de pirrol e à degradação oxidativa (superoxidação) do filme polimérico (Avelino *et al.*, 2022).

Figura 36 - Eletropolimerização do PPy por voltametria cíclica.



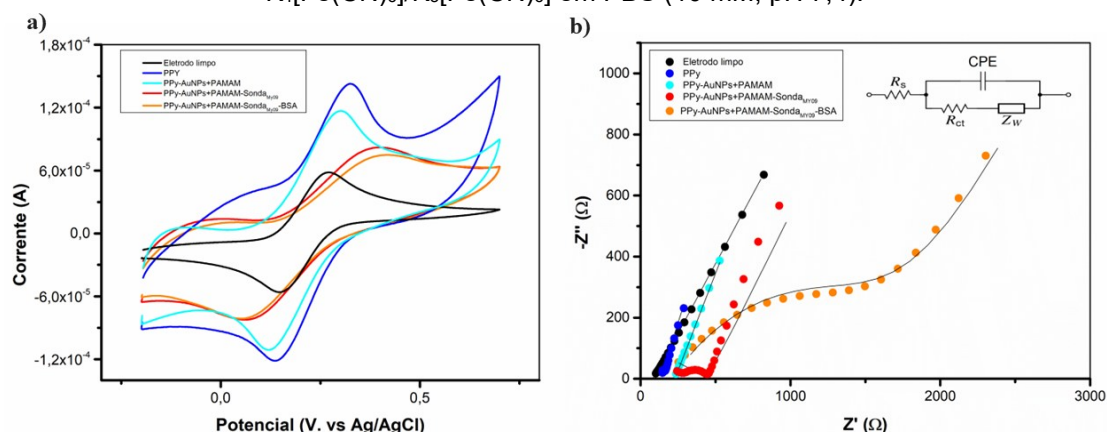
Fonte: Autoria própria (2024).

5.5 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DA PLATAFORMA SENSORA

Para a caracterização eletroquímica do biossensor, foram utilizadas técnicas de VC e EIE em um sistema com a sonda redox ferro-ferricianeto de potássio ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$), permitindo excelente troca eletrolítica do meio. A Fig. 37a apresenta os voltamogramas cíclicos de cada etapa de montagem do sensor e a voltametria foi estudada por meio dos dados de corrente de pico anódico (I_{pa}).

Na Fig.37b é possível observar o circuito de Randles que foi utilizado para avaliar a resposta impedimétrica, sendo este composto pelo R_{CT} , CPE, Z_W , N e R_s . O R_{CT} se relaciona com o processo faradaico de transferência de carga entre as espécies da sonda redox, e na Fig. 37b, corresponde ao diâmetro do semicírculo formado, podendo ser aplicado para determinar as interações entre a superfície do eletrodo de trabalho e a solução eletrolítica.

Figura 37 - Voltamograma cíclico (a) e diagramas de Nyquist (b) da montagem da plataforma sensora PPy-AuNps+PAMAM-G5-MY09-BSA. Os experimentos foram feitos utilizando 10 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em PBS (10 mM, pH 7,4).



Fonte: Autoria própria (2024).

A primeira etapa para construção da plataforma é a limpeza do eletrodo de trabalho, que teve resposta elétrica média de $55.73 \mu\text{A}$ e R_{CT} $0.08 \text{ k}\Omega$. Seguidamente, realizou-se o aumento da condutividade da superfície do eletrodo pelo processo de eletropolimerização com PPy via voltametria cíclica, tendo um aumento da I_{pa} com alta densidade de corrente e resposta amperométrica significativa $I_{pa} = 73.59 \pm 4.56 \mu\text{A}$, em consequência o PPy revelou baixa resistência a transferência de carga ($R_{CT} = 0.07 \pm 0.02 \text{ k}\Omega$) devido a sua característica condutora (Jain; Jadon; Pawaiya, 2017).

A superfície do eletrodo após eletropolimerização foi adsorvida com AuNPs+PAMAM-G5 visando o aumento da área de adsorção e amplificação do sinal de resposta; observou-se uma diminuição do I_{pa} ($I_{pa} = 83.79 \pm 1.92 \mu A$) e aumento do $R_{CT} = 0.15 \pm 0.02 k\Omega$, devido à interferência dos AuNPs no processo de dopagem/desdopagem de ânions do PPy (Chen *et al.*, 2007). Em seguida, para promover a ligação de elementos de biorreconhecimento na superfície de trabalho, utilizou-se o reagente bioconjugante GA para o ancoramento de sondas oligonucleotídicas.

O GA se liga covalentemente ao dendrímero PAMAM-G5 graças a sua propriedade de reticulação, por meio dos grupos carbonila e grupos amino livres da AuNPs+PAMAM-G5 (BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2016). Esta interação resulta numa diminuição de correntes de pico ($I_{pa} = 65.12 \pm 8.11 \mu A$) e aumento da resistividade eletroquímica ($R_{CT} = 0.18 \pm 0.01 k\Omega$). Construindo assim um ambiente adequado no eletrodo de trabalho para imobilização da sonda degenerada MY09, usada na rotina diagnóstica para detectar a presença ou ausência do HPV (Senapati *et al.*, 2017).

Com a imobilização da sonda ocorreu uma diminuição da corrente amperométrica ($I_{pa} = 41.09 \pm 5.36 \mu A$) e aumento do ($R_{CT} = 0.69 \pm 0.04$) indicando o processo de hibridização. A adição de BSA 1% no eletrodo de trabalho bloqueou os sítios ativos não específicos para o HPV com diminuição da corrente amperométrica ($I_{pa} = 46.89 \pm 7.51$) e aumento da transferência de carga ($R_{CT} = 1.58 \pm 0.17$). A Tab. 3 descreve os valores apresentados pelos elementos do circuito de Randles para cada etapa de modificação do eletrodo.

Tabela 3 - Valores dos elementos do circuito equivalente obtidos a partir do ajuste dos resultados de impedância da plataforma biossensora.

Eletrodo modificado	CPE (μF)	N	R_{CT} ($k\Omega$)	RS (Ω)	ZW (μMho)
Eletrodo limpo	728.33 ± 7.50	0.459 ± 0	0.08 ± 0.004	0.33 ± 0.0005	299 ± 6.92
PPy	0.71 ± 0.31	1.05 ± 0.07	0.07 ± 0.02	0.26 ± 0.04	2090 ± 242.48
AuNPs-PAMAM (G5)	1683.33 ± 80.82	0.60 ± 0.002	0.15 ± 0.02	398 ± 5.19	317 ± 51.96
PrimerMY09	10.34 ± 6.61	0.35 ± 0.04	0.69 ± 0.04	111.8 ± 71.90	1623.33 ± 66.58
BSA	4.88 ± 1.59	0.46 ± 0.14	1.58 ± 0.17	537.33 ± 183.14	1440 ± 217.94

Fonte: Autoria própria (2024).

5.6 DESEMPENHO ANALÍTICO DA PLATAFORMA SENSORA FRENTE A SUBTIPOS DE HPV

Para o ensaio de hibridização se utilizou o gene L1 de diferentes genótipos de HPV de baixo risco (6) e de alto risco (16, 18, 31 e 33) nas concentrações de 1, 10, 25, 50, 75 e 100 pg.μL⁻¹ com o tempo de incubação de 5 minutos. A utilização dos plasmídeos recombinantes é recomendada para testes por especialistas, por conter o genoma completo do HPV em um contexto de DNA genômico humano (Thapa; Unger; Querec, 2023).

5.6.1 Análise dos dados voltamétricos frente a genótipos de HPV

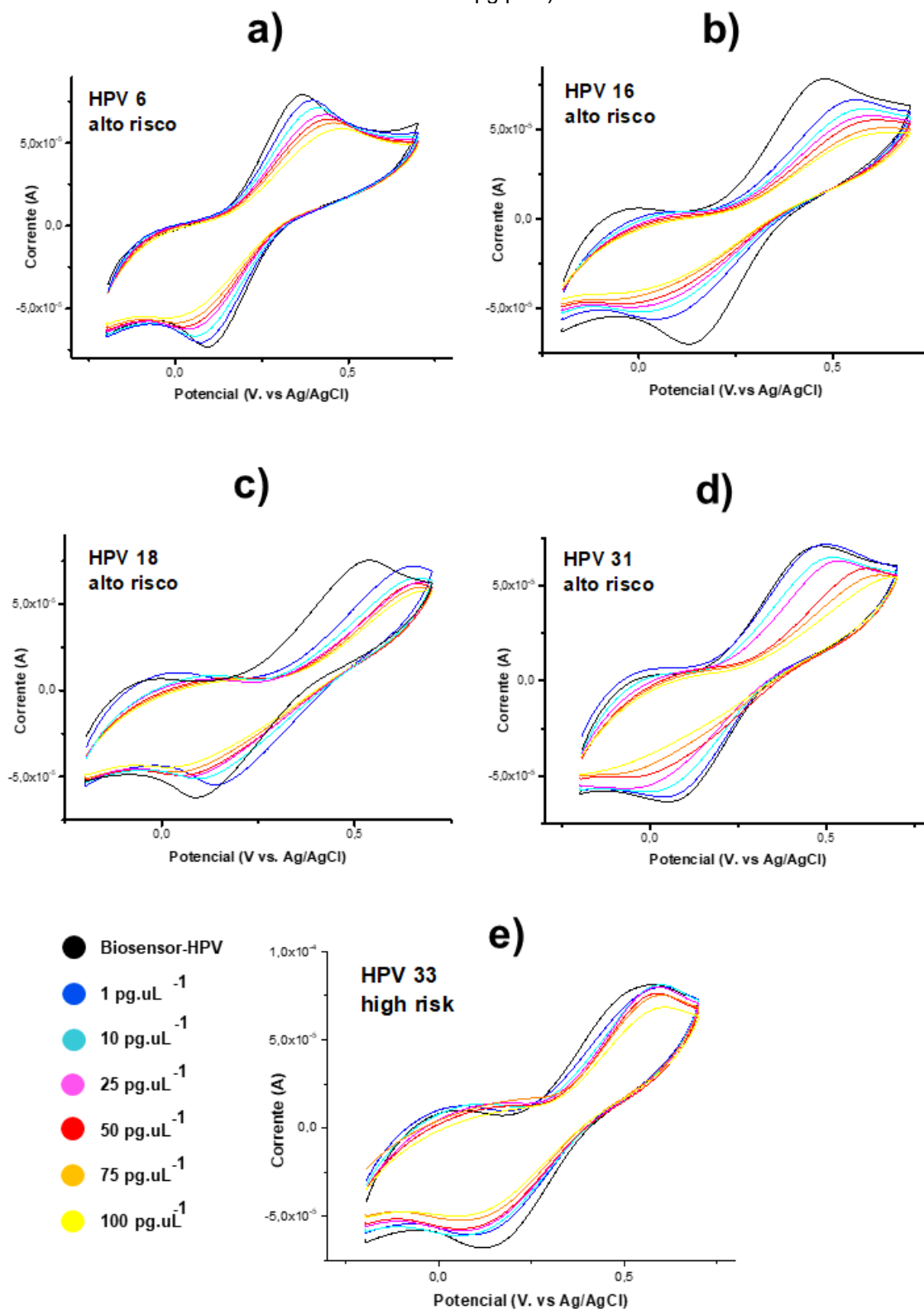
A resposta voltamétrica dos plasmídeos após interação com o biossensor apresentou diminuição expressiva dos picos anódicos e catódicos, com proporcionalidade ao aumento das concentrações das amostras (Fig. 38 a-e). Todas as leituras foram feitas em triplicata.

A redução dos picos anódicos e catódicos ocorre porque a imobilização com oligonucleotídeos sintéticos diminui o transporte interfacial geral de elétrons, devido ao comportamento isolante demonstrado pelas moléculas de DNA (Avelino *et al.*, 2022a). Com os parâmetros obtidos das respostas voltamétricas dos subtipos de HPV, o grau de reconhecimento do biossensor pode ser avaliado por meio da porcentagem de desvio relativo da variação de corrente anódica (ΔI) (Silva Junior, 2021).

$$\Delta I (\%) = \frac{\left[\left(\frac{1}{I_b}\right) - \left(\frac{1}{I_a}\right)\right]}{\left(\frac{1}{I_b}\right)} \times 100 \text{ Eq. 6}$$

Na Eq. 6, I_a e I_b , corresponde respectivamente a corrente de pico anódica antes e após o processo de hibridização. O I_a do biossensor corresponde a 46,98 μA, e a Tab. 4 dispõe dos valores de ΔI (%) da plataforma genossensora após interação com diferentes concentrações e genótipos de HPV. Os resultados demonstraram um aumento nos valores de ΔI (%) à medida que a concentração das amostras aumenta. Todas as leituras foram feitas em triplicata.

Figura 38 - Voltamogramas cíclicos de plasmídeos recombinantes contendo o gene L1: genótipos de baixo risco HPV 6 (a) e de alto risco 16 (b), 18 (c), 31 (d) e 33 (e) (1, 10, 25, 50, 75 e 100 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$).



Fonte: Autoria própria (2024).

Tabela 4 - Variação da corrente anódica (I_{pa}) dos resultados dos voltamogramas derivados da hibridização com o gene L1 do HPV inserido em plasmídeos recombinantes.

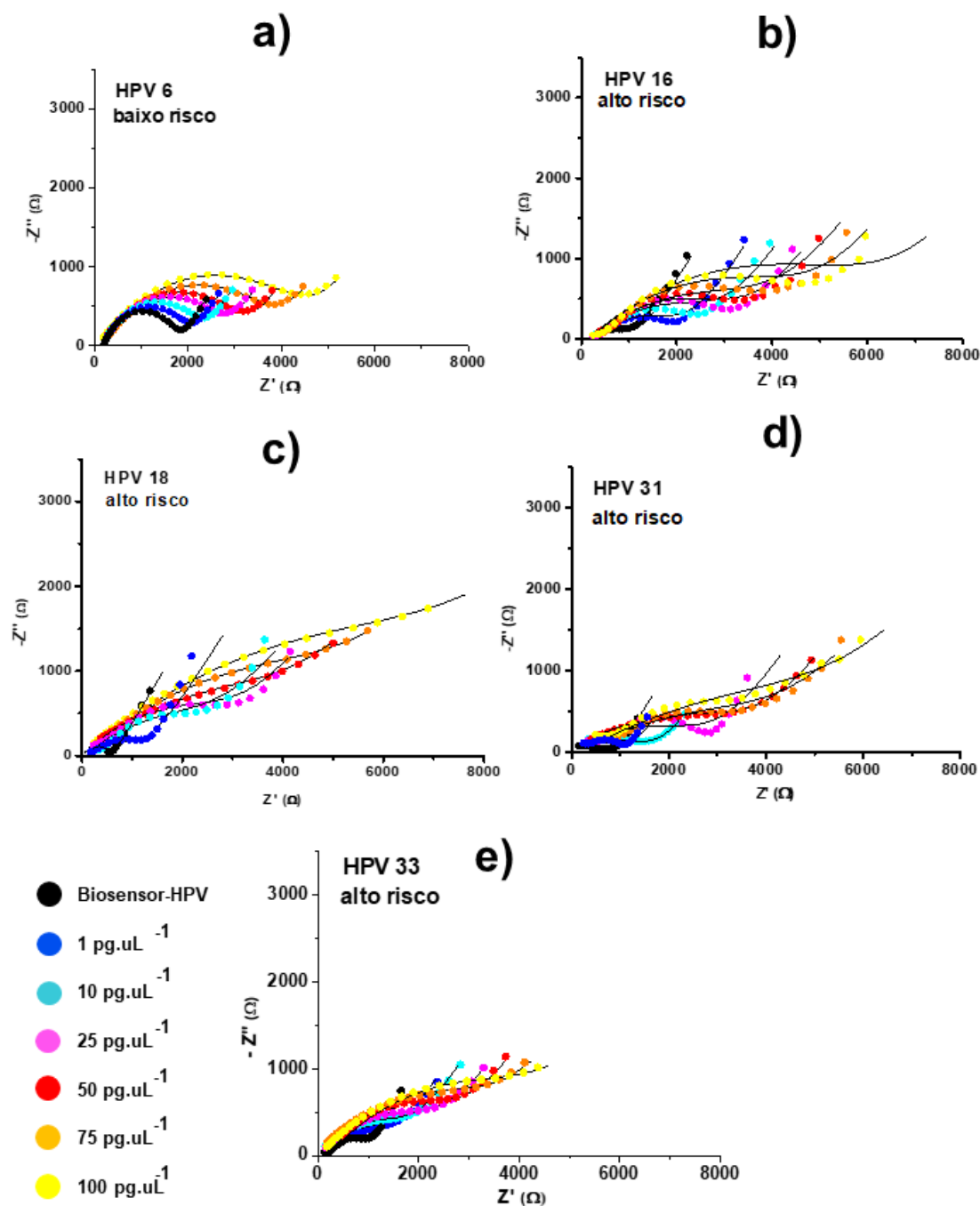
	Concentração analítica	I_{pa} (μA)	ΔI (%)
PPy-AuNPs+PAMAM-G5-MY09-BSA			
HPV de baixo-risco (plasmídeo recombinante)			
Biossensor-HPV6	1	45.95 ± 0.14	2.04 ± 0.31
Biossensor-HPV6	10	41.30 ± 1.02	13.53 ± 2.73
Biossensor-HPV6	25	35.8 ± 1.93	30.97 ± 6.56
Biossensor-HPV6	50	34.98 ± 1.11	34.09 ± 4.25
Biossensor-HPV6	75	28.7 ± 2.94	63.37 ± 14.65
Biossensor-HPV6	100	28.2 ± 1.06	66.27 ± 5.93
HPV de alto-risco (plasmídeo recombinante)			
Biossensor-HPV16	1	24.67 ± 0.32	90.08 ± 2.50
Biossensor-HPV16	10	20.15 ± 0.35	132.74 ± 4.08
Biossensor-HPV16	25	17.1 ± 0.28	174.24 ± 4.53
Biossensor- HPV16	50	15.15 ± 1.06	210.26 ± 21.72
Biossensor- HPV16	75	11.9 ± 0.14	294.22 ± 4.68
Biossensor-HPV16	100	10.6 ± 0.14	342.39 ± 5.90
Biossensor-HPV18	1	12.35 ± 2.17	285.67 ± 68.01
Biossensor-HPV18	10	9.11 ± 2.15	429.24 ± 125.22
Biossensor-HPV18	25	8.03 ± 0.01	483.93 ± 1.02
Biossensor- HPV18	50	8.39 ± 0.37	459.10 ± 24.95
Biossensor-HPV18	75	7.75 ± 1.00	510.15 ± 79.05
Biossensor-HPV18	100	6.06 ± 0.63	678.05 ± 81.70
Biossensor-HPV33	1	24.34 ± 0.36	92.66 ± 2.91
Biossensor-HPV33	10	23.32 ± 1.85	101.70 ± 16.02
Biossensor-HPV33	25	24.94 ± 1.08	88.15 ± 8.16
Biossensor-HPV33	50	22.09 ± 0.74	112.33 ± 7.13
Biossensor-HPV33	75	20.66 ± 0.74	127.10 ± 8.23
Biossensor-HPV33	100	19.31 ± 0.09	142.76 ± 1.15
Biossensor-HPV31	1	31.95 ± 0.55	46.78 ± 2.53
Biossensor-HPV31	10	28.11 ± 1.36	66.97 ± 8.10
Biossensor-HPV31	25	24.94 ± 1.08	88.15 ± 8.16
Biossensor-HPV31	50	15.51 ± 0.24	202.26 ± 4.82
Biossensor-HPV31	75	10.21 ± 0.29	359.45 ± 13.36
Biossensor-HPV31	100	4.71 ± 0.06	894.57 ± 13.42

Fonte: Autoria própria (2024).

5.6.2 Análise dos dados impedimétricos frente a genótipos de HPV

Os dados impedimétricos da detecção dos plasmídeos recombinantes está disposto na Fig. 39 a-e.

Figura 39 - Espectros de impedância de plasmídeos recombinantes contendo o gene L1: genótipos de baixo risco HPV 6 (a) e de alto risco 16 (b), 18 (c), 31 (d) e 33 (e) (1, 10, 25, 50, 75 e 100 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). Todas as leituras foram feitas em triplicata.



Fonte: Autoria própria (2024).

É possível observar que o biossensor obteve um aumento gradual no R_{CT} à medida que a concentração de amostras de plasmídeo aumentava. As alterações mais relevantes nos valores dos componentes do circuito após interação com as amostras estão ligadas ao CPE e ao R_{CT} . O CPE correlaciona variações na área ativa do sensor, como a espessura da dupla camada elétrica (EDL). O R_{CT} fornece informações sobre as alterações que ocorrem na superfície do sensor e a interação analito-alvo, ou seja, detecção quantitativa do papilomavírus (Córdoba-Torres; Mesquita; Nogueira, 2015; Silva Junior, 2021).

Os resultados deixam claro a capacidade da plataforma em detectar diferentes genótipos de HPV, aumentando os valores do R_{CT} , devido à ancoragem dos oligonucleotídeos na superfície de detecção, resultando na efetiva hibridização. Em contraste, o CPE diminui até certo ponto devido à redução de locais de sonda livres na área superficial efetiva do eletrodo (Saxena; Srivastava, 2019).

A Tab. 5 dispõem dos valores dos elementos do circuito equivalente de Randles, extraídos a partir dos dados impedimétricos. Foram realizadas duas réplicas para cada condição experimental e os valores são descritos como os valores médios $\pm$ o desvio padrão.

Com base nos dados obtidos a partir do ajuste do circuito equivalente de Randles, calculou-se os valores de ΔR_{CT} (%) da resposta do genossensor frente a plasmídeos recombinantes para posterior construção de uma curva de calibração. Esta relação foi calculada pela Eq. 7.

$$\Delta R_{CT} (\%) = \frac{R_{CT} (\text{Genossensor-HPV}) - R_{CT} (\text{Genossensor})}{R_{CT} (\text{Genossensor})} \times 100 \text{ Eq. 7}$$

O R_{CT} (Genossensor) consiste no valor de leitura da plataforma sensora, ou seja, PPy-AuNPs+PAMAM-G5-MY09-BSA, enquanto o R_{CT} (Genossensor-HPV) corresponde aos valores de leituras do circuito das amostras de plasmídeo recombinante (Fig. 40).

As curvas de calibração foram construídas a partir do ajuste linear do erro do x, exibindo correlação linear com os valores logarítmicos das concentrações de plasmídeo recombinante contendo o gene L1 de baixo risco HPV 6 e de alto

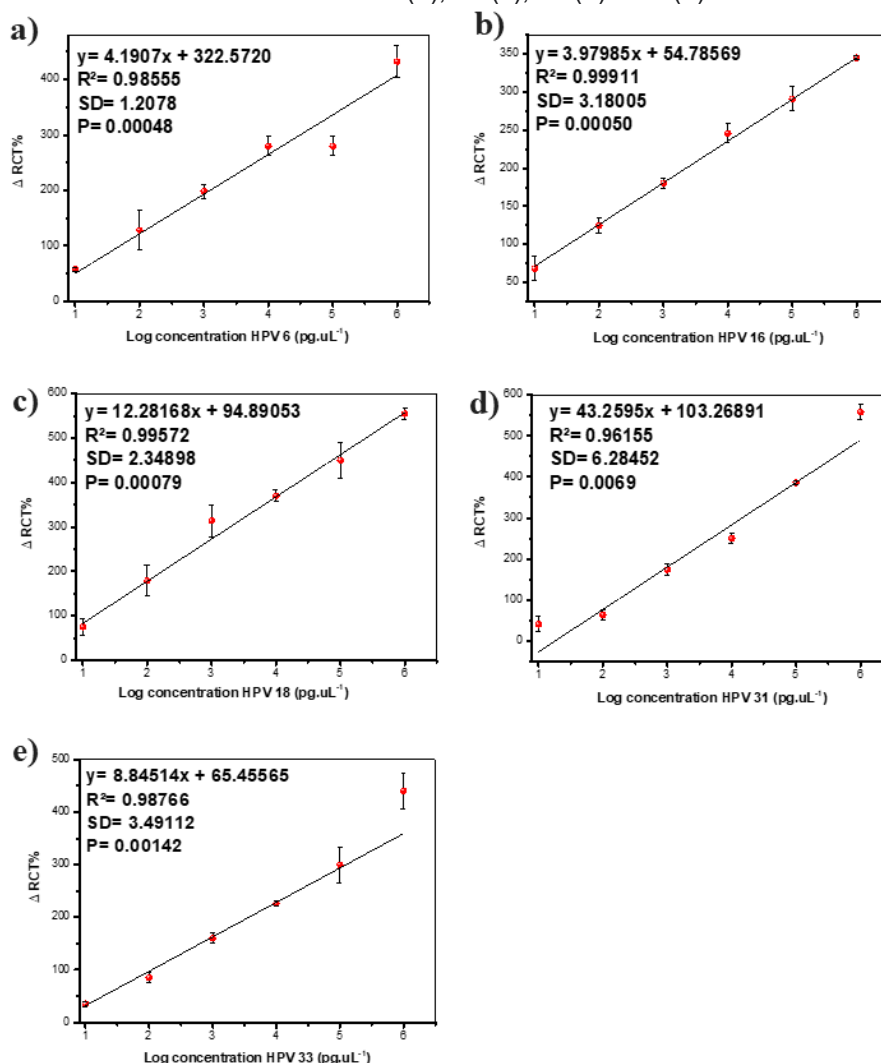
risco 16, 18, 31 e 33 (1 a 100 pg.µL⁻¹). O coeficiente de correlação (R^2), desvio padrão (DP) e probabilidade de significância (P) são mostrados na Fig. 40 a-e.

Tabela 5 - Valores dos elementos do circuito equivalente obtidos a partir do ajuste dos resultados de impedância dos plasmídeos recombinantes de baixo risco HPV 6 e de alto risco 16, 18, 33 e 31.

	Concentração de amostra (pg.µL ⁻¹)	CPE (µMho)	Rs (kΩ)	R _{CT} (kΩ)
HPV de baixo-risco (plasmídeo recombinante)				
Biossensor-HPV6	1	32.4 ± 4.10	0.51 ± 0.28	2.47 ± 0.02
Biossensor-HPV6	10	42.2 ± 4.24	0.51 ± 0.08	3.61 ± 0.55
Biossensor-HPV6	25	54.95 ± 1.90	0.51 ± 0.35	4.72 ± 0.19
Biossensor-HPV6	50	50.75 ± 12.23	0.52 ± 0.28	6 ± 0.26
Biossensor-HPV6	75	61 ± 8.90	0.34 ± 0.16	8.40 ± 0.45
Biossensor-HPV6	100	57.15 ± 2.05	0.65 ± 0.13	10.12 ± 1.27
HPV de alto-risco (plasmídeo recombinante)				
Biossensor-HPV16	1	27.6 ± 0.14	0.70 ± 0.08	2.66 ± 0.35
Biossensor-HPV16	10	30.45 ± 4.87	0.68 ± 0	3.55 ± 0.15
Biossensor-HPV16	25	35 ± 0.70	0.68 ± 0.01	4.43 ± 0.11
Biossensor- HPV16	50	35 ± 8.48	0.61 ± 0.10	5.46 ± 0.19
Biossensor- HPV16	75	29.45 ± 2.61	0.71 ± 0.01	6.18 ± 0.25
Biossensor-HPV16	100	26.95 ± 0.77	0.71 ± 0	7.03 ± 0.04
Biossensor-HPV18	1	36.95 ± 35.0	0.57 ± 0.15	2.77 ± 0.41
Biossensor-HPV18	10	40.33 ± 53.12	0.70 ± 0.07	4.41 ± 0.55
Biossensor-HPV18	25	9.82 ± 0.39	0.87 ± 0.09	6.54 ± 0.56
Biossensor- HPV18	50	24.30 ± 1.83	0.85 ± 0.05	7.43 ± 0.21
Biossensor-HPV18	75	60.95 ± 24.11	0.92 ± 0.21	8.69 ± 0.62
Biossensor-HPV18	100	78.05 ± 2.05	1.10 ± 0.002	10.35 ± 0.21
Biossensor-HPV33	1	48.45 ± 7.56	0.48 ± 0.02	2.13 ± 0.10
Biossensor-HPV33	10	51.0 ± 10.04	0.38 ± 0.03	2.93 ± 0.15
Biossensor-HPV33	25	56.45 ± 0.21	0.25 ± 0.17	4.10 ± 0.14
Biossensor-HPV33	50	61.5 ± 4.94	0.16 ± 0.04	5.15 ± 0.09
Biossensor-HPV33	75	58.05 ± 10.39	0.28 ± 0.003	6.31 ± 0.54
Biossensor-HPV33	100	62.85 ± 0.63	0.28 ± 0.06	8.54 ± 0.53
Biossensor-HPV31	1	55.5 ± 15.98	0.32 ± 0.07	1.86 ± 0.01
Biossensor-HPV31	10	32.05 ± 5.86	0.15 ± 0.10	2.58 ± 0.20
Biossensor-HPV31	25	25 ± 1.83	0.103 ± 0.07	4.33 ± 0.24
Biossensor-HPV31	50	34.65 ± 4.31	0.11 ± 0	5.53 ± 0.18
Biossensor-HPV31	75	50.4 ± 8.76	0.278 ± 0.06	7.68 ± 0.05
Biossensor-HPV31	100	55 ± 5.23	0.35 ± 0.01	9.95 ± 0.07

Fonte: Autoria própria (2024).

Gráfico – 40: Curvas de calibração, coeficiente de correlação (R^2), desvio padrão (DP) e probabilidade de significância (P) dos plasmídeos recombinantes de baixo risco HPV 6 (a) e de alto risco HPV 16 (b), 18 (c), 31 (d) e 33 (e).



Fonte: Autoria própria (2024).

O limite de quantificação (LQ) e detecção (LOD) foram calculados respectivamente pelas fórmulas, $10\sigma \cdot s^{-1}$ e $3,3\sigma \cdot s^{-1}$, aonde σ é o desvio padrão do intercept e s é o slope, grau de inclinação da curva. O limite de detecção é considerado o menor valor de concentração do analito, a qual, poderá ser detectado, mas não necessariamente quantificado. Já o limite de quantificação é a menor concentração do analito, que poderá ser medida, ou seja, quantificada em níveis aceitáveis de precisão e exatidão (Forti; Alcaide, 2011).

As curvas de calibração resultaram nos seguintes valores: HPV 6, $y = 58.54 + 5.415.43$ (pg.μL⁻¹) com LOD de 0.04 e LQ de 0.12; HPV 16, $y = 68.35 + 410.44$ (pg.μL⁻¹) com LOD de 0.23 e LQ de 0.72; HPV 18, $y = 75.31 + 3996$ (pg.μL⁻¹)

¹⁾ com LOD de 0.42 e LQ de 1.29; HPV 31, $y = 17.72 + 80156 (\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1})$ com LOD de 1.38 e LQ de 4.18 e HPV 33, $y = 35.12 + 8.946 (\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1})$ com LOD de 0.44 e LQ de 1.35 (Tab. 6). Esses dados são consistentes com excelente desempenho analítico quando comparados aos previamente descritos na literatura. Ao nível de comparação, a Tab. 7 dispõe de trabalhos voltados a construção de biossensores para o diagnóstico de HPV.

Tabela 6 – Valores de LOD e LQ obtidos do genossensor PPy-AuNPs+PAMAM-MY09-BSA.

Plasmídeo recombinante contendo o gene L1	LOD ($\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	LQ ($\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)
HPV de baixo risco		
6	0.04	0.12
HPV de alto risco		
16	0.23	0.72
18	0.42	1.29
31	1.38	4.18
33	0.44	1.35

Fonte: autoria própria (2024).

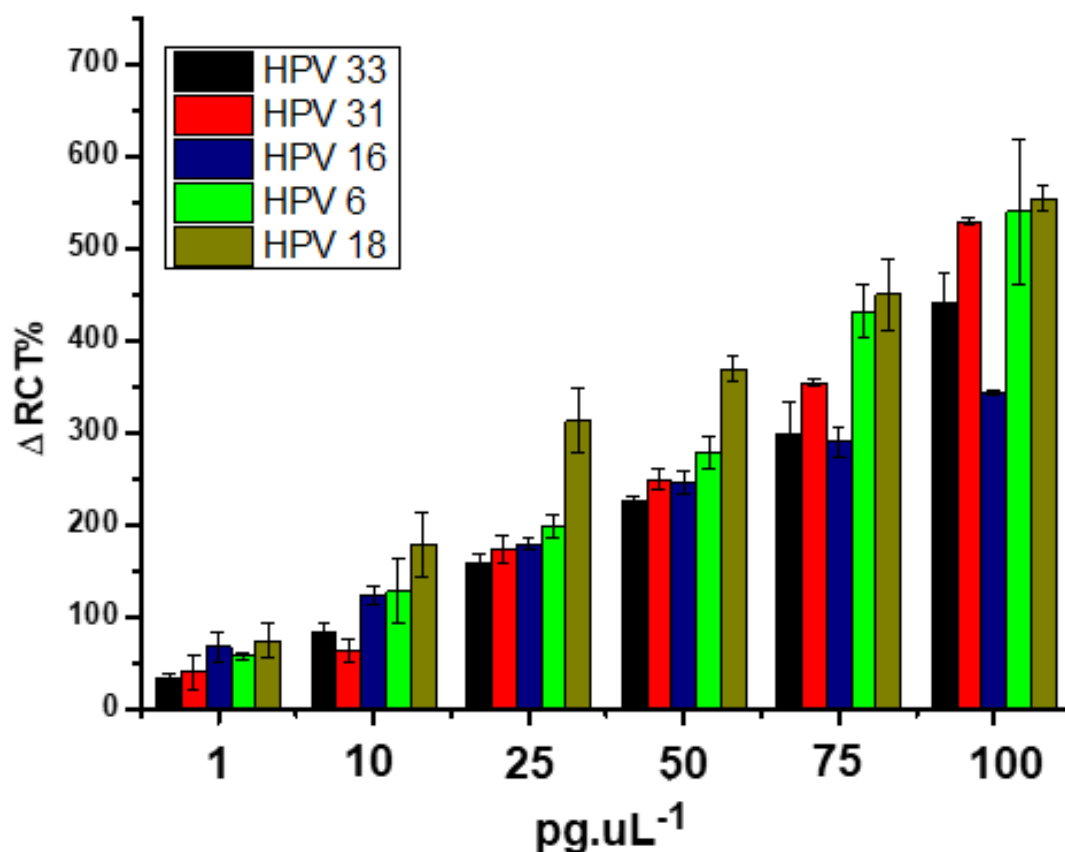
Tabela 7 - Desempenho analítico de biossensores para detecção de HPV comparado ao genossensor PPy-AuNPs+PAMAM-MY09-BSA.

Plataforma	Molécula alvo	Técnica analítica	Tempo de detecção	Limite de detecção	Referencias
PPy-AuNPs+PAMAM- -Probe _{MY09} -BSA	HPV6	CV e EIS	5 min	0.04 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	Este trabalho
	HPV16			0.23 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	
	HPV18			0.42 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	
	HPV31			1.38 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	
	HPV33			0.44 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	
Superfície de ouro/AuNp/PANI -sonda	HPV11	CV e EIS	15 min	2.74 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	(Avelino <i>et al.</i> , 2020)
	HPV16			7.43 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	
ITO/PPy/AuNp/ Cys/ ProbeBSH16/BS A	HPV16	CV e EIS	15 min	57.14 fM	(AVELINO <i>et al.</i> , 2022a)
	HPV31				
	HPV33				
	HPV35				
	HPV52				
Au/Cu- PTCA/rGO/PDN A	HPV16	SWV	1 a 20 min	2.15 fM	(Peteni <i>et al.</i> , 2023)
Fe 3 O 4 - AuNPs-SPCE	HPV16	DPV	30 min	0.1nM	(Rasouli <i>et al.</i> , 2023)
rGO-MWCNT / AuNPs-L- cisteína/ssDNA	HPV18	DPV	15 min	0.05 fM	(Mahmoodi <i>et al.</i> , 2020)
PAA-PSS- Avidin-DNA RP- biotina	HPV16	DPV	30 min	22 fM	(Chaibun <i>et al.</i> , 2022)
	HPV18			20 fM	
MWCNT/NH 2 - IL-rGOssDNA	HPV16	DPV	-	1.3 nM	(Farzin <i>et al.</i> , 2020)
Micro-gapped IDE Genosensor (micro-IDE)	HPV18	VC	30 min	0.529 aM	(Jaapar <i>et al.</i> , 2023)
Gold surface- GNRsTh-probe	HPV16	CV and EIS	30 min	3.5 amol L ⁻¹	(Lucena <i>et al.</i> , 2021)
	HPV18			1.2 amol L ⁻¹	
Au/APTES/CP/T D/AP1/AP2	HPV16	DPV	2 h	5.475×10^{-16} mol/L	(Yang <i>et al.</i> , 2022)
GONRs/Ag@Au NPs	HPV16	CV e EIS	-	100 aM	(Pareek <i>et al.</i> , 2023)

Fonte: Autoria própria (2024).

A Fig. 41 mostra o $\Delta R_{CT}\%$ com relação à adesão das amostras de plasmídeo à superfície do genossensor.

Figura 41 - $\Delta R_{CT}\%$ da camada sensora PPy-AuNPs+PAMAM-G5-MY09-BSA após exposição a diferentes concentrações de amostras de plasmídeo HPV.



Fonte: Autoria própria (2024).

A variação de resposta do $\Delta R_{CT}\%$ pode ser correlacionada a duas hipóteses: semelhança genética entre HPVs pertencentes ao mesmo ramo filogenético e forças de pareamento com a sonda MY09.

Todos os papilomavírus usados neste trabalho foram escolhidos por pertencerem ao gênero alfa-papilomavírus, que segundo a IARC são os tipos carcinógenos. O HPV de baixo risco HPV 6, pertence ao ramo filogenético alfa-10, os de alto risco 31, 33, e 16 alfa-9 e o HPV 18 alfa-7 (Cosper *et al.*, 2021). Assim, é possível observar que os alfa-papilomavírus pertencentes ao mesmo ramo filogenético obtiveram um padrão de resposta semelhante, enquanto os de outros ramos estão minimamente distantes.

No entanto, outro ponto que merece atenção é a semelhança de resposta entre o HPV de baixo risco 6 e o de alto risco 18, apesar de pertencerem a ramos filogenéticos distintos. Isto, pode ser devido a força de pareamento da sonda degenerada MY09, de acordo com a complementariedade da amostra analisada. Também é preciso comprovar a integridade da amostra de HPV 18, com sequenciamento por PCR, para descartar a possibilidade de infecção múltipla da amostra, onde estaria presente mais de um tipo de HPV.

Ainda assim, dentre todos os genótipos analisados, o biossensor apresentou maior sensibilidade ao HPV 18, que está presente em aproximadamente 71% dos casos de CC, e também intimamente atrelado ao desenvolvimento de lesões glandulares e adenocarcinoma (ADC) que é um tumor maligno em diferentes órgãos (Ambiente, 2024).

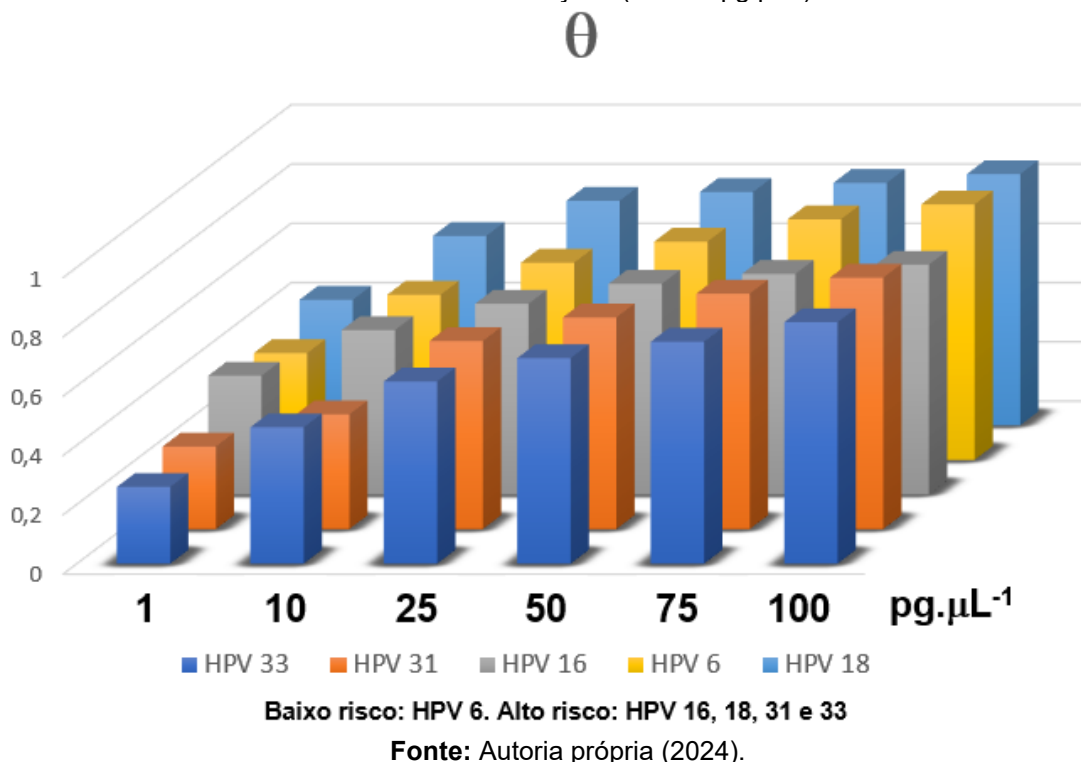
Outro parâmetro adicional para atestar o grau de reconhecimento biológico da plataforma, é o percentual de quantificação do recobrimento da camada sensora (θ). A partir deste se identifica informações sobre o preenchimento dos sítios de ligação do genossensor após a hibridização das amostras plasmidiais, e isto é feito por meio da Eq. 8.

$$\theta = 1 - \frac{R_{CT} (Genossensor)}{R_{CT} (GenossensorHPV)} \times 100 \text{ Eq. 8}$$

O R_{CT} (Genossensor) corresponde a resistência à transferência de elétrons da camada PPy-AuNPs+PAMAM-G5-MY09-BSA e R_{CT} (GenossensorHPV) são os valores do R_{CT} após exposição aos plasmídeos recombinantes dos respectivos HPV 6, 31, 33, 16 e 18 (Fig. 42).

O HPV 6 e 18 apresentaram um θ de 0,86 e 0,84 respectivamente, para a concentração de 100 pg. μL^{-1} . Como pode ser observado na Fig. 42 os valores de θ aumentam proporcionalmente à concentração de plasmídeos em pg. μL^{-1} em escala logarítmica. Os dados obtidos destacam que ocorreu o preenchimento adequado dos sítios de reconhecimento do genossensor, em todas as concentrações analisadas com resposta significativamente elevada.

Figura 42 - Quantificação do recobrimento da camada sensora (θ) após exposição a amostras de plasmídeos recombinantes de HPV de baixo risco 6 e alto risco HPV 31, 33, 16 e 18 em diferentes concentrações (1 - 100 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$).



5.6.3 Amostras clínicas e teste de especificidade

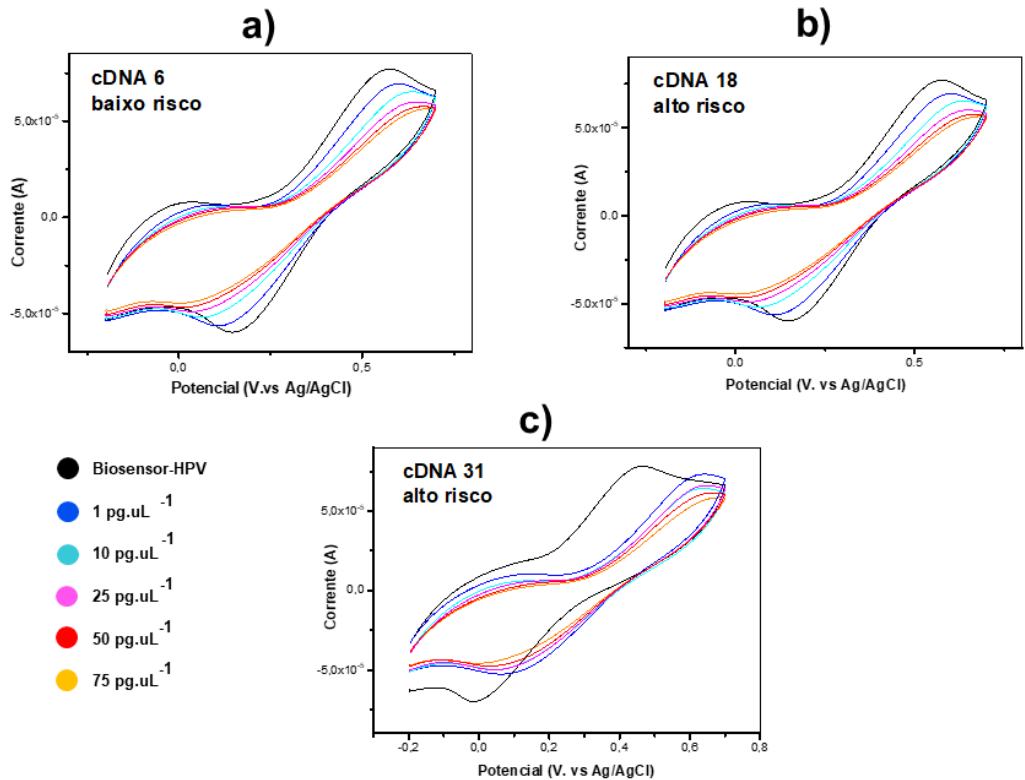
O desempenho do genossensor foi analisado por meio da capacidade de reconhecer amostras clínicas positivas para o HPV. As medidas de VC (Fig. 43 a-c) foram utilizadas para avaliar a interação da plataforma genossensora com amostra de DNA complementar (cDNA) de paciente com HPV 6, 18 e 31 nas concentrações de 1 a 75 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

Conforme pode ser visualizado na Fig. 43 a-c houve uma diminuição dos picos anódicos e catódicos na voltametria. Estas respostas estão diretamente relacionadas a formação de um complexo de DNA híbrido, entre a sonda MY09 e as amostras de cDNA (Thapa; Liu; Wang, 2022). Desta forma, é demonstrado a usabilidade do sistema AuNPs+PAMAM-G5 para imobilizar a sonda MY09 para permitir a identificação do HPV.

A partir das respostas voltamétricas foram extraídas as correntes de pico anódicas. A Tab. 8 dispõe dos valores de ΔI (%) da plataforma genossensora após interação com diferentes concentrações de cDNA de pacientes infectadas

com HPV 6, 18 e 31. Os resultados mostraram aumento nos valores de ΔI (%) à medida que a concentração das amostras aumentava. Foram realizadas duas análises, onde os valores experimentais são apresentados como valores médios $\pm$ seu desvio padrão.

Figura 43 - Resposta voltamétrica do genossensor para amostras de cDNA de paciente do sexo feminino infectada pelo HPV 6 (a), 18 (b) e 31 (c) na concentração 1-75 pg.μL⁻¹.



Fonte: Autoria própria (2024).

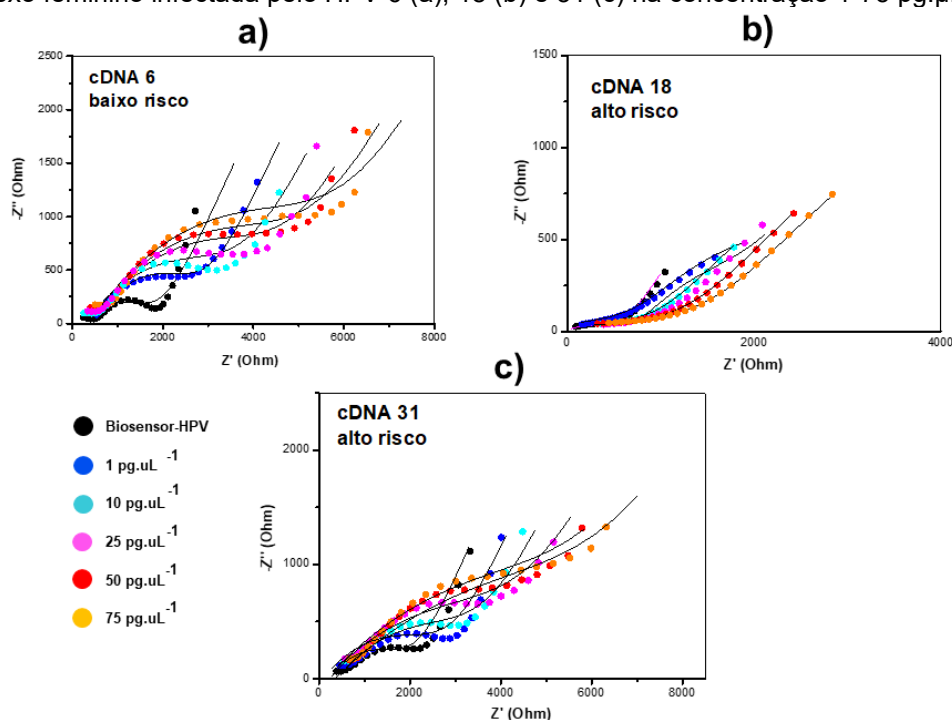
Tabela 8 - Variação da corrente anódica (I_{pa}) da plataforma genossensora PPy-AuNPs+PAMAM-G5-MY09-BSA após exposição a amostras de cDNA.

Ensaio com células cervicais (cDNA)	Concentração da amostra	I_{pa} (μA)	ΔI (%)
Biosensor-HPV31	1	1.96 ± 0.02	196.40 ± 2.64
Biosensor-HPV31	10	2.35 ± 0.01	235.16 ± 1.01
Biosensor-HPV31	25	2.63 ± 0.09	263.34 ± 9.95
Biosensor-HPV31	50	3.55 ± 0.05	355.71 ± 5.01
Biosensor-HPV31	75	5.60 ± 0.30	560.18 ± 30.18
Biosensor-HPV18	1	0.30 ± 0.09	30.86 ± 9.73
Biosensor-HPV18	10	1.05 ± 0.11	105.67 ± 11.65
Biosensor-HPV18	25	2.85 ± 0.18	285.26 ± 18.55
Biosensor-HPV18	50	4.71 ± 0.24	471.66 ± 24.61
Biosensor-HPV18	75	5.78 ± 0.13	578.21 ± 13.17
Biosensor-HPV6	1	1.26 ± 0.01	126.57 ± 1.00
Biosensor-HPV6	10	2.40 ± 0.32	240.33 ± 32.34
Biosensor-HPV6	25	3.21 ± 0.40	321.35 ± 40.50
Biosensor-HPV6	50	4.04 ± 0.26	404.61 ± 26.45
Biosensor-HPV6	75	6.02 ± 0.72	602.55 ± 72.55

Fonte: Autoria própria (2024).

As amostras clínicas positivas para o HPV também foram avaliadas por meio de dados impedimétricos (Fig. 44 a-c). Foi possível identificar aumento gradual do RCT à medida que aumenta a concentração das amostras. Pode-se atribuir esta resposta à ancoragem das amostras na superfície genossensora (Avelino *et al.*, 2020). Os valores do ajuste do circuito de Randles das leituras estão dispostos na Tab. 9. Os valores experimentais são descritos como os valores médios $\pm$ o desvio padrão de três medidas independentes.

Figura 44 - Resposta impedimétrica do genossensor para amostras de cDNA de paciente do sexo feminino infectada pelo HPV 6 (a), 18 (b) e 31 (c) na concentração 1-75 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.



Fonte: Autoria própria (2024).

O cDNA de amostra de paciente com HPV, pertencem a diferentes ramos filogenéticos, bem como o seu grau de risco. O cDNA 6 é de baixo risco e do grupo alfa-10, 31 e 18 são de alto risco, alfa-9 e alfa-7 respectivamente (Deutsch *et al.*, 2022). Além disso, também deve-se levar em consideração que a diferença notável no padrão de resposta das amostras, pode ser devido a influência da força de pareamento das amostras com a sonda degenerada MY09.

Tabela 9 - Valores dos elementos do circuito equivalente obtidos de amostras de cDNA de paciente do sexo feminino infectada com HPV 6, 18 e 31 na concentração de 1-75 pg.μL⁻¹ e controles negativos *Candida albicans* e Células humanas hematológicas não infectadas por HPV.

Ensaio com células cervicais (cDNA)	Concentração da amostra (pg.μL ⁻¹)	CPE (μMho)	Rs (kΩ)	R _{CT} (kΩ)	ΔR _{CT} (%)
Biossensor-HPV6	1	15.4 ± 1.41	0.56 ± 14.84	2.92 ± 0.12	85.12 ± 5.38
Biossensor-HPV6	10	22.6 ± 5.37	0.48 ± 0.05	4.31 ± 0.18	172.78 ± 11.63
Biossensor-HPV6	25	25.75 ± 0.35	0.52 ± 0.03	5.58 ± 0.28	253.48 ± 18.34
Biossensor-HPV6	50	24.85 ± 1.34	0.54 ± 0.02	6.36 ± 0.14	302.84 ± 9.39
Biossensor-HPV6	75	25.55 ± 1.48	0.57 ± 0.02	7.32 ± 0.40	363.60 ± 25.50
Biossensor-HPV18	1	353 ± 1.41	0.539 ± 0.01	5.92 ± 0.07	275 ± 3.48
Biossensor-HPV18	10	279 ± 9.89	0.51 ± 0.06	6.75 ± 0.29	327.53 ± 18.34
Biossensor-HPV18	25	213 ± 8.48	0.61 ± 0.05	8.06 ± 0.09	410.12 ± 6.26
Biossensor-HPV18	50	193 ± 0.01	0.70 ± 0.02	11.8 ± 0.03	646.83 ± 0.01
Biossensor-HPV18	75	171 ± 11.31	0.77 ± 2.75	16.15 ± 2.75	922.15 ± 174.53
Biossensor-HPV31	1	21.35 ± 1.20	0.563 ± 0.02	3.37 ± 0.33	113.60 ± 14.87
Biossensor-HPV31	10	26.65 ± 9.54	0.49 ± 0.11	4.32 ± 0.36	173.73 ± 22.82
Biossensor-HPV31	25	36.1 ± 9.19	0.46 ± 0.09	6.34 ± 0.53	301.26 ± 34.02
Biossensor-HPV31	50	41 ± 6.50	0.48 ± 0.07	8.11 ± 0.13	413.60 ± 8.50
Biossensor-HPV31	75	45.45 ± 4.54	0.39 ± 0.01	10.35 ± 0.21	555.06 ± 13.42
Ensaio de seletividade					
Células humanas hematológicas não infectadas por HPV	-	31.5 ± 9.19	1 ± 0.04	1.62 ± 0	2.53 ± 0
<i>C. albicans</i>	-	54.31 ± 20.15	0.109 ± 0.05	1.67 ± 0,12	6.01 ± 5.37

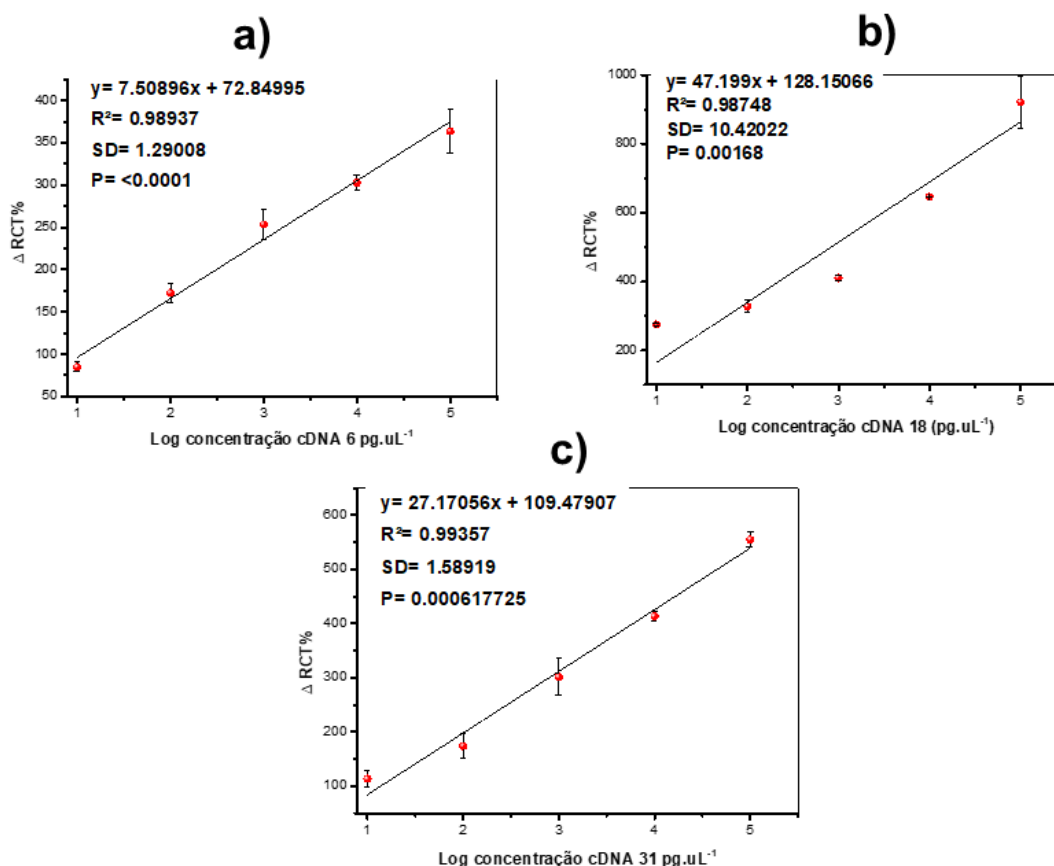
Fonte: Autoria própria (2024).

A biodetecção do genossensor em amostras de pacientes com HPV foi analisada por meio do ΔR_{CT} (%), como referido na Eq. 7. A curva de calibração foi gerada com base no ajuste linear do erro do x, exibindo correlação linear com o valor logarítmico das concentrações de cDNA (Fig. 45). O cDNA de amostra de paciente com HPV 18, obteve como equação da reta $y = 47.199x + 128.15066$ ($R^2 = 0.98748$) com LOD de 1.21 e LQ de 3.68; cDNA 6, $y = 7.50896x + 72.84995$ ($R^2 = 0.98937$) LOD de 0.34 e LQ de 1.10 e cDNA 31, $y = 27.17056x + 109.47907$ ($R^2 = 0.99357$) LOD de 0.81 e LQ de 2.48 (Fig. 45 a-c).

Para avaliação da especificidade, o genossensor foi exposto a amostras células humanas hematológicas não infectadas com HPV e *Candida albicans*. Conforme apresentado na Tabela 8, as amostras citadas apresentaram baixa variação no ΔR_{CT} após o teste de bioatividade, com valores de: células humanas hematológicas não infectadas com HPV ΔR_{CT} = 2.53 e *Candida albicans* ΔR_{CT} = 6.01. Estas respostas analíticas em comparação com a amostra clínica de HPV foram insignificantes. Assim, fica demonstrado que a plataforma genossensora

apresenta especificidade e confiança analítica para detectar amostras biológicas complexas.

Figura 45 - Curvas de calibração, coeficiente de correlação (R^2), desvio padrão (DP) e probabilidade de significância (P) das amostras de cDNA 6 (a), 18 (b) e 31 (c).



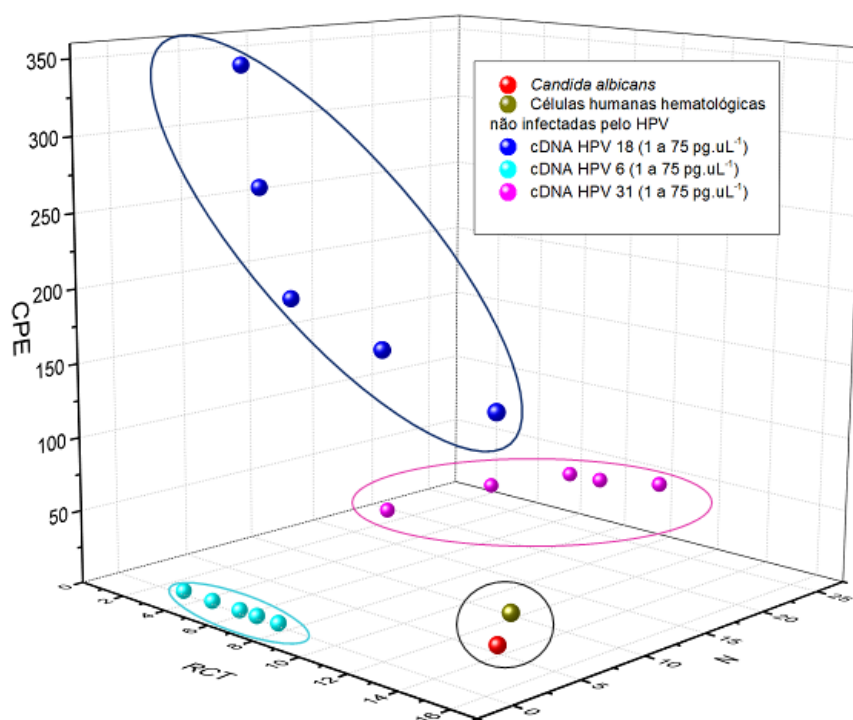
Fonte: Autoria própria (2024).

5.6.4 Gráfico tridimensional para avaliar a resposta do HPV

A partir das respostas impedimétricas, extraiu-se os valores de N, CPE e R_{CT} para construção de um gráfico 3D (Fig. 46). O gráfico exprime os resultados das leituras de cDNA de amostra de paciente com o HPV 6, 18 e 31 nas concentrações de 1 a 75 pg.uL^{-1} e controles negativos *Candida albicans* e células humanas hematológicas não infectadas por HPV.

Como esperado, observa-se separação entre as amostras de HPV, devido a maior homologia entre elas. Os controles negativos agruparam-se e mantiveram certa distância das amostras de HPV. Observando o gráfico é possível notar diferenciação entre os HPVs de alto risco e baixo risco.

Figura 46 - Gráfico tridimensional para os valores de R_{CT} , N, CPE obtidos como resultado do ajuste do circuito equivalente de Randles.



Fonte: Autoria própria (2024).

Assim, relata-se que a plataforma utilizada neste trabalho aumenta a capacidade de detecção da sonda MY09 e se traduz em um valor mensurável. Ainda sim, pode ser utilizada para diferenciar HPV de baixo risco e alto risco, de diferentes ramos filogenéticos, devendo ser avaliado ainda, a influência da força de pareamento das amostras com a sonda degenerada MY09.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, uma plataforma nanoestruturada baseada em PPy–AuNPs+PAMAM-G5 foi construída em eletrodo de ouro para a imobilização covalente da sonda degenerada MY09 voltada para a detecção do HPV em amostras plasmidiais e cDNA de amostra de paciente com HPV. O PPy atrelado a AuNPs funcionalizadas com PAMAM-G5 mostrou-se promissor devido ao aumento na área de superfície, baixo custo de produção, boa reprodutibilidade e alta densidade de grupos funcionais do PAMAM-G5 auxiliando na imobilização de receptores. A MY09 é amplamente usada na clínica para identificar e diferenciar subtipos oncogênicos do HPV. A análise topográfica por AFM e eletroquímica usando a VC e EIS comprovaram a eficácia da plataforma no processo de modificação da superfície do eletrodo.

Os testes de bioatividade com plasmídeos recombinantes do HPV 6, 16, 18, 31 e 33 e cDNA de amostra de paciente com HPV 6, 18 e 31 comprovaram a capacidade do genossensor de detectar diferentes genótipos do HPV com elevada sensibilidade e especificidade. A avaliação da variação do $\Delta R_{CT}\%$ das amostras dos plasmídeos permitiu identificar uma maior sensibilidade e resposta mais expressiva para o HPV 18, presente em cerca de 71% dos casos de CC, o terceiro responsável por mais matar mulheres e de maior predisposição ao câncer. No entanto, para atestar a confiabilidade dos resultados, será necessário amplificação da amostra por PCR. Isto irá confirmar a integridade da amostra e descartar a possibilidade de infecções múltiplas.

Para as leituras de cDNA de amostra de paciente com HPV também foi possível atestar a formação de um complexo de DNA híbrido, entre a sonda MY09 e as amostras. Os testes com controle negativos, também atestaram a especificidade do sensor. Conforme pesquisas na literatura, ainda não há uma ferramenta de diagnóstico diferencial do HPV, e de sensoriamento construída com PPy–AuNPs+PAMAM-G5 por meio do emprego da sonda degenerada MY09. Ademais, o tempo de resposta analítica foi de 5 minutos, sem auxílio de marcadores. É de crucial importância a implementação de biodispositivos eletroquímicos de DNA na triagem do HPV, por sua portabilidade e tempo de análise. Assim, seria possível um melhor prognóstico e tratamento dos

pacientes, auxiliando na prevenção do câncer. Por fim, o sistema sensor proposto nesta pesquisa, se destaca como uma ferramenta promissora de diagnóstico clínico e diferencial do HPV, podendo futuramente ser associado às técnicas consideradas padrão ouro.

7 PERSPECTIVAS

- Testar amostras de cDNA de outros tipos de HPV de alto e baixo risco;
- Testar o limite de detecção da amostra em menores concentrações como a exemplo, fentograma;
- De forma adicional, será interessante caracterizar a superfície sensora também frente a amostras de paciente infectado com HPV de baixo risco, pela técnica de AFM;
- Realizar amplificação da amostra do plasmídeo recombinante do HPV 18 por PCR, para descartar a possibilidade de infecção múltipla;
- Realização de ensaios de validação analítica, para atestar a estabilidade do biossensor, armazenamento e reusabilidade;
- Após ter testado as amostras de cDNA, construir novos protocolos experimentais que não necessitem de amplificação prévia das amostras clínicas por PCR;
- Testar a plataforma nanoestruturada no desenvolvimento de outros biossensores para a detecção de doenças cancerígenas, e até mesmo na identificação de biomarcadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDI, Rokhsareh *et al.* A novel genosensor based on Fe₃O₄@SiO₂/DABCO-modified screen-printed graphite electrode for detection of prostate cancer gene sequence hybridization. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 19, n. 6, p. 2631–2640, 2022.

AMARAL, Eduardo M. F. *et al.* Electrochemical Sensors and Biosensors: Their Basic Working Principles and Some Applications. **Revista Virtual de Química**, v. 15, n. 3, p. 519–535, 2023.

AMAROUCHE, Mohamed Yassine; EL HILALY, Jaouad; MAZOUZI, Driss. AFM and FluidFM Technologies: Recent Applications in Molecular and Cellular Biology. **Scanning**, v. 2018, p. 1–10, 2018.

AMBIENTE, Secretária de Vigilância em Saúde e. **NOTA TÉCNICA Nº 41/2024-CGICI/DPNI/SVSA/MS**. Brasília: BioMed Central Ltd, 2024.

ASSOCIAÇÃO HOSPITALAR MOINHOS DE VENTO. **ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE A PREVALÊNCIA NACIONAL DE INFECÇÃO PELO HPV POP-BRASIL**. Porto Alegre: [s. n.], 2020.

AVELINO, Karen Yasmim Pereira dos Santos. **DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM NANOESTRUTURAS PARA O DIAGNÓSTICO ULTRASSENSÍVEL DO ONCOGENE QUIMÉRICO BCR/ABL**. 2017. 163 f. - Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

AVELINO, Karen Y.P.S. *et al.* Electrochemical DNA biosensor for chronic myelocytic leukemia based on hybrid nanostructure. **Bioelectrochemistry**, v. 147, p. 108176, 2022.

AVELINO, Karen Y.P.S. *et al.* Impedimetric sensing platform for human papillomavirus and p53 tumor suppressor gene in cervical samples. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, v. 7, n. 1, 2022.

AVELINO, Karen Y.P.S. *et al.* Metal-polymer hybrid nanomaterial for impedimetric detection of human papillomavirus in cervical specimens. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 185, p. 113249, 2020.

BAHADIR, Elif Burcu; SEZGINTÜRK, Mustafa Kemal. Poly(amidoamine) (PAMAM): An emerging material for electrochemical bio(sensing) applications. **Talanta**, v. 148, p. 427–438, 2016.

BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, Ch. Atomic Force Microscope. **Physical Review Letters**, v. 56, n. 9, p. 930–933, 1986.

BURGO, Thiago A.L. *et al.* AFM advanced modes for dental and biomedical applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 136, p. 105475, 2022.

BURK, Robert D.; HARARI, Ariana; CHEN, Zigui. Human papillomavirus genome variants. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 232–243, 2013.

CHAKKARAPANI, Lakshmi Devi; ARUMUGAM, Sivaranjani; BRANDL, Martin. Simultaneous electrochemical detection of L-dopa and hydrogen peroxide by poly (amido amine) dendrimer/poly (neutral red) modified sensor. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 126, p. 105847, 2024.

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.

CHEN, Wei *et al.* Electrosynthesis and characterization of polypyrrole/Au nanocomposite. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 8, p. 2845–2849, 2007.

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

CLARK, Leland C.; LYONS, Champ. ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, n. 1, p. 29–45, 1962.

COLPANI, Verônica *et al.* Prevalence of human papillomavirus (HPV) in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 15, n. 2, p. e0229154, 2020.

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.

CÓRCOLES, Emma P.; BOUTELLE, Martyn G. **Biosensors and Invasive Monitoring in Clinical Applications**. Heidelberg: Springer International Publishing, 2013. (SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology).

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.

CORRÊA, Flávia M. *et al.* Cervical cancer screening, treatment and prophylaxis in Brazil: Current and future perspectives for cervical cancer elimination. **Frontiers in Medicine**, v. 9, 2022.

COSPER, Pippa F. *et al.* Biology of HPV Mediated Carcinogenesis and Tumor Progression. **Seminars in Radiation Oncology**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 265–273, 2021.

CREWS, Phillip *et al.* **ORGANIC STRUCTURE ANALYSIS**. [S. l.: s. n.], 1998.
CROSBIE, Emma J *et al.* Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 382, n. 9895, p. 889–899, 2013.

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

DEUTSCH, Fiona *et al.* Current state of play for HPV-positive oropharyngeal cancers. **Cancer Treatment Reviews**, v. 110, p. 102439, 2022.

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

DONG, Jing *et al.* A label-free electrochemical impedance immunosensor based on AuNPs/PAMAM-MWCNT-Chi nanocomposite modified glassy carbon electrode for detection of Salmonella typhimurium in milk. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1980–1986, 2013.

ELANCHEZIYAN, M. *et al.* Viologen-terminated polyamidoamine (PAMAM) dendrimer encapsulated with gold nanoparticles for nonenzymatic determination of hydrogen peroxide. **Materials Today Chemistry**, v. 16, p. 100274, 2020.

FARZIN, Leila *et al.* 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. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 179, p. 112989, 2020.

FERREIRA, Davi L. *et al.* Electrochemical Impedance Spectroscopy: Basic Principles and Some Applications. **Revista Virtual de Química**, v. 15, n. 3, p. 436–552, 2023.

FERREIRA, Chrystiano Campos. The relation between human papillomavirus (HPV) and oropharyngeal cancer: a review. **PeerJ**, v. 11, p. e15568, 2023.

FERRETTI, Silvia *et al.* Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 530–540, 2000.

FORTI, Maria Cristina; ALCAIDE, Roberta Lee Maciviero. **Normas de procedimentos para separação, identificação, acondicionamento e tratamento de resíduos químicos do laboratório de aerossóis, soluções aquosas e tecnologias - LAQUATEC**. São José dos Campos: [s. n.], 2011.

FRANCO, Juliana Rodrigues. **CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DE MATERIAL ATIVO DE ELETRODO DE SUPERCAPACITOR BASEADO EM NANOCOMPÓSITO DE NANOTUBOS DE CARBONO E ÓXIDO DE NÍQUEL**. 2014. 99 f. - Universidade Federal de Viçosa, 2014.

FREIRE, Renato S.; PESSOA, Christiana A.; KUBOTA, Lauro T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381–389, 2003.

FRENS, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. **Nature Physical Science**, v. 241, n. 105, p. 20–22, 1973.

FU, Yongzhu; MANTHIRAM, Arumugam. Core-shell structured sulfur-polypyrrole composite cathodes for lithium-sulfur batteries. **RSC Advances**, v. 2, n. 14, p. 5927, 2012.

GANDARILLA, Ariamna María D. **DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA DETECÇÃO DE BIOMARCADORES DA MALÁRIA**. 2022. 95 f. - Universidade Federal do Amazonas, 2022.

GANDARILLA, Ariamna. **Desenvolvimento e Caracterização de um Biossensor Bienzimático Imobilizado Sobre Monocamadas Auto-Organizadas para Determinação de Açúcares em Alimentos**. 2009. 143 f. - Universidade Federal do Amazonas, 2009.

GARROTE, Beatriz L.; SANTOS, Adriando; BUENO, Paulo R. **Biossensores eletroquímicos para diagnóstico clínico**. 2020. Disponível em: <https://www.iq.unesp.br/#!/noticia/723/biossensores--eletroquimicos-para-diagnostico-clinico/>. Acesso em: 1 dez. 2023.

HOLFORD, Timothy R.J.; DAVIS, Frank; HIGSON, Séamus P.J. Recent trends in antibody based sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 34, n. 1, p. 12–24, 2012.

INCA. **Ambiente, trabalho e câncer: aspectos epidemiológicos, toxicológicos e regulatórios / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. 2021.

INSIGHTS, Business Research. **Tamanho do mercado de biossensores vestíveis, participação, crescimento e análise da indústria, por tipo (uso único, uso repetido), por aplicação (esportes e fitness, monitoramento remoto de pacientes, militares) Previsão regional para 2027**. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.businessresearchinsights.com/pt/market-reports/wearable-biosensors-market-107432>. Acesso em: 2 fev. 2024.

JAAPAR, F. Nadhirah *et al.* Micro-interdigitated electrodes genosensor based on Au-deposited nanoparticles for early detection of cervical cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 253, p. 126745, 2023.

JAIN, Rajeev; JADON, Nimisha; PAWAIYA, Archana. Polypyrrole based next generation electrochemical sensors and biosensors: A review. **TrAC Trends in**

Analytical Chemistry, v. 97, p. 363–373, 2017.

JIN, Hui *et al.* An amplified label-free electrochemical aptasensor of γ -interferon based on target-induced DNA strand transform of hairpin-to-linear conformation enabling simultaneous capture of redox probe and target. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 145, p. 111732, 2019.

JOHN, Anjali *et al.* Electrochemical sensors using conducting polymer/noble metal nanoparticle nanocomposites for the detection of various analytes: a review. **Journal of Nanostructure in Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 1–31, 2021.

KHADEMI, Mahmoud; BARZ, Dominik P. J. Structure of the Electrical Double Layer Revisited: Electrode Capacitance in Aqueous Solutions. **Langmuir**, [s. l.], v. 36, n. 16, p. 4250–4260, 2020.

KOPS, Natália L. *et al.* The impact of socioeconomic status on HPV infection among young Brazilians in a nationwide multicenter study. **Preventive Medicine Reports**, v. 21, p. 101301, 2021.

LEE, Hyunjae *et al.* Enzyme-Based Glucose Sensor: From Invasive to Wearable Device. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 8, 2018.

LI, Yan-Feng *et al.* Tyrosine kinase c-Abl regulates the survival of plasma cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 40133, 2017.

LIMA, Maria Andressa Nicácio de. **DESENVOLVIMENTO DE GENOSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DO ZIKA VÍRUS**. 2023. 105 f. - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, 2023.

LIN, Shiming *et al.* Dynamic response of HPV16/anti-HPV16 pairs with unbinding events studied by atomic force microscopy. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 6, p. 203–208, 2016.

LIU, Qingjun *et al.* Cell-Based Biosensors and Their Application in Biomedicine. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 12, p. 6423–6461, 2014.

LIU, Qin *et al.* Progress in the applications of atomic force microscope (AFM) for mineralogical research. **Micron**, v. 170, p. 103460, 2023.

LOGUERCIO, Lara Fernandes. **Biossensor enzimático eletroquímico para detecção do pesticida carbaril utilizando filme funcional de polipirrol**. 2019. 120 f. - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2019.

LUCENA, Raiza Pereira Santos de. **GENOSENSORES ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM NANOESTRUTURAS DE GRAFENO E FILME DE POLITIOFENO PARA A DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PAPILOMA VÍRUS HUMANO**. 2021. 145 f. - Universidade Federal de Pernambuco, 2021.

LUPPA, Peter B.; SOKOLL, Lori J.; CHAN, Daniel W. Immunosensors—

principles and applications to clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 314, n. 1–2, p. 1–26, 2001.

MA, Li-Na; LIU, Dian-Jun; WANG, Zhen-Xin. Synthesis and Applications of Gold Nanoparticle Probes. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 1–7, 2010.

MAGALHÃES, Geraldo Magela *et al.* Update on human papilloma virus - part I: epidemiology, pathogenesis, and clinical spectrum. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 96, n. 1, p. 1–16, 2021.

MAHMOODI, Pegah *et al.* Early-stage cervical cancer diagnosis based on an ultra-sensitive electrochemical DNA nanobiosensor for HPV-18 detection in real samples. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 18, n. 1, p. 11, 2020.

MANDLER, Daniel; TURYN, Iva. Applications of self-assembled monolayers in electroanalytical chemistry. **Electroanalysis**, v. 8, n. 3, p. 207–213, 1996.

MARTÍNEZ-GARCÍA, G. *et al.* Multiplexed electrochemical immunosensing of obesity-related hormones at grafted graphene-modified electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 202, p. 209–215, 2016.

MASUMI, S.; MAHDAVI, S.; ETMINANFAR, M.R. Electrochemical deposition of bilayer PPy/PPy-HA coating on AZ31 Mg alloy: Effect of HA content on characteristics and corrosion protection. **Materials Today Communications**, v. 37, p. 107034, 2023.

MEDEIROS, E S *et al.* Uso de Polímeros Condutores em Sensores. Parte 2: Aplicações em Sensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 7, p. 144–158, 2012.

MILLÁN, Magdalena *et al.* Mechanical profile of human keratinocytes expressing HPV-18 oncogenes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 657, p. 86–91, 2023.

MIRGHANI, H. *et al.* Virus del papiloma humano y cáncer de orofaringe. **Emc - Otorrinolaringología**, [S.L.], v. 45, n. 1, p. 1-13, fev. 2016. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1632-3475\(16\)76086-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1632-3475(16)76086-3).

MORAWSKI, Rodrigo. **Síntese e caracterização de nanocompósitos de nanotubos de polipirrol e nanopartículas de prata : aplicação na detecção eletroquímica não enzimática do pesticida metil paration**. 2021. 63 f. - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Química. Curso de Química: Bacharelado., 2021.

NUIĆ, Laura *et al.* Polymerization of aromatic dinitroso derivatives initiated by nitroso-terminated monolayer on Au(111) surface: Insights from ellipsometry, AFM and nano-FTIR spectroscopy. **Polymer**, v. 271, p. 125795, 2023.

OLIVEIRA, Maria D.L. *et al.* Electrochemical evaluation of lectin–sugar interaction on gold electrode modified with colloidal gold and polyvinyl butyral. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 1, p. 13–19, 2008.

OLIVEIRA, J E *et al.* Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 3: Biossensores. n. 1, p. 1–11, 2013.

OPOLSKI, Marcelo Marcos *et al.* Salivary and plasmatic levels of <scp>tumor necrosis factor-alpha</scp> do not correlate with the clinicopathological profile in breast cancer patients. **Precision Medical Sciences**, v. 11, n. 4, p. 155–160, 2022.

OYOUNI, Atif Abdulwahab A. Human papillomavirus in cancer: Infection, disease transmission, and progress in vaccines. **Journal of Infection and Public Health**, v. 16, n. 4, p. 626–631, 2023.

OZCELIKAY, Goksu *et al.* Recent advances in electrochemical biosensors for detection of oncoviruses. **Biosensors and Bioelectronics: X**, v. 12, p. 100260, 2022.

PACHECO, Wagner Felipe *et al.* **Voltammetry: A brief review about concepts**. Sociedade Brasileira de Química, 2013.

PAREEK, Sakshi *et al.* An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor for monitoring Human papillomavirus-16 (HPV-16) using graphene oxide/Ag/Au nano-biohybrids. **Analytical Biochemistry**, v. 663, p. 115015, 2023.

PASHA, Apsar *et al.* High Performance Organic Coatings of Polypyrrole Embedded with Manganese Iron Oxide Nanoparticles for Corrosion Protection of Conductive Copper Surface. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 32, n. 2, p. 499–512, 2022.

PRATES, Rosebel T. Cunha *et al.* A IMPORTÂNCIA DA RELAÇÃO ENTRE O DIAGNÓSTICO MOLECULAR E O RASTREAMENTO DA INFECÇÃO POR HPV ASSOCIADO AOS MÉTODOS CONVENCIONAIS / THE IMPORTANCE OF THE RELATIONSHIP BETWEEN DIAGNOSIS MOLECULAR AND THE TRACKING OF HPV INFECTION ASSOCIATED WITH CONVENTIONAL. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 38283–38288, 2020.

PRATES, Bruno Ximenes. **RADIOATIVIDADE: UMA PROPOSTA PARA O ENSINO DE QUÍMICA COM UTILIZAÇÃO DE SIMULADORES**. 2021. 67 f. - FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL, 2021.

QUEIROZ, Jefferson Coelho. **Preparação e caracterização de polipirrol: aplicação em músculos artificiais e agente antimicrobiano**. 2016. 74 f. - Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2016.

RAMANATHAN, Kumaran; DANIELSSON, Bengt. Principles and applications of thermal biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 6, p. 417–423,

2001.

RAMANAVICIUS, Arunas *et al.* Single-step procedure for the modification of graphite electrode by composite layer based on polypyrrole, Prussian blue and glucose oxidase. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 240, p. 220–223, 2017.

RASOULI, Elisa *et al.* Electrochemical DNA-nano biosensor for the detection of cervical cancer-causing HPV-16 using ultrasmall Fe₃O₄-Au core-shell nanoparticles. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 40, p. 100562, 2023.

RAZZINO, Claudia A. *et al.* An electrochemical immunosensor using gold nanoparticles-PAMAM-nanostructured screen-printed carbon electrodes for tau protein determination in plasma and brain tissues from Alzheimer patients. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 163, 2020.

REINSON, Tormi *et al.* The Cell Cycle Timing of Human Papillomavirus DNA Replication. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0131675, 2015.

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

ROSARIO, Ruben; MUTHARASAN, Raj. Nucleic acid electrochemical and electromechanical biosensors: a review of techniques and developments. **Reviews in Analytical Chemistry**, v. 33, n. 4, 2014.

RUMGAY, Harriet *et al.* International burden of cancer deaths and years of life lost from cancer attributable to four major risk factors: a population-based study in Brazil, Russia, India, China, South Africa, the United Kingdom, and United States. **eClinicalMedicine**, v. 66, p. 102289, 2023.

SATIJA, Jitendra; KARUNAKARAN, Bhuvaneshwari; MUKHERJI, Soumyo. A dendrimer matrix for performance enhancement of evanescent wave absorption-based fiber-optic biosensors. **RSC Advances**, v. 4, n. 31, p. 15841, 2014.

SAÚDE, Ministério da. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST)**. 2020.

SAXENA, Rahul; SRIVASTAVA, Sudha. An insight into impedimetric immunosensor and its electrical equivalent circuit. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 297, p. 126780, 2019.

SENAPATI, Rashmirani *et al.* HPV genotypes co-infections associated with cervical carcinoma: Special focus on phylogenetically related and non-vaccine targeted genotypes. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187844, 2017.

SHAMAILA, Shahzadi *et al.* Gold Nanoparticles: An Efficient Antimicrobial Agent against Enteric Bacterial Human Pathogen. **Nanomaterials**, v. 6, n. 4, p. 71, 2016.

SILVA, Maria Lúcia Perez Gomes da. **DEFINIÇÃO DE PRÁTICAS OPERACIONAIS PADRÃO EM POLÍMEROS PARA FINS DE IMPORTAÇÃO**. 2017. 128 f. - UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ, 2017.

SILVA JUNIOR, Alberto Galdino da. **DESENVOLVIMENTO DE BIODISPOSITIVOS A PARTIR DE MOLÉCULAS BIOINSPIRADAS DO PANTANAL PARA APLICAÇÕES EM MICRORGANISMOS**. 2021. 269 f. - Universidade Federal de Pernambuco, 2021.

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

STANLEY, Margaret A. Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 215–222, 2012.
SUMITHA, M.S.; XAVIER, T.S. Recent advances in electrochemical biosensors – A brief review. **Hybrid Advances**, v. 2, p. 100023, 2023.

SUN, Jian-Zhong *et al.* Microbial fuel cell-based biosensors for environmental monitoring: a review. **Water Science and Technology**, v. 71, n. 6, p. 801–809, 2015.

TALLON, Blenda *et al.* Tendências da mortalidade por câncer de colo no Brasil em 5 anos (2012-2016). **Saúde em Debate**, v. 44, n. 125, p. 362–371, 2020.

TAVARES, Gina Marta Ferraz. **Work developed under the supervision of Professor José Carlos Almeida Mesquita and co-supervised by Professor João Manuel Cunha Rodrigues**. 2019. 111 f. - Faculdade de Ciências Exatas e de Engenharia, 2019.

TAYEBI, Atousa; KARGARI, Ali; AKBARI, Somaye. Enhancing the performance of a modified poly(ether-b-amide) blend membrane by PAMAM dendritic polymer for separation of CO₂/CH₄. **Polymer Testing**, v. 128, p. 108225, 2023.

TEIXEIRA, Scrillet de Almeida. **VALIDAÇÃO DE MARCADORES SOROLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE ANTI- PGL-I EM BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO**. 2022. 29 f. - Universidade Federal de Uberlândia, 2022.

THAPA, Krishna; LIU, Wenyan; WANG, Risheng. **Nucleic acid-based electrochemical biosensor: Recent advances in probe immobilization and signal amplification strategies**. 2022.

THAPA, Hem R.; UNGER, Elizabeth R.; QUEREC, Troy D. A human papillomavirus whole genome plasmid repository: A resource for HPV DNA quality control reagents. **Journal of Clinical Virology**, v. 166, p. 105548, 2023.

TURKEVICH, John; STEVENSON, Peter Cooper; HILLIER, James. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, p. 55, 1951.

UNSER, Sarah *et al.* Localized Surface Plasmon Resonance Biosensing: Current Challenges and Approaches. **Sensors**, v. 15, n. 7, p. 15684–15716, 2015.

VÁSQUEZ, Gersson *et al.* Amperometric biosensor based on a single antibody of dual function for rapid detection of *Streptococcus agalactiae*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 453–458, 2017.

VIÉGAS, Deracilde Santana da Silva; SILVA, Deranilde Santana da; RODRIGUES, Isaide de Araujo. Caracterização de sensores eletroquímicos por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)/ Characterization of electrochemical sensors by electrochemical impedance spectroscopy (EIS). **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 7, p. 67244–67260, 2021.

VO-DINH, T.; CULLUM, B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 366, n. 6–7, p. 540–551, 2000.

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, Zhaoyin; DAI, Zhihui. Carbon nanomaterial-based electrochemical biosensors: an overview. **Nanoscale**, v. 7, n. 15, p. 6420–6431, 2015.
WEST, Donald M.; SKOOG, Douglas A.; JAMES, Holler F. **Fundamentos de Química Analítica**. 1. ed. [S. l.: s. n.], 2006.

YANG, Po-Yu *et al.* Molecular dynamics simulations of PAMAM dendrimer-encapsulated Au nanoparticles of different sizes under different pH conditions. **Computational Materials Science**, v. 137, p. 144–152, 2017.

ZHANG, Huan *et al.* Fluorescent biosensors enabled by graphene and graphene oxide. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 96–106, 2017.

ZHAO, Yu-Wen *et al.* Application of Aptamer-Based Biosensor for Rapid Detection of Pathogenic *Escherichia coli*. **Sensors**, v. 18, n. 8, p. 2518, 2018.

ZHOU, Ling *et al.* Application of Biosensor Surface Immobilization Methods for Aptamer. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 39, n. 3, p. 432–438, 2011.

ZHOU, Yuxiao; DU, Jing. Atomic force microscopy (AFM) and its applications to bone-related research. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 176, p. 52–66, 2022.

APÊNDICE A



Regular article

Genosensor based on polypyrrole and dendrimer-coated gold nanoparticles for human papillomavirus detection

Heloisa B. Dantas^{a,b}, Alberto G. Silva-Junior^{a,b}, Norma L.C.L. Silva^c, Abdelhamid Errachid^d, Maria D.L. Oliveira^{a,b}, Cesar A.S. Andrade^{a,b,*}

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

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

^c Departamento de Virologia-Instituto Aggeu Magalhães-Fiocruz, Recife, PE 50670-420, Brazil

^d Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques (ISA), 5 rue de la Doua, Lyon, Villeurbanne 69100, France



ARTICLE INFO

Keywords:

Genosensor

Electrochemical impedance spectroscopy

Hybrid nanocomposite

Polypyrrole

Human Papillomavirus

ABSTRACT

Human Papillomavirus (HPV) is an often asymptomatic widespread sexually transmitted infection responsible for causing various health issues. Low-risk HPV primarily causes genital warts. High-risk HPV types are associated with several cancers, including cervical, anal, and oropharyngeal cancers, posing significant health risks. In this work, we developed an electrochemical biosensor for the detection and differentiation of HPV genotypes based on electropolymerized polypyrrole (PPy) and PAMAM dendrimer-coated gold nanoparticles (PAMAM-AuNPs) for the immobilization of a DNA probe for detecting different HPV genotypes. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS), cyclic voltammetry (CV), and atomic force microscopy (AFM) were used to characterize the biosensor. AFM analysis revealed varied topographic surfaces associated with the increased peaks concerning the biosensor and against patient samples. Electrochemical responses indicated that the genosensor could detect HPV using plasmid (HPV 6, 16, 18, 31, and 33) and cDNA samples (HPV 6, 18, and 31) from infected patients. Different electrochemical profiles were obtained between high-risk and low-risk genotypes. The sensor presented an excellent analytical performance, presenting a lower LOD of $0.04 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ and $0.34 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ for plasmidial and cDNA samples, respectively. Electrochemical analysis pointed out the ability of the developed genosensor platform to differentiate the HPV genotypes. The proposed biosensor is a promising tool for detecting and monitoring HPV and related diseases such as cervical cancer.

1. Introduction

Human Papillomavirus (HPV) is the most common sexually transmitted infection worldwide, resulting in a significant public health challenge, widespread prevalence, and potential for severe health outcomes. According to the World Health Organization, high-risk HPV can cause cervical cancer in approximately 90 % of cases, representing the fourth most common cancer and affecting 6.5 % of all cancers in women [1,2]. HPV encompasses over 200 genotypes, each with varying oncogenic potential, as classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC). These genotypes are divided into high-risk (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68) and low-risk (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73, and 81), and each category is based on its association with cancer development [3].

High-risk HPVs are of particular concern due to their significant role in the pathogenesis of cervical cancer. HPV 16 and HPV 18 are responsible for approximately 70 % of all cervical cancer cases globally [4]. Low-risk HPV typically causes benign lesions, such as anogenital warts, but it does not carry the same cancer risk [5]. The IARC classification guides public health strategies, including vaccination and screening programs. Prevention and early detection efforts are based on understanding the distribution and impact of these genotypes, which contributes to better clinical outcomes and reduced cancer incidence [6].

The primary techniques used for HPV diagnosis include polymerase chain reaction (PCR), hybrid capture 2 (HC2), and Papanicolaou test (Pap-test) [7]. PCR is highly sensitive and specific for detecting various HPV genotypes. However, their cost and complexity limit their

* Corresponding author at: Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE 50670-901, Brazil.

E-mail address: csrandrade@gmail.com (C.A.S. Andrade).

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2024.109551>

Received 7 August 2024; Received in revised form 27 October 2024; Accepted 28 October 2024

Available online 29 October 2024

1369-703X/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

widespread use, especially in low-resource places. HC2 is commonly employed for its ability to differentiate between high-risk and low-risk HPV. Also, it lacks genotype specificity and can produce false positives [8]. Pap smear tests are widely used for cervical cancer screening and to identify cellular abnormalities indicative of HPV infection. However, they are less sensitive and require frequent follow-up testing [9,10].

Electrochemical biosensors represent an innovative and promising approach for HPV diagnosis, offering several advantages over traditional methods. Biosensors are associated with the specificity of biomolecular interactions and electrochemical transduction, enabling highly sensitive and rapid detection of DNA or proteins [7]. Their portability, low cost, and minimal sample preparation make them particularly suitable for point-of-care testing, addressing the limitations of conventional techniques such as PCR and HC2 [8]. Moreover, electrochemical biosensors can be designed to simultaneously detect multiple HPV genotypes, thereby enhancing their diagnostic utility. Integrating these biosensors into diagnostic protocols can significantly improve early detection and HPV monitoring [9].

Nanomaterials are revolutionizing the field of electrochemical sensor platforms, offering improvements in disease diagnostics. Conductive polymers such as polypyrrole (Ppy) provide efficient electron transfer and enhance sensor performance [10]. Gold nanoparticles (AuNPs) can also be used to optimize biosensors; however, one drawback is the aggregation of some particles, which affects the analytical response. Stabilizers such as polymers are used to assist in the preparation of nanocomposites. Thus, gold nanoparticles (AuNPs) encapsulated in 5th generation poly(amidoamine) dendrimers (PAMAM-G5) are promising, as PAMAM-G5 acts as a stabilizer due to its three-dimensional structure, low polydispersity, nanometric size (2–100 nm), and surface flexibility [11]. Integrating these materials synergistically enhances sensor sensitivity, amplifies electrochemical signals, and increases the surface area for analyte detection. This combination allows for highly accurate detection of low biomarker concentrations, such as oligonucleotides and proteins [12].

The present study describes the development of an electrochemical biosensor based on Ppy and PAMAM-G5-AuNPs, which is a promising tool for HPV detection and differentiation of low-risk and high-risk HPV. The proposed biosensor associates the conductivity of the Ppy and high surface area and functionalization capability of the PAMAM-G5-AuNPs complex. PAMAM-G5-AuNPs possess amine groups that immobilize the degenerate probe MY09 (5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3'), identifying different HPV genotypes. Atomic force microscopy (AFM) was used to characterize the surface morphology of the biosensor. Cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were used to evaluate the biosensor's assembly process and its ability to detect HPV. The analytical response time was 5 minutes without the use of labels.

Biosensor efficacy was tested against recombinant plasmids containing the viral capsid L1 gene and complementary DNA (cDNA) samples from patients infected with low-risk and high-risk HPV. Implementing electrochemical DNA receptors is important for HPV screening due to their portability and fast analysis time. The proposed approach holds significant potential to improve early diagnosis and may eventually be associated with gold-standard techniques.

2. Experimental

2.1. Materials

PAMAM-G5, glutaraldehyde ($C_5H_8O_2$), pyrrole (98 %), bovine serum albumin (BSA), hydrochloric acid, sodium borohydride ($NaBH_4$), 1-ethyl-3-(dimethyl aminopropyl)carbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), and gold(III) chloride hydrate ($HAuCl_4 \cdot H_2O$) were obtained from Sigma AldrichCo. (St Louis, USA). Potassium ferricyanide ($K_3[Fe(CN)_6]$), potassium ferrocyanide ($K_4[Fe(CN)_6]$), monobasic sodium phosphate (NaH_2PO_4), dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4), and

hydrogen peroxide (H_2O_2) were purchased from VETEC (Brazil). The DNA probe was purchased from Invitrogen (USA). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore-Synergy, Billerica, USA). All chemicals and solvents were of analytical grade and used as received without further purification.

2.2. DNA probe and biological samples

A DNA MY09 probe (5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3') with an amino-terminal group was used for detection assays. MY09 probe is a degenerate oligonucleotide used to detect the conserved region in the HPV L1 gene. Recombinant plasmids were obtained by subcloning the L1 gene sequence from different types of HPV (HPV 6, 16, 18, 31, and 33) into a PTA vector. To confirm the subcloning of the L1 gene, sequencing of the recombinant plasmids was performed using primers complementary to the plasmid backbone.

Regarding clinical samples, the Trizol reagent was used to extract total RNA from cervical cells. RNA samples were then reverse-transcribed using a random primer to produce cDNA (types 6, 18, and 31). PCR and ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis were used to validate the samples. PCR characterization was used to identify positive or negative HPV samples. The local ethics committee approved the study (number CAAE 23698513.0.0000.5190). The samples were serially diluted using 10 mM phosphate-buffered saline (PBS) at a pH of 7.4 and stored frozen until use.

2.3. Synthesis of polyamidoamine (PAMAM) dendrimer-coated gold nanoparticles (AuNPs)

PAMAM-G5-AuNPs were synthesized according to a previous study with some modifications [13]. The procedure follows the reduction of Au^{3+} ions enclosed in PAMAM-G5 dendrimers by H_2 produced by a sodium borohydride solution. Briefly, 5 mL of 2 mM of $HAuCl_4 \cdot H_2O$ was placed in a beaker containing 7 mL of 10 μ M PAMAM G5. After 30 min in an ultrasonic bath, the solution was kept in magnetic stirring for 30 min. Subsequently, 100 μ L of a freshly prepared 0.3 M $NaBH_4$ was added to the previous solution, resulting in the PAMAM-G5-AuNPs. The synthesized nanoparticles had a size of approximately 37 nm for non-functionalized nanostructure and an average of 375 nm after PAMAM G5 immobilization. The nanoparticles were then stored in refrigerator ($\sim 4^\circ C$) until use.

2.4. Biosensor platform assembly

The bare gold surface was first polished with alumina paste (Al_2O_3) and fine sandpaper (grain size 4000). The electrodes were then sonicated in MilliQ ultrapure water. CV and EIS evaluated the electrodes, and after revealing a clean pattern, they were subjected to Ppy polymerization.

First, the cleaned electrodes were immersed in a solution containing 1 M HCl and 30 mM pyrrole monomer. Two cycles of polymerization were used in a potential range of -0.4 V to 1.2 V at a scan rate of 100 mV.s $^{-1}$. After that, 2 μ L of the PAMAM-G5-AuNPs drop cast onto the Ppy layer. The immobilization of the MY09 DNA probe was obtained using 2 % glutaraldehyde for 10 min, where 2 μ L of the oligonucleotide (100 μ M) was adsorbed on the functionalized electrode for 15 min. Glutaraldehyde is a bifunctional cross-linking agent used to form Schiff bases between the amino groups of PAMAM-G5-AuNPs and the aminated DNA probe. 1 % BSA was added to block nonspecific binding sites. Fig. 1 shows the step-by-step biosensor manufacturing process.

2.5. Hybridization analysis

Biorecognition assays were conducted with samples of recombinant plasmid containing the HPV L1 gene (HPV 6, 16, 18, 31, and 33) at varying concentrations (1 – 100 pg. μ L $^{-1}$) and cervical cell (cDNA)

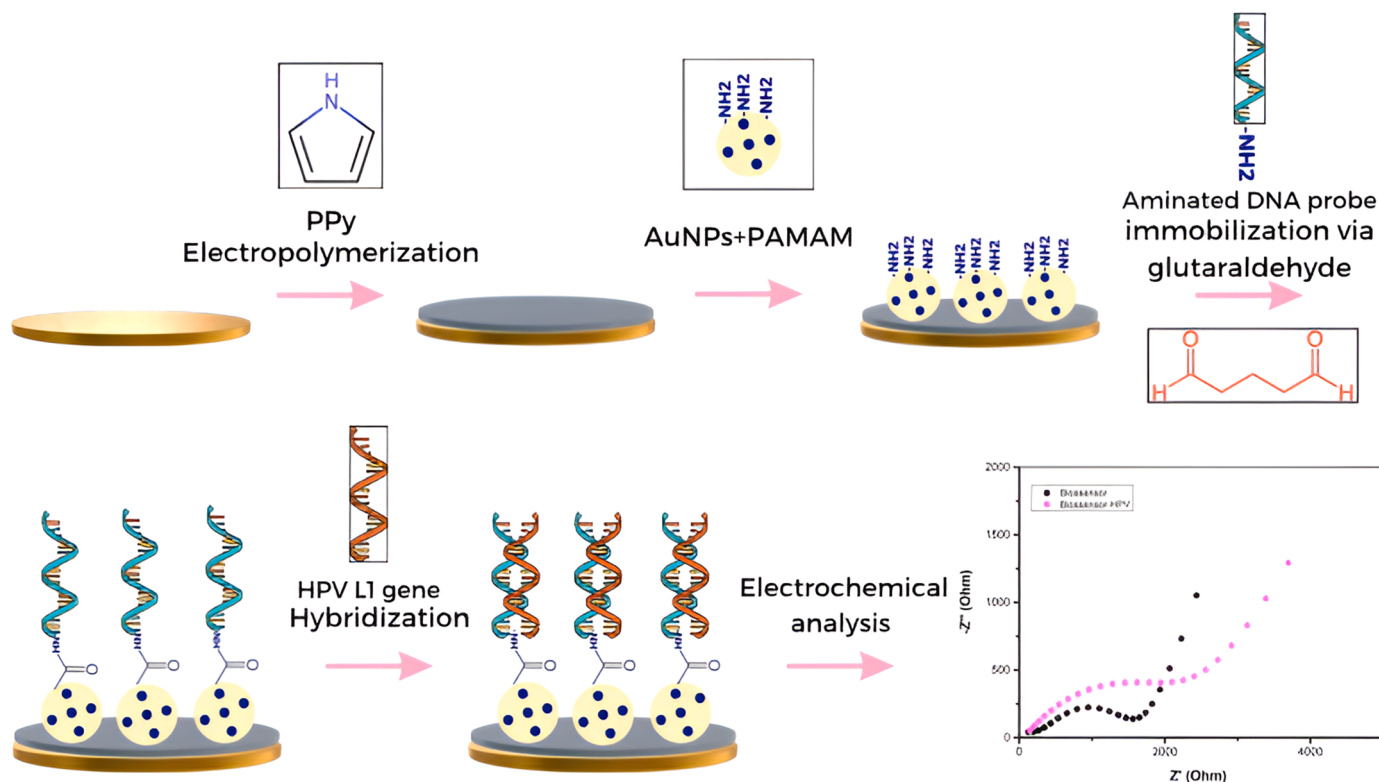


Fig. 1. Schematic representation of the biosensor assembly process.

samples positive for HPV (HPV 6, 18, and 31) at concentrations of $1\text{--}75\text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Specificity tests were performed using non-complementary DNA sequences and cDNA samples from patients presenting the genome of acute lymphoblastic leukemia, *Candida albicans*, and TNF-alpha biomarker.

Before electrochemical assays, recombinant plasmid samples were heated at 90°C to denature the strand. Then, hybridization was performed by drop-coating $2\text{ }\mu\text{L}$ of each sample on the functionalized electrode for 5 min. After sample adsorption, the electrode was thoroughly rinsed with ultrapure deionized water to remove unbound molecules. The same procedure was adopted for cDNA detection analysis. Afterward, the sensor platform was subjected to electrochemical analysis through CV and EIS.

2.6. Electrochemical characterization

Electrochemical analyses were performed using an Autolab PGSTAT 128 N potentiostat/galvanostat (Metrohm, Netherlands) interfaced with NOVA 1.11 software. Electrochemical measurements were performed in a three-electrode system immersed in a $10\text{ mM K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1, v/v) solution prepared in PBS (pH 7.4), considered as optimal pH for analysis. Previous studies examined how to improve experimental conditions, such as the pH of an electrolyte solution. The platform was tested at various pH concentrations, and it found that lower pHs resulted in more ssDNA sequences being immobilized. In contrast, the electrolyte solution becomes negative at higher pH levels, causing electrostatic repulsion. As a result, a pH of 7.4 is considered optimum as it does not interfere with the interaction of electrical charges [13].

A silver/silver chloride (Ag/AgCl) electrode with saturated 3 M KCl was used as the reference electrode. Platinum wire was used as the counter electrode. The bare gold electrode was used as the working electrode. Voltammograms were obtained from -0.2 V to 0.7 V (scan rate of $50\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$). Impedance data were recorded in a frequency range of 100 mHz to 100 kHz with an applied sinusoidal potential amplitude of 10 mV . All measurements were performed in triplicate at room

temperature ($24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) inside a Faraday cage.

2.7. Topographical analysis

Topographical images of the sensor platform and its interaction with the target analyte were obtained using an SPM-9700 atomic force microscope (Shimadzu, Japan) operating in non-contact mode. Measurements utilized silicon probe cantilevers (Nanoworld, Japan) with a spring constant of $42\text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ and resonance frequencies of 300 kHz . Imaging was conducted at room temperature, with a line-scan rate of 1 Hz , covering a scanning area of $5 \times 5\text{ }\mu\text{m}$ and achieving a lateral resolution of 512×512 pixels. The final image processing was performed using Gwyddion software.

2.8. Optical analysis

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) measurements were conducted in the range of 650 cm^{-1} to 4000 cm^{-1} with a resolution of 2 cm^{-1} , utilizing an Agilent Cary 630 FTIR spectrometer (Agilent Technologies, Rowville, Australia) equipped with a diamond attenuated total reflectance (ATR) sampling accessory. The experiments were performed at room temperature and 50% relative humidity. UV-vis analysis was performed in a range of 200 nm to 600 nm with a K37-UV-vis Kasvi spectrophotometer. Quartz cuvettes with an optical path of 1.0 cm were used.

3. Results and discussion

3.1. Topographic characterization

AFM was used to investigate the topographical features of the sensor assembly processes in different stages. Fig. 2a-e shows the topographic profile and average roughness (R_a) before and after the analyte interaction. Root mean square roughness (R_{MS}) also served as a basis for the roughness evaluation. The gold electrode surface is shown

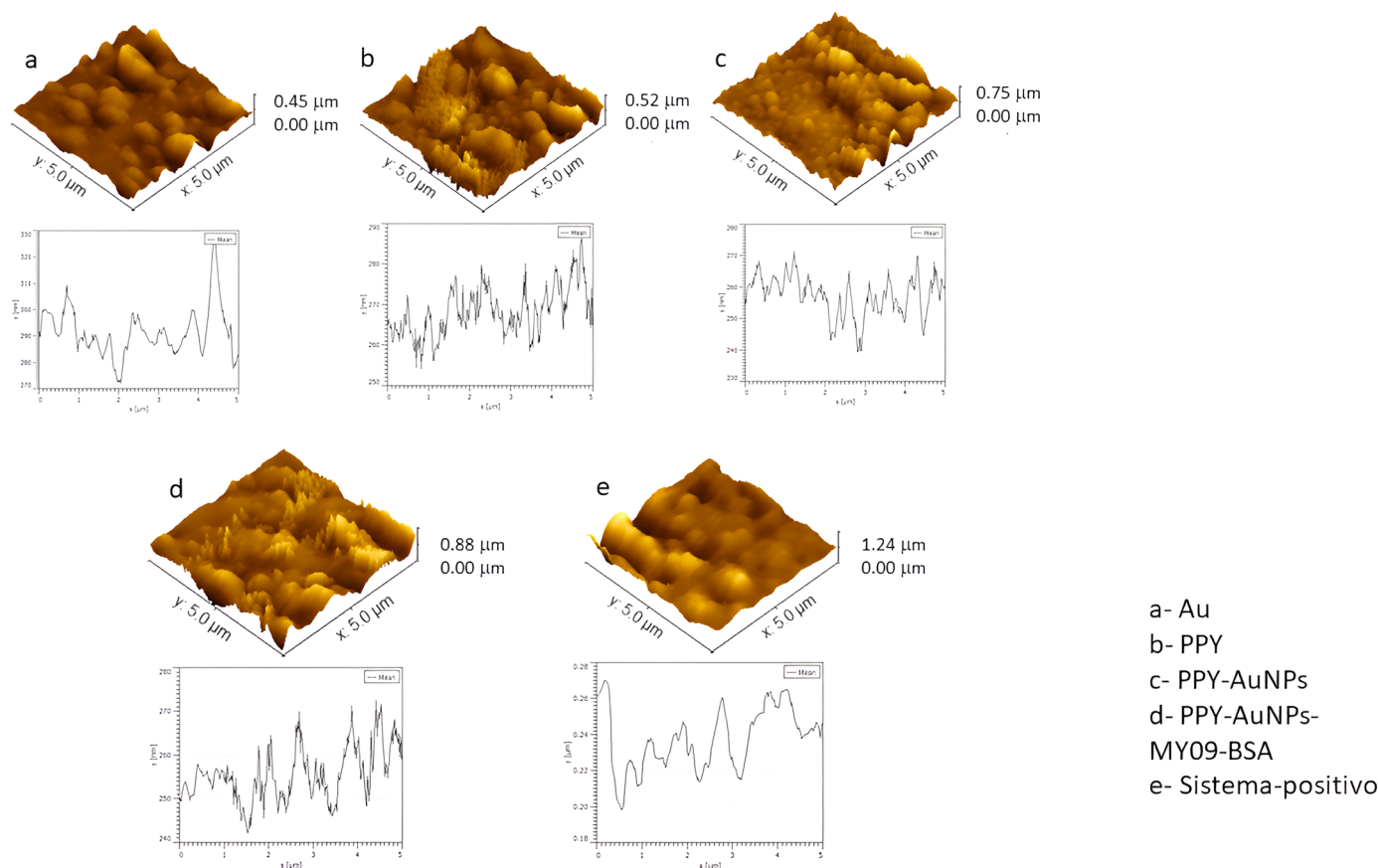


Fig. 2. 3D AFM images ($5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$) of the (a) gold electrode, (b) Ppy electropolymerized layer, (c) PAMAM-AuNPs, (d) MY09-BSA, and (e) HPV 18.

in Fig. 2a, featuring atomically flat terraces with a maximum height of $0.45\ \mu\text{m}$, $R_a = 38.08\ \text{nm}$, and $RMS = 67.24\ \text{nm}$. Ppy film revealed a granular morphology like a cauliflower, presenting a height of $0.52\ \mu\text{m}$ and roughness values of $R_a = 41.50\ \text{nm}$ and $Rms = 56.05\ \text{nm}$ (Fig. 2b). The quantity and size of the Ppy globular structures can vary depending on parameters such as the oxidation and reduction state of the polymer, monomer concentration, and the nature of the dopant ions [14].

Characteristic grooves and domes with roughness values $R_a = 44.11\ \text{nm}$, $RMS = 57.79\ \text{nm}$, and a height of $0.75\ \mu\text{m}$ are observed for PAMAM-G5-AuNPs system (Fig. 2c). The height value for genosensor surface indicates that the dendrimer molecules have flattened. This is explained by the packing of functional groups into globular shapes, which is a perfect conformation for biosensors since it helps to effectively immobilize bioreceptors. The presented findings are aligned with previous works [15,16].

AFM images revealed a profile with higher surface roughness after the immobilization of the recognition probe (MY09) and BSA (Fig. 2d), resulting in values of $R_a = 47.76\ \text{nm}$, $RMS = 67.24\ \text{nm}$, and a height of $0.88\ \mu\text{m}$. Well-defined peaks and an increase in the density of molecules immobilized on the genosensor were observed after hybridization with the complementary DNA target from HPV 18 (Fig. 2e). The height increases to $1.24\ \mu\text{m}$ and the roughness to $R_a = 57.36\ \text{nm}$ and $RMS = 73.87\ \text{nm}$. The values increase are associated with the genosensor ability to detect HPV samples [17,18].

3.2. Optical analyses

Typical stretching vibrations of the Ppy ring are found in the bands between 1555 and $1494\ \text{cm}^{-1}$ [19], while the bending vibrations of the aromatic ring are found between 950 and $795\ \text{cm}^{-1}$ [20,21], $C = N$ stretching vibrations ($1394\ \text{cm}^{-1}$), and $= C-H$ plane vibrations

($1221\ \text{cm}^{-1}$). The spectrum in Fig. S1a shows that PAMAM-G5-AuNPs adhered to the electropolymerized Ppy layer. Additionally, characteristic bands of the PAMAM chemical structure were observed at $1540\ \text{cm}^{-1}$, corresponding to the secondary amide ($1394\ \text{cm}^{-1}$, $1284\ \text{cm}^{-1}$, and $1394\ \text{cm}^{-1}$) from the carboxylate groups, and $880\ \text{cm}^{-1}$ from the CH bond [22,23].

Nanoparticles exhibit high absorption spectra in the visible region due to the oscillations of free electrons on the particle surface. The AuNPs reduced by NaBH_4 have a distinctive red color and exhibit a peak at a wavelength of around $\lambda = 520\ \text{nm}$ (Fig. S1b). PAMAM-G5-AuNPs display a band in the $\lambda = 280\ \text{nm}$ region [24].

3.3. Electrochemical characterization of the biosensing platform

The cyclic voltammograms of the sensor assembly steps are shown in Fig. S2a. The anodic peak currents (I_{pa}) were used to evaluate the voltammetry response. EIS data was evaluated using Randle's circuit (Fig. S2b). The electrochemical variables were charge-transfer resistance (R_{CT}), constant phase element (CPE), Warburg impedance (Z_W), and electrolyte solution resistance (R_s). The impedimetric variables of the genosensor platform can be seen in Table S1 [25].

R_{CT} is a crucial parameter in electrochemical characterization due to its correlation with the electrode surface. The cleaned working electrode showed an R_{CT} of $0.08\ \text{k}\Omega$ and an amperometric response of $55.73\ \mu\text{A}$. Afterwards, cyclic voltammetry was used to electropolymerize Ppy to enhance surface conductivity. Due to Ppy ability to operate as a protective layer for electron transfer, the impedance exhibited low charge transfer resistance ($R_{CT} = 0.07 \pm 0.02\ \text{k}\Omega$). An I_{pa} increase was observed after Ppy electrodeposition ($I_{pa} = 73.59 \pm 4.56\ \mu\text{A}$) [22,26].

PAMAM-G5-AuNPs were adsorbed onto the electrode surface during electropolymerization to expand the adsorption area and improve the

response signal. As a result, R_{CT} increased ($R_{CT} = 0.15 \pm 0.02$), and I_{pa} decreased ($I_{pa} = 83.79 \pm 1.92 \mu A$). As a bifunctional cross-linking agent, glutaraldehyde enabled the attachment of biorecognition elements to the working electrode surface [17,23].

PAMAM-G5 dendrimers covalently bind to the sensor surface through glutaraldehyde crosslinking [27,28], aiming to immobilize the MY09 probe. The viral genome was detected using the MY09 probe [29,30]. A decrease in the amperometric current ($I_{pa} = 41.09 \pm 5.36 \mu A$) and an increase in R_{CT} ($R_{CT} = 0.69 \pm 0.04$) following the probe immobilization indicates the hybridization process. 1 % BSA was applied to the sensor surface to prevent nonspecific active sites. BSA blocks non-specific active sites, reduces non-specific binding, and improves biosensor performance by forming a physical, steric, and electrostatic barrier that keeps undesirable molecules from reaching the sensor surface. 1 % BSA is used in small amounts to avoid interference with the sensor response. Furthermore, voltammetric and impedimetric measurements confirmed a slight change in the peak currents and impedimetric parameters [8]. Thus, a decrease in the amperometric current ($I_{pa} = 46.89 \pm 6.51$) and an increase in charge transfer ($R_{CT} = 1.58 \pm 0.17$) were observed.

3.4. Analytical performance of the sensing platform

Experiments were conducted using samples of recombinant plasmids from low-risk HPV (6) and high-risk HPV (16, 18, 31, and 33) at varying concentrations ($1\text{--}100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) and after a 5-minute incubation period. The biorecognition process is demonstrated in Fig. 3a-e and Fig. S3a-e using voltammetric and impedimetric techniques, respectively. The anodic and cathodic peak currents decrease as the HPV concentration increases. Electrostatic repulsion occurs between the phosphate groups of the hybrid DNA structures and the electroactive anions $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ as a result of the target oligonucleotide being captured [8,31]. The recognition degree was also evaluated using the anodic current variation (ΔI), according to the following equation [32]:

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

where I_b represent the anodic peak for the Ppy_PAMAM-AuNPs_MY09 sensing layer and I_a corresponds to the peak current after hybridization with the complementary HPV oligonucleotide sequence. Current values for the genosensor and ΔI (%) values of the genosensor platform against HPV genotypes at various concentrations are showed in Table S3 and S4. The findings showed that the ΔI (%) values increase proportionally to the sample concentration.

EIS is an effective technique for studying electrochemical biosensor platforms. The genosensor obtained a progressive increase in the semi-circle diameter and subsequently R_{CT} values as the concentration of plasmid samples increased. This is associated with the electrostatic repulsion between the electroactive anions and the negative charges of the phosphate groups in the DNA structure [33].

CPE and R_{CT} are associated with the most significant changes in the values of the circuit components following interaction with the analytes. R_{CT} offers details on surface changes and the analyte-target interaction, such as the quantitative detection of the papillomavirus, while CPE correlates variations in the active area of the sensor, such as the thickness of the electrical double layer [34,35]. Table 1 shows the data from the equivalent circuit.

Results demonstrate the platform's ability to detect different HPV genotypes. This was evidenced by the increased R_{CT} values resulting from the anchoring of oligonucleotides on the detection surface, indicating effective hybridization of the samples. In contrast, the CPE decreased to some extent because of the reduction in the number of free probe sites on the effective surface area of the electrode.

The analytical performance of the electrochemical platform was assessed considering the relative variations in resistance to electron transfer (ΔR_{CT}) [36], as follows:

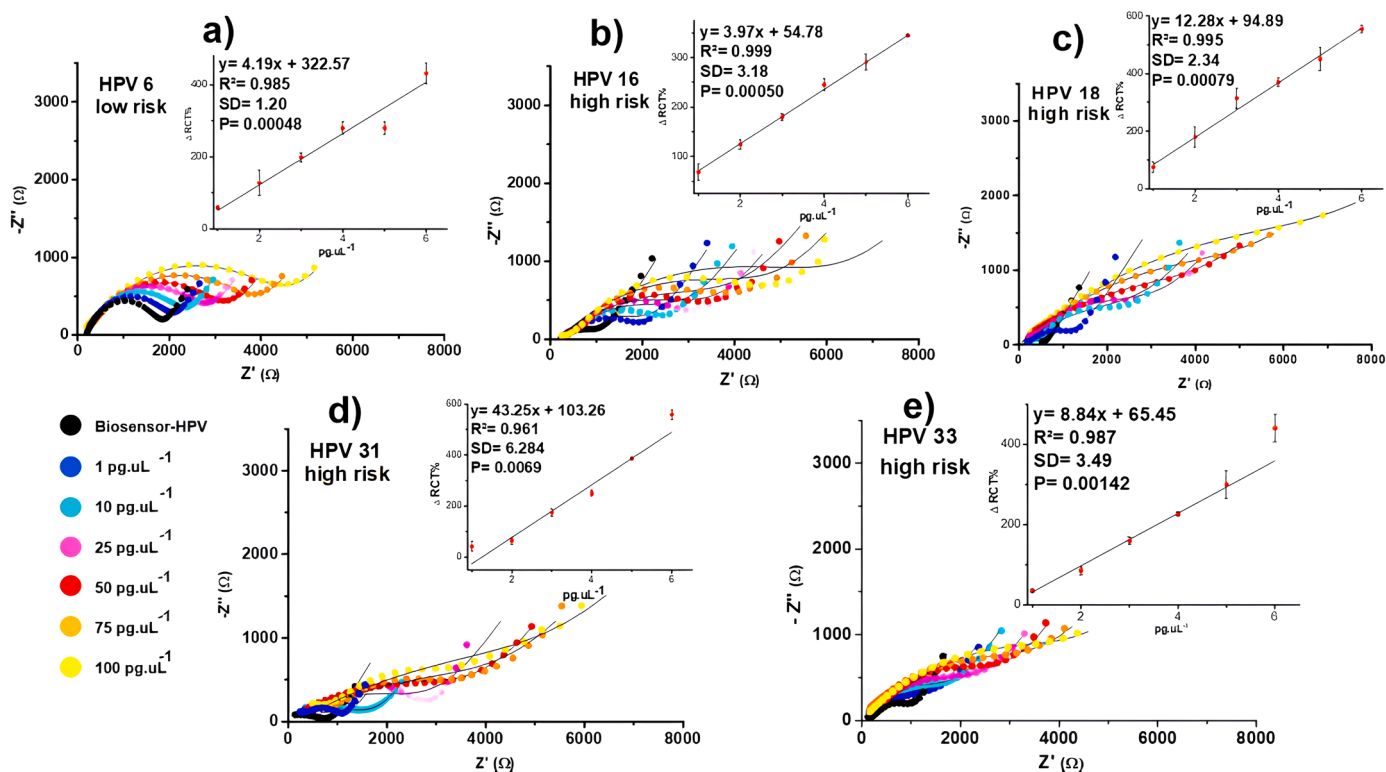


Fig. 3. Nyquist plots of PPy_PAMAM-AuNPs_MY09 biosensor to different concentrations of low-risk HPV 6 (a) and high-risk HPV 16 (b), HPV 18 (c), HPV 31 (d), and HPV 33 (e) genotypes at varying concentrations.

Table 1

Adjusted data of equivalent circuit elements obtained from fitted impedance results for the recombinant plasmid analyses.

	Concentration (pg.μL ⁻¹)	CPE (μF)	R _S (kΩ)	R _{CT} (kΩ)	ΔR _{CT}
HPV 6	1	32.40 ± 4.10	0.51 ± 0.28	2.47 ± 0.02	58.54 ± 3.48
		42.21 ± 4.24	0.51 ± 0.08	3.61 ± 0.55	128.48 ± 34.90
	25	54.95 ± 1.90	0.51 ± 0.35	4.72 ± 0.19	198.73 ± 12.53
		50.75 ± 12.23	0.52 ± 0.28	6.14 ± 0.26	279.74 ± 17.00
	75	61.29 ± 8.90	0.34 ± 0.16	8.40 ± 0.45	431.96 ± 29.08
		57.15 ± 2.05	0.65 ± 0.13	11.50 ± 1.27	627.84 ± 80.55
	10000	57.61 ± 1.41	0.47 ± 0.19	15.60 ± 1.83	5410.43 ± 65.14
		27.62 ± 0.14	0.70 ± 0.08	2.66 ± 0.35	68.35 ± 15.82
	10	30.45 ± 4.87	0.68 ± 0.02	3.55 ± 0.15	124.68 ± 9.84
		35.02 ± 0.70	0.68 ± 0.01	4.43 ± 0.11	180.37 ± 7.16
	50	33.88 ± 8.48	0.61 ± 0.07	5.46 ± 0.19	245.88 ± 12.08
		29.45 ± 2.61	0.71 ± 0.01	6.18 ± 0.25	291.13 ± 16.11
	100	26.95 ± 0.77	0.71 ± 0.03	7.03 ± 0.04	344.93 ± 2.68
		27.19 ± 1.13	0.72 ± 0.02	8.06 ± 0.03	4102.44 ± 23.23
	10000	36.95 ± 35.0	0.57 ± 0.15	2.77 ± 0.41	75.31 ± 18.35
		40.33 ± 53.12	0.70 ± 0.07	4.41 ± 0.55	179.11 ± 34.90
HPV 16	1	9.82 ± 0.39	0.87 ± 0.09	6.54 ± 0.56	313.92 ± 35.80
		24.30 ± 1.83	0.85 ± 0.05	7.43 ± 0.21	370.25 ± 13.42
	25	60.95 ± 24.11	0.92 ± 0.21	8.69 ± 0.62	450.31 ± 39.83
		78.05 ± 2.05	1.10 ± 0.02	10.35 ± 0.21	555.06 ± 13.42
	50	33.55 ± 11.95	0.79 ± 0.14	16.8 ± 0.56	3996.24 ± 137.93
		55.50 ± 15.98	0.32 ± 0.07	1.86 ± 0.01	17.72 ± 0.63
	10	32.05 ± 5.86	0.15 ± 0.10	2.58 ± 0.20	63.60 ± 12.97
		25.13 ± 1.83	0.03 ± 0.07	4.33 ± 0.24	174.05 ± 15.21
	25	34.65 ± 4.31	0.11 ± 0.02	5.53 ± 0.18	250.21 ± 11.63
		50.41 ± 8.76	0.27 ± 0.06	7.68 ± 0.05	386.07 ± 3.58
	75	55.26 ± 5.23	0.35 ± 0.01	10.4 ± 0.28	558.22 ± 17.90
		53.79 ± 7.21	0.45 ± 0.13	11.35 ± 0.49	8015.68 ± 35.02
	10000	48.45 ± 7.56	0.48 ± 0.02	2.13 ± 0.10	35.12 ± 4.74
		51.0 ± 10.04	0.38 ± 0.03	2.93 ± 0.15	85.44 ± 9.84
	25	56.45 ± 0.21	0.25 ± 0.17	4.10 ± 0.14	159.81 ± 9.39
		61.58 ± 4.94	0.16 ± 0.04	5.15 ± 0.09	226.26 ± 5.81
HPV 18	1	58.05 ± 10.39	0.28 ± 0.03	6.31 ± 0.54	299.68 ± 34.46
		62.85 ± 0.63	0.28 ± 0.06	8.54 ± 0.53	440.50 ± 34.01
	100	60.85 ± 1.34	0.30 ± 0.10	9.59 ± 0.85	8946.43 ± 86.65

$$\Delta R_{CT} (\%) = \frac{R_{CT} (\text{viral genome}) - R_{CT} (\text{genosensor})}{R_{CT} (\text{genosensor})} \times 100 \quad (2)$$

R_{CT} (viral genome) is equivalent to the circuit values of the recombinant plasmid samples, whereas R_{CT} (genosensor) is composed of the reading value of the sensor platform. $\Delta R_{CT}\%$ values are shown in Table 1. Calibration curves exhibit a linear correlation with the logarithmic value of the L1 gene concentrations (6, 16, 18, 31, and 33) (Fig. 3a-e). The most conserved portion of the viral genome is represented by the nucleotide sequence of the open reading frame (ORF) of the L1 gene. Table S5 displays the homology of the L1 gene for various HPV genotypes.

The calculations $10\sigma/s$ and $3.3\sigma/s$ were utilized to determine the limits of quantification (LOQ) and detection (LOD), respectively (Table S5). The standard deviation of the intercept is represented by σ , while the slope or degree of curve inclination is represented by s [37]. The developed electrochemical biosensor revealed a LOD of 0.04 pg/mL, demonstrating remarkable sensitivity, significantly surpassing the detection limits reported in other studies, as shown in Table 2, which brings a comparative analysis of previous biosensors. Ultra-low detection capability is critical in applications where trace-level analyte concentrations must be accurately quantified.

The correlation between the $\Delta R_{CT}\%$ response and the virus phylogenetics is shown in Fig. 4a. The IARC states that all papillomaviruses studied in this work are members of the genus alphapapillomavirus, which is a carcinogenic variety. The high-risk HPVs (HPV 16, 31, and 33) are members of the same phylogenetic branch, alpha-9, while HPV 18 is a member of alpha-7, and HPV 6 is a member of alpha-10 [29,30]. As a result, alphapapillomaviruses belonging to the same phylogenetic branch have greater genetic similarity. Thus, HPVs from the same branch exhibit a similar electrochemical response pattern. Another point worth highlighting is the similarity in response between low-risk HPV 6 and high-risk HPV 18, despite belonging to different branches. This occurs due to the pairing strength of the degenerate MY09 probe, according to the complementarity of the analyzed sample. The platform was assembled and stored at 4 °C for stability and regeneration investigations. During a week, the nanostructured platform remained stable. The genosensor was stable for a day following the attachment of the MY09 probe. We regard the electrode as a single-use electrode as it cannot regenerate at the same level of response.

A further parameter to verify the level of biological recognition on the platform is the quantification percentage of the sensor layer coverage (θ), as follow [44]:

$$\theta = 1 - \left(\frac{R_{CT} (\text{genosensor})}{R_{CT} (\text{viral genome})} \right) \quad (3)$$

$R_{CT}(\text{genosensor})$ corresponds to the electron transfer resistance of the PPy PAMAM-AuNPs_MY09 layer, and $R_{CT}(\text{viral genome})$ represents the R_{CT} values after exposure to HPV recombinant plasmids. The biodevice produced a notable response at all sample concentrations (Fig. 4b), where θ values rise proportionately to the plasmid concentration. The sensor reached values of $\theta = 0.83$ (83 %) and $\theta = 0.81$ (81 %) for HPV 6 and 16, respectively, at a concentration of 100 pg.μL⁻¹. Of note, it is widely recognized that HPV 18 carries a significant oncogenic risk and is present in about 70 % of all cervical cancer cases, whereas HPV 6 is shown to be present in 90 % of cases of genital condyloma and laryngeal papilloma. Additionally, the branched structure of PAMAM allowed for widespread immobilization of the MY09 probe, improving the recognition of target oligonucleotides [41,45].

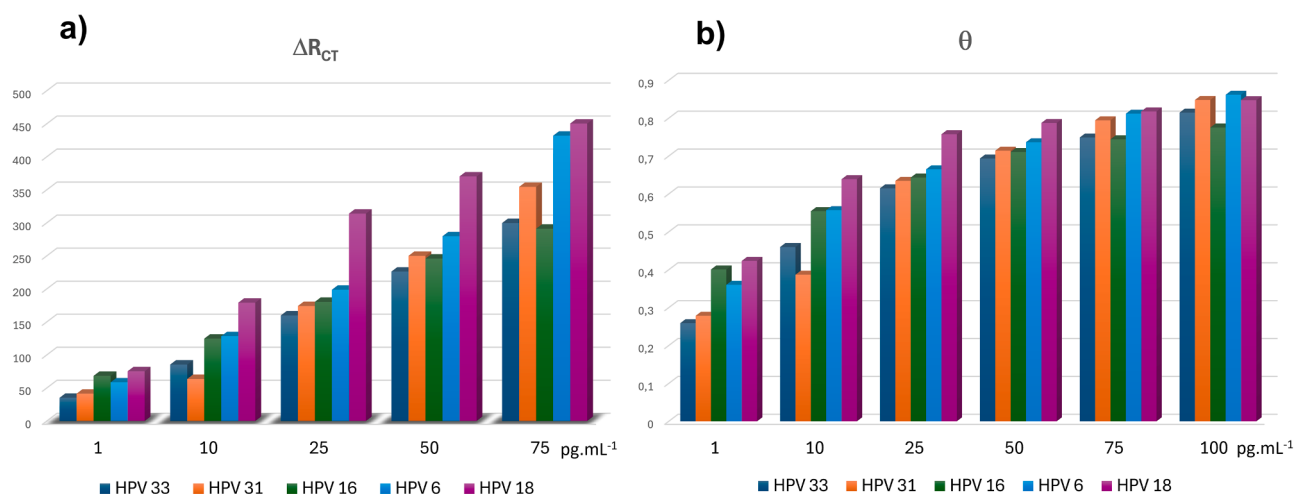
3.5. Selectivity test and evaluation of clinical samples

A three-dimensional plot was obtained using N , CPE, and R_{CT} values (Fig. 5). The n value is a useful tool for characterizing how closely the surface of an electrochemical biosensor platform matches ideal

Table 2

Analytical performance of biosensors for detecting HPV compared to PPy_AuNPs-PAMAM G5_MY09 genosensor.

Platform	Molecular target	Analytical technique	Detection time	Limit of detection	Reference
PPy-AuNPs-Cys-MY11-BSA	HPV6	CV and EIS	15 min	0.37 pg.μL ⁻¹	[8]
Gold electrode – AuNP/PANI – sonda	HPV16 HPV18 HPV45 HPV53 HPV54 HPV58	CV and EIS	15 min	2.74 pg.μL ⁻¹	[17]
ITO surface/PPy/AuNP/Cys/ ProbeBSH16/BSA	HPV16 HPV31 HPV33 HPV35 HPV52 HPV58	CV and EIS	15 min	57.14 fM	[27]
Au/Cu-PTCA/rGO/PDPA	HPV16	SWV	1 a 20 min	2.15 fM	[31]
Fe 3 O 4 -AuNPs-SPCE	HPV16	DPV	30 min	0.1 nM	[38]
rGO-MWCNT / AuNPs-L-cisteína-ssDNA	HPV18	DPV	15 min	0.05 fM	[39]
PAA-PSS-Avidin-DNA RP-biotina	HPV16	DPV	30 min	22 fM	[40]
	HPV18			20 fM	
MWCNT/NH 2 -IL-rGO-ssDNA	HPV16	DPV	-	1.3 nM	[33]
Micro-gapped IDE Genosensor (micro-IDE)	HPV18	VC	30 min	0.529 aM	[41]
Gold surface-GNRsTh-probe	HPV16 HPV18	CV and EIS	30 min	3.5 amol L ⁻¹ 1.2 amol L ⁻¹	[9]
Au/APTES/CP/TD/AP1/AP2	HPV16	DPV	2 h	5475 × 10 ⁻¹⁶ mol/L	[42]
GONRs/Ag@AuNPs	HPV16	CV e EIS	-	100 aM	[43]
PPy-AuNPs-PAMAM G5-Probe _{MY09} -BSA	HPV6 HPV58 HPV31 HPV33 HPV16 HPV18	CV and EIS	5 min	0.04 pg. μL ⁻¹	This work

**Fig. 4.** ΔR_{CT} (a) and surface coverage (b) of the PPy_PAMAM-AuNPs_MY09 biosensor as a function of the concentration of HPV plasmid samples.

capacitive behavior. If the n value is smaller, it could suggest that the biosensor surface is rough or porous, which could be caused by nanomaterials or immobilized biomolecules. A smoother and more uniform surface would be indicated by a higher n number closer to 1 [46]. Negative samples comprising the genomes of *Candida albicans*, acute lymphoblastic leukemia with a 9:22 gene translocation, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were subjected to the genosensor. TNF- α is a biomarker that is crucial in mediating the inflammatory response [47]. It was utilized as a negative control sample since it was found to be significantly elevated in HPV cases, particularly in malignancies like cervical cancer [40,41,43]. Following the bioactivity test, we obtained minimal changes in the ΔR_{CT} values (TNF- α ΔR_{CT} = 9.81 %, leukemia ΔR_{CT} = 2.53 %, and *Candida albicans* ΔR_{CT} = 6.01 %) (Table S2). When compared to the HPV clinical sample, these analytical results were insignificant. Non-specific adsorption is the cause of the small variations in interfacial resistance that have been noticed. Thus, the biodevice exhibits analytical reliability and specificity for identifying the target analyte in complex biological samples.

The analysis of the genosensor performance in identifying clinical

samples was also performed. The interaction of the platform with cervical cell samples (cDNA) from female patients infected with HPV 6, 18, and 31 (1–75 pg.μL⁻¹) was evaluated using CV and EIS. The clinical samples exhibited decreased oxidation/reduction currents in voltammetry (Fig. S5 a-c) and increased semicircle diameter in impedance (Fig. S4 a-c). These reactions are associated with the MY09 probe and cDNA samples, which form a hybrid DNA complex [37,42].

ΔR_{CT} (%) was used to investigate the biodetection of the genosensor in clinical samples (Table S2). The calibration curves exhibited a linear correlation with the logarithmic values of the cDNA concentrations (HPV 6, 18, and 31).

It was possible to confirm the formation of a hybrid DNA complex between the MY09 probe and cDNA samples, attesting to the sensor's functionality. The analyzed cDNA samples are classified into low-risk (cDNA 6) and high-risk groups (cDNA 18 and 31), belonging to distinct phylogenetic branches, alpha-10, alpha-7, and alpha-9. As expected, due to belonging to different evolutionary branches, they exhibited a notable difference in response patterns. Allowing for the distinction between low-risk and high-risk HPV.

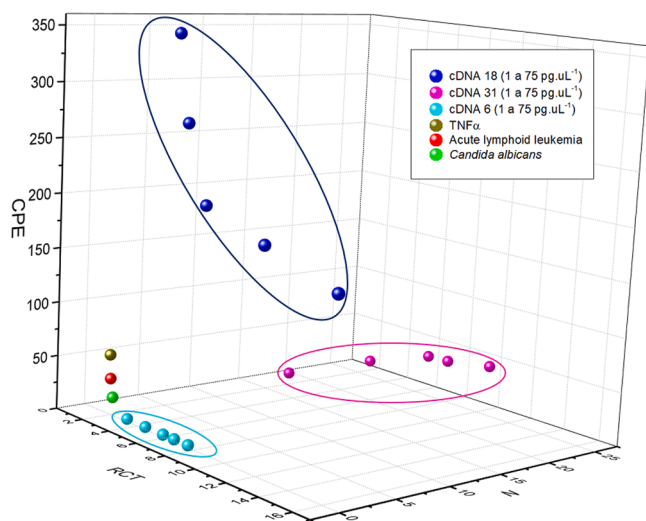


Fig. 5. A three-dimensional plot was derived from the theoretical modeling of the Nyquist spectra for the R_{CT} , CPE, and n variables.

4. Conclusion

In the present study, a label-free biosensor platform for the specific detection of the HPV L1 gene in clinical samples was developed. An improved electrochemical interface for the examination of recombinant plasmids and cDNA from HPV-infected patients was demonstrated by the nanostructured system composed of an electropolymerized layer of conductive polymer, dendrimer-functionalized gold nanoparticles, and aminated MY09 degenerated probe. Topographic examination demonstrated successful immobilization of the probe and its ability to identify HPV oligonucleotide sequences. The Ppy_PAMAM-AuNPs_MY09 platform was evaluated against prominent HPV genotypes (HPV 6, 16, 18, 31, and 33) using a calibration curve ranging from 1 to 100 $\text{pg.}\mu\text{L}^{-1}$. The sensor demonstrated a noteworthy analytical performance with limits of detection ranging from 0.04 to 1.38 $\text{pg.}\mu\text{L}^{-1}$ and limits of quantification from 0.12 to 4.18 $\text{pg.}\mu\text{L}^{-1}$ with good selectivity among negative samples. The sensor also revealed superior electrochemical screening of cDNA extracted from cervical cell samples, showing the platform's ability to distinguish high-risk HPV. The analysis time of 5 minutes is a distinguishing feature compared to other biosensors. The developed genosensor can be useful for clinical screening and HPV genotype distinction, helping with the prognosis of several virus-related cancers.

CRediT authorship contribution statement

Heloisa Barros Dantas: Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Alberto Galdino Silva-Junior:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Resources, Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization. **Abdelhamid Errachid:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis. **Maria Danielly Lima de Oliveira:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Resources, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization. **Cesar Augusto Souza Andrade:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Declaration of Competing Interest

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

Acknowledgments

The authors are grateful for the support from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grant number 304678/2021–0 and 304680/2021–4), Foundation for the Support of Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) (grant numbers APQ-0425–2.01/22 and APQ-0384–2.01/19) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) (grant number 88881.878936/2023–01 – CAPES/COFECUB).

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.bej.2024.109551](https://doi.org/10.1016/j.bej.2024.109551).

Data availability

Data will be made available on request.

References

- [1] S.K. Katirachi, M.P. Grønlund, K.K. Jakobsen, C. Grønhoj, C. von Buchwald, The Prevalence of HPV in oral cavity squamous cell carcinoma, *Viruses* 15 (2023), <https://doi.org/10.3390/v15020451>.
- [2] F.M. Corrêa, A. Migowski, L.M. de Almeida, M.A. Soares, Cervical cancer screening, treatment and prophylaxis in Brazil: Current and future perspectives for cervical cancer elimination, *Front. Med.* 9 (2022), <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.945621>.
- [3] D. Bhat, The “why and how” of cervical cancers and genital hpv infection, *CytoJournal* 19 (2022) 22, <https://doi.org/10.25259/CMAS.03.03.2021>.
- [4] N. Bhatla, S. Singhal, Primary HPV screening for cervical cancer, *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 65 (2020) 98–108, <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2020.02.008>.
- [5] A. Herzum, G. Ciccarese, C. Occella, L. Gariazzo, C. Pastorino, I. Trave, G. Viggizzo, Treatment of pediatric anogenital warts in the era of hpv-vaccine: a literature review, *J. Clin. Med.* 12 (2023), <https://doi.org/10.3390/jcm12134230>.
- [6] C.D. Hernández-Silva, A. Ramírez de Arellano, A.L. Pereira-Suárez, I.G. Ramírez-López, HPV and cervical cancer: molecular and immunological aspects, epidemiology and effect of vaccination in latin american women, *Viruses* 16 (2024), <https://doi.org/10.3390/v16030327>.
- [7] V. Naresh, N. Lee, A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors, *Sens. (Switz.)* 21 (2021) 1–35, <https://doi.org/10.3390/s21041109>.
- [8] K.Y.P.S. Avelino, L.S. Oliveira, H.P. de Oliveira, N. Lucena-Silva, C.A.S. Andrade, M.D.L. Oliveira, Impedimetric sensing platform for human papillomavirus and p53 tumor suppressor gene in cervical samples, *J. Sci.: Adv. Mater. Devices* 7 (2022), <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2021.100411>.
- [9] R.P. Lucena, I.A. Frías, N. Lucena-Silva, C.A. Andrade, M.D. Oliveira, Impedimetric genosensor based on graphene nanoribbons for detection and identification of oncogenic types of human papillomavirus, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 96 (2021) 1496–1503, <https://doi.org/10.1002/jctb.6726>.
- [10] L. Hao, C. Dong, L. Zhang, K. Zhu, D. Yu, Polypyrrole nanomaterials: structure, preparation and application, *Polymers* 14 (2022), <https://doi.org/10.3390/polym14235139>.
- [11] C. Modi, V. Prajapati, N. Udhwani, K. Parekh, H. Chadha, Dendrimer-based nanomaterials for biosensors, *Biosens. Nanotechnol.* (2023) 61–83, <https://doi.org/10.1002/9781394167135.ch3>.
- [12] Y. Zhou, H. Lü, D. Zhang, K. Xu, N. Hui, J. Wang, Electrochemical biosensors based on conducting polymer composite and PAMAM dendrimer for the ultrasensitive detection of acetamiprid in vegetables, *Microchem. J.* 185 (2023) 108284, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108284>.
- [13] A. Jafari-Kashi, H.-A. Rafiee-Pour, M. Shabani-Nooshabadi, A new strategy to design label-free electrochemical biosensor for ultrasensitive diagnosis of CYFRA 21–1 as a biomarker for detection of non-small cell lung cancer, *Chemosphere* 301 (2022) 134636, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134636>.
- [14] L. Nuić, B. Panić, L.-K. Pereković, I. Šrut Rakić, M. Kralj, A. Mihanović, H. Vancik, I. Biljan, Polymerization of aromatic dinitroso derivatives initiated by nitroso-terminated monolayer on Au(111) surface: Insights from ellipsometry, AFM and nano-FTIR spectroscopy, *Polymer* 271 (2023) 125795, <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2023.125795>.

- [15] L.D. Chakkarapani, S. Arumugam, M. Brandl, Simultaneous electrochemical detection of L-dopa and hydrogen peroxide by poly (amido amine) dendrimer/poly (neutral red) modified sensor, *J. Food Compos. Anal.* 126 (2024) 105847, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105847>.
- [16] J. Satija, B. Karunakaran, S. Mukherji, A dendrimer matrix for performance enhancement of evanescent wave absorption-based fiber-optic biosensors, *RSC Adv.* 4 (2014) 15841, <https://doi.org/10.1039/C4RA00198B>.
- [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) 113249, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113249>.
- [18] S. Lin, C.-H. Hong, B.-C. Sheu, L.-X. Wu, W.-C. Huang, W.-C. Huang, C.-Y. Guo, Dynamic response of HPV16/anti-HPV16 pairs with unbinding events studied by atomic force microscopy, *Biochem. Biophys. Rep.* 6 (2016) 203–208, <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.04.008>.
- [19] Y. Fu, A. Manthiram, Core-shell structured sulfur-polypyrrole composite cathodes for lithium-sulfur batteries, *RSC Adv.* 2 (2012) 5927, <https://doi.org/10.1039/c2ra20393f>.
- [20] A. Pasha, S. Khasim, A.A.A. Darwish, T.A. Hamdalla, S.A. Al-Ghamdi, High Performance Organic Coatings of Polypyrrole Embedded with Manganese Iron Oxide Nanoparticles for Corrosion Protection of Conductive Copper Surface, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* 32 (2022) 499–512, <https://doi.org/10.1007/s10904-021-02130-x>.
- [21] R. Turczyn, K. Krukiewicz, A. Katunin, J. Sroka, P. Sul, Fabrication and application of electrically conducting composites for electromagnetic interference shielding of remotely piloted aircraft systems, *Compos. Struct.* 232 (2020) 111498, <https://doi.org/10.1016/j.compstruct.2019.111498>.
- [22] A.G. da Silva Junior, I.A.M. Frias, R.G. Lima-Neto, S.R. Sá, M.D.L. Oliveira, C.A. S. Andrade, Concanavalin A Differentiates Gram-Positive Bacteria Through Hierarchized Nanostructured Transducer, *Microbiol. Res.* 251 (2021) 126834, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126834>.
- [23] Z. Chen, M. Schiffman, R. Herrero, R. DeSalle, K. Anastos, M. Segondy, V. V. Sahasrabudhe, P.E. Gravitt, A.W. Hsing, P.K.S. Chan, R.D. Burk, 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* 516 (2018) 86–101, <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.01.002>.
- [24] S. Shamaia, N. Zafar, S. Riaz, R. Sharif, J. Nazir, S. Naseem, Gold Nanoparticles: An Efficient Antimicrobial Agent against Enteric Bacterial Human Pathogen, *Nanomaterials* 6 (2016) 71, <https://doi.org/10.3390/nano6040071>.
- [25] H. Jin, R. Gui, X. Gao, Y. Sun, An amplified label-free electrochemical aptasensor of γ -interferon based on target-induced DNA strand transform of hairpin-to-linear conformation enabling simultaneous capture of redox probe and target, *Biosens. Bioelectron.* 145 (2019) 111732, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111732>.
- [26] R. Jain, N. Jadon, A. Pawaiya, Polypyrrole based next generation electrochemical sensors and biosensors: A review, *TrAC Trends Anal. Chem.* 97 (2017) 363–373, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.009>.
- [27] K.Y.P.S. Avelino, L.S. Oliveira, N. Lucena-Silva, C.A.S. Andrade, M.D.L. Oliveira, Flexible sensor based on conducting polymer and gold nanoparticles for electrochemical screening of HPV families in cervical specimens, *Talanta* 226 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122118>.
- [28] E.B. Bahadır, M.K. Sezgintürk, Poly(amidoamine) (PAMAM): An emerging material for electrochemical bio(sensing) applications, *Talanta* 148 (2016) 427–438, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.022>.
- [29] P.F. Cosper, S. Bradley, Q. Luo, R.J. Kimple, Biology of HPV Mediated Carcinogenesis and Tumor Progression, *Semin. Radiat. Oncol.* 31 (2021) 265–273, <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2021.02.006>.
- [30] F. Deutsch, I. Regina Bullen, K. Nguyen, N.-H. Tran, M. Elliott, N. Tran, Current state of play for HPV-positive oropharyngeal cancers, *Cancer Treat. Rev.* 110 (2022) 102439, <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2022.102439>.
- [31] R. Rawat, S. Singh, S. Roy, A. Kumar, T. Goswami, A. Mathur, Design and development of an electroanalytical genosensor based on Cu-PTCA/rGO nanocomposites for the detection of cervical cancer, *Mater. Chem. Phys.* 295 (2023) 127050, <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2022.127050>.
- [32] A.G. da Silva-Junio, I.A.M. Frias, R.G. Lima-Neto, L. Migliolo, P.S. e Silva, M.D. L. Oliveira, C.A.S. Andrade, Electrochemical Biosensor Based on Temporin-Pta Peptide for Detection of Microorganisms, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2022) 114788, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114788>.
- [33] L. Farzin, S. Sadjadi, M. Shamsipur, S. Sheibani, Electrochemical genosensor based on carbon nanotube/amine-ionic liquid functionalized reduced graphene oxide nanoplatfor 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>.
- [34] P. Córdoba-Torres, T.J. Mesquita, R.P. Nogueira, Relationship between the Origin of Constant-Phase Element Behavior in Electrochemical Impedance Spectroscopy and Electrode Surface Structure, *J. Phys. Chem. C* 119 (2015) 4136–4147, <https://doi.org/10.1021/jp512063f>.
- [35] R. Saxena, S. Srivastava, An insight into impedimetric immunosensor and its electrical equivalent circuit, *Sens. Actuators B: Chem.* 297 (2019) 126780, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126780>.
- [36] E.M.N. Do Egito, A.G. Silva-Júnior, R.P.S. Lucena, M.D.L. Oliveira, C.A.S. Andrade, Electrochemical platform for anti-cardiolipin antibody detection in human syphilis serum, *Curr. Res. Biotechnol.* 4 (2022) 58–65, <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.01.001>.
- [37] H.R. Thapa, E.R. Unger, T.D. Querec, A human papillomavirus whole genome plasmid repository: A resource for HPV DNA quality control reagents, *J. Clin. Virol.* 166 (2023) 105548, <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2023.105548>.
- [38] E. Rasouli, W.J. Basirun, M.R. Johan, M. Rezayi, M.R. Mahmoudian, D.P. Poenar, Electrochemical DNA-nano biosensor for the detection of cervical cancer-causing HPV-16 using ultrasmall Fe₃O₄-Au core-shell nanoparticles, *Sens. Bio-Sens. Res.* 40 (2023) 100562, <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2023.100562>.
- [39] P. Mahmoodi, M. Rezayi, E. Rasouli, A. Avan, M. Gholami, M. Ghayour Mobarhan, E. Karimi, Y. Alias, Early-stage cervical cancer diagnosis based on an ultra-sensitive electrochemical DNA nanobiosensor for HPV-18 detection in real samples, *J. Nanobiotechnology* 18 (2020) 11, <https://doi.org/10.1186/s12951-020-0577-9>.
- [40] T. Chaibun, P. Thanasapburachot, P. Chatchawal, L. Su Yin, S. Jiaranuchart, P. Jearanaikoon, C. Promptmas, W. Buajeeb, B. Lertanantawong, A Multianalyte Electrochemical Genosensor for the Detection of High-Risk HPV Genotypes in Oral and Cervical Cancers, *Biosensors* 12 (2022) 290, <https://doi.org/10.3390/bios12050290>.
- [41] F.N. Jaapar, N.A. Parmin, N.H.A. Halim, U. Hashim, S.C.B. Gopinath, F.S. Halim, M.N.A. Uda, A. Afzan, N.M. Nor, K.A. Razak, Micro-interdigitated electrodes genosensor based on Au-deposited nanoparticles for early detection of cervical cancer, *Int. J. Biol. Macromol.* 253 (2023) 126745, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126745>.
- [42] Y. Yang, Y. Qing, X. Hao, C. Fang, P. Ouyang, H. Li, Z. Wang, Y. Liao, H. Fang, J. Du, APTES-Modified Remote Self-Assembled DNA-Based Electrochemical Biosensor for Human Papillomavirus DNA Detection, *Biosensors* 12 (2022) 449, <https://doi.org/10.3390/bios12070449>.
- [43] S. Pareek, U. Jain, M. Bharadwaj, K. Saxena, S. Roy, N. Chauhan, An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor for monitoring Human papillomavirus-16 (HPV-16) using graphene oxide/Ag/Au nano-biohybrids, *Anal. Biochem.* 663 (2023) 115015, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.115015>.
- [44] C.A.S. Andrade, J.M. Nascimento, I.S. Oliveira, C.V.J. de Oliveira, C.P. de Melo, O. L. Franco, M.D.L. Oliveira, Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavanin A for bacterial detection, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 135 (2015) 833–839, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.037>.
- [45] S. Thakare, A. Shaikh, D. Bodas, V. Gajbhiye, Application of dendrimer-based nanosensors in immunodiagnosis, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 209 (2022) 112174, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112174>.
- [46] A.C. Lanzas, M.I. Prodromidis, Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial, *ACS Meas. Sci. Au* 3 (2023) 162–193, <https://doi.org/10.1021/acsmesuresci.2c00070>.
- [47] M. Tampa, C.I. Mitran, M.I. Mitran, I. Nicolae, A. Dumitru, C. Matei, L. Manolescu, G.L. Popa, C. Caruntu, S.R. Georgescu, The Role of Beta HPV Types and HPV-Associated Inflammatory Processes in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma, *J. Immunol. Res.* 2020 (2020) 5701639, <https://doi.org/10.1155/2020/5701639>.

**GENOSENSOR BASED ON POLYPYRROLE AND DENDRIMER-COATED
GOLD NANOPARTICLES FOR HUMAN PAPILLOMAVIRUS DETECTION**

Heloisa B. Dantas ^{a,b}, Alberto G. Silva-Junior ^{a,b}, Norma L. C. L. Silva^c,
Abdelhamid Errachid^d, Maria D.L. Oliveira ^{a,b}, Cesar A. S. Andrade ^{a,b,*}

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

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

^c Departamento de Virologia-Instituto Aggeu Magalhaes-Fiocruz, 50670-420 Recife, PE, Brazil.

^d Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques (ISA), 5 rue de la Doua,
69100, Lyon, Villeurbanne, France

*To whom correspondence should be addressed.

Cesar A.S. Andrade, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

Phone: +55-81-2126.8450

E-mail: csrandrade@gmail.com

Figure captions

Fig. S1. (a) ATR-FTIR of the gold electrode after pyrrole polymerization and functionalization and UV-vis analysis (b) of AuNPs before and after PAMAM coverage.

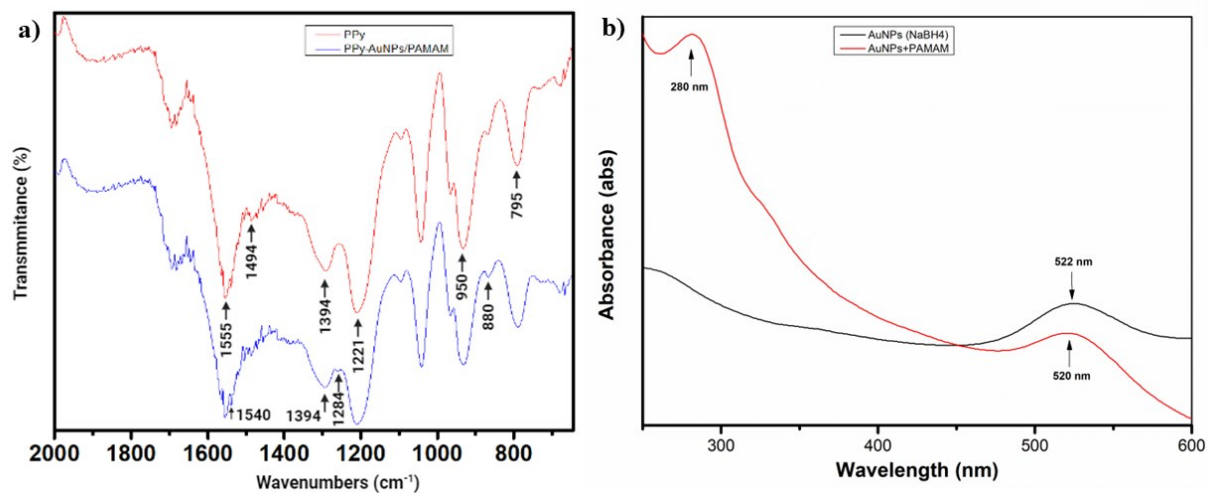


Fig. S2. Cyclic voltammograms (a) and impedance spectra (b) for each step of assembly of the biosensor. Inset: Randle's equivalent circuit is used to fit the impedance measurements.

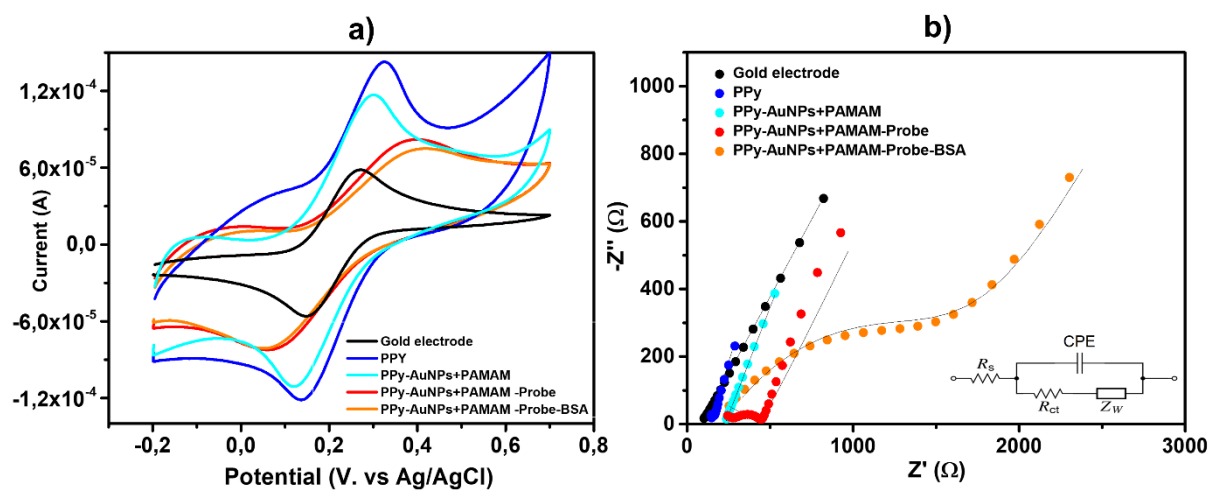


Fig. S3. Cyclic voltammograms of the PPy_AuNPs-PAMAM G5_MY09 biosensor to different concentrations of high-risk HPV 33 (a), 16 (b), 18 (c), 31 (d) and low-risk HPV 6 (e) genotypes at varying concentrations.

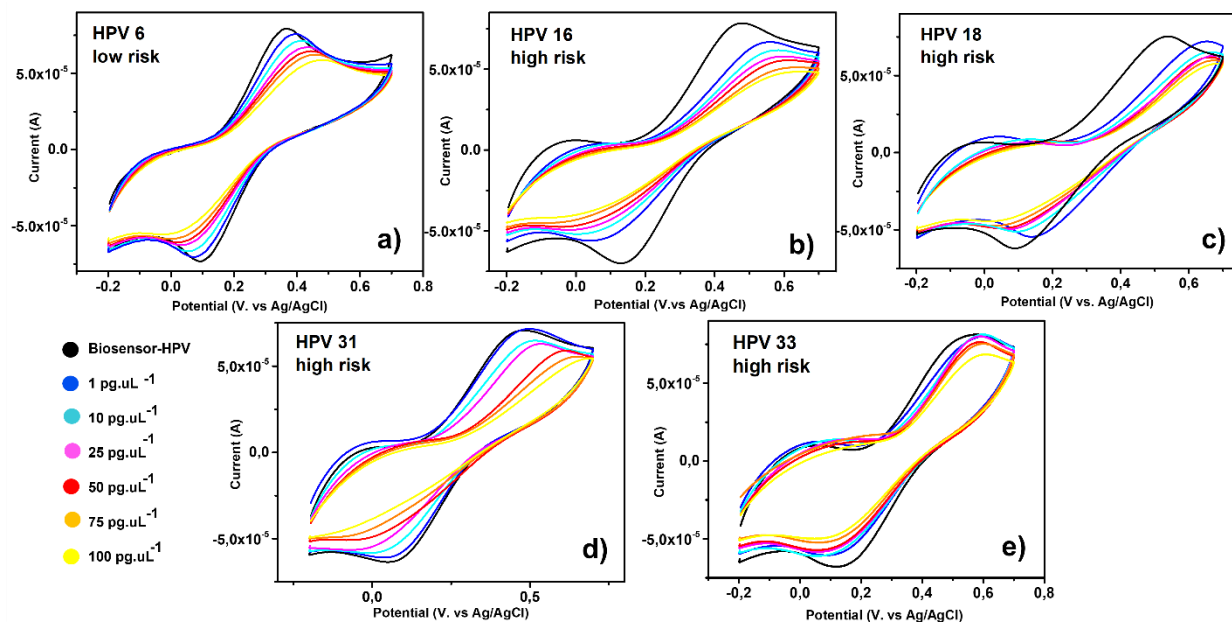


Fig. S4. Impedance plots for cDNA samples from patients infected with HPV 18 (a), 31 (b) and 6 (c).

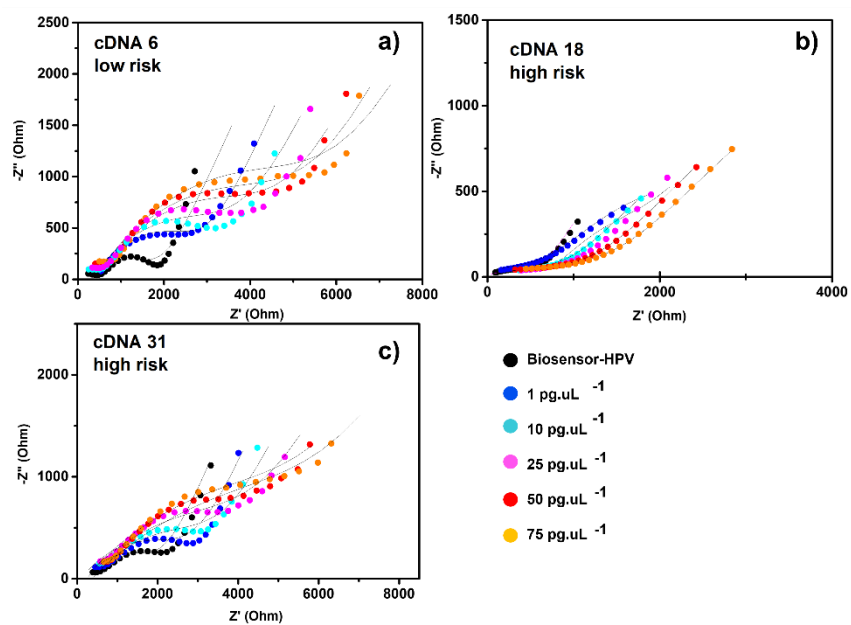


Fig. S5. Cyclic voltammograms for cDNA samples from patients infected with HPV 18 (a), 31 (b), and 6 (c).

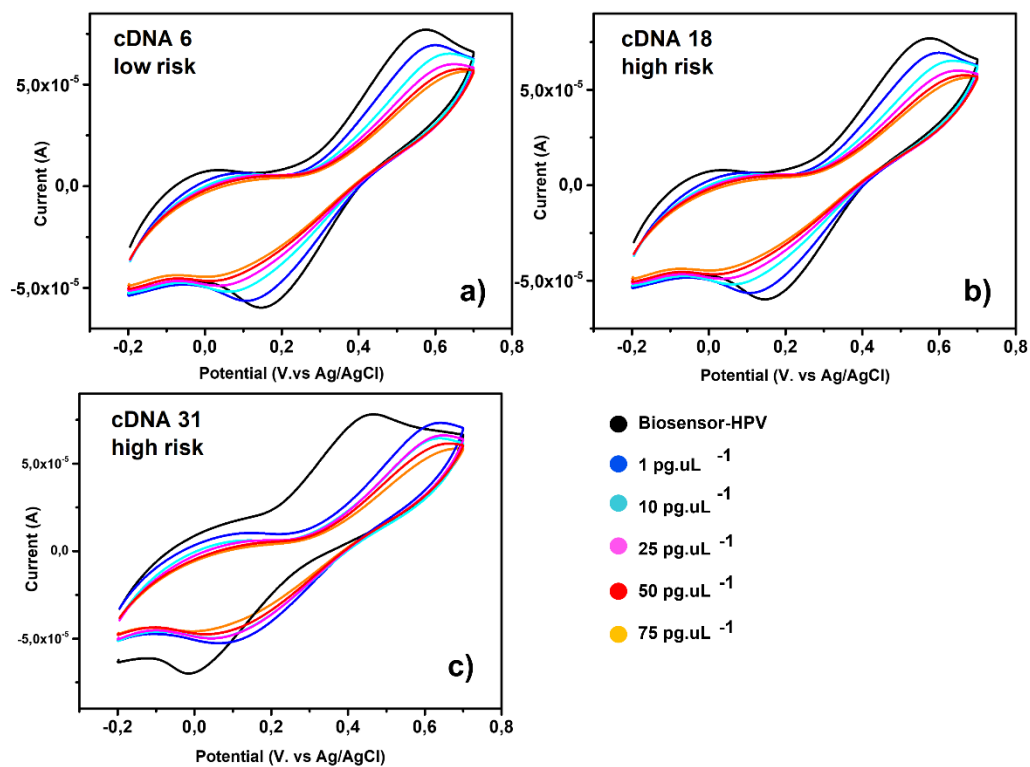


Table S1. Equivalent circuit element data for the PPy_AuNPs-PAMAM G5_MY09 genosensor platform impedance results.

Modified electrode	R_{CT} (k Ω)	CPE (μ Mho)	N	Z_w (μ Mho)	ΔR_{CT}
Bare gold electrode	0.08 ± 0.004	28.33 ± 7.50	0.45 ± 0.01	299 ± 6.92	299 ± 6.92
PPy	0.07 ± 0.02	0.71 ± 0.32	1.05 ± 0.07	2090 ± 242.48	2090 ± 242.48
PPy-AuNPs-PAMAM G5	0.15 ± 0.02	683.33 ± 80.82	0.60 ± 0.02	317 ± 51.96	317 ± 51.96
PPy-AuNPs- PAMAM G5-MY09	0.69 ± 0.04	10.34 ± 6.61	0.35 ± 0.04	1623.33 ± 66.58	1623.33 ± 66.58
PPy-AuNPs- PAMAM G5-MY09.BSA	1.58 ± 0.17	4.88 ± 1.59	0.46 ± 0.14	1440 ± 217.94	1440 ± 217.94

Table S2. Adjusted data of equivalent circuit elements obtained from fitted impedance results for the cDNA samples from patients infected with HPV 6, 18, and 31 and negative control.

cDNA samples	Concentration (pg.μL ⁻¹)	CPE (μF)	R _s (kΩ)	R _{CT} (kΩ)	n	ΔR _{CT}
HPV 6	1	21.35 ± 1.20	0.56 ± 0.02	3.37 ± 0.33	0.42 ± 0.03	113.60 ± 14.87
	10	26.65 ± 9.54	0.49 ± 0.11	4.32 ± 0.36	0.38 ± 0.05	173.73 ± 22.82
	25	36.17 ± 9.19	0.46 ± 0.09	6.34 ± 0.53	0.37 ± 0.02	301.26 ± 34.02
	50	41.03 ± 6.50	0.48 ± 0.07	8.11 ± 0.13	0.38 ± 0.04	413.60 ± 08.50
	75	45.45 ± 4.54	0.39 ± 0.05	10.35 ± 0.21	0.38 ± 0.02	555.06 ± 13.42
HPV 18	1	353 ± 1.41	0.59 ± 0.01	5.92 ± 0.07	0.32 ± 0.06	275.11 ± 3.48
	10	279 ± 9.89	0.51 ± 0.06	6.75 ± 0.29	0.19 ± 0.09	327.53 ± 18.34
	25	213 ± 8.48	0.61 ± 0.05	8.06 ± 0.09	0.23 ± 0.05	410.12 ± 6.26
	50	193 ± 0.74	0.70 ± 0.03	11.8 ± 0.11	0.24 ± 0.05	646.83 ± 11.41
	75	171 ± 11.31	0.77 ± 2.75	16.15 ± 2.75	0.25 ± 0.03	922.15 ± 17.53
HPV 31	1	32.4 ± 4.10	0.51 ± 0.28	2.47 ± 0.02	0.37 ± 0.03	58.54 ± 3.48
	10	42.2 ± 4.24	0.51 ± 0.08	3.61 ± 0.55	0.34 ± 0.05	128.48 ± 34.90
	25	54.95 ± 1.90	0.51 ± 0.35	4.72 ± 0.19	0.31 ± 0.02	198.73 ± 12.53
	50	50.75 ± 12.23	0.52 ± 0.28	6.14 ± 0.26	0.30 ± 0.03	279.74 ± 17.00
	75	61.12 ± 8.90	0.34 ± 0.16	8.40 ± 0.45	0.28 ± 0.04	431.96 ± 29.08
Selectivity assays						
Acute lymphoid leukemia	-	31.5 ± 9.19	1.02 ± 0.04	1.62 ± 0.01	0.44 ± 0.02	2.53 ± 0.38
<i>C. albicans</i>	-	54.31 ± 20.15	0.11 ± 0.05	1.67 ± 0.12	0.45 ± 0.09	6.01 ± 5.37
TNF-α	-	14.3 ± 0.70	0.71 ± 0.02	1.73 ± 0.03	0.44 ± 0.07	9.81 ± 0.31

Table S3. Amperometric anodic shift for the assembling process of the Ppy_AuNPs-PAMAM G5_MY09 genosensor platform.

Electrode modification	I _{PA} before hybridization (μA)
PPy	55.73 ± 0.40
Ppy-AuNPs-PAMAM G5	83.79 ± 1.92
Ppy-AuNPs-PAMAM G5-MY09	41.09 ± 5.36
Ppy-AuNPs-PAMAM G5-MY09-BSA	46.89 ± 7.51

Tabela. S4. Amperometric anodic shift for assembling the Ppy_AuNPs-PAMAM G5_MY09 genosensor platform after exposure to recombinant plasmids and cDNA samples from infected patients.

	Analyte concentration (pg.µL ⁻¹)	I _{PA} (µA)	ΔI (%)
Low-risk oncogenic HPV (plasmid samples)			
Biosensor-HPV6	1	45.95 ± 0.14	2.04 ± 0.31
	10	41.30 ± 1.02	13.53 ± 2.73
	25	35.8 ± 1.93	30.97 ± 6.56
	50	34.98 ± 1.11	34.09 ± 4.25
	75	28.7 ± 2.94	63.37 ± 14.65
	100	28.2 ± 1.06	66.27 ± 5.93
	10000	23.44 ± 3.13	100.04 ± 22.56
High-risk oncogenic HPV (plasmid samples)			
Biosensor- HPV16	1	24.67 ± 0.32	90.08 ± 2.50
	10	20.15 ± 0.35	132.74 ± 4.08
	25	17.1 ± 0.28	174.24 ± 4.53
	50	15.15 ± 1.06	210.26 ± 21.72
	75	11.9 ± 0.14	294.22 ± 4.68
	100	10.6 ± 0.14	342.39 ± 5.90
	10000	0.87 ± 0.02	525.03 ± 43.30
Biosensor- HPV18	1	12.35 ± 2.17	285.67 ± 68.01
	10	9.11 ± 2.15	429.24 ± 125.22
	25	8.03 ± 0.01	483.93 ± 1.02
	50	8.39 ± 0.37	459.10 ± 24.95
	75	7.75 ± 1.00	510.15 ± 79.05
	100	6.06 ± 0.63	678.05 ± 81.70
	10000	2.85 ± 0.13	1544.20 ± 77.37
Biosensor-HPV33	1	24.34 ± 0.36	92.66 ± 2.91
	10	23.32 ± 1.85	101.70 ± 16.02
	25	24.94 ± 1.08	88.15 ± 8.16
	50	22.09 ± 0.74	112.33 ± 7.13
	75	20.66 ± 0.74	127.10 ± 8.23
	100	19.31 ± 0.09	142.76 ± 1.15
	10000	15.58 ± 2.45	204.64 ± 47.96
Biosensor-HPV31	1	31.95 ± 0.55	46.78 ± 2.53
	10	28.11 ± 1.36	66.97 ± 8.10
	25	24.94 ± 1.08	88.15 ± 8.16
	50	15.51 ± 0.24	202.26 ± 4.82

	75	10.21 ± 0.29	359.45 ± 13.36
	100	4.71 ± 0.06	894.57 ± 13.42
	10000	1.62 ± 0.16	2810.41 ± 304.88
Assays with cervical specimens (cDNA samples)			
HPV31	1	1.96 ± 0.02	196.40 ± 2.64
	10	2.35 ± 0.01	235.16 ± 1.01
	25	2.63 ± 0.09	263.34 ± 9.95
	50	3.55 ± 0.05	355.71 ± 5.01
	75	5.60 ± 0.30	560.18 ± 30.18
HPV18	1	0.30 ± 0.09	30.86 ± 9.73
	10	1.05 ± 0.11	105.67 ± 11.65
	25	2.85 ± 0.18	285.26 ± 18.55
	50	4.71 ± 0.24	471.66 ± 24.61
	75	5.78 ± 0.13	578.21 ± 13.17
HPV6	1	1.26 ± 0.01	126.57 ± 1.00
	10	2.40 ± 0.32	240.33 ± 32.34
	25	3.21 ± 0.40	321.35 ± 40.50
	50	4.04 ± 0.26	404.61 ± 26.45
	75	6.02 ± 0.72	602.55 ± 72.55

Table S5. Sequences of nitrogenous bases of the L1 gene for different HPV genotypes.

Family	Type of HPV	Access number
F16	HPV 16	FJ006723.1
	HPV 31	HQ537668.1
	HPV 33	HQ537694.1
F18	HPV 18	GQ180791.1
F6	HPV 6	AF092932.1